

# 봉독침의 봉독함량분석

권기록\* · 장성봉\* · 차배천\*\*

\* 상지대학교 한의과대학 침구학교실

\*\* 상지대학교 생명자원과학대학

## Experimental Studies of quantitative evaluation using HPLC

Ki Rok Kwon\*, Seong Bong Jang\*, Bae Chon Cha\*\*

\* Department of Acupuncture & Moxibution, College of Oriental Medicine, Sangji University

\*\* Department of applied animal science, Sangji University

### Abstract

**Methods** : This study was conducted to carry out quantitative evaluation using HPLC

Content analysis was done using HPLC

**Results** : According to HPLC analysis, each BVA-1 contained approximately 0.36 $\mu$ g melittin, and BVA-2 contained approximately 0.54 $\mu$ g melittin. But the volume of coating was so minute, slight difference exists between each needle.

**Conclusions** : Above results indicate that the bee venom acupuncture can complement shortcomings of syringe usage as a part of Oriental medicine treatment, but extensive researches should be done for further verification.

**Key words** : Bee Venom Acupuncture, HPLC, melittin

## 1. 서 론

봉독침(Bee Venom Acupuncture, BVA)은 침침에 특수한 방법으로 일정량의 봉독을 코팅하여 침과 봉독을 결합시킨 것으로 새로운 개념의 한방의료 도구이다(특허출원 10-2005-0024321).

봉독침요법은 살아 있는 꿀벌의 독낭 안에 들어 있는 봉독을 전기 자극 등으로 추출하여 건조한 후, 정제 가공하여 辨證施治하는 新鍼療法으로 1회용 주사기를 사

용하여 경혈이나 질병과 유관한 부위에 주입하는 방법을 사용하고 있는데, 이는 다음과 같은 아쉬움이 있다. 첫째, 취혈의 정확도에서 정교함이 부족하고, 둘째, 임상에서 봉독침을 사용하고 싶지만 주사기에 대한 거부반응을 가지고 있는 한의사들이 많아 대중화의 걸림돌이 되고 있으며, 셋째, 한 주사기로 여러 부위를 시술하므로 드물게는 감염의 우려가 있고, 넷째 단시간에 많은 양의 봉독침이 주입되면서 유발되는 통증으로 인하여 pain shock과 같은 문제를 야기할 가능성이 있다. 이러한 문제를 개선하고자하는 목적으로 봉독침이 개발되었다.

아직은 연구단계이지만 침과 약침의 중간단계의 치

※ 교신저자 : 권기록, 상지대학교 한의과대학 침구학교실  
(Tel : 033-738-7503 E-mail: bcevenom@paran.com)

료법으로 한국한의학의 새로운 치료개념으로 발전할 가능성이 많은 시도로 판단되며, 보다 나은 품질관리와 치료효능에 대한 많은 연구가 이루어져야 할 것이다.

따라서 그 첫 번째 시도로서 HPLC를 이용한 봉독침의 봉독함량분석을 시행하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 실험방법 및 결과

### 1. 봉독침의 정량분석

#### 1) 봉독침

실험에 사용한 봉독침은 3중의 코팅구조로 구성되어 있다(Fig. 1).

Stainless still의 침침과 봉독층 사이의 첫 번째 층, 봉독층, 그리고 봉독과 외부의 접촉을 차단하기 위한 층으로 구성되어 있으며, 침이 피부층을 통과할 때 닦이거나 손상되지 않도록 특수건조방법을 사용하여 봉독의 성상에 변화를 주지 않으면서 고체의 형태로 균일하게 분포할 수 있도록 하였다(Fig. 2).

코팅에 사용된 봉독은 전기자극법으로 추출된 봉독을 무균실에서 정제하여 사용하였고, 동결건조된 분말을 3차 증류수에 희석하여 1.000%(이하 BVA-1)와 2.000%(BVA-2)의 두 종류로 만들어 코팅하였다.

