

## 山梨酸钾的毒理学评价

曾 婷, 谢逸欣, 马 丽

(广州军区疾病预防控制中心, 广东 广州 510507)

**【摘要】** 目的 研究山梨酸钾的毒性, 评价其安全性。方法 按照GB15193.1-21《食品安全性毒理学评价程序》的方法对山梨酸钾的毒性级别、遗传毒性等进行安全性评价。结果 山梨酸钾对小鼠急性毒性实验 $LD_{50}=1\ 300\ \text{mg/kg}$ , 属低毒级; 通过骨髓细胞微核试验、小鼠精子畸形试验、传统致畸试验, 发现山梨酸钾无遗传毒性; 30 d 喂养试验对动物体重、血液常规及血清ALT、BUN、GLU、TC、TG均未有明显毒性作用( $P>0.05$ )。结论 山梨酸钾是一种安全、相对无毒的食品添加剂, 可用于各类食品及饮料中。

**【关键词】** 山梨酸钾; 小鼠; 毒理学; 安全性; 评价

**【中图分类号】** R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2012)19-019-03

**Study on the toxicity of potassium sorbate.** ZENG Ting, XIE Yi-xin, MA LI. Center of Disease Control and Prevention, Guangzhou Military Region, Guangzhou 510507, Guangdong, CHINA

**【Abstract】 Objective** To investigate the general toxicity of potassium sorbate, and evaluate its security. **Methods** According to the standards of the People's Republic of China "Procedures and Methods for Toxicological Assessment on Food Safety" (GB15193.1-21), the toxic level, hereditary toxicity, long-term toxicity and security of potassium sorbate were evaluated. **Results** The  $LD_{50}$  of potassium sorbate was  $1\ 300\ \text{mg/kg}$ , which belongs to low-toxic degree. In bone marrow cell micronucleus, mice sperm abnormality test, teratogenicity study, thirty days feeding study, there were no genetic toxicity and dramatically changes between the experimental groups and the control group for body weight, blood routine examination, and the respective levels of ALT, BUN, GLU, and TC, TG in serum ( $P>0.05$ ). **Conclusion** Potassium sorbate is a kind of safe, non-toxic additive for food, which could be used in kinds of food and beverage.

**【Key words】** Potassium sorbate; Mice; Toxicology; Security; Evaluation

山梨酸盐是一种抗菌防腐剂, 具有抗细菌和抗真菌的性质, 通常用于口服和局部用制剂中, 特别是含有非表面活性剂的制剂中, 常用浓度是0.1%~0.2%。一般认为它是相对无毒的食品添加剂, 但是, 也有一些关于山梨酸盐不良反应的报道, 包括皮肤刺激性、过敏性或超敏性反应, 然而口服山梨酸盐未见系统不良发应的报道<sup>[1]</sup>。为了探明其食用的安全性, 现对其常用品种山梨酸钾进行安全毒理学评价。

### 1 材料与方法

1.1 样品 山梨酸钾(河南浩鑫生物科技有限公司, 纯度>98%), 白色结晶性粉末, 无异味, 易吸湿。

1.2 实验动物 健康昆明种小鼠, 雌雄各半, 体重18~22 g; 于2008年购入即用于本实验, 由四川省医学实验动物中心提供(川动管字第2008 09号)。实验环境: 温度23℃~25℃, 相对湿度65%~70%。

1.3 实验方法 根据卫生部2003年发布的《食品安全性毒理学评价程序》(GB15193)中要求的方法进行相关实验<sup>[2]</sup>。实验中以实际给药量为依据, 配制相应浓度的山梨酸钾水溶液, 即配即用。

1.3.1 急性毒性实验 将昆明小鼠40只随机分

为对照组及受试组各20只, 雌雄各半, 分养在4个笼里。采用寇氏法测定 $LD_{50}$ 。实验过程: 实验小鼠隔夜空腹, 24 h内口服给药(灌胃), 给药量为0.4 ml/20 g。三周内连续观察, 记录动物进食、一般活动(中毒表现)、大小二便以及死亡情况<sup>[3]</sup>, 并计算 $LD_{50}$ 。

