

TERATOGENICITY STUDY OF SODIUM GLYCYRRHIZINATE IN THE DEVELOPING CHICK EMBRYO

Jae-Jun Choi, Yong-Soon Lee* and Hee-Yul Ahn**

Eli Lilly Asia Inc., (Korea Branch) and College of Veterinary Medicine, Seoul National University* and College of Medicine, Chung Buk National University** Suwon 440-744, Korea

(Received November 15, 1989)

(Accepted December 10, 1989)

ABSTRACT: Potential teratogenicity of sodium glycyrrhizinate in developing chick embryo was investigated. Body length was shortened significantly by dosage related when compared to untreated and vehicle control, but there was no significant difference on body weight, hind-limb length, claw length in all of the groups.

Key words: Sodium glycyrrhizinate, Chick embryo

서 론

최근에 식품공업이 발달됨에 따라 가공식품에는 식품의 상품적 가치향상, 보존, 영양강화, 식욕증진 등 여러가지 목적에 의해 다양한 식품첨가물이 사용되고 있다. 그러나 대부분의 식품첨가물은 다소의 독성을 지니고 있고, 또한 빈번한 사용에 의한 체내의 누적으로 만성중독을 유발할 가능성이 있어 그에 대한 안전성을 확보할 필요가 있다.

우리나라에서 식품첨가물의 규제는 식품위생법에 의해 첨가물의 범위를 규정하고 있을 뿐, 거의 기형, 독성학적 평가가 이루어지고 있지 않은 실정이어서 안전성의 확보를 위해 기형, 독성학적 screening test의 필요성이 절실히 요구되어지고 있다.

된장에 간장에 사용하고 있는 sodium glycyrrhizinate는 설탕이 약 200배의 지속성있는 독특한 단맛을 내는 감미료로써 우리나라에서는 된장과 간장에 허가되어 있는 식품첨가물이다. 된장에는 제품 1 kg 당 0.03~0.07g 정도 사용하고 있다(한국식품공업협회, 1985).

본 연구의 목적은 계태아를 이용하여(Goel, 1976; Gebhard, 1968; Greenberg, 1970; Hoffman, 1982; Maclaulhin, 1963; Malic, 1965; Verrett, 1964; Walker, 1971) 현재 국내에서 식품첨가물로 사용되고 있는 sodium glycyrrhizinate의 기형 독성 유무를 확인하고, 그에 대한 안전성을 파악함으로써 국민보건향상에 이바지하고자 한다.

재료 및 방법

시험용 수정란

국내의 SPF 계란 생산장인 천호 SPF 계란 농장으로부터 모든 수정란을 구입하였다. 수정율과 부화율이 90% 이상으로서 품종은 White Leghorn이며 대형란과 소형란을 골라낸 52~63g의 것을 사용하였다.

Table 1. Experimental groups and each treatment of sodium glycyrrhizinate

	Untreated Control	Vehicle Control (D.W.)	Low Dose	Middle Dose	High Dose
Treatment *		1 ml/egg	0.25 mg/egg	0.5 mg/egg	1.0 mg/egg
Administration Time (hr)	96 hr				
Administration Route	cover egg surface under the air sac				

* Each group consisted of 15 eggs.

시험물질

된장과 간장에 사용하고 있는 감미료인 sodium glycyrrhizinate 를 시험물질로서 사용하였다.

시험군 설정 및 투여실험

실험설계와 각 군의 처치내용 및 수정란의 수는 Table 1에 나타내었다. 무처치 대조군을 설정하고 sodium glycyrrhizinate 을 증류를 용매로 사용하여 실험설계에 맞는 용량을 녹여 4일간 발육시킨란의 혈관 분포가 왕성이 일어날 때 기실밑 난각표면에 도포하였다. 투여량은 저용량(0.25 mg/egg), 중간용량(0.5 mg/egg), 고용량(1.0 mg/egg)으로 나누어 용매에 녹인 다음 검란하여 투여용량이 1 ml 씩 되도록 조제하여 각각 도포하였다. 이렇게 도포한 이유는, 위 용량이 기실 투여 용량인 0.1 ml 정도의 적은 양으로는 전부 용해되지 않을 뿐만 아니라 시험물질이 점도를 갖고 있기 때문이다. 실제 점도를 갖고 있는 시험물질의 투여방법으로 난각표면에 도포하는 법이 많이 이용되고 있다. 용매 대조군도 동량의 용매를 기실 및 난각표면에 도포하였다.