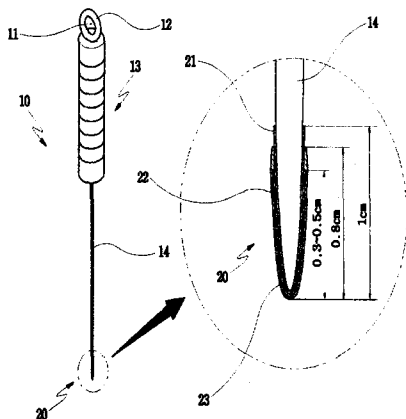


Fig. 1 The structure of Bee Venom Acupuncture



Fig. 2 Needle tip of Bee Venom Acupuncture

#### 2) Melittin의 함량분석

##### ① 검량선 작성

표준물질인 melittin을 여러 농도로 희석하여 20 $\mu$ l를 HPLC(High Pressure Liquid Chromatography)에 주입한 후 얻은 결과의 피크 면적을 x값으로, 표준물질의 농도를 y값으로 하여 표준검량곡선을 작성하였다.

HPLC 분석조건은 Table 1.에 나타내었고, 표준물질의 chromatogram은 Fig. 3-7과 같다. 그리고 검량선은 Fig. 8과 같으며 상관계수(Correlation coefficient)는  $r^2=0.9992$  ( $p<0.001$ )이었다.

Table 1. HPLC condition for analysis of melittin

Instrument			
Pump	9012 solvent delivery system, Varian Co.		
Detector	9050 variable wavelength UV-VIS detector Varian Co.		
Autosample	9300 Autosample, Varian Co.		
Column	Capcell Pak C18(150 $\times$ 4.6mm: 5 $\mu$ ), Shiseido Co.		
Operating condition			
UV absorbance	215nm		
Column temp.	35 $^{\circ}$ C		
Injection volume	20 $\mu$ l		
Mobile phase A	0.22% TFA in water		
Mobile phase B	0.2% TFA acid in Acetonitrile		
Gradient profile			
Time(min)	%A	%B	Flow(ml/min)
0:00	100	0	1.0
20:00	50	50	1.0
50:00	100	0	1.0

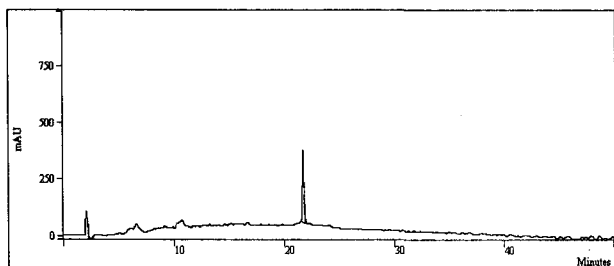
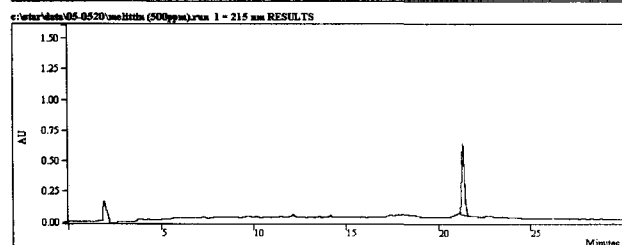


Fig. 3 HPLC chromatogram of standard melittin

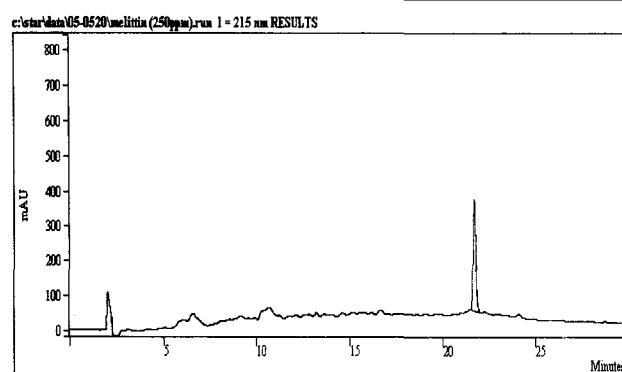
Sample Name: melittin (500ppm)  
 Operator (In):  
 Injection Date: 05-05-20 01:48:28 PM  
 Calc Date: 05-05-20 02:19:37 PM  
 Run Time (min): 31.042  
 Workstation: Varies Star #1  
 Run Mode: Analysis  
 Peak Measurement: Peak Area  
 Calculation Type: Percent



