

甜叶菊苷 M 的毒理学安全性评价

武新月, 赵悦, 施伟庆, 陆罗定, 陈耿, 吴俊, 俞萍

(江苏省疾病预防控制中心, 江苏南京 210009)

摘要: 甜叶菊苷 M 是在甜叶菊中发现的糖苷类物质, 已被确定为一种潜在的甜味剂。本研究依据食品安全国家标准, 采用小鼠急性经口毒性试验、Ames 试验、小鼠骨髓红细胞微核试验、小鼠精母细胞染色体畸变试验和 28 d 经口毒性试验对甜叶菊苷 M 进行了安全性评价。结果显示: 甜叶菊苷 M 对雌雄小鼠急性经口 MTD 值均大于 10000 mg/kg·bw, 属实际无毒级; Ames 试验、小鼠骨髓红细胞微核试验和小鼠精母细胞染色体畸变试验均为阴性; 将样品以 2000、1000 和 500 mg/kg 的设计剂量掺入基础饲料中喂养大鼠 28 d 后, 各剂量组雌雄动物的体重、摄食量、食物利用率、血液学、血生化和组织病理学等指标与对照组相比无明显异常。样品对雌、雄大鼠未观察到有害作用剂量 (NOAEL) 分别为 2650 和 2421 mg/kg·bw。研究结果表明, 甜叶菊苷 M 未见急性毒性、遗传毒性和短期毒性, 具有较高的食用安全性。

关键词: 甜叶菊苷 M; 甜菊糖苷; 急性毒性; 遗传毒性; 短期毒性; 安全性评价

文章编号: 1673-9078(2021)03-250-258

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.3.0760

Toxicological Safety Evaluation of Stevioside M

WU Xin-yue, ZHAO Yue, SHI Wei-qing, LU Luo-ding, CHEN Geng, WU Jun, YU Ping

(Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Nanjing 210009, China)

Abstract: Stevioside M is a glycoside found in the leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) that has been identified as a potential sweetener. The safety of stevioside M was evaluated according to the national food safety standard, using the acute oral toxicity test, Ames test, mouse bone marrow erythrocyte micronucleus test, mouse spermatocyte chromosome aberration test, and 28 day oral toxicity test. The results showed that the acute oral MTD values of stevioside M in both male and female mice were higher than 10000 mg/kg·bw, indicating that stevioside M was practically non-toxic; the results of Ames test, mouse bone marrow erythrocyte micronucleus test, mouse spermatocyte chromosome aberration test were negative; after the 28 day administration with the basic diet incorporated by stevioside M at designed doses of 2000, 1000 and 500 mg/kg, no significant changes were found in indices including body weight, food intake, food utilization rate, hematology, blood biochemistry and histopathology between each dose group and control group. The No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) of female and male mice were 2650 and 2421 mg/kg·bw. The results indicate that stevioside M has no acute toxicity, genetic toxicity or short-term toxicity, and is therefore of high food safety.

Key words: stevioside M; steviol glycosides; acute toxicity; genetic toxicity; short-term toxicity; safety evaluation

引文格式:

武新月, 赵悦, 施伟庆, 等. 甜叶菊苷 M 的毒理学安全性评价[J]. 现代食品科技, 2021, 37(3): 250-258

WU Xin-yue, ZHAO Yue, SHI Wei-qing, et al. Toxicological safety evaluation of stevioside M [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(3): 250-258

甜叶菊 (*Stevia rebaudiana* Bertoni) 俗称甜菊、甜草^[1], 原产于巴西南部 and 巴拉圭北部之间的阿曼拜山脉, 是一种多年生的菊科草本植物^[2]。已有的研究表明, 甜叶菊具有显著的抗炎、抗氧化、抗菌、抗糖尿病以及抗肿瘤等作用^[3-7]。目前从甜叶菊中分离得到的成分主要有甜菊糖苷、三萜类、黄酮类、植物甾醇、

收稿日期: 2020-08-14

作者简介: 武新月 (1993-), 女, 检验师, 研究方向: 食品与健康

通讯作者: 俞萍 (1973-), 女, 主任医师, 研究方向: 毒理学检测与功能评价

挥发油和香豆素类等^[8], 甜菊糖苷作为低热量、无毒的天然甜味剂, 甜度高出蔗糖 300 倍, 因此成为非热糖替代品应用于食品、饮料、酿酒等生产工艺中^[1,9]。甜菊糖苷是一类由多种甜味成分组成的四环二萜类化合物, 包括甜菊苷、莱鲍迪苷 A (rebaudioside A, reb A)、莱鲍迪苷 B (rebaudioside B, reb B)、莱鲍迪苷 C (rebaudioside C, reb C)、莱鲍迪苷 E (rebaudioside E, reb E)、莱鲍迪苷 F (rebaudioside F, reb F)、莱鲍迪苷 M (rebaudioside M, reb M)、甜茶苷、杜克苷和甜菊双糖苷等^[10]。其中甜菊苷和 reb A 作为甜菊糖苷

的主要甜味成分, 含量最高(约占 85%), 但其味道带有强烈的苦涩, 一定程度上限制了甜菊糖苷的应用^[11]。相比之下, reb M 则甜度高, 口感干净, 苦味大大降低, 风味更加令人愉悦, 但在甜菊糖苷中的含量极低(约占 0.06%), 因此作为甜味剂的开发和利用受到很大挑战^[12-14]。为了解决这一难题, 研究者通过发酵和生物转化的方法, 使用基因工程改造的酵母菌将甜菊糖苷转化成 reb M, 从而有效地提高 reb M 的产量^[15,16]。以甜菊糖苷为原料, 在麦芽糖淀粉酶和葡萄糖淀粉酶以及毕赤酵母提取液的作用下充分反应, 分离反应混合物, 去除蛋白残渣得到上层清液。然后将上层清液加入大孔树脂进行吸附, 接着用水冲洗树脂柱, 再用乙醇洗提数次, 经浓缩、结晶、干燥后可得到 reb M 及其同分异构体的混合物, 称为甜叶菊苷 M (stevioside M)。目前对甜叶菊苷 M 有限的研究中, 主要是从化学结构、甜度和理化性质等方面进行的^[17,18], 而对甜叶菊苷 M 的毒理学安全性评价则尚未有报道。本研究按照国家卫生和计划生育委员会发布的《食品安全性毒理学评价程序与方法》^[19], 采用小鼠急性经口毒性试验、Ames 试验、小鼠骨髓红细胞微核试验、小鼠精母细胞染色体畸变试验和 28 d 经口毒性试验对甜叶菊苷 M 的毒理学安全性进行评价, 为甜叶菊苷 M 的进一步开发应用提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品