부란기의 조건

상대습도, 온도, 공기순환 등을 조절할 수 있는 것으로 난좌를 회전시키는 교반시설이 갖추어진 부란기로써, 발육조건은 37.8°C의 온도와 상대습도 61%를 유지하도록 하였다.

검 란

검란은 매일 같은 시각에 행하였으며, 검란시 발육 정지란 및 사란을 수거하여 태아의 발육 정도를 검사하였고, 실제 현미경으로 기형 발생을 검색하였다(Hamburger와 Hamilton, 1951). 발육이 계속된 태아는 부란 22일까지 자연부화시켰으며 부화하지 않은 태아는 폐사된 것으로 간주하여 난각을 제거시킨 후 외형검사와 골격검사를 실시하였다.

검사와 통계학적 처리

부화된 병아리는 육안적으로 외형검사를 한 후 에테르로 마취시켜 체중, 체장, 전지와 후지의

Table 2. Effects of sodium glycyrrhizinate on the body weight and body length of hatchlings

	Untreated Control	Vehicle Control	Low Dose	Middle Dose	High Dose
Body Weight (g)	40.92 ± 2.30	41.50 ± 2.97	38.85 ± 2.33	41.47 ± 3.06	43.00 ± 3.18
Body length (cm)	9.63 ± 0.31	9.85 ± 0.24 ^{a)}	9.98 ± 0.27 ^{b)}	9.72 ± 0.22 ^{b, d)}	9.55 ± 0.15 ^{c, d)}
Fore-limb length (cm)	4.45 ± 0.29	4.41 ± 0.15	4.41 ± 0.18	4.08 ± 0.15 ^{a, d)}	4.09 ± 0.11 ^{a, d)}
Hind-limb length (cm)	6.49 ± 0.39	6.53 ± 0.13	6.51 ± 0.15	6.61 ± 0.13	6.50 ± 0.20
Claw length (mm)	3.86 ± 0.29	3.97 ± 0.13	3.90 ± 0.21	3.77 ± 0.46	3.83 ± 0.36
Beak length (mm)	1.30 ± 0.04	1.31 ± 0.03	1.29 ± 0.07	1.33 ± 0.10	1.31 ± 0.05

(Mean ± S.D.)

^{a)}Significantly different from the untreated control group (p < 0.001)^{b)}Significantly different from the untreated control group (p < 0.01)^{c)}Significantly different from the untreated control group (p < 0.05)^{d)}Significantly different from the vehicle control group (p < 0.001)**Table 3.** Experimental data demonstrating mortality rates and frequencies of embryos with malformations following treatment of sodium glycyrrhizinate

	Untreated Control	Vehicle Control	Low Dose	Middle Dose	High Dose
Total No. of embryos	15	15	15	15	15
No. of dead embryos				1	
No. of embryos with forelimb malformations					
No. of embryos with hindlimb malformations					
No. of embryos with brain malformation					
No. of embryos with eye defect					
No. of embryos with generalized edema					
No. of embryos with hematoma					
No. of embryos with congestion of occipital region		1		1	1
No. of embryos with cephalothoracopagus					
No. of embryos with cephalothoracopagus affected		1		2	1
No. of embryos affected including death		1		2	1

길이, 부리의 길이 등을 측정하고 부검을 하기 장기 검사를 하였으며(Faherty 등, 1972), 각 군마다 5마리씩을 Alizarin red S와 Alcian blue 로 이중염색하여 실제 현미경으로 골격검사를 하였다(Simons와 Vanhorn, 1971). 대조군과 실험군, 그리고 각 실험군간의 유의성 검정은 Student's T-test 로 하였다.

결 과

육안적인 외형검사

Sodium glycyrrhizinate 를 투여한 부화 병아리에서 체중, 체장, 전후지의 길이, 발톱 및 부리길이에 미치는 영향을 조사한 것이 Table 2 이다.

체중의 변화에서는 각 군에 차이가 없었으나, 체장에서 용매투여군과 시험물질 투여군 중에서 저농도와 중농도 투여군이 무처리 대조군보다 유의성있게 길게 나타났다. 그러나 고농도 투여군은 무처리 대조군이나 용매투여군에 비해서 유의성있게 짧게 나타났다. 전지의 길이는 중간농도 투여군과 고농도 투여군에서 무처리 대조군이나 용매투여 대조군에 비하여 유의성있게 짧게 나타났다. 그밖에 후지의 길이, 발톱 및 부리의 길이에서는 대조군과 실험군간에 유의성있는 변화를 볼 수가 없었다.

