

新 甘味 資源 Stevioside의 安全性에 關한 研究

李相稷 · 李甲郎 · 朴正陸 · 金光秀 · 蔡範錫*

嶺南 大學校, 食品 營養 學科 · *서울 대학교, 人口 醫學 研究所
(1979년 7월 12일 수리)

A Study on the Safety of Stevioside as a New Sweetening Source

Sang Jik Lee, Kap Rang Lee, Jyung Rewng Park, Kwang Soo Kim and Bum Suk Tchai*

Department of Food and Nutrition, Yeungnam University, Daegu

*Institute of Reproductive Medicine and Population,

Seoul National University

(Received July 12, 1979)

Abstract

The safety of the sweetening component of stevia was studied by administrating it to the rats. The LD₅₀ determined by intraperitoneal injection was 3,400 mg/Kg as the stevia extract containing 50 % stevioside, i.e. LD₅₀ of stevioside was more than 1,700 mg/Kg. Oral administration of large quantities of the stevia extract for 56 days resulted in no effect on the growth of rats.

The analyses of total blood (RBC, WBC, Hb and Hct), 17 blood serum components including total protein, glucose, cholesterol, GOT, and 11 items of findings on the liver tissues including nuclear deterioration of liver cells, proliferation of Kupffer cells, fibrosis of portal area showed no significant differences between control and treatments except lactate dehydrogenase activity after 56 day-oral administration of the extract.

From the results obtained, it was supposed that the stevia extract/stevioside revealed no acute or sub-acute toxic effects on rats.

서 론

식품 성분으로서의 甘味에 대한 인간의 요구는 절대적인 것으로 古來로 설탕이 주로 이 요구에 부응해 왔으나, 그의 감미도, 경제성 및 위생 문제등 복합적 요인 때문에 그에 대신하는 安全 甘味料의 필요성이 제기되고 있다. 설탕 이외에도 지금까지 사용된 合成 甘味料 및 天然 甘味料는 상당수 있지만, 합성품은 發癌性 등 安全性의 문제가 대두되고 있고, 천연 감미료는 오래 전부터 사용해 온 역사가 있어 비교적 무해한 것으로 간주되는데, 그중에서 감미의 質이나 경제성의

견지에서 탁월하다고 생각되는 것이 多年生 草木 stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*)의 감미 성분이다. Stevia의 감미 성분 가운데 主成分은 stevioside(葉의 6~12%)라고 칭하는 포도당 배당체인데 이것은 설탕의 약 300 배의 감미도를 나타내는 無色 無臭의 非吸濕性 고체이다.

현재 원산지인 南美의에 日本, 臺灣, 기타 東南 아시아에서 주로 재배되고 있는데, 韓國에는 1973년에 처음으로 도입된 이래 이에 대한 관심이 높아졌고, 재배 면적이 늘어나고 있으며 감미 성분 추출용으로 對日 輸出도 이루어지고 있다⁽¹⁾. 본 연구자들 중 1인은 1976년에 stevia의 재배 시험과 감미 성분의 함량 분석

에 관한 연구를 행하여 양호한 결과를 보고한 바 있으며, 농업 관계 기관 및 기타 연구진에 의하여서도 이 감미 자원의 開發과 實用化의 연구를 행하고 있다^(2,3).

日本에서는 1971년 브라질로 부터 種子를 도입하여 현재 이 植物의 감미 성분 추출물을 市販하고 있는 실정이나, 韓國에서는 아직 감미 자원으로서의 실용화가 이루어 지지 않고 있다.

甘味度 및 甘味質이 탁월하고 대량 재배가 가능한 본 甘味 資源의 開發 利用에 先行하여, 저자들은 stevia의 감미 성분의 食品學的 安全性을 檢討하고 저 實驗動物에 投與하여 그에 미치는 영향을 營養學的, 血液化學的, 藥物學的 및 組織學的으로 확인 하였기에 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