甜叶菊苷 M: 由无锡新和源生物制造有限公司提供。

1.1.2 主要试剂

鼠伤寒沙门氏菌突变型菌株 TA97a、TA98、TA100、TA102 和 TA1535, 美国 Moltex 公司; S₉, 齐氏生物科技有限公司; 敌克松, AccuStandard 公司; 叠氮钠, 浙江东阳市天宇化工有限公司; 2-氨基苄, Fluka AG 公司; 1,8-二羟基蒽醌, SIGMA-ALDRICH 公司; 环磷酰胺, Sigma 公司; 丝裂霉素, 浙江海正药业股份有限公司; 秋水仙素, 国药集团化学试剂有限公司。

1.1.3 试验动物

SPF 级健康 ICR 雌、雄小鼠, 由北京维通利华实验动物技术有限公司南京分公司提供, 生产许可证号: SCXK(苏)2016-0003 号; SPF 级健康 SD 雌、雄大鼠, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 生产许可证号: SCXK(京)2016-0006 号。

1.1.4 仪器与设备

电子天平: PL203 型, 梅特勒托利多仪器(上海)有限公司; 生化培养箱: LRH-400 型, 韶关市泰宏医疗器械有限公司; 生物显微镜: OLYMPUS CX41RF 型, 日本日立公司; 生化分析仪: OLYMPUS AU640 型, 日本日立公司; 电解质分析仪: PSD-15b 型, 南京攀事达电子仪器有限公司; 血细胞分析仪: ADVIA 2120 型, 德国西门子公司; 全自动血凝仪: Coatron 1800 型, 德国 TECO 公司; 尿分析仪: Scan 500 型, 德国科宝公司; 半自动石蜡切片机: RM 2245 型, 德国莱卡公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠急性经口毒性试验(限量法)

选取 SPF 级健康 ICR 小鼠 20 只, 雌雄各半, 体重为 18.5~21.3 g。给样前禁食 6 h。准确称取样品 10000 mg 加纯净水至 30 mL 搅拌成均匀的糊状物, 采取一次灌胃给予, 灌胃容量为 30 mL/kg·bw, 剂量为 10000 mg/kg·bw。灌胃后连续观察 14 d, 记录中毒表现及死亡情况。

1.2.2 Ames 试验

平板掺入法。使用菌株鉴定符合要求的鼠伤寒沙门氏菌突变型菌株 TA97a、TA98、TA100、TA102 和 TA1535。采用 β -萘黄酮和苯巴比妥联合诱导的大鼠肝 S₉ 作为体外代谢活化系统。准确称取样品 1000 mg, 加入 DMSO 溶解定容至 20 mL, 经 121 °C, 20 min 高压灭菌。试验设 5 个剂量组, 分别为 5000、1000、200、40 和 8 μ g/皿, 同时设自发回变组, 溶剂对照组和阳性对照组。每个测试点做 3 个平行皿, 同样实验条件下测试两次。

1.2.3 小鼠骨髓红细胞微核试验

SPF 级健康 ICR 小鼠 50 只, 雌雄各半, 随机分为 5 组, 分别为 6670、3330、1670 mg/kg·bw 三个剂量组, 溶剂对照组(纯净水)和阳性对照组(环磷酰胺 40 mg/kg·bw)。采用 30 h 两次灌胃法, 每次灌胃容量为 20 mL/kg·bw。于末次给药后 6 h 颈椎脱臼处死动物, 取股骨骨髓于小牛血清中涂片、固定、染色。显微镜下, 每只动物计数 1000 个嗜多染红细胞(PCE), 记录含微核的细胞数, 并计算含微核细胞率; 每只动物计数 200 个嗜多染红细胞, 同时计数正染红细胞(NCE), 计算 PCE 在总红细胞中的比例。

1.2.4 小鼠精母细胞染色体畸变试验

SPF 级健康雄性 ICR 小鼠 25 只, 随机分为 5 组, 分别为 6670、3330、1670 mg/kg·bw 三个剂量组, 溶剂对照组和阳性对照组。样品各剂量组和溶剂对照组的灌胃容量为 20 mL/kg·bw, 每日灌胃 1 次, 连续 5 d;

阳性对照组仅于实验第 1 d 腹腔注射一次, 注射量为 10 mL/kg-bw。试验第 14 d 处死动物, 取双侧附睾精子滤液制片镜检。显微镜下, 每只动物计数 500 个精母细胞, 记录染色体畸变细胞数, 并计算畸变细胞率。

1.2.5 28 d 经口毒性试验

SPF 级健康 SD 大鼠, 雌雄各 40 只, 随机分为 4 组, 分别为 2000、1000、500 mg/kg-bw 三个样品剂量组和基础饲料对照组。采用逐步稀释的方法将样品掺入基础饲料中, 以每日约 100 g/kg-bw 的摄食量给予大鼠自由食用, 连续喂养 28 d。每日观察动物的一般表现, 记录中毒体征和死亡情况。每周称量体重和进食量, 计算食物利用率。试验结束时采血进行血液学检查、血清生化和电解质检查。血液学检查指标包括白细胞 (WBC)、红细胞 (RBC)、血小板 (PLT) 计数、血红蛋白 (HGB) 浓度、红细胞压积 (HCT), 中性粒细胞 (NE)、淋巴细胞 (LY)、单核细胞 (MO)、嗜酸性粒细胞 (EO)、嗜碱性粒细胞 (BA) 分类, 凝血酶原时间 (PT)、活化部分凝血活酶时间 (APTT); 血清生化检查指标包括丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天