폐사율과 기형발생 정도

각 군의 폐사율과 기형발생수 및 종류는 Table 3 과 같다. Sodium glycyrrhizinate 를 투여한 계태아의 폐사율은 중간농도 투여군에서 한 마리 있었을 뿐 모두 정상이었다. 후두부가 충혈된 계태아가 중간농도 및 고농도 투여군에서 각기 한 마리씩 관찰되었으나 용매투여 대조군에서도 한 마리가 같은 후두부에 충혈을 보이는 것이 관찰되었다. 이외에 부검시 약물투여의 영향으로 생각되는 쇠약, 위축, 탈수상태의 개체들이 중간농도와 고농도 투여군에서 각기 한 마리씩 관찰되었으나, 이는 용매투여대조군에서도 같은 정도로 관찰되어 유의성은 없었다.

고 찰

일반적으로 독성이 약한 물질에서와 높은 독성과 기형을 유발시키는 물질에서의 기형의 형태는 다소 차이가 있다. Moscinoi 등(1976)은 유기인체에 의한 계태아 기형을 제 1형 증상과 제 2형 증상으로 구분하였다. 즉, 소지증(micromelia), 피모발생이상(abnormal feathering), 부리이상(abnormal beak) 등의 기형은 제 1형에 속하는 것으로 독성이 다소 약한 물질이나 저농도에서 흔히 보인다. 반면, 사경(wry neck), 단경(short neck), 관절만곡(muscular hypoplasia of the legs) 등은 제 2형에 속하는데, 높은 기형발생 물질의 고농도 투여에서 볼 수 있다.

Sodium glycyrrhizinate 투여 계태아에서는 외형적인 체장의 길이에서만 용량의존적으로 투여농도가 높을수록 체장의 길이가 유의성있게 짧아졌으나 기형의 발생은 없었다.

참고문헌

한국식품공업협회, 식품첨가공전, 성광문화사, pp.41-43(1985).

- Faherty, J.F., Jackson, B.A. and Greene, M.F. (1972): Surface staining of 1 mm (Wilson) slices of fetuses for internal visceral examination, *Stain Technol.*, **47**, 53-58.
- Gebhardt, D.O.E. (1968): The teratogenic action of propylene glycol (propanediol-1,2) and propanediol-1,3 in the chick embryo, *Teratol.*, **1**, 153-161.
- Goel, S.C., and Jornad, A. (1976): Effects of hydrocortison acetate on the development of chicken embryos, *Teratol.*, **13**, 139-149.
- Greenberg, J. and LaHam, O.N. (1970): Reversal of malathione-induced teratisms and its biochemical implications on the developing chick, *Canad. J. Zool.*, **48**, 1047-1053.
- Hamburger, V. and Hamilton, H.L. (1951): A series of normal stages on the development of the chick embryos, *J. Morphol.*, **88**, 49-92.
- Hoffman, D.J. and Eastin, W.C. Jr. (1982): Embryotoxic and biochemical effects of waste crankcase oil on bird's eggs, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **63**, 230-241.
- Marliac, J.P., Verrett, M.J., MaLaughlin, J. and Fitzhuch, O.G. (1965): A comparison of toxicity data obtained for twenty-one pesticides by the chicken embryo technique with acute oral LD₅₀ in rats, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **7**, 490-496.
- McLaughlin, J. and Marliac, J.P. (1973): The injection of chemicals into yolk sac of fertile eggs prior to incubation as a toxicity test, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **63**, 230-241.
- Moscioni, A.D., *et al.*, (1976) Kynureine formamidase inhibition as a possible mechanism for certain teratogenic effects of organophosphorus and methylcarbamate insecticides in chick embryo, *Biochem. Pharm.*, **26**, 2251.
- Simons, E.B. and VanHorn, J.R. (1971): A new procedure for whole-mount alcian blue staining of the cartilaginous skelton for chicken embryos, adapted to the clearing procedure on potassium hydroxide, *Acta Morphol. Neerl.-Scand.*, **8**, 281-292.
- Verrett, M.J., Marliac, J.P. and McLaughlin, J. (1964): Use of the chicken embryo in the assay of aflatoxin toxicity, *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, **47**, 1003-1006.
- Verrett, M.J., William, F.S., Reynaldo, E.F., Alterman, E.K. and Thomas, C.A. (1980): Toxicity and teratogenicity of food additive chemicals in the developing chicken embryo, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **58**, 265-273.
- Walker, N.E. (1971): The effect of malathion and malaoxon on esterases and gross development of the chick embryo, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **19**, 590-601.