Stevioside의 정제

陰地에서 건조하여 暗所에 보관한 stevia의 乾葉 400 g을 3.5 l의 70% 에탄올에 1주일 浸漬한 다음 Büchner funnel을 사용하여 吸引 濾過하고 1.5 l의 70% 에탄올로 洗滌하여 그 추출액을 얻었다. 1차 추출을 거친 stevia 葉은 다시 2차에 걸쳐 메탄올 1.5 l씩으로 3일간씩 반복 추출하여 原液과 함께 回轉式 濃縮器(rotary evaporator)로 40°C이하에서 粉末狀으로 될 때까지 減壓 濃縮 乾燥 하였다. 이 粉末狀 추출물을 500 ml의 증류수에 녹여 常壓에서 여과하여 殘渣를 제거하고 그 여액에 대하여 각 200 ml의 에테르로서 4회에 걸쳐 脂溶性 物質을 제거 하였다. 5회에 걸쳐 물로 포화된 100 ml의 부탄올을 상기 수용액에 가하여 上層을 취하여 粗 stevioside 용액으로 하였다. 이상의 分液 操作은 강하게 振盪하여 명료하게 두 相이 분리될 만큼 장시간 방치 함으로써 행하였다. 이 粗 stevioside 용액을 다시 회전식 농축기로 40°C 이하에서 감압하에 농축하여 건조 분말을 얻고 이것을 100 ml의 메탄올에 용해시켜 0°C에서 10일이상 靜置함으로써 stevioside를 結晶化 하였다.

急性 毒性 試驗

상기한 stevioside의 純結晶은 물에 대한 용해도가 극히 작으나(1.25 mg/ml), "Marumiron 50"(丸善 化成 株式 會社, stevia 추출물로서 50%의 stevioside 함유)은 용해성이 대단히 양호하여 高濃度 溶液의 제조가 가능하므로 이를 본 毒性 試驗에 제공 하였다.

Marumiron 50을 1.005 g/ml의 수용액으로 하여 autoclave로 滅菌후 생후 7~8개월의 흰쥐(300~400 g, ♂)에 腹腔 注射하여 72시간후의 生死를 조사하고

Table 1. Rat groups set according to the doses of stevia extract for the purpose of estimating growth rates*

Groups	Numbers of rats		Daily allowances of stevia ext. (g/rat)	Daily allowances of basal diet (g/rat)
	♂	♀		
Control	10	10	0.0	15.0
Test A	8	8	0.5	14.5
Test B	8	8	1.0	14.0

* Stevia extract used with the basal diet was: Marumiron 50 which could be supplied in large amounts from Maruzen Co. in Japan as an alternative to crystalline stevioside

Table 2. Composition of basal diet allowed to experimental rats*

Components	Contents (%)
Crude protein	>12.0
Crude fat	> 3.0
Crude fiber	< 7.5
Crude ash	< 9.0
Calcium	> 0.4
Phosphorus	> 0.4
Calorie	>2,600 Kcal/kg

* Guaranteed values of the Maker. No fortification was done because the rats, living on the diet, had shown normal growth and no apparent nutritional symptoms of deficiencies throughout their life span

Behrens-Kärber법⁽⁴⁾에 따라 $LD_{50}=LD_{100}-(\sum xd)/m$. (x : 두 연속된 用量으로 사망한 동물수의 합의 1/2, d : 두 연속된 用量의 差, m : 한 群의 동물 수)를 계산 하였다.

실험 동물의 成長 狀態

生後 70일의 흰쥐 52마리를 Table 1과 같이 3개군으로 나누어 일정량(0, 0.5 및 1 g)의 Marumiron 50를 함유한 基本 飼料(대구시 우성 실험 주식 회사제 配合 飼料)를 매일 15 g/首씩 제공하여 56일간 自由 攝取(ad lib intake)하도록 하여 그의 체중 증가를 측정하여 비교 하였다. 기본 사료의 主成分은 Table 2와 같다.

全血 檢査

Table 1에서 기술한 바와 같이 일정 기간 stevia 추출물을 투여한 동물을 클로로포름으로 麻醉하여 割腹하고 주사기(200 ml, 20 KG)로 심장으로부터 全血을 채취 하였다. 2 ml용 해파린管에 1 ml씩의 全血을 취하여 잘 섞은 후 다음과 같이 赤, 白血球(RBC, WBC), 헤

모글로빈(Hb) 및 充填 血球 容積(Hct)을 측정하였다.

