

첨가물에 의한 봉독의 안정화 및 안전성

배영현¹, 이종환¹, 김해솔¹, 김호선¹, 서창용¹, 김노현¹, 이진호²,
 하인혁², 김미령², 정화진², 이인희², 김민정², 김은지², 이재웅^{2,*}

¹강남자생한방병원 침구의학과

²자생척추관절연구소 자생의료재단



[Abstract]

Stability and Safety of Bee Venom with and without Additives

Young Hyeon Bae¹, Chong Hwan Lee¹, Hae Sol Kim¹, Ho Sun Kim¹, Chang Yong Suh¹,
 No Hyeon Kim¹, Jin Ho Lee², In Hyuk Ha², Me Riong Kim², Hwa Jin Chung²,
 In Hee Lee², Min Jeong Kim², Eun Jee Kim² and Jae Woong Lee^{2,*}

¹Department of Acupuncture and Moxibustion of Korean Medicine, Gangnam Jaseng
 Korean Medicine Hospital

²Jaseng Spine and Joint Research Institute, Jaseng Medical Foundation

Objectives : Previous studies have shown that the amount of melittin, the main active ingredient in bee venom pharmacopuncture, tends to decrease substantially with time during pharmacopuncture manufacture. This study aimed to assess whether the stability of bee venom pharmacopuncture improved with pharmacopuncture additives.

Methods : Components were measured using high performance liquid chromatography. Acute toxicity and antigenicity tests by subcutaneous and venous routes were conducted at Korea Pharmaceutical Test & Research Institute and mortality, adverse reactions, and body weight changes were assessed.

Results : Stability tests using additives revealed that bee venom without additives was most stable. Bee venom pharmacopuncture without additives was further tested for toxicity in subcutaneous and venous administration in mice and no changes pertaining to toxicity were found over the testing period.

Conclusions : Bee venom pharmacopuncture without additives was found to be most stable, and further, it did not show toxicity or antigenicity in subcutaneous and venous administration in mice.

Key words :

Bee venom;
 Pharmacopuncture;
 Melittin

Received : 2015. 08. 20.
 Revised : 2015. 08. 28.
 Accepted : 2015. 09. 02.
 On-line : 2015. 09. 20.

* Corresponding author : Jaseng Spine and Joint Research Institute, Jaseng Medical Foundation,
 858, Eonju-ro, Gangnam-gu, Seoul, 06017, Republic of Korea
 Tel : +82-2-3218-2153 E-mail : leejuw@jaseng.co.kr

© This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The Acupuncture is the Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Medicine Society. (<http://www.TheAcupuncture.org>)

Copyright © 2014 KAMMS, Korean Acupuncture & Moxibustion Medicine Society. All rights reserved.

1. 서 론

藥鍼療法는 다양한 방법에 의해 제조된 약침액을 질환과 연관된 경혈과 체표촉진에 의해 얻어진 양성 반응점(압통점, 아시혈) 및 혈관에 약침주입용 주사기를 사용하여 시술하는 방법으로서 자침과 약물의 효능을 이용해 생체의 기능을 조정하고 병리상태를 개선시켜 질병을 치료하는 신침요법이다¹⁾. 《대한약전》에 따르면 피하, 근육 내 또는 혈관 등의 체내 조직이나 기관에 직접 투여하는 용액은 주사제로 분류되며 주사제 중 수용성제를 사용할 때 혈액이나 체액과 등장으로 하기 위하여 염화나트륨 또는 다른 적당한 첨가제를, pH 조절을 위하여 산 또는 알칼리를 넣을 수 있다고 고시되어 있다. 이는 증류수를 다량 정맥주사하면 삼투압의 변화로 적혈구 용혈현상, 혈전 생성, 혈뇨, 급성신부전, 뇌부종 등을 일으킬 수 있으며, 소량 주사할 때도 소아나 신장질환자에게는 문제가 발생할 수 있기 때문이다. 약침액 역시 인체 내부에 주입하는 것이기 때문에 투여 시 인체에 영향을 주지 않도록 pH와 염도를 보정하여 사용하고 있다.