1.3.2 骨髓细胞微核试验 小鼠50只, 随机分为5组, 雌雄各半。根据本品 $LD_{50}=1\ 300\ \text{mg/kg}$ 设3个剂量组, 分别为高剂量组( $1/2\ LD_{50}=650\ \text{mg/kg}$ )、中剂量组( $1/4\ LD_{50}=325\ \text{mg/kg}$ )、低剂量组( $1/8\ LD_{50}=162.5\ \text{mg/kg}$ ); 并且设立溶剂对照组和阳性对照组共五个组别。阳性对照组在间隔24 h内, 用环磷酰胺40 mg/kg连续灌胃两次, 在最后一次给药后的6 h, 劲椎脱位处死小鼠, 将股骨骨髓腔制成的细胞悬液涂片置于Giemsa应用液中染色, 在油镜下观察。用双盲法阅片, 每只动物计数1 000个嗜多染红细胞, 观察含有微核的嗜多染红细胞数, 微核率以千分率表示<sup>[4]</sup>。

1.3.3 小鼠精子畸形试验 将雄性小鼠50只随机分为五组, 根据本品 $LD_{50}=1\ 300\ \text{mg/kg}$ 设3个剂量组: 高剂量组( $1/2\ LD_{50}=650\ \text{mg/kg}$ )、中剂量组( $1/4\ LD_{50}=325\ \text{mg/kg}$ )、低剂量组( $1/8\ LD_{50}=162.5\ \text{mg/kg}$ ); 另

设溶剂对照组和阳性对照组。阳性对照组以甲基磺酸甲酯(MMS) 50 mg/kg 体重灌胃。各组小鼠连续给药 5 d,于第一次给药后的第 35 天处死,取出两侧附睾,常规制片,用伊红染色 1 h,在高倍镜下检查精子形态,计数结构完整精子。每只动物观察 1 000 个精子形态(无钩、香蕉形、胖头、无定性、尾折叠、双头、双尾等)并计数<sup>[5]</sup>。

1.3.4 致畸试验 选用健康、性成熟且未交配的雌性小鼠 40 只以及雄性小鼠 20 只,随机分为四组,雌雄各半,根据本品 LD<sub>50</sub>=1 300 mg/kg 设 3 个剂量组,分别为高剂量组(1/2 LD<sub>50</sub>=650 mg/kg)、中剂量组(1/4 LD<sub>50</sub>=325 mg/kg)、低剂量组(1/8 LD<sub>50</sub>=162.5 mg/kg)和溶剂对照组。实验小鼠按照雌雄动物 1:1 比例同笼后,每日早晨检查阴栓(或阴道涂片),查出阴栓(或精子)则认为该鼠已经交配,当日作为受孕 0 d。如果 5 d 内未交配,则更换雄鼠。检出的妊娠鼠随机分组,并称重和编号,在受孕的第 7~16 天,每天给予本品。分别于受孕的 0 d、7 d、12 d、16 d、10 d 称重。每组实验孕鼠于妊娠第 20 天颈椎脱位处死 5 只,剖腹取出子宫称重,记录并检查吸收胎、早死胎、晚死胎及活胎数。活胎鼠出生 24 h 内逐一记录性别、体重、体长,对胎鼠进行体表检查(头部、躯干部、四肢),观察是否有异常。定时称量体重,断乳时处死解剖,检查骨骼以及内脏(头部、胸部、腹部)有无畸形<sup>[6]</sup>。

1.3.5 30 d 喂养试验 小鼠 80 只随机分成四组,每组 20 只,雌雄各半,根据本品 LD<sub>50</sub>=1 300 mg/kg 设 3 个剂量组,分别为高剂量组(1/4 LD<sub>50</sub>=325 mg/kg)、中剂量组(1/8 LD<sub>50</sub>=162.5 mg/kg)、低剂量组(1/12 LD<sub>50</sub>=108.3 mg/kg)和溶剂对照组。连续 30 d,各剂量组按照相应剂量口服给药(灌胃),溶剂对照组给予蒸馏水。每周观察并记录小鼠的一般表现、行为、中毒表现和死亡情况。每周称 1 次体重和食物摄入量。实验至 30 d 时,眼眶取血后颈椎脱位处死。测定红细胞

(RBC)、白细胞(WBC)等血液学指标以及丙氨酸氨基转移酶(ALT)、尿素氮(BUN)、血糖(GLU)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)等血液生化学指标;对肝、肾、脾、胃肠等重要脏器进行组织病理学检查<sup>[7]</sup>。

1.4 统计学方法 本实验中所有数据均采用 SPSS11.5 进行统计;计数资料数据呈正态分布的比较采用 *t* 检验,非正态分布的比较采用卡方检验。计量资料采用配对 *t* 检验,以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。*P*<0.05 为差异具有统计学意义。