가. RBC와 WBC

Automaticquick pipette를 사용하여 0.02 μl의 혈액을 취하여 0.85 %식염수 10 ml로 稀釋한 다음 “하계” 용액 2방울을 떨어뜨려 혼합하고 10분간 방치해서 自動 血球 計數器(blood cell counter, ACM-30, Erma Opt. Works Ltd.)로 측정하였다.

나. Hb

시험관에 Drabkin's solution(1.25 g dry mix./l, dry mix.: 50 mg KCN+1 g NaHCO₃+200 mg K₃Fe(CN)₆)을 5 ml 취하고 Sahli 피펫으로 헤파린 처리된 혈액을 20 μl 가하여 잘 섞은 다음 5분 경과 후 543 nm에서의 흡광도를 측정하고 g Hb/100 ml=A×36.8에 의하여 Hb의 농도를 계산하였다(6).

다. Hct

Micro-hematocrit tube(Clay Adams, 길이 75 mm, 內徑 1.10 mm)에 헤파린 처리된 혈액을 눈금 까지 채워 下部를 봉하고 microanalysis centrifuge(Unitron Manuf. Co., Model 329)로 5분간 원심분리 후 充填 血球部의 길이를 microhematocrit reader로 측정하였다.

血清 檢査

위에서 기술한 바와 같이 채취한 혈액의 나머지 부분은 室溫에서 응고 시킨 후 원심 분리하여 다음과 같은 각종 성분의 분석에 제공할 혈청을 얻었다.

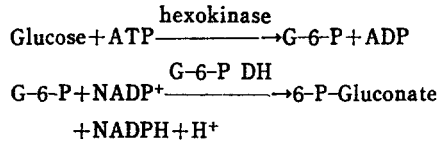
가. 總 蛋白質 및 그 分劃

혈청 총 단백질은 biuret 형성을 측정하는 Skeggs-Hochstrasser 방법(6)에 따라, Technicon MT II autoanalyzer를 사용하여 정량하였다.

혈청 알부민, α₁-, α₂-, β-, 및 γ-글로불린의 분리, 정량은 Kaplan-Savory의 방법(7)에 따라 Beckman microzone cellulose acetate electrophoresis system을 사용하여 시행하였다. Cellulose acetate membrane(5.8×14.5 cm)과 barbital 완충액(pH 8.6, μ=0.075)을 사용하여 250 V, 3.5~5.8 mA/strip의 조건하에서 혈청을 18~20분간 전기 영동시킨 후, 3% 삼염화 초산과 sulfosalicylic acid를 함유하는 0.2% Ponceau 고정 염료로 염색하고 5% 초산으로 3회 세척하였다. 다음에 membrane을 알코올로 탈수시키고 洗淨液(30% 시클로헥사논의 에탄올 용액)에 1분간 浸漬하여 硝子板上에서 70~80°C로 15~20분간 가열하였다. 각 단백질 분획은 integrative densitometer에 의해 520 nm filter를 사용하여 그 백분율을 측정하고 총 단백질 양에 그 분율을 곱하여 정량하였다.

나. 포도당

Technicon MT II autoanalyzer(이하 모든 혈액 화학치 및 효소 활성의 측정은 본 機器를 사용하였음)를 사용하여 Schmidt 방법(8)에 의하여 아래 반응에 의하여 생성된 NADPH의 농도를 340 nm의 흡광도로 부터 측정함으로써 포도당의 농도를 측정하였다.

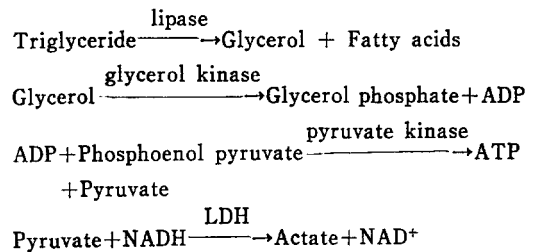


다. 총 콜레스테롤

Klose-Greif-Hagen의 방법(9)에 따라 콜레스테롤을 정량하였다. 콜레스테롤 에스테르는 cholesterol esterase에 의하여 유리 콜레스테롤로 변하게 하고 유리 콜레스테롤은 산화시켜 과산화수소를 생성하게 한 다음, 이 과산화수소가 quinoneimine dye를 형성하도록 하였다. 520 nm의 흡광도로 측정할 수 있는 이 염료의 농도는 혈청 시료의 콜레스테롤 함량에 정비례 하였다.