봉약침은 꿀벌의 독낭에 들어 있는 봉독을 이용한 약침으로 오래전부터 민간요법으로 관절염, 통풍 등의 질환에 사용되어 오던 봉침²⁾을 현대 한의약에 맞게 정제하여 약침으로 사용하고 있다. 봉독은 무색 투명하며 점성이 있는 액체로 강한 쓴맛이 나는 방향성 물질이며, 건조 상태에서는 회백색 또는 황백색의 과상이거나 분말상이다. 봉독액의 비중은 1.13이며, 산도는 5.2~5.5 범위이다. 봉독은 쉽게 물과 산에 용해되지만, 알코올에는 거의 용해되지 않는다. 봉독액은 상온에서 공기에 노출되면 재빨리 마르고 액 증량의 70%를 손실한다. 봉독은 냉동 상태에서 장기간 활성을 유지할 수 있으나 봉독은 산화성 물질에 의해서 쉽게 파괴되는 경향이 있다^{3,4)}. 봉독은 40여 가지의 성분으로 이루어져 있으며 melittin, apamin, mastcell degranulating(MCD) peptide 등의 peptide 성분과 효소 성분인 phospholipase A2, hyauronidase, acid phosphomonoesteras 그리고 histamin, dopamin, noradrenaline 등의 아민성분으로 구성되어 있다^{5,6)}.

그 중 melittin은 건조 봉독의 약 50%를 차지하는 주성분으로 진통⁷⁾, 소염⁸⁾ 작용이 매우 뛰어난 것으로 알려져 있다. Melittin은 1954년에 Neumann과 Habermann에 의해 직접 용혈성 요소로 처음 발견되었고, 1972년 Habermann에 의해 적혈구 용해 시의 세포막활성 성질이 관찰되었다⁹⁾. 구조적으로는 26개의 아미노산을 함유하고 있으며, 대식세포의 이동을 강하게 억제하고, 용혈작용에서는 phospholipase A2와 상승 작용하여 서로의 활성성을

증가시킨다. 효소작용에서는 뇌하수체와 부신피질체계를 자극하여 catecholamine과 cortisone 분비를 촉진하고¹⁰⁾, 시상하부에 serotonin의 증가를 유도하며¹¹⁾, 리소좀의 세포막을 안정화시켜 항염증 작용을 한다. 또한 용해, 효소, 통증 유발, 방사능 저항성 작용 등이 있다¹²⁾.

이러한 봉독을 이용하여 약침을 만드는 과정에서 주요 유효성분인 melittin이 시간이 경과함에 따라 큰 폭으로 줄었다는 경향을 확인하였으며(Table 1), 이에 봉약침의 안정성을 높이고자 약침 첨가물에 의한 봉독의 안정화 시험을 진행하였다. 그리고 안정화시킨 봉약침을 이용하여 안전성 시험 및 항원성 시험을 진행하여 독성 유무를 관찰하였다.

Table 1. Composition of the Mobile Phase Employed in the Gradient LC System

Time(min)	Composition of mobile phase(%)	
	0.1 % TFA in water	0.1 % TFA in acetonitrile
0	95	5
40	20	80
50	95	5
60	95	5

LC : high performance liquid chromatography.
TFA : trifluoroacetic acid.

II. 재료 및 방법

1. 기기 및 시약

건조 봉독은 (주)청진바이오텍(경기도, 한국)에서 구입하였다. 표준품으로 사용된 melittin은 Sigma Aldrich (USA)에서 구입하였고, 각각 99%의 순도를 사용하였다. 정량분석에 사용된 water, acetonitrile(ACN), methanol은 high performance liquid chromatography(HPLC) grade (JT Baker, Phillipsburg, NJ, USA), trifluoroacetic acid는 Junsei Chemical(Japan)을 사용하였다. 첨가물로 사용된 NaCl과 Na₂HPO₄는 Junsei Chemical(Japan) 제품을 사용하였다.