2 实验结果

2.1 急性毒性试验 试验期间,中、高剂量组部分小鼠出现了中毒症状,主要表现为:反应迟钝,行为呆滞,缺乏知觉,呼吸减弱,流涎流泪等,同时有 2 只小鼠死亡。经查表得 LD<sub>50</sub>=1 300 mg/kg,因此,本品属于低毒级。

2.2 骨髓细胞微核试验 根据试验结果统计分析,各实验组微核率均为 1.8%,差异无统计学意义(*P*>0.05);和阳性对照组 22.0%比较,差异有统计学意义(*P*<0.01),结果见表 1。

表 1 骨髓细胞微核试验结果

组别	剂量 (mg/kg)	动物数 (只)	细胞数 (个)	微核数 (个)	微核率 (%)
低剂量组	162.5	10	1000	2	1.8
中剂量组	325	10	1000	2	1.8
高剂量组	650	10	1000	2	1.8
溶剂对照组	0	10	1000	2	1.8
阳性对照组	/	10	1000	22	22.0*

注:阳性对照组与溶剂对照组比较,\**P*<0.01。

2.3 小鼠精子畸形试验 统计结果显示,各剂量组小鼠精子畸形率分别为 2.84%、2.88%、2.94%,与溶剂对照组 2.58%比较,差异无统计学意义(*P*>0.05);和阳性对照组 98.36%比较,差异具有统计学意义(*P*<0.01),结果见表 2。

表 2 小鼠精子畸形试验结果(只)

组别	剂量 (mg/kg)	动物数 (只)	精子数 (个)	精子畸变类型						精子畸变率(%)	
				双头	双尾	无定型	无钩	胖头	香蕉形		尾折叠
低剂量组	162.5	10	1000	0	1	9	3	11	1	1	2.6
中剂量组	325	10	1000	1	0	11	2	14	1	1	2.9
高剂量组	650	10	1000	1	1	12	4	8	1	2	2.9
溶剂对照组	0	10	1000	0	0	14	2	8	1	1	2.6
阳性对照组	/	10	1000	11	8	226	42	40	12	645	98.4*

注:阳性对照组与溶剂对照组比较,\**P*<0.01。

2.4 传统致畸试验 小鼠妊娠前后的一般情况良好,且药物对其生殖能力并无明显影响。孕鼠妊娠 14 d 处死后,各剂量组与溶剂对照组比较,在吸收胎、早死胎、晚死胎及活胎数方面差异无统计学意义(*P*>0.05),见表 3。各剂量组胎鼠体重、体长增长速度均无异常,

各剂量组与溶剂对照组比较差异也无统计学意义(*P*>0.05),见表 4。肉眼检查胎鼠体表、头部、躯干部及四肢未见明显异常和畸形。处死后,检查枕骨、脊椎骨、骨盆等骨骼,未见明显异常和畸形。检查头部、胸部、腹部的内脏,在大小、形态等方面未见明显异常和畸形。

表3 山梨酸钾对胎仔影响试验结果比较(只)

组别	剂量 (mg/kg)	动物数	吸收胎数	早死胎数	晚死胎数	活胎数
低剂量组	162.5	5	0	0	0	61
中剂量组	325	5	0	0	0	58
高剂量组	650	5	1	1	1	60
溶剂对照组	0	5	0	0	0	57

表4 山梨酸钾对胎鼠出生后体重增长情况比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	剂量 (mg/kg)	动物数 (只)	出生时间(d)			
			0	7	14	21
低剂量组	162.5	5	1.70±0.20	3.56±0.35	5.59±0.40	12.01±0.61
中剂量组	325	5	1.69±0.21	3.51±0.41	5.52±0.44	11.95±0.57
高剂量组	650	5	1.65±0.19	3.49±0.32	5.33±0.47	11.92±0.60
溶剂对照组	0	5	1.71±0.22	3.61±0.40	5.66±0.42	12.02±0.53

表5 血液生化指标结果( $\bar{x}\pm s$ )

组别	剂量 (mg/kg)	动物数 (只)	血液生化指标				
			ALT(U/L)	BUN(mmol/L)	GLU(mmol/L)	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)
低剂量组	108.3	20	48.6±4.1	8.37±0.86	5.26±0.43	1.25±0.30	0.73±0.06
中剂量组	162.5	20	49.2±4.1	8.37±0.79	5.37±0.45	1.27±0.33	0.77±0.07
高剂量组	325	20	51.5±4.3	10.68±1.01	5.89±0.59	1.75±0.42*	1.02±0.15*
溶剂对照组	0	20	45.8±3.6	7.56±0.81	4.98±0.39	1.18±0.08	0.51±0.05