라. Triglyceride

Triglyceride는 Buccolo-David의 방법(10)에 따라 정량 하였다. Triglyceride는 다음과 같은 일련의 생화학 적 반응에 의하여 NADH를 소모하게 되므로 340 nm에서의 흡광도의 감소로 부터 이를 정량 하였다.



마. Creatinine

Creatinine의 정량은 Chasson-Grady-Stanlay의 방법(11)에 따랐다. 즉, creatinine이 알칼리 존재하에서 피크린산과 반응하여 생성된 着色 物質을 505 nm의 흡광도로써 정량 하였다.

바. 뇨소

Marsh-Fingerhut-Miller의 방법(12)에 따라 뇨소가 약 산성 용액내에서 diacetyl-monoxime, 3가철 이온 및 thiosemicarbazide에 의하여 생성된 착색 물질을 520 nm에서 정량 하였다.

사. 칼슘

Gitelman의 방법(13)에 따라 칼슘이 8-hydroxy-quinoline과 반응하여 생성된 着色 錯物을 570 nm에서의 흡광도로 부터 정량 하였다.

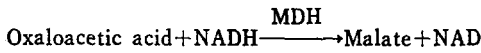
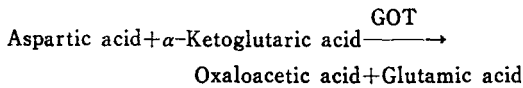
아. 無機磷

Hurst-Kraml의 방법(14)에 따라 황산의 작용으로

생성된 인산이 ammonium molybdate와 반응하여 phosphomolybdic acid를 생성하고 이것이 stannous chloride-hydrazine에 의하여 환원 되어 생성한 molybdenum blue를 660 nm에서 측정 하였다.

자. Glutamic oxaloacetic transaminase(GOT)의 활성

Rush의 방법⁽¹⁵⁾에 따라 GOT의 촉매 작용으로 생성된 oxaloacetic acid가 malate dehydrogenase(MDH)에 의하여 환원될 때 소모되는 NADH를 340 nm에서 측정 하였다.



차. Alkaline phosphatase의 활성

Morgenstern의 방법⁽¹⁶⁾에 따라 基質 p-nitrophenyl phosphate에 대하여 이 효소가 작용하여 생성된 p-nitrophenol이 2-amino-2-methyl-1-propanol과 형성하는 착색 물질을 410 nm에서 측정 하였다.

카. Lactic dehydrogenase(LDH)의 활성

Morgenstern의 방법⁽¹⁷⁾에 따라 lactate가 NAD⁺와 반응하여 생성하는 NADH를 340 nm에서 측정 하였다.

肝 組織 檢査

全血 檢査에서 기술한 바와같이 割腹한 쥐의 간조직切片을 0.85 % NaCl로 세척하고 濾紙로 물기를 제거한 다음 즉시 증성 포르말린(40 % 100 ml, sodium phosphate monobasic 4 g, sodium phosphate dibasic 6.5 g을 포함한 1 l 수용액)에 24시간 固定한 후 파라핀으로 包埋하여 7μ 두께로 薄切하고 hematoxylin-eosin 용액으로 염색하여 광학 현미경으로 관찰 하였다. 광학 현미경 所見의 기술은 관례에 따라 별 변화가 없을 때를 -, 아주 輕할 때를 ±, 輕中의 것을 +, 中等度를 ++, 아주 甚할 때를 +++로 표시하여 서로 비교 하였다.