门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、谷氨酰转氨酶 (GGT)、碱性磷酸酶 (ALP)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、血糖 (GLU)、尿素氮 (BUN)、肌酐 (CRE)、总胆固醇 (CHO)、甘油三酯 (TG); 尿液检测指标包括相对密度 (SG)、pH 值、尿蛋白 (PRO)、尿糖 (GLU) 和潜血 (ERY)。采血后进行大体解剖检查, 并称量心脏、胸腺、肾上腺、肝、肾、脾、睾丸、脑的绝对重量, 计算脏/体比值; 固定保存各组动物的脏器, 先对高剂量组和对照组动物的脑、甲状腺、胸腺、心脏、肝、肾、脾、肾上腺、胃、十二指肠、结肠、胰、肠系膜淋巴结、睾丸、卵巢、膀胱进行组织病理学检查, 若发现病变再对较低剂量组相应脏器及组织进行检查。

1.3 数据分析

试验所得数据以平均值±标准差表示, 采用 SPSS 18.0 统计软件对数据进行统计分析。用泊松分布 U 检验法对骨髓红细胞微核试验结果进行分析; 用卡方检验对小鼠精母细胞染色体畸变试验结果进行分析。

表 1 甜叶菊苷 M 对小鼠体重的影响

Table 1 Effects of stevioside M on body weight in mice ($\bar{x}\pm s$)

性别	动物数/只	剂量/(mg/kg-bw)	初始体重/g	第 1 周体重/g	第 2 周体重/g	死亡数/只	MTD/(mg/kg)
雌	10	10000	19.91±0.77	23.38±1.21	27.00±1.64	0	>10000
雄	10	10000	20.03±0.91	26.87±1.10	30.55±1.84	0	>10000

表 2 Ames 试验结果

Table 2 Results of Ames test (n=3, $\bar{x}\pm s$)

测试次数	组别	TA97a		TA98		TA100		TA102		TA1535	
		+S ₉	-S ₉	+S ₉	-S ₉	+S ₉	-S ₉	+S ₉	-S ₉	+S ₉	-S ₉
第 1 次 测试	自发回变	122±9	115±8	33±4	32±3	120±6	144±7	295±7	287±24	14±4	13±5
	8 μg/皿	107±4	113±3	30±1	31±3	119±4	120±6	315±15	289±7	16±6	17±4
	40 μg/皿	105±7	109±4	30±2	30±2	108±6	130±5	307±17	284±8	15±1	17±2
	200 μg/皿	109±5	104±8	33±3	32±3	113±4	139±3	300±14	280±16	19±4	18±3
	1000 μg/皿	106±11	106±3	33±3	32±3	110±4	139±4	314±9	286±8	16±4	15±4
	5000 μg/皿	107±8	105±7	30±2	31±2	115±3	141±5	315±7	284±7	15±5	21±2
	溶剂对照	114±10	112±7	41±2	34±3	127±5	134±6	310±22	297±8	11±4	15±2
阳性对照	1052±69**	1142±96**	896±35**	769±99**	905±8**	922±107**	830±82**	888±40**	200±11**	418±32**	
第 2 次 测试	自发回变	115±10	120±8	34±2	32±3	116±13	135±7	289±5	283±16	17±3	12±3
	8 μg/皿	108±6	109±10	34±2	34±2	116±13	135±9	307±12	279±12	19±3	11±3
	40 μg/皿	119±10	110±7	35±5	34±3	112±7	139±6	324±9	295±8	20±1	13±6
	200 μg/皿	108±17	111±3	36±3	34±2	116±6	142±8	31320±	286±12	19±2	12±2
	1000 μg/皿	117±3	110±8	38±2	35±3	117±3	146±6	314±11	283±16	17±1	13±4
	5000 μg/皿	118±4	104±8	36±4	34±4	119±16	157±9	308±3	289±5	18±5	13±3
	溶剂对照	124±8	113±11	34±2	28±3	114±10	141±5	300±2	276±10	17±3	10±1
阳性对照	940±65**	1143±110**	921±65**	761±73**	910±24**	911±69**	892±92**	818±76**	250±76**	533±62**	

注: **表示超过溶剂对照 2 倍以上。

2 结果与分析

2.1 小鼠急性经口毒性试验

小鼠灌胃后未见明显中毒表现, 观察期内无动物死亡。观察期结束后, 大体解剖未见明显异常。由表 1 可见, 甜叶菊苷 M 对动物体重无明显影响; 本次试验中样品对雌雄小鼠急性经口 MTD 值均大于 10000 mg/kg b-wt (相当于估计最大摄入量的 1312 倍), 根据小鼠急性经口毒性分级标准, 该样品属于实际无毒级。

2.2 Ames 试验

剂量达 5000 μg/皿各平板背景菌苔均生长良好。由表 2 可见, 在加与不加 S₉ 的情况下, 两次测试, 样品各剂量组五种菌株的回变菌落数均未达到空白对照组的 2 倍, 且无剂量-反应关系, 而阳性对照组均表现出强烈的诱变作用。在本试验条件下, 甜叶菊苷 M 对标准测试菌株 TA97a、TA98、TA100、TA102 和 TA1535

不具有致突变作用, Ames 试验结果为阴性。这一结果与文献报道的 rebA 的 Ames 阴性^[20]结果一致。

2.3 小鼠骨髓红细胞微核试验

由表 3 可见, 与溶剂对照组相比, 样品各剂量组含微核细胞率差异均无统计学意义 ($p>0.05$), 也无剂量-反应关系; 阳性对照组含微核细胞率与溶剂对照组相比差异具有统计学意义 ($p<0.01$); 样品各剂量组动物 PCE 占红细胞总数的比例均高于对照组的 20%。表明甜叶菊苷 M 小鼠骨髓红细胞微核试验结果为阴性。