본 시험에 사용된 HPLC는 waters사의 waters 600s controller, watersTM 626 pump, waters temperature control module, waters In-Line degasser, watersTM 717plus autosampler and watersTM 996 photodiode array detector(PDA)를 사용하였다.

2. 봉약침 조제 방법

봉독 1 g을 1 l의 정제수로 용해하였으며, 사용된 첨가제 중 NaCl을 이용하여 염도를 0.9 %로 보정하였으며 Na₂HPO₄로 pH를 7.0으로 보정하여 각각 약침을 조제하였다. 조제된 약침은 제균 여과를 통하여 여과하였다. 조제된 약침은 시험기간 동안 냉장상태(1~5°C)에서 보관하였다.

3. Melittin 분석법

봉독의 안정화 분석을 위하여 분석은 조제 당일, 3개월 후, 6개월 후 간격으로 분석하였다. 지표물질로 사용된 melittin을 HPLC grade water에 녹여 1 mg/mL 농도로 조제하여 사용하였다.

각 물질에 대한 분석은 참고문헌¹³⁾ 등을 기초로 하여 분석조건을 설정하였다. Column은 TC-C18(5 um, 4.6 I.D. x 250 mm, Agilent), Column temperature는 35°C, injection volume은 10 uL, flow rate는 1 mL/min을 유지하였다. 이동상으로는 trifluoroacetic acid를 0.1 % 첨가한 water와 acetonitrile을 초음파를 이용하여 degassing하여 사용하였고, gradient system을 이용하여 분석하였다(Table 1). 사용한 detector로는 UV detector로 220 nm 파장으로 분석하였다.

분석 후 함량 계산은 아래와 같은 공식을 이용하여 계산하였다.

Calculation : (sample area/ standard area)(standard injection volume / sample injection volume) standard concentration standard purity = sample concentration mg/ml

4. 안전성 시험법

pH와 염도를 보정하지 않은 봉약침의 안전성 확인을 위하여 한국의약품시험연구원에 안전성 시험을 의뢰하여 시험을 진행하였다. 시험 동물로는 17~23 g 사이의 마우스에 피하 투여 및 미정맥 투여에 각각 5마리씩 총 10마리로 시험을 진행하였다. 개체의 식별은 꼬리 마킹으로 구분하였으며, 주사량은 피하 투여는 50 ml/kg, 미정맥 투여는 25 ml/Kg의 용량으로 투여하였다.

이상 유무 판정기준으로 피하주사에서는 48시간 관찰할 때 마우스가 이상이 있거나 사망하지 않아야 하고, 미정맥 투여에서는 48시간 관찰할 때 마우스가 사망하지 않아야

하며, 이상 증세를 보이는 마우스가 1마리 이하임을 기준으로 하였다.

5. 항원성 시험법

pH와 염도를 보정하지 않은 봉약침의 안전성 확인을 위하여 한국의약품시험연구원에 항원성 시험을 의뢰하여 시험을 진행하였다. 시험 동물로는 17~23 g 사이의 마우스 5마리를 사용하였으며, 개체의 식별은 꼬리 마킹으로 구분하였다. 마우스 각 개체마다 시료 0.01 ml과 2 mg 수산화알루미늄을 주사용수 0.19 ml에 녹여 감작항원으로 하여 1주일간 3회씩 복강 투여한 뒤, 14일 후에 유발항원으로 시료 0.1 ml를 미정맥에 투여하였다.

이상 유무 판정기준은 마우스가 미정맥 투여 1시간 후 이상 증상이 관찰되지 않아야 하며, 24시간 후에 사망하는 것을 기준으로 하였다.