결과 및 고찰

Stevioside의 精製

乾葉의 70 % 에탄올 抽出物에 대하여 물 : 부탄올系를 이용한 分液 方法으로 結晶化한 stevioside는 薄層 크로마토그래피에서 單一 spot로 나타났으며 400 g의 재료로부터의 收率이 20 g이었다. Fig. 1에 나타낸 바와같이 이 結晶 stevioside는 丸善製 Marumiron 50의 主成分과 일치하였다. Marumiron 50은 주 성분인

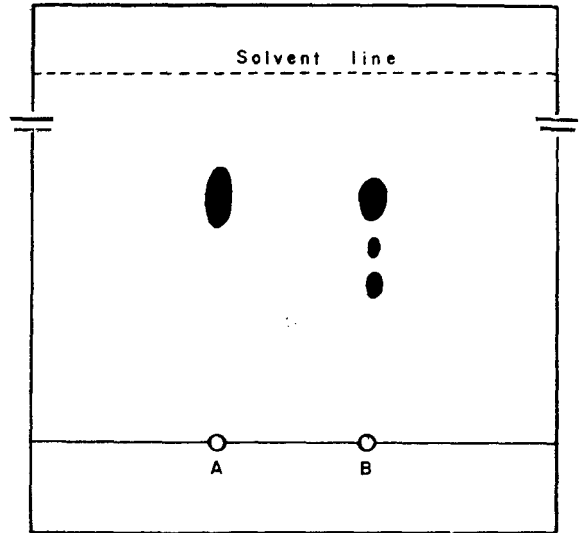


Fig. 1. Chromatogram of crystalline stevioside purified from the leaves of stevia and Marumiron 50

Thin-layer used was silica gel G activated for 2 hrs at 110°C just before use. Developing solvent was CHCl₃: CH₃OH:H₂O (14 : 6 : 1) and detection was carried out by charring with 5 % H₂SO₄ in CH₃OH. R_f value for stevioside was 0.36. A : crystalline stevioside purified from the leaves of stevia. B : stevioside purified from Marumiron 50

stevioside 외에 다른 성분도 함유하고 있는 것이나, stevia 葉 由來의 성분만으로 구성되어 있고, 溶解性이 양호하며, 大量 供給이 가능 하였기에 본 安全性 研究에 제공 하였던 것이다.

急性 毒性 試驗

Behrens-Kärber법에 따라 Table 3과 같은 결과로부터 산출한 LD₅₀ 값은 3,400 mg/Kg인데, 이를 stevioside만으로 한다면 1,700 mg/Kg이 된다. 純 stevioside 口腔 投與의 LD₅₀는 8.2 g/Kg으로 보고 되어 있는 바⁽¹⁸⁾, 본 연구의 복강 투여에 의한 값이 훨씬 적은 것은 일반적으로 모든 藥物에서 볼 수 있는 경향과 마찬가지로이다. LD₅₀=3,400 mg/Kg 혹은 1,700 mg/Kg의 값은 상당히 높은 값이므로 stevioside는 사실상 급성 독성이 없다고 관정함이 타당할 것이다.

실험 동물의 體重 增加

Stevia 抽出物을 투여한지 56일간의 각 動物群의 체중 증가량은 Table 4와 같다. Stevia 抽出物을 투여한 試驗群(test group)은 對照群(control group)과 마찬가지로 순조로운 체중 증가를 나타내었다.

Table 3. Results for the calculation of lethal dose of stevia extract after Behrens-Kärber*

Amount administered (mg/Kg)	Numbers of rats used	Numbers of rats died	z^{**}	d^{***}
2,500	10	1	2.0	600
2,900	10	3		
3,400	10	4	3.5	500
3,750	10	6		
4,100	10	8	5.0	330
4,500	10	10		
			7.0	350
			9.0	400

* Doses were injected intraperitoneally

** Means of two adjacent numbers of rats died

*** Differences of two adjacent amounts administered

Table 4. Weight gains of rat groups for 56 days of oral administration of stevia extract

Groups	Daily allowances of stevia extract (g/rat)	Weight gains*	
		♂	♀
Control	0	72±6.5	52±4.4
Test A	0.5	70±5.2	51±5.0
Test B	1.0	71±5.8	53±3.6

* Arithmetic means and their standard deviations

Table 5. Blood cell countings, hemoglobin concentrations and hematocrits of animal groups

Groups*	RBC(ten thousands/ μ l)		WBC		Hb(g/dl)		Hct(%)	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Control	452.5±65.9	425.0±6.2	2,650±702	3,266±1,033	12.7±1.76	12.2±0.26	43±0.81	40.5±0.71
Test A	464.0±36.9	449.0±47.6	2,828±1,622	5,457±2,289	13.3±0.94	12.8±1.28	42±3.50	44.3±3.76
Test B	397.5±44.9	444.0±29.7	2,650±1,538	1,742±750	11.5±1.30	12.8±0.80	42±4.10	41.9±3.96

* Notations for animal groups as in Table 4

全血 検査

全血중에 함유되어 있는 血球數, 헤모글로빈 농도 및 充填 血球 容積은 Table 5과 같다.