2.4 小鼠精母细胞染色体畸变试验

由表 4 可见, 样品各剂量组小鼠初级精母细胞染色体畸变细胞率与溶剂对照组相比, 差异均无统计学意义 ($p>0.05$), 也无剂量-反应关系; 阳性对照组与溶剂对照组的染色体畸变细胞率、性染色体和常染色体单价体、断裂和裂隙差异均具有统计学意义 ($p<0.01, p<0.05$)。提示甜叶菊苷 M 对小鼠初级精母细胞染色体无致畸变作用, 试验结果为阴性。

表 3 小鼠骨髓红细胞微核试验结果

Table 3 Results of micronucleus test in mice bone marrow ($\bar{x}\pm s$)

性别	组别	动物数/只	观察细胞数/个	含微核细胞数/个	含微核细胞率		PCE 比例/%
					‰	p 值	
雌性	溶剂对照	5	10000	20	2.00±0.79		50.72±2.18
	1670 mg/kg	5	10000	18	1.80±0.76	>0.05	51.10±0.79
	3330 mg/kg	5	10000	20	2.00±0.61	>0.05	51.24±1.35
	6670 mg/kg	5	10000	21	2.10±1.24	>0.05	50.88±1.59
	阳性对照	5	10000	254	25.40±7.76	<0.01	49.36±2.35
雄性	溶剂对照	5	10000	22	2.20±0.76		51.10±1.93
	1670 mg/kg	5	10000	23	2.30±0.97	>0.05	50.82±2.15
	3330 mg/kg	5	10000	20	2.00±0.79	>0.05	50.78±0.53
	6670 mg/kg	5	10000	26	2.60±0.89	>0.05	50.45±1.80
	阳性对照	5	10000	274	27.40±5.52	<0.01	49.03±1.68

表 4 小鼠精母细胞染色体畸变试验结果

Table 4 Results of chromosome aberration test in mice spermatocyte ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	观察细胞数/个	裂隙/个	性染色体单价体/%	常染色体单价体/%	染色体畸变类型			畸变细胞数/个	畸变细胞率
						断片/个	异位/个	微小体/个		
阴性对照	5	500	0	3.40±1.06	2.0±1.61	3	0	0	3	0.60±0.89
1670 mg/kg	5	500	0	3.20±1.26	1.80±1.26	4	0	0	4	0.80±0.84
3330 mg/kg	5	500	0	3.00±1.55	2.20±0.75	2	0	0	2	0.40±0.55
6670 mg/kg	5	500	0	3.20±1.09	2.00±1.15	4	0	0	4	0.80±0.84
阳性对照	5	500	6*	8.20±1.26**	6.60±1.48**	42	4	0	46**	9.20±1.92**

注: 与阴性对照组相比, * $p<0.05$; ** $p<0.01$ 。

表5 甜叶菊苷 M 对大鼠体重的影响

Table 5 Effects of stevioside M on body weight in rats ($\bar{x}\pm s$)

性别	组别	动物数/只	初始体重/g	第1周体重/g	第2周体重/g	第3周体重/g	第4周体重/g	增重/g
雌	对照	10	76.20±4.34	125.60±4.17	167.40±13.23	195.40±15.86	220.30±18.53	144.10±16.29
	低剂量	10	76.10±3.60	123.90±6.85	162.10±7.39	189.00±12.26	213.60±17.40	138.00±15.84
	中剂量	10	75.70±2.83	126.80±3.91	170.30±11.91	198.30±15.28	224.60±16.30	149.08±15.41
	高剂量	10	76.10±3.25	125.50±4.93	168.60±8.04	194.40±8.57	221.70±11.24	146.36±11.01
雄	对照	10	86.30±4.69	150.00±8.57	212.20±14.23	271.00±19.44	325.10±28.23	238.80±28.83
	低剂量	10	86.30±6.67	149.00±7.56	216.60±15.82	277.50±19.82	339.40±24.64	253.10±19.40
	中剂量	10	86.70±5.72	149.30±6.06	213.80±13.87	272.30±18.07	328.70±21.43	242.00±18.41
	高剂量	10	87.10±5.28	150.60±9.85	215.00±11.16	274.80±13.54	333.90±17.10	246.80±15.35

表6 甜叶菊苷 M 对大鼠每周摄食量及总摄食量的影响

Table 6 Effects of stevioside M on weekly and total food intake in rats ($\bar{x}\pm s$)

性别	组别	动物数/只	第1周摄食量/g	第2周摄食量/g	第3周摄食量/g	第4周摄食量/g	总摄食量/g
雌	对照	10	113.50±7.44	146.00±9.96	149.20±8.40	171.20±16.09	579.90±33.73
	低剂量	10	114.60±6.19	137.40±7.29	144.40±10.37	163.10±17.82	559.60±33.66
	中剂量	10	111.40±6.57	144.30±12.47	154.00±13.74	172.20±17.32	581.90±40.80
	高剂量	10	112.40±4.86	145.00±10.09	151.30±8.92	175.7±10.67	584.40±20.62
雄	对照	10	131.20±6.55	175.10±13.74	192.00±13.58	193.20±18.20	691.50±45.77
	低剂量	10	129.00±7.16	174.50±13.09	191.6±15.09	204.60±12.98	699.70±41.27
	中剂量	10	132.50±6.77	179.60±14.43	198.30±14.27	201.70±19.13	712.10±46.80
	高剂量	10	136.00±4.78	181.70±11.18	198.40±11.66	204.00±12.52	720.10±31.44

表7 甜叶菊苷 M 对大鼠食物利用率的影响

Table 7 Effects of stevioside M on food utilization rate in rats ($\bar{x}\pm s$)