III. 결 과

각각 다른 방식으로 조제한 약침을 주기적으로 분석한 결과, 아무 것도 보정하지 않은 봉약침에서는 시간이 경과함에 따른 melittin의 농도 변화가 적게 일어나지만(49.68 → 44.95 → 33.15 ug/ml), pH와 염도를 각각 보정하였을 때는 그에 비해 안정성이 떨어지는 것을 관찰할 수 있었으며, pH와 염도를 둘 다 보정하였더니 melittin 함량이 큰 쪽으로 떨어지짐을 관찰할 수 있었다(Table 2).

pH와 염도를 보정하지 않은 봉약침으로 안전성 시험을 진행한 결과, 피하 투여 및 미정맥 투여 시 모두 사망 및 이상 증상이 있는 동물은 없었다.

항원성 시험 결과 역시 투여 1시간 후에 증상이 변화하지 않았으며, 24시간 후에도 사망하는 동물은 없었다.

Table 2. Stability of Melittin by Adjustment Using Additives

	Melittin(ug/ml)		
	0	1	2
BV	49.68	44.95	33.15
BV+pH	33.74	17.85	14.31
BV+NaCl	45.42	18.22	12.00
BV+pH+NaCl	43.27	22.50	4.96

IV. 고 찰

약침요법은 경혈에 소량의 약물을 주입하여 치료 효과를 극대화하는 요법이다. 약침요법은 한의학에서 십이경맥, 기경팔맥의 경혈과 경외기혈, 아시혈 등의 특정 수혈에 자침하여 경맥의 기능을 조절함으로써 정신기혈, 오장육부의 질병을 치료하는 침구경혈학의 이론과 한약의 기미, 성상, 작용을 살피 임상 치료 효율을 극대화시키고 약물을 인체의 기관이나 병소에 접근, 작용하는 기전을 연구하는 본초학의 이론을 결합시킨 신침요법이다.

즉 약침요법이란 본초학을 기반으로 하여 한 가지 혹은 수종의 기존 독립 처방이나 복합 처방으로 구성된 한약물을 전탕법, 증화법, 양화법, 알코올추출법, 수증기 증류법 등에 의한 추출법에 따라 해당 약물을 추출해서 질병과 유관한 경혈에 주입하여 경락 기능을 자극하고 조절하는 침구학 및 경혈학 이론에 토대를 둔 한방의료행위라고 할 수 있다. 따라서 약침요법은 약물을 단순히 혈위 내에 주입시키는 것뿐만 아니라 경락계통에 대한 이해가 겸비되면서 비로소 그 효과기전에 대한 설명이 충실해질 수가 있는데, 이와 함께 서양의학의 신경계통에 관련된 설명도 좋은 참고가 될 수 있다⁴⁾. 이때 사용되는 약침은 혈액이나 체액과 등장한 상태로 만들기 위해 pH와 염도를 조절하여 사용하고 있다. 그 이유는 증류수를 다량 정맥주사하면 삼투압의 변화로 적혈구 용혈 현상, 혈전 생성, 혈뇨, 급성 신부전, 뇌부종 등을 일으킬 수 있으며, 소량 주사할 때도 소아, 신장 질환자에게는 문제가 발생할 수 있기 때문이다.