3개군의 RBC, Hb 및 Hct 값은 雌雄을 막론하고 有意差를 발견할 수 없었다. 단 WBC가 수컷에서는 3개군이 유사하나 雌性에서 크게 차이가 나는 것은 WBC 값의 散布가 넓음(1,100~9,400)에 기인한 우연한 결과로 간주된다.

血清의 分析

Technicon MT II 自動 分析器 및 Beckman microzone cellulose acetate 電氣 泳動 裝置를 사용하여 실험 방법에서 기술한 원리로 측정된 혈청 단백질 및 그 分割의 양과 諸 血液 化學值를 Table 6, 7 및 8에 요약하여 제시하였다. 각 평균치의 차이의 統計學的 有意성을 판별하기 위하여 student's *t*-test를 행하였

으며 P값이 0.02보다 작은 경우에 그 차이를 有意한 것으로 보았다.

Table 6의 혈청 단백질 값은, 28개 有意성 검정에서 단 1개(試驗群 A(♀), β -globulin)가 $0.01 < P < 0.02$ 로서 有意한 것으로 나타났으나 試驗群 B에서는 암·수 모두 有意차를 보이지 않았으므로 試驗群 A(♀)의 有意성을 의심하게 되고 따라서, 전반적으로 볼 때 stevia 추출물 투여에 따른 특별한 함량 및 組成상의 변동은 없다고 사료된다.

Table 7의 7개 혈액 성분의 경우, 試驗群 A(♂)의 creatinine 항목에서 $P < 0.01$ 로 有意 차를 나타내고 있으나 同群의 수컷에서는 有意차가 없으며, 同 測定 項目의 stevia 추출물 大量 投與群인 B群에는 암·수 모두 有意차가 전혀 없으므로 A(♂)군의 有意성을 破棄하여도 무방할 것으로 본다. 無機磷 항목의 B(♀)군

Table 6. Serum proteins of rat groups and their electrophoretic fractions

Serum protein components**	Control		Test A		Test B	
	♂	♀	♂(p)	♀(p)	♂(p)	♀(p)
Total protein	6.8±0.5	7.0±0.4	6.3±0.1 (0.05~0.1)	6.5±0.2 (0.02~0.05)	6.3±0.3 (0.1~0.2)	6.7±0.3 (0.1~0.2)
Albumin	2.9±0.4	2.8±0.2	2.8±0.1 (0.6~0.8)	1.7±0.4 (0.6~0.8)	2.5±0.1 (0.1~0.1)	2.9±0.1 (0.5~0.6)
α ₁ -Globulin	0.7±0.1	0.6±0.1	0.7±0.9 (>0.9)	0.6±0.1 (0.6~0.8)	0.6±0.1 (0.1~0.4)	0.5±0.1 (0.05~0.1)
α ₂ -Globulin	1.0±0.2	0.9±0.1	0.8±0.1 (0.2~0.3)	0.8±0.1 (0.2~0.4)	0.9±0.1 (0.6~0.8)	0.9±0.1 (0.4~0.5)
β-Globulin	1.3±0.3	1.5±0.3	1.1±0.1 (0.2~0.3)	1.1±0.1 (0.01~0.02)	1.5±0.1 (0.5~0.6)	1.4±0.2 (0.2~0.4)
γ-Globulin	0.9±0.2	1.3±0.3	0.9±0.1 (0.8~0.9)	1.1±0.2 (0.1~0.2)	0.8±0.1 (0.4~0.5)	1.1±0.1 (0.2)
A/G	0.8±0.2	0.7±0.2	0.8±0.0 (0.8~0.9)	0.8±0.1 (0.1~0.2)	0.7±0.0 (>0.9)	0.8±0.1 (0.2~0.4)