性别	组别	动物数/只	第1周食物利用率/%	第2周食物利用率/%	第3周食物利用率/%	第4周食物利用率/%	总食物利用率/%
雌	对照	10	43.72±3.76	28.42±5.54	18.81±2.95	14.47±2.78	24.83±2.06
	低剂量	10	41.75±3.88	27.89±3.50	18.60±4.39	14.87±2.75	24.55±2.26
	中剂量	10	45.88±2.27	29.84±5.44	18.10±3.04	15.27±2.10	25.55±1.35
	高剂量	10	43.91±2.67	29.72±2.50	17.16±2.45	15.44±3.62	24.91±1.64
雄	对照	10	48.96±4.84	35.30±4.33	30.59±3.00	27.86±2.97	34.48±2.98
	低剂量	10	48.67±1.97	38.63±3.05	31.81±2.48	30.29±2.71	36.16±1.53
	中剂量	10	47.34±2.90	35.93±4.58	29.50±1.63	28.08±3.01	34.02±2.04
	高剂量	10	46.70±4.70	35.41±2.79	30.17±2.82	29.01±3.46	34.29±1.88

2.5 28 d 经口毒性试验

2.5.1 一般临床观察

试验期间, 各组动物的外观、排便、进食及活动等均未见明显异常, 未见明显中毒体征和死亡。这一研究与 Nikiforov 等人进行的 reb D 的 28 d 喂养试验结果一致^[21]。

2.5.2 动物的体重及摄食情况

由表 5~7 可见, 与对照组相比, 样品各剂量组动物多个观察点的体重、摄食量、食物利用率以及总的摄食量和食物利用率均无显著性差异 ($p>0.05$)。

2.5.3 甜叶菊苷 M 对大鼠血液学指标的影响

由表 8 可见, 与对照组相比, 雌性大鼠低剂量组 WBC 计数值偏高, NE 值偏低, 差异有统计学意义 ($p<0.05$), 但两项指标值均在本实验室历史正常值范围内, 且无剂量-效应关系; 雌性低、中剂量组和雄性低、中、高剂量组大鼠 PT 值以及雄性低剂量组 APTT 值差异有统计学意义 ($p<0.01$, $p<0.05$), 但两项指标变化均无剂量-效应关系, 且雌雄动物变化趋势不同, 结合其他指标综合分析认为, 上述变化不具有生物学意义和毒理学意义; 其余各剂量组的多项血常规指标与对照组相比无显著性差异 ($p>0.05$)。

表 8 甜叶菊苷 M 对大鼠血液学指标的影响

Table 8 Effects of stevioside M on hematological indexes in rats ($\bar{x}\pm s$)

性别	组别	动物数/只	WBC/(10 ⁹ /L)	RBC/(10 ¹² /L)	HGB/(g/L)	HCT/%	PLT/(10 ⁹ /L)	NE/%
雌	对照	10	6.37±1.08	6.66±0.31	120.30±5.27	37.15±1.49	1076.00±115.77	11.30±2.75
	低剂量	10	7.90±1.62*	6.65±0.36	121.30±6.53	36.94±2.22	1086.20±132.86	7.22±1.94*
	中剂量	10	7.51±1.65	6.76±0.30	122.10±7.25	37.19±2.14	1006.40±103.04	8.67±3.50
	高剂量	10	6.29±1.06	6.63±0.33	119.00±6.85	36.54±2.44	1164.20±119.77	9.15±3.52
雄	对照	10	7.12±1.26	6.73±0.35	127±8.51	38.99±3.02	1013.90± 99.16	10.25±1.84
	低剂量	10	8.55±1.57	7.00±0.27	124.60±5.60	40.05±1.54	1156.60±147.40	8.88±2.08
	中剂量	10	7.58±0.93	6.66±0.30	123.00±5.58	38.07±1.90	1094.40± 86.93	9.31±3.23
	高剂量	10	6.55±1.41	6.86±0.42	123.40±7.85	38.25±2.27	995.00±202.00	13.21±5.89

性别	组别	动物数/只	LY/%	MO/%	EO/%	BA/%	PT/s	APTT/s
雌	对照	10	84.19±3.55	2.77±1.13	1.15±0.49	0.13±0.07	21.90±1.62	11.67±1.49
	低剂量	10	88.89±2.69	2.17±0.67	0.96±0.43	0.18±0.08	17.90±0.73**	11.25±1.21
	中剂量	10	86.75±4.26	2.57±1.02	1.13±0.50	0.15±0.05	18.35±0.55**	11.93±1.63
	高剂量	10	86.85±4.03	2.29±0.63	0.91±0.30	0.15±0.10	23.15±1.65	11.82±1.30
雄	对照	10	85.42±2.33	2.75±0.76	1.20±0.72	0.16±0.05	22.08±1.42	10.63±2.21
	低剂量	10	88.23±2.64	1.97±0.68	0.59±0.20	0.16±0.05	25.85±3.04**	12.39±1.15*
	中剂量	10	87.30±4.09	2.14±0.98	0.84±0.66	0.15±0.07	24.40±1.31**	10.68±0.94
	高剂量	10	82.92±6.39	2.39±0.91	1.00±0.65	0.14±0.07	24.02±1.03**	10.74±0.82

注：与对照组相比，* $p<0.05$ ；** $p<0.01$ 。

表 9 甜叶菊苷 M 对大鼠血清生化指标的影响

Table 9 Effects of stevioside M on serum biochemical indexes in rats ($\bar{x}\pm s$)

性别	组别	动物数/只	ALT/(U/L)	AST/(U/L)	ALP/(U/L)	GGT/(U/L)	TP/(g/L)	ALB/(g/L)
雌	对照	10	39.34±4.13	175.26±14.97	124.39±24.72	0.69±0.46	69.27±3.62	37.10±1.94
	低剂量	10	34.65±6.14	161.68±22.57	111.62±35.17	0.65±0.26	69.04±6.56	37.59±3.75
	中剂量	10	36.98±5.52	169.86±21.86	107.72±38.52	0.55±0.10	68.37±5.20	37.15±2.69
	高剂量	10	38.87±5.27	171.86±16.15	131.51±38.93	0.52±0.22	68.28±3.42	36.31±1.93
雄	对照	10	47.30±6.37	181.18±17.73	239.87±58.95	0.47±0.16	61.85±2.87	31.77±1.12
	低剂量	10	44.55±6.63	162.37±23.66	253.03±50.81	0.47±0.17	59.74±2.94	30.83±1.21
	中剂量	10	46.23±5.60	171.30±25.04	226.86±25.70	0.38±0.08	59.10±3.03	30.67±1.53
	高剂量	10	45.37±7.09	172.49±25.16	248.45±49.29	0.39±0.18	60.90±1.36	31.29±1.38