봉독의 性味는 大熱有毒 辛甘鹹하며, 補益精氣 除中益氣하고, 通經活絡 消腫排膿 清熱涼血하는 효능이 있다¹⁵⁾. 주요 작용으로는 強壯, 鎮靜, 平喘, 祛風濕, 鎮痛, 抗炎, 免疫, 抗癌, 아드레날린 분비 촉진 및 임파세포와 적혈구의 再生과 增加 등이 있다^{8, 16-18)}. 봉독의 치료 작용은 전신적·국소적 작용과 경혈 작용으로 나누어 생각해볼 수 있는데¹⁹⁾, 전신 작용은 봉독이 신체의 면역계에 변화를 초래하고 시상하부-뇌하수체-부신피질 축에 작용하여 cortisone 촉진 작용 등을 질병의 치료에 이용하는 것이고, 국소 작용은 근골격계 질환에 봉독이 그 투여 부위에 일으키는 국소적 효과로 작용하는 항염증, 진통효과이다. 경혈 작용은 봉독 자극 부위를 침구학 이론에 따라 선혈한 경혈의 자극에 의한 침의 효과와 봉독 자체의 효과가 상승작용이 일어나는 것을 말한다. 봉독 자극은 경혈에 가해지는 기계적 자극 외에도 국소 반응인 발적, 발열, 종창에 의한 온열 자극의 의미도 포함한다. 봉약침요법은 상기한 국소적 작용과 경혈 작용을 이용하는 치료이다¹³⁾.

봉침이란 벌이 외부의 침입이나 공격으로부터 스스로를 지키기 위해 지닌 무기인데, 봉침요법은 이러한 벌의 침에 의한 직접적인 자극과 동시에 독낭에 저장되어 있는 벌의 독액이 인체에 미치는 약리작용을 이용한 치료방법이다²⁰⁾. 역사적으로 볼 때 BC 2000년 전 이집트 파피루스에서도 벌의 침을 아픈 곳에 쓰이거나 문질러 치료했다는 내용을 확인할 수 있고, BC 4, 5 C에 히포크라테스도 봉침을 신비한 치료제라고⁸⁾ 하였으며, 前漢시대 이전의 의학 저서로 추정되는 馬王堆醫書에서도 봉독을 질병의 치료에 이용하였음을 알 수 있다¹⁵⁾. 전통적으로는 봉침을 직접 인체에 자입하는 방법을 사용하였으나, 최근에는 봉독을 추출, 가공한 후 인체의 경혈에 자입하는 봉약침요법이 주로 활용되고 있다. 즉 봉약침요법은 봉독을 추출, 가공하여 질병과 유관한 부위나 혈위에 주입함으로써 자침 효과와 봉독의 생화학적 특이물질이 인체에 미치는 약리작용을 동시에 이용하는 치료요법의 일종이다^{21, 22)}.

봉침요법의 적응증과 관련하여 World Health Organization (WHO)의 국제질병사인분류에서의 22개 chapter 중에서 봉침요법의 적응증이 속해 있는 chapter는 모두 17개였으며, 봉침요법의 적응증은 총 83가지였다(Table 3)²³⁾.

봉독 구성성분 중 가장 많은 부분을 차지하는 melittin은 26개의 amino acid로 구성된 활성 peptide로서(Fig. 1), phospholipase A2와 상승적으로 작용하는 성질이 있는데, 주된 작용은 크게 용혈작용과 산소작용으로 나누어 볼 수 있다²¹⁾. Melittin은 phospholipase A2의 세포막에 대한 간접적 분해 작용으로 세포 내부에 저장된 물질을 공격한다. 또한 특이한 mast cell에서 histamin을 방출시켜 말초혈관의 혈류를 증가시키며 독성성분을 확산시키는 작용을 도와준다. Histamin의 방출을 도와주는 것이 염증 반응을 유발할 수도 있으나, 자연적인 항염증 반응은 조직의 histamin level을 어느 정도 증가시켜야 그 시발점이 이루어지므로 반드시 필요악은 아니다^{24, 25)}. Melittin은 활성 peptide로 세제처럼 강한 계면 활성작용이 있고 물에도 기름에도 섞이는 친화성이 있으므로, 다른 세포막에서도 막의 투과성을 변화시키는 작용도 있다²⁶⁾.

한편 HPLC는 정밀한 성분 분리가 가능하고²⁷⁾ 용량이 적거나 이미 부분적으로 정제하였을 때 효과적이며, 봉독에서 순수한 peptide를 최종 분리해낼 때 그 순도를 측정하는 방법으로도 쓰인다.