Peak No	Ret. Time (min)	Peak Name	Area (counts)	Result (%)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1	21.310		3132066	100.000	BB	9.4	
Totals			3132066	100.000			

Fig. 4 HPLC chromatogram of melittin(500ppm)

Sample Name: melittin (250ppm)  
 Operator (In):  
 Injection Date: 05-05-20 04:20:01 PM  
 Calc Date: 05-05-20 07:43:23 PM  
 Run Time (min): 49.987  
 Workstation: Varies Star #1  
 Run Mode: Analysis  
 Peak Measurement: Peak Area  
 Calculation Type: Percent

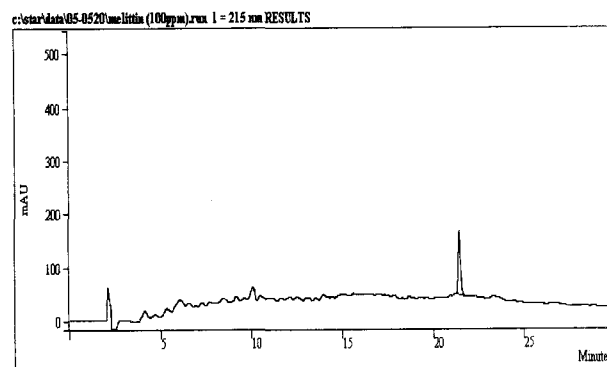


Peak No	Ret. Time (min)	Peak Name	Area (counts)	Result (%)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1	21.673		1642974	100.000	BB	9.0	
Totals			1642974	100.000			

Fig. 5 HPLC chromatogram of melittin(250ppm)

Sample Name: melittin (100ppm)

Operator (In):  
 Injection Date: 05-05-20 03:37:13 PM  
 Calc Date: 05-05-20 06:27:17 PM  
 Run Time (min): 49.982  
 Workstation: Varies Star #1  
 Run Mode: Analysis  
 Peak Measurement: Peak Area  
 Calculation Type: Percent

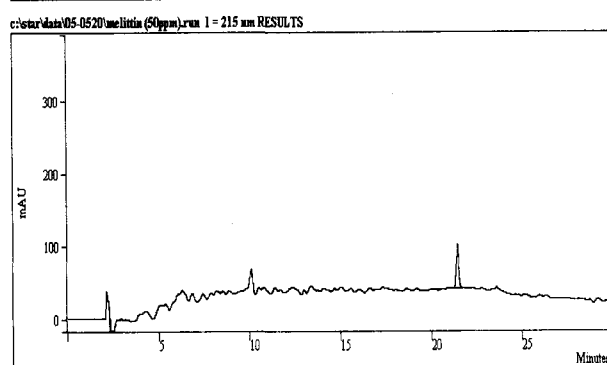


Peak No	Ret. Time (min)	Peak Name	Area (counts)	Result (%)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1	21.424		611954	100.000	BB	9.0	
Totals			611954	100.000			

Fig. 6 HPLC chromatogram of melittin(100ppm)

Sample Name: melittin (50ppm)

Operator (In):  
 Injection Date: 05-05-20 06:48:22 PM  
 Calc Date: 05-05-20 07:36:20 PM  
 Run Time (min): 41.697  
 Workstation: Varies Star #1  
 Run Mode: Analysis  
 Peak Measurement: Peak Area  
 Calculation Type: Percent



Peak No	Ret. Time (min)	Peak Name	Area (counts)	Result (%)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1	21.417		300747	100.000	BB	9.1	
Totals			300747	100.000			

Fig. 7 HPLC chromatogram of melittin(50ppm)