性别	组别	动物数/只	GLU/(mmol/L)	TG/(mmol/L)	CHO/(mmol/L)	BUN/(mmol/L)	CRE/(mmol/L)
雌	对照	10	5.01±0.36	0.82±0.37	1.94±0.26	5.44±0.60	39.12±7.71
	低剂量	10	4.93±0.39	0.68±0.18	1.86±0.24	5.00±0.81	31.26±2.32**
	中剂量	10	5.18±0.35	0.64±0.14	1.87±0.51	5.41±0.65	35.73±4.07
	高剂量	10	4.90±0.53	0.77±0.30	1.93±0.44	5.12±0.40	38.52±4.30
雄	对照	10	5.03±0.82	1.09±0.43	1.87±0.20	5.19±0.52	29.71±3.20
	低剂量	10	5.47±0.45	0.83±0.26	1.63±0.32	4.52±0.89	27.08±2.90
	中剂量	10	4.96±0.53	0.76±0.19	1.59±0.19	4.59±0.73	28.56±3.15
	高剂量	10	5.01±0.44	0.82±0.21	1.70±0.30	4.20±0.49**	28.59±2.07

注：与对照组相比，** $p<0.01$ 。

2.5.4 甜叶菊苷 M 对大鼠血清生化指标和电解质浓度的影响

由表 9~10 可见，与对照组相比，雌性大鼠低剂

量组 CRE 值偏低，雄性高剂组 BUN 值偏低，差异均有统计学意义 ($p<0.01$)，但这些指标值均在本实验室历史正常值范围内，也无剂量-效应关系，其降低没有

毒理学意义；其余各项生化指标和电解质浓度值组间 差异均无统计学意义 ($p>0.05$)。

表 10 甜叶菊苷 M 对大鼠血清电解质浓度的影响

Table 10 Effects of stevioside M on serum electrolyte concentration in rats ($\bar{x}\pm s$)

性别	组别	动物数/只	Na ⁺ /(mmol/L)	K ⁺ /(mmol/L)	Cl ⁻ /(mmol/L)
雌	对照	10	137.00±2.71	6.67±0.64	103.30±1.57
	低剂量	10	134.50±3.31	6.59±0.60	102.80±0.92
	中剂量	10	134.50±2.72	6.44±0.51	102.10±1.60
	高剂量	10	137.70±3.68	6.74±1.04	103.20±2.44
雄	对照	10	137.90±3.03	6.85±0.59	102.20±1.14
	低剂量	10	135.00±5.29	6.64±0.55	101.50±2.42
	中剂量	10	135.30±3.95	6.51±0.39	100.40±2.22
	高剂量	10	135.50±3.69	6.64±0.46	101.40±2.84

表 11 甜叶菊苷 M 对大鼠尿液指标的影响

Table 11 Effects of stevioside M on urine indexes in rats ($\bar{x}\pm s$)

性别	组别	动物数/只	SG	pH	ERY/(P/N)	PRO/(g/L)	GLU/(P/N)
雌	对照	10	1.02±0.01	6.20±0.42	0/10	0.14±0.15	0/10
	低剂量	10	1.02±0.01	5.90±0.74	0/10	0.22±0.30	0/10
	中剂量	10	1.02±0.01	5.90±0.99	0/10	0.17±0.13	0/10
	高剂量	10	1.02±0.01	5.90±0.32	0/10	0.08±0.13	0/10
雄	对照	10	1.02±0.01	6.40±0.84	0/10	0.38±0.35	0/10
	低剂量	10	1.02±0.01	6.30±0.67	0/10	0.26±0.40	0/10
	中剂量	10	1.02±0.01	6.40±0.52	0/10	0.17±0.13	0/10
	高剂量	10	1.02±0.01	6.20±0.42	0/10	0.18±0.12	0/10

表 12 甜叶菊苷 M 对大鼠脏器体比的影响

Table 12 Effects of stevioside M on the organ-to body weight of rats ($\bar{x}\pm s$)

性别	组别	动物数/只	空腹体重/g	脏器体比/%							
				肝脏	肾脏	脾脏	心脏	胸腺	肾上腺	脑	睾丸
雌	对照	10	214.70±17.49	3.61±0.16	0.90±0.07	0.24±0.02	0.42±0.06	0.36±0.05	0.03±0.01	0.83±0.08	-
	低剂量	10	209.10±17.83	3.59±0.18	0.96±0.05	0.25±0.04	0.46±0.10	0.34±0.08	0.03±0.01	0.82±0.09	-
	中剂量	10	219.00±15.51	3.44±0.14	0.91±0.09	0.24±0.03	0.42±0.05	0.36±0.08	0.03±0.01	0.84±0.07	-
	高剂量	10	215.50±8.86	3.56±0.33	0.91±0.05	0.24±0.03	0.42±0.05	0.36±0.07	0.03±0.01	0.85±0.10	-
雄	对照	10	313.90±27.82	3.38±0.21	0.88±0.03	0.25±0.03	0.41±0.04	0.28±0.06	0.02±0.01	0.60±0.04	0.89±0.10
	低剂量	10	326.20±24.58	3.33±0.22	0.86±0.03	0.22±0.03	0.43±0.08	0.28±0.06	0.02±0.00	0.60±0.05	0.89±0.07
	中剂量	10	316.20±21.74	3.32±0.14	0.88±0.08	0.24±0.03	0.40±0.06	0.29±0.04	0.02±0.00	0.60±0.05	0.89±0.08
	高剂量	10	320.20±16.65	3.29±0.22	0.88±0.04	0.22±0.03	0.42±0.06	0.26±0.06	0.02±0.00	0.61±0.07	0.84±0.09