봉독의 pH 및 염도를 보정하면 안정성이 큰 폭으로 떨어짐을 시험을 통해 확인할 수 있었다. 이는 봉독의 주성분인 melittin 등이 peptide이며, peptide는 pH 조절제나 NaCl에 의해 응고가 되기 때문이라고 판단된다²⁸⁾. 이에 pH 및 염도 보정을 하지 않은 봉약침을 조제할 때 안정성 확보를

위하여 시험을 진행하였다. 안정성 시험 결과 아무 것도 보정하지 않은 봉약침에서는 시간이 경과함에 따른 melittin의 농도 변화가 적게 일어남을 확인하였다.

하지만 pH 및 염도 보정을 하지 않았을 때 인체에 부작용을 미치는지에 대한 연구가 필요하다고 판단하였다. 봉독은 알레르기 등 이상체질의 환자가 맞는 경우에 두드러기, 소양감, 호흡곤란, 구토, 부종, 오한 등의 부작용이 발

생할 수 있다. 이러한 부작용 여부를 확인하기 위해서는 첫 치료 시 한 부위만 자침한 뒤 적어도 2분 이상 관찰하였다가 부작용이 없음을 확인하고, 그 뒤 30분 정도 후에 다시 한 부위 정도를 자침한 뒤 환자의 상태를 면밀히 관찰하는 것이 중요하다. 또한 목욕 전후 6시간 정도, 음주 전후, 심장 질환이나 열성 질환이 있을 때, 극도로 피로하거나 허약할 때는 주의하는 것이 좋다²⁹⁾. 이번 연구에서는 부작용 여

Table 3. Indication of Bee Sting Therapy According to International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems(ICD)

Chapter	Diseases and related health problems
1) Certain infections and parasitic diseases	Tinea pedis, tetanus
2) Neoplasms	Malignant neoplasm of thyroid gland, malignant neoplasm of uterus, malignant neoplasm of breast, malignant neoplasm of skin, malignant neoplasm of stomach, malignant neoplasm of oral cavity, malignant neoplasm of larynx, malignant neoplasm of colon
3) Diseases of the blood and blood-forming organs and certain disorders involving the immune mechanism	Anemia
4) Endocrine, nutritional and metabolic diseases	Goitre, hyperthyroidism, diabetes mellitus, obesity
5) Mental and behavioural disorders	Tic disorders(eye blinking), somatoform disorders, dementia
6) Diseases of the nervous system	Bell's palsy, migraine, epilepsy, intercostal neuropathy, trigeminal neuralgia, polyneuropathy, parkinson's disease, cerebral palsy
7) Diseases of the eye and adnexa	Cataract, conjunctivitis, uveitis
8) Diseases of the ear and mastoid process	Otitis media
9) Diseases of the circulatory system	Haemorrhoids, essential hypertension, paroxysmal tachycardia, cerebrovascular diseases, hypotension, thromboangiitis obliterans, atherosclerosis
10) Diseases of the respiratory system	Asthma, chronic bronchitis, common cold, allergic rhinitis, sinusitis, laryngitis, pneumonia, tonsillitis, abscess of lung
11) Diseases of the digestive system	Fibrosis and cirrhosis of liver, anal fistula, periodontitis, appendicitis, stomatitis, gastritis
12) Diseases of the skin and subcutaneous tissue	Urticaria, acne, eczema, androgenic alopecia, decubitus ulcer
13) Diseases of musculoskeletal system and connective tissue	Adhesive capsulitis of shoulder, low back pain, lumbar disc disorders, rheumatoid arthritis, gonarthrosis, tuberculous arthritis, tuberculous of spine, spondylosis, gout, cervical disc disorders, osteoporosis
14) Diseases of the genitourinary system	Dysmenorrhoea, leukorrhoea, cystitis, impotence, nephritis, hypertrophy of prostate, urinary incontinence
15) Pregnancy, childbirth and the puerperium	Complications of labour and delivery
16) Symptoms, signs and abnormal clinical and laboratory findings, not elsewhere classified	Lump, stupor, hiccough
17) Injury, poisoning and certain other consequences of the external causes	Frosbite, sprain of ankle, sprain of lumbar spine