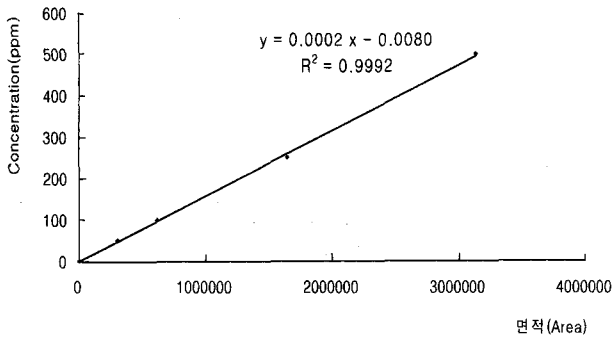


Fig. 8 Calibration Curve of Melittin

② BVA-1의 Melittin 분석

침을 5개, 10개, 20개씩으로 하여 H<sub>2</sub>O 100 $\mu$ l에 1시간 이상 녹인 후 30분 동안 40 $^{\circ}$ C에서 incubation하였다. 그 결과 5개와 10개에서는 피크를 얻을 수 없었고, 20개에서 피크를 얻을 수 있었다. 이를 검량곡선에 대입하여 20개의 침에 7.21562  $\mu$ g/ml의 봉독이 있음을 알 수 있었다. 이를 다시 침 1개의 양으로 나눈 결과 침 1개에는 약 0.36 $\mu$ g의 melittin이 들어있음을 알 수 있었다 (Table 2).

Table 2. Melittin contents of Bee Venom Acupuncture-1

Sample	함량( $\mu$ g/20needles)	함량( $\mu$ g/1needle)
BVA-1	7.21562	0.36078

Sample Name: 100/10ea.30min.incu  
 Operator (Inj):  
 Injection Date: 05-05-26 04:26:42 PM  
 Calc Date: 05-05-26 04:57:44 PM  
 Run Time (min): 30.938  
 Workstation: Venian Star #1  
 Instrument (Inj): Venian Star #1  
 Run Mode: Analysis  
 Peak Measurement: Peak Area  
 Calculation Type: Percent

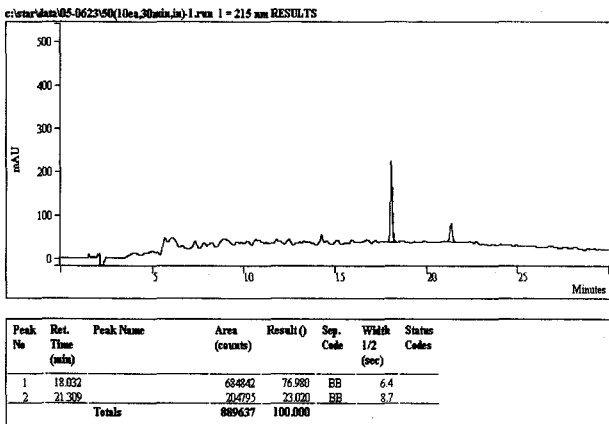


Fig. 9 HPLC chromatogram of melittin in Bee Venom Acupuncture-1

③ BVA-2의 Melittin 분석

10개의 침을 H<sub>2</sub>O 100 $\mu$ l에 1시간 이상 녹인 후 30분 동안 40 $^{\circ}$ C에서 incubation하였다.

얻어진 피크를 검량곡선에 대입하여 10개의 침에 5.4441  $\mu$ g/ml의 봉독이 있음을 알 수 있었다. 이를 다시 침 1개의 양으로 나눈 결과 침 1개에는 약 0.54 $\mu$ g이 들어있음을 알 수 있었다(Table 3).

Table 3. Melittin contents of Bee Venom Acupuncture-2

Sample	함량( $\mu$ g, 10개)	함량( $\mu$ g, 1개)
BVA-2	5.4441	0.54441

Sample Name: 50/10ea.30min.in-5  
 Operator (Inj):  
 Injection Date: 05-06-23 04:52:56 PM  
 Calc Date: 05-06-23 06:17:18 PM  
 Run Time (min): 33.143  
 Workstation: Venian Star #1  
 Instrument (Inj): Venian Star #1  
 Run Mode: Analysis  
 Peak Measurement: Peak Area  
 Calculation Type: Percent

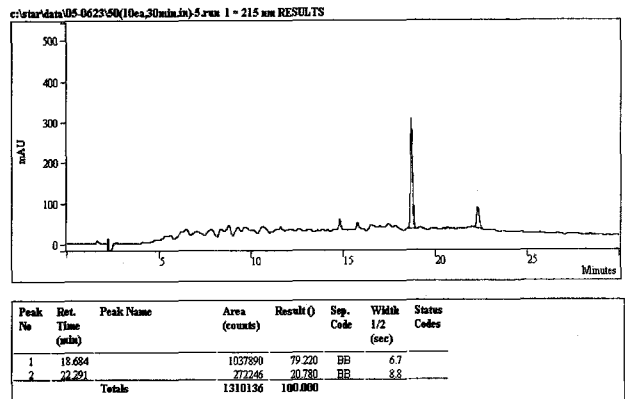


Fig. 10 HPLC chromatogram of melittin in Bee Venom Acupuncture-2

Ⅲ. 고 찰

봉약침요법은 살아 있는 꿀벌의 독낭 안에 들어 있는 봉독을 전기 자극 등<sup>1)</sup>으로 추출하여 건조한 후, 정제 가공하여 辨證施治하는 新鍼療法이다.