注:实验组与溶剂对照组比较,\* $P<0.01$ 。

2.5.4 病理学检查 在组织病理学检查中,观察各剂量组相对于溶剂对照组的动物脏器是否具有明显改变。结果发现,在外观、大小等各方面,心、肝、脾、肺、肾、胃肠等重要脏器均正常,未见明显的毒性病理改变。

### 3 讨论

根据以上毒理学实验结果,证实了山梨酸钾对动物机体无毒害,加上其具有较广的抗菌谱,对霉菌、酵母菌等均有抗菌性,是一种典型的酸性防腐剂,在人体正常的代谢下,大部分会代谢生成二氧化碳和水从人体排出。本实验中通过对小鼠进行急性毒性实验,得到其 $LD_{50}=1\ 300\text{ mg/kg}$ ,表示山梨酸钾为低毒级物质;通过骨髓细胞微核试验,证实山梨酸钾无致突变的作用;在小鼠精子畸形试验中也证实了本品无遗传毒性及潜在的致癌作用;通过传统致畸试验显示本品无致畸作用;在急性毒性试验的基础上,通过30 d喂养试验,对动物体重和食物摄取量的观察,RBC、WBC等血液学指标以及ALT、BUN、GLU、TC、TG等血液生化学指标的分析,对肝、肾、脾、胃肠等重要脏器进行组织病理学检查,进一步证明山梨酸钾对动物机体无毒害。

本实验中,血清生化指标中胆固醇有随试验剂量增高而增高的趋势,但无剂量反应关系,而且山梨酸钾浓度过大,实际用量将稀释许多倍,但为安全起见,建议进一步做大鼠90 d喂养等试验,以长期对山梨酸盐进行更深入细致的研究。

毒理学安全评价是衡量食品添加剂毒性大小的

### 2.5 30 d喂养试验

2.5.1 动物一般情况 实验过程中无动物死亡,各组动物毛发正常,无异常行为表现。在体重和食物摄入量方面,各剂量组动物与溶剂对照组比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。

2.5.2 血液常规检查 本实验中,各剂量组与溶剂对照组动物的RBC、WBC等血液学指标均在正常范围内,比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

2.5.3 各实验组动物血清生化指标 根据实验结果,高剂量组与溶剂对照组动物的指标TC、TG比较差异具有统计学意义( $P<0.01$ ),见表5。

重要依据,各种添加剂能否使用以及使用范围和最大使用量应严格按照《食品添加剂管理办法》的规定操作,以保证其在安全范围内使用。中国卫生部发布的《食品添加剂使用卫生标准》中有规定,山梨酸钾在不同食物中的使用量是在0.075~2.01 g/kg的范围内,这个限量相对于日本的《食品卫生法》和世界卫生组织联合国粮食及农业组织制定的《国际食品法典委员会(CAC)标准》中的规定限量远远偏低。当然,各国制定的标准可能与每个国家的饮食、环境、生活方式等的不同有很大的关系。

综上所述,可以断定山梨酸钾是安全的,可作为食品、药品、饲料等领域的防腐剂,商业前景十分广泛。

### 参考文献

- [1] 郑俊民. 药用辅料手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 581-583.
- [2] 中华人民共和国卫生部. 食品安全性毒理学评价-食品安全性毒理学评价程序. 中华人民共和国国家标准, GB15193.1-2003.
- [3] 中华人民共和国卫生部. 食品安全性毒理学评价-急性毒性实验. 中华人民共和国国家标准, GB15193.3-2003.
- [4] 中华人民共和国卫生部. 食品安全性毒理学评价-骨髓细胞微核试验. 中华人民共和国国家标准, GB15193.5-2003.
- [5] 中华人民共和国卫生部. 食品安全性毒理学评价-小鼠精子畸形试验. 中华人民共和国国家标准, GB15193.7-2003.
- [6] 中华人民共和国卫生部. 食品安全性毒理学评价-致畸试验. 中华人民共和国国家标准, GB15193.14-2003.
- [7] 中华人民共和国卫生部. 食品安全性毒理学评价-90天和30天喂养试验. 中华人民共和国国家标准, GB15193.13-2003.

(收稿日期:2012-03-22)