* Notations for animals groups as in Table 4

** Values for all components are in g/ml. A/G represents ratio of albumin to globulin

Table 7. Some blood chemical values of experimental rat groups

Blood chemical values**	Control		Test A		Test B	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Glucose	190.7±22.5	168.0±25.9	176.0±19.6 (0.2~0.4)	170.6±14.9 (0.8~0.9)	194.0±31.0 (0.6~0.8)	173.0±25.2 (0.6~0.8)
Triglyceride	73.7±4.8	71.5±24.9	75.3±18.8 (0.8~0.9)	92.3±52.3 (0.5~0.6)	84.2±20.3 (0.4~0.5)	69.2±8.5 (0.8~0.9)
Total cholesterol	46.6±8.0	61.5±19.4	85.8±5.4 (0.4~0.5)	42.1±4.0 (0.05~0.1)	46.1±4.0 (>0.9)	53.5±13.0 (0.4~0.5)
Creatinine	0.48±0.09	0.50±0.11	0.70±0.07 (<0.01)	0.53±0.08 (0.6~0.8)	0.52±0.16 (0.6~0.8)	0.52±0.07 (0.6~0.8)
Urea	30.6±3.2	31.6±10.3	26.6±3.5 (0.1~0.2)	26.0±4.1 (0.1~0.2)	29.3±5.4 (0.6~0.8)	29.9±4.7 (0.6~0.8)
Inorg. phosphorus	7.50±0.82	6.84±0.44	7.30±1.22 (0.6~0.8)	5.98±0.85 (0.05~0.1)	6.95±0.57 (0.2~0.4)	5.28±0.56 (<0.01)
Calcium	10.2±0.22	9.9±0.35	10.4±0.30 (0.5~0.6)	10.4±0.23 (0.1~0.2)	9.9±0.31 (0.2~0.4)	10.4±0.42 (0.2~0.4)

* Notations for animal groups as in Table 4

** All the values are in mg/100 ml and in the parentheses are P values

Table 8. Some serum enzyme activities of experimental rat groups

Enzymes**	Control		Test A		Test B	
	♂	♀	♂(p)	♀(p)	♂(p)	♀(p)
Alkaline phosphatase	207.7±86.3	258.7±105.7	282.3±73.0 (0.8~0.9)	173.6±19.8 (0.1~0.2)	268.5±51.8 (>0.9)	292.3±106.5 (0.6~0.8)
GOT	168.0±55.8	162.0±32.4	155.3±27.3 (0.6~0.8)	117.6±15.4 (0.2~0.4)	129.0±5.9 (0.2~0.4)	173.0±38.3 (0.6~0.8)
LDH	376.7±132.0	680±207	551.6±167 (0.2)	200.6±87.5 (<0.01)	120.0±21.2 (0.01~0.02)	263.2±49.8 (<0.01)

* Notations for animal groups as in Table 4

** All the values of enzyme activities are in IU/l

Table 9. Light microscopic finding on the liver tissues of experimental rat groups

Items	Control		Test A		Test B	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Liver cell						
Nuclear deterioration	2.5	2.5	2.7	2.0	2.25	2.57
Hazy cell boundary	2.5	1.8	1.86	1.71	2.0	2.14
Hydropic cytoplasm	1.25	0.67	1.43	1.0	1.5	1.43
Flaky cytoplasm	2.0	1.83	2.29	1.43	1.5	1.71
Cytoplasm shrinkage	1.25	1.5	1.71	1.14	1.25	1.57
Mitosis	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Kupffer cell						
Proliferation	1.5	1.17	1.43	1.42	1.5	1.57
Phagocytosis	1.0	0.17	1.0	0.86	1.0	1.0
Portal area						
Fibrosis	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Inflam. infiltration	1.0	1.33	1.42	1.43	1.0	1.57
Bile duct proliferation	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Summation	13.0	11.0	13.8	11.0	12.0	13.6

* Notations for animal groups as in Table 4

($P < 0.01$)도 같은 이유로 그 유의성이 무시된다. 본 연구에서 측정된 3종 효소의 활성 가운데 LDH 활성이 試驗群에서 대체로 낮음을 Table 8에서 볼 수 있는 바, 이 부분은 장차 再 確認, 檢討 되어야 할 것이며 유의차가 다시 인정 된다면 그에 관한 生理學的 意義가 考察되어야 할 것이다.