봉독은 大熱有毒 辛甘鹹<sup>2)</sup>하며 補益精氣 除中益氣하고, 通經活絡 消腫排膿 清熱涼血의 효능<sup>3)</sup>이 있다. 봉독의 주요 성분은 약 40가지로, peptide, enzymes, physiologically active amines, carbohydrates, Lipids, amino acids 등으로 나누어 볼 수 있으며<sup>5,6)</sup>이 중 重要的 役割을 하는 Peptide로는 Mellitin, Apamin, Adolapin, 그리고

Mast Cell Degranulating Peptide(MCD peptide)를 들 수 있고 전체적으로 항염, 항균, 해열작용과 함께 ACTH 분비 촉진, 혈관 투과성 촉진의 작용이 있다.

봉약침의 효능에 대한 연구로는 항염<sup>7)</sup>, 진통<sup>8)</sup>, 면역기능 강화<sup>9)</sup> 그리고 항암작용<sup>10)</sup> 등이 있었고, 임상적인 연구로는 요추간판탈출증<sup>11)</sup>, 근위축증<sup>12)</sup>, 류마티스 관절염<sup>13,14)</sup>, 슬관절염<sup>15)</sup> 등 다양한 연구가 보고되었으며 그 효능 또한 뛰어난 것으로 알려져 있다.

하지만 1회용 주사기를 사용하므로 침에 비하여 취혈의 정확도가 떨어지고, 주사기에 대한 거부반응을 가지고 있는 한의사들의 접근이 용이하지 않으며, 감염의 우려, pain shock의 유발가능성 등 여러 가지 불편함을 지니고 있다. 따라서 이러한 문제를 개선하고자하는 목적으로 봉독침이 개발되었다.

봉독침은 stainless 침의 침부에 봉독이 일정량 코팅되어 있으며, 특히 피부층을 통과할 때 독이 손상을 입지 않도록 특수한 방법으로 건조하여 체내에서 서서히 녹으면서 흡수되도록 설계되어 있다.

봉독침은 시술방법이나 형태가 일반침과 동일하여 전혀 거부감이 나지 않고, 휴대가 간편하며, 동일한 양이라 하더라도 체내에서 서서히 흡수되기 때문에 주사기를 사용할 때보다 시술시의 통증이 훨씬 가벼울 뿐만 아니라 봉약침의 우수한 치료효과를 얻을 수 있는 많은 장점을 가지고 있다. 하지만 현재 연구단계에 있어서 훌륭한 한방치료기기가 되기 위해서는 앞으로 많은 보완과 검증을 거쳐야 할 것이다.

따라서 본 연구는 봉독침을 연구 발전시키기 위한 일환으로 시도되었다.

이를 위하여 먼저 침침에 코팅되어 있는 봉독의 양을 HPLC를 이용하여 정량적으로 평가하였다.

HPLC는 정밀한 성분 분리가 가능하고<sup>16)</sup> 용량이 적은 경우나 이미 부분적으로 정제한 경우에 효과적이며, 봉독으로부터 순수한 Peptide를 최종적으로 분리해낼 때 그 순도를 측정하는 방법으로도 쓰인다. 이 등은 HPLC로 봉독의 성분분석이 용이함을 보고한 바 있어, 봉독의 주성분인 melittin의 검량선을 HPLC로 먼저 확보한 후 봉독침에 코팅된 봉독의 양을 분석하였다.