2.5.5 甜叶菊苷 M 对大鼠尿液分析指标的影响

各剂量组大鼠尿液外观无明显异常。由表 11 可见，各组雌雄大鼠尿液检测指标与对照组相比，无统计学差异 ($p>0.05$)。

2.5.6 甜叶菊苷 M 对大鼠脏器体比的影响

与对照组相比，各剂量组大鼠肝、肾、脾、心脏、胸腺等脏器的脏器体比均无统计学差异 ($p>0.05$)，数据见表 12。Nikiforov 等人的 reb D 喂养大鼠的实验中，测定器官重量与对照组无显著差异^[21]，与本试验结果

一致。由此说明甜叶菊苷 M 对大鼠脏器体比没有明显影响。

2.5.7 组织病理学检查

对所有动物进行大体解剖检查，均未发现明显异常。因此，先选择高剂量组和对照组动物的脑、甲状腺、胸腺、心脏、肝、肾、脾、肾上腺、胃、十二指肠、结肠、胰、肠系膜淋巴结、睾丸、卵巢、膀胱进行组织病理学检查。与对照组相比，高剂量组大鼠各受检脏器均未出现与甜叶菊苷 M 明显有关的特异性组织病理学改变，故未进行其他剂量组动物脏器的组

织病理学检查。

3 结论

基于甜菊糖苷现有的研究结果, 欧洲食品安全局 (European Food Safety Authority, EFSA) 和粮农组织/世卫组织食品添加剂联合专家委员会 (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA) 建立了甜菊糖苷的每日允许摄入量 (acceptable daily intake, ADI), 即 4 mg/kg·bw 甜菊醇当量^[22,23]。由于各种甜菊糖苷具有相同的代谢产物甜菊醇, 因此 ADI 值适用于所有的甜菊糖苷^[24]。按照文献报道的方法, 假设由 reb M 构成整个甜味剂市场 (这一估计非常保守), 那么对于一般健康成人人群, reb M 估计最大摄入量为 5.19 mg/kg·bw, 相当于 1.28mg/kg·bw 甜菊醇当量; 健康儿童的估计最大摄入量为 7.62 mg/kg·bw, 相当于 1.88 mg/kg·bw 甜菊醇当量^[25]。若以甜菊醇当量表示, 则 reb M 的估计最大摄入量远低于 EFSA 和 JECFA 建立的 ADI 值。在本次试验中, 甜叶菊苷 M 对雌雄小鼠急性经口 MTD 值均大于 10000 mg/kg·bw, 相当于估计最大摄入量的 1312 倍, 因此属于实际无毒级。Ames 试验、小鼠骨髓红细胞微核试验和小鼠精母细胞染色体畸变试验均为阴性, 表明样品无遗传毒性。28 d 经口毒性试验发现, 剂量达到 2000 mg/kg·bw 时, 样品对大鼠的体重、摄食量、食物利用率、血液学、血生化和组织病理学等均未产生明显影响, 提示样品不具有短期毒性。在本试验设定的条件下, 根据高剂量组动物实际摄入样品的剂量计算, 该样品对雌、雄大鼠 28 d 经口毒性 NOAEL 值分别为 2650 和 2421 mg/kg·bw。本次试验初步评价了甜叶菊苷 M 的安全性, 并为下一步较长期毒性和慢性毒性试验剂量、观察指标、毒性终点的选择提供依据。由于动物和人存在物种差异, 试验结果外推到人有一定的局限性, 但可为初步估计人群允许接触水平提供有价值的信息。

参考文献

- [1] Ahmad U, Ahmad R S, Arshad M S, et al. Antihyperlipidemic efficacy of aqueous extract of *Stevia rebaudiana* Bertoni in albino rats [J]. *Lipids in Health and Disease*, 2018, 17(1): 175
- [2] Carrera-Lanestosa A, Moguel-Ordóñez Y, Segura-Campos M. *Stevia rebaudiana* bertoni: a natural alternative for treating diseases associated with metabolic syndrome [J]. *Med Food*, 2017, 20(10): 933-943
- [3] Alavala S, Sangaraju R, Nalban N, et al. Stevioside, a diterpenoid glycoside, shows anti-inflammatory property against dextran sulphate sodium-induced ulcerative colitis in mice [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2019, 855(15): 192-201
- [4] Barba F J, Criado M, Beldagalbis C M, et al. *Stevia rebaudiana* Bertoni as a natural antioxidant/antimicrobial for high pressure processed fruit extract: processing parameter optimization [J]. *Food Chemistry*, 2014: 261-267
- [5] Sansano S, Rivas A, Pinaperez M C, et al. *Stevia rebaudiana* Bertoni effect on the hemolytic potential of *Listeria monocytogenes* [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2017, 250(5): 7-11
- [6] He J, Zhu N L, Kong J, et al. A newly discovered phenylethanoid glycoside from *Stevia rebaudiana* Bertoni affects insulin secretion in rat INS-1 islet beta cells [J]. *Molecules*, 2019, 24(22): 4178
- [7] Chen J, Xia Y, Sui X, et al. Steviol, a natural product inhibits proliferation of the gastrointestinal cancer cells intensively [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(41): 26299-26308
- [8] Wolwer-Rieck U. The leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), their constituents and the analyses thereof: a review [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(4): 886-895
- [9] Salehi B, Lopez M D, Martinezlopez S, et al. *Stevia rebaudiana* Bertoni bioactive effects: from *in vivo* to clinical trials towards future therapeutic approaches [J]. *Phytotherapy Research*, 2019, 33(11): 2904-2917
- [10] 杨全花, 陈光, 任红梅, 等. 甜叶菊化学成分及其甜度的研究 [J]. *北京化工大学学报(自然科学版)*, 2012, 39(2): 28-32
YANG Quan-hua, CHEN Guang, REN Hong-mei, et al. Study on chemical constituents and sweetness of *Steviol rebaudiana* [J]. *Journal of Beijing University of Chemical Technology (Natural Science)*, 2012, 39(2): 28-32
- [11] Singla R, Jaitak V. Synthesis of rebaudioside A from stevioside and their interaction model with hTAS2R4 bitter taste receptor [J]. *Phytochemistry*, 2016, 125: 106-111
- [12] 万会达, 李丹, 夏咏梅. 甜菊糖苷类物质的功能性研究进展 [J]. *食品科学*, 2015, 36(17): 264-269
WAN Hui-da, LI Dan, XIA Yong-mei. Progress in Functions of Steviol Glycosides [J]. *Food Science*, 2015, 36(17): 264-269
- [13] 李红, 向增旭. HPLC 法测定不同产地甜叶菊中糖苷含量 [J]. *江苏农业科学*, 2012, 40(8): 306-307
LI Hong, XIANG Zeng-xu. Determination of glycosides in *Stevia rebaudiana* from different habitats by HPLC [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2012, 40(8): 306-307