肝 組 織 檢 査

실험 방법에서 언급한 바와 같은 광학 현미경에 의한 소견 一, 土, +, 卍 및 卐를 각각 0, 1, 2, 3, 및 4로 하여 그의 평균치를 계산하고 Table 9에 나타내었다. 어떤 항목을 막론하고 對照群과 試驗群이 特記 할만한 차이를 보이지 않고 소견이 유사하므로 stevia 추출물 투여에 의하여 간 조직의 異常은 초래되지 않는 것으로 보인다.

56일간 구강 투여 후의 全血 檢査(RBC, WBC, Hb 및 Hct), 血清 成分 分析(총 단백질, 血糖, 콜레스테롤, GOT 등 17개 조사 항목) 및 肝 組 織 檢査(간 세포核 頽廢, Kupffer 세포의 增殖, 門脈域 纖維化 등 11개 所見)는 총 33개 항목인데, 그 중 lactate dehydrogenase (LDH) 활성을 제외 하고는 모두 對照群과 試驗群 사이에 有意差를 볼 수 없었다.

상기한 실험 결과에 입각하여 stevia 추출물 및 stevioside는 원위에 대하여 急性 및 亞急性 毒性을 發現하지 아니하는 것으로 思料된다.

이 연구는 產學 協同 財團 學術 研究 補助로 이루어진 것이다.

문 헌

요 약

甘味 植物 stevia의 抽出物(主 甘味 成分, stevioside)을 원위에 투여함으로써 본 감미 성분의 安全性을 검토하였다.

腹腔內 注射로 致死量 LD₅₀를 측정된 결과 抽出物로 보아서는 3,400 mg/Kg이고 stevioside로 보면 1,700 mg/Kg이었으며, stevia 추출물의 56일간에 걸친 多量 口腔 投與(2.5~5.0 g/Kg·day)에도 실험 동물의 成長에 아무 障礙가 초래되지 않았다.

- 1, 農漁村 開發 公社 : 스테비아 開發 事業 實績 및 調查 報告 (1977)
- 2, 李鍾弼, 李盛雨, 曹秀悅, 金光秀 : 韓國 營養 食糧 學 會誌, 6(1), 55 (1977)
- 3, 金榮洙, 李喜子 : 韓國 食品 科學 會誌, 11(1), 56 (1979)
- 4, 高木敬次郎, 小澤光 : 藥物學 實驗法, 南山堂, p. 197 (1970)
- 5, Zijlstra, W. G. and Kampen, E. J. : *Clin. Chim.*

- Acta*, 5, 719 (1960)
6. Skeggs, L. T. and Hochstrasser, H. : *Clin. Chem.*, 10, 918 (1964)
 7. Kaplan, A. and Savory, J. : *Standard Methods of Clinical Chemistry*, 6, MacDonald, R. P., Eds., New York, Academic Press, Inc., p. 12 (1970)
 8. Schmidt, F. H. : *Klin. Wschr.*, 39, 1244 (1961)
 9. Klose, S., Greif, H. and Hagen, M. : *Clin. Chem.*, 21(7), 942(1975)
 10. Buccolo, G. and David, H. : *Clin. Chem.*, 19(5), 475 (1973)
 11. Chasson, A. L., Grady, H. T. and Stanley, M. A. : *AJCP*, 35, 83 (1961)
 12. Marsh, W. H., Fingerhut, B. and Miller, H. : *Clin. Chem.*, 11, 624 (1965)
 13. Gitelman, H. J. : *Anal. Biochem.*, 18, 521 (1967)
 14. Hurst, R. O. : *Can. J. Biochem.*, 45, 2015 (1967) / Kraml, M. : *Clin. Chim. Acta*, 13, 442 (1966)
 15. Rush, R. L. : *Clin. Chem.*, 6, 530 (1970)
 16. Morgenstern, S. : *Clin. Chem.*, 11, 876 (1965)
 17. Morgenstern, S. : *Anal. Biochem.*, 13, 149 (1965)
 18. 九善化成株式會社 : 스테비오사이드의 食品への 利用 p. 3 (1978)