봉독침은 2.000%와 1.000%의 봉독으로 코팅된 BVA-1과 BVA-2가 있다. HPLC 분석결과 1개의 BVA-1에는 약 0.36 $\mu$ g의 melittin이, BVA-2에는 약 0.54 $\mu$ g의 melittin이 들어있음을 알 수 있었다. 하지만 코팅된 양이 극히 미량이라서 개체간의 차이가 있음을 알 수 있었다. 이

는 앞으로 보완해야 될 기술적인 부분으로 생각되었다.

이상의 내용을 종합해보면 봉독침은 아직 기술적으로 보완해야 할 부분이 있고, 지속적인 Quality Control이 이루어져야 함을 알 수 있었다. 향후 다양한 방법으로 추가적인 연구가 진행되기를 바란다.

#### IV. 결 론

봉독침의 HPLC를 이용한 함량분석과 LD<sub>50</sub> 측정, 피부 및 근육의 조직학적 관찰을 시행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. HPLC 분석결과 1개의 BVA-1에는 약 0.36 $\mu$ g의 melittin이, BVA-2에는 약 0.54 $\mu$ g의 melittin이 들어있음을 알 수 있었다. 하지만 코팅된 양이 극히 미량이라서 개체간의 차이가 있음을 알 수 있었다.
2. 1개의 봉독침(BVA-1)에는 약 0.7 $\mu$ g의 봉독이 들어있음을 알 수 있었다.

이상의 결과로 보아 봉독침은 주사기 사용의 단점을 보완할 수 있는 한방치료도구로 평가되지만 이를 위해서는 정량적 조절과 같은 지속적인 연구가 진행되어야 한다고 생각된다.

#### 參考文獻

1. 대한약침학회. 약침요법 시술 지침서, 대한약침학회, 서울, 1999; 133-135.
2. 권기록. 蜂針에 대한 考察, 대한 침구학회지. 11(1), 1994; 160.
3. 인창식, 고흥균. 봉독요법에 대한 한의학 최초의 문헌기록 : 마왕퇴의서의 봉독요법 2례, 대한 침구학회지, 1998; 15(1): 143.
4. Barbara & Rudolf, Chemistry and Pharmacology of Honey Bee venom, Academic Press. 1986; 329-402.
5. Herberman, R.B. and Ortaldo, J.R.. Natural killer cells. their role in defenses against disease. Science. 1981; 214: 24.
6. 권기록, 고흥균. 봉독약침요법의 항염, 진통작용에

- 미치는 효능에 관한 실험적 연구, 대한침구학회지, 1998 ; 15(2) : 317-331.
7. 고희균. 봉독약침요법의 항염, 진통작용에 미치는 효능에 관한 실험적 연구, 대한한의학회지. 1992 ; 13(1) : 283-292.
8. 권기록, 고희균. 봉약침요법의 면역반응에 관한 임상적 연구. 대한침구학회지. 2000 ; 17(1) : 169-174.
9. 권기록. 봉독약침자극이 3-MCA 유발 상피종에 대한 항암 및 면역반응에 미치는 영향, 대한침구학회지 1997 ; 14(2) : 151-172.
10. 전형준 외. 봉약침으로 치료한 요추간판탈출증 환자의 임상적 평가, 대한침구학회지. 2003 ; 20(5), 63-72.
11. 권기록. 한방치료를 통한 근위축성 측삭경화증의 임상적 연구, 대한침구학회지. 2003 ; 20(3) : 209-216.
12. 권기록. 봉독요법의 류마티스성 관절염 치료에 대한 임상적 연구, 전국한의학 학술대회지. 1998 ; 130-131.
13. 이상훈 외. 무작위 대조 이중맹검 시험을 통한 봉독약침의 류마티스 관절염 치료효과, 대한침구학회지. 2003 ; 20(6), 80-87.
14. 이성노 외. 봉약침 치료의 퇴행성 슬관절염에 대한 임상적 고찰, 대한 침구학회지. 2003 ; 20(5), 73-81.
15. GY.SZOKAN, J.HORVATH, M. ALMANS, etc, Liquid chromatographic analysis and separation of polypeptide components from Honey Bee Venoms. JOURNAL OF LIQUID CHROMATOGRAPHY, 1994 ; 17(16), 3333-3349.
16. 권기록, 장성봉, 최영근. 봉약침의 LD50 변화량 보고. 대한약침학회지. 2005 ; 8(1) :41-44.