- [14] Prakash I, Markosyan A, Bunders C, et al. Development of next generation stevia sweetener: rebaudioside M [J]. *Foods*, 2014, 3(1): 162-175
- [15] 叶玉稳,王璐,胡国华. 莱鲍迪苷 M 及其复配甜味剂在无糖酸奶中的应用[J]. *食品科学技术学报*, 2020, 38(3): 111-118
YE Yu-wen, WANG Lu, HU Guo-hua. Application of rebaudioside M and compound sweetener in sugar-free yogurt [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2020, 38(3): 111-118
- [16] Chen L, Sun P, Zhou F, et al. Synthesis of rebaudioside D, using glycosyltransferase UGTSL2 and *in situ* UDP-glucose regeneration [J]. *Food Chem*, 2018, 259: 286-291
- [17] Prakash I, Bunders C, Devkota K P, et al. Isolation and characterization of a novel rebaudioside M isomer from a bioconversion reaction of rebaudioside A and NMR comparison studies of rebaudioside M isolated from *Stevia rebaudiana* Bertoni and *Stevia rebaudiana* Morita [J]. *Biomolecules*, 2014, 4(2): 374-389
- [18] Olsson K, Carlsen S, Semmler A, et al. Microbial production of next-generation stevia sweeteners [J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15(1): 207
- [19] GB 15193-2014, 食品安全性毒理学评价程序与方法(2014)[S]
GB 15193-2014, Procedures and Methods for Toxicological Assessment of Food (2014) [S]
- [20] Rumelhard M, Hosako H, Eurlings I M, et al. Safety evaluation of rebaudioside A produced by fermentation [J]. *Food Chem Toxicol*, 2016, 89(1): 73-84
- [21] Nikiforov A I, Rihner M O, Eapen A K, et al. Metabolism and toxicity studies supporting the safety of rebaudioside D [J]. *International Journal of Toxicology*, 2013, 32(4): 261-273
- [22] EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources (ANS). Scientific opinion on the safety of steviol glycosides for the proposed uses as a food additive [J]. *EFSA Journal*, 2010, 8(4): 1537.
- [23] Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additive (JECFA). Summary and conclusions of the seventy-third meeting of joint FAO/WHO expert committee on food additives [R]. Geneva: FAO/WHO, 2010
- [24] Purkayastha, Sidd, Pugh, et al. *In vitro* metabolism of rebaudioside B, D, and M under anaerobic conditions: comparison with rebaudioside A [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2014, 68(2): 259-68
- [25] Renwick A G. The use of a sweetener substitution method to predict dietary exposures for the intense sweetener rebaudioside A [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2008, 46(7): S61-S69

(上接第 105 页)

- [31] Zhao L, Feng R, Ren F, et al. Addition of buttermilk improves the flavor and volatile compound profiles of low-fat yogurt [J]. *LWT*, 2018, 98: 9-17
- [32] Vénica C I, Bergamini C V, Rebecchi S R, et al. Galacto-oligosaccharides formation during manufacture of different varieties of yogurt. Stability through storage [J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2015, 63(1): 198-205
- [33] 刘梅森,何唯平,赖敬财,等. 奶粉脂肪酸与乳制品风味关系研究[J]. *中国乳品工业*, 2008, 2: 13-15
LIU Mei-sen, HE Wei-ping, LAI Jing-cai, et al. Relationship between fatty acids in milk powder and flavor of dairy products [J]. *Chinese Dairy Industry*, 2008, 2: 13-15
- [34] 李广富,陈伟,范路平,等. 灵芝功能成分酸奶营养品质与风味物质分析[J]. *食品科学*, 2015, 36(10): 168-173
LI Guang-fu, CHEN Wei, FAN Lu-ping, et al. Analysis of nutritional quality and flavor of functional components of *Ganoderma lucidum* yogurt [J]. *Food Science*, 2015, 36(10): 168-173
- [35] 王富云,王成财,王哲铭,等. 虾青素微球对酸奶品质与风味的影响 [J/OL]. *食品科学*, 2020-7-22, <https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=CAPJ&dbname=CAPJLAST&filename=SPKX2020072001M&v=17WwU59A5kC8jB7UYAWL3Kn1IHB3bUFqrAbdX6WX42AOOcFcLwHTm4G0wey7SS16>
WANG Fu-yun, WANG Cheng-cai, WANG Zhe-ming, et al. Effect of astaxanthin microspheres on quality and flavor of yogurt [J/OL]. *Food Science*, 2020-7-22, <https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=CAPJ&dbname=CAPJLAST&filename=SPKX2020072001M&v=17WwU59A5kC8jB7UYAWL3Kn1IHB3bUFqrAbdX6WX42AOOcFcLwHTm4G0wey7SS16>