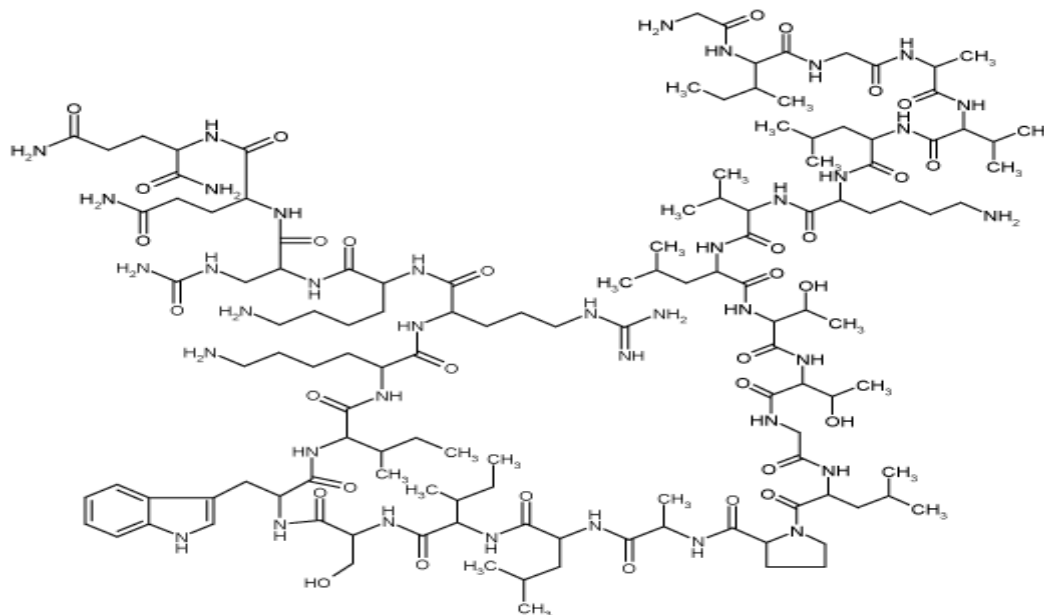


Fig. 1. The structure of melittin

부를 확인하기 위하여 한국의약품시험연구원에 안전성 시험 및 항원성 시험을 의뢰하여 시험을 진행하였다. 그 결과 pH 및 염도 보정을 하지 않더라도 마우스에 대한 피하 및 정맥 독성은 없었으며, 항원성 시험에서도 이상 증상이 관찰되지 않았다.

위 결과를 종합해 볼 때, 봉약침은 pH 및 염도 보정을 하지 않았을 때 안정성을 유지한 상태로 사용할 수 있을 것으로 판단되며, pH 및 염도 보정을 하지 않아도 임상 사용 농도에서는 안전한 약침으로 판단된다. 하지만 pH 및 염도 보정을 한 봉약침은 효능에 대한 연구가 이루어져왔지만, pH 및 염도 보정을 하지 않았을 때 효능의 변화에 대한 연구는 진행되지 않았기 때문에 이의 효능에 대한 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

봉독으로 약침을 만드는 과정에서 주요 유효 성분인 melittin이 시간이 경과함에 따라 큰 폭으로 줄어드는 경향을 확인하였으며, 이에 봉약침의 안정성·안전성 및 항원성과 관련한 시험을 진행하였다.

1. 봉독의 경우 pH 및 염도 보정을 하면 안정성이 큰 폭으로 떨어지는 것을 시험을 통해 확인할 수 있었다.

이에 반해 pH 및 염도 보정을 하지 않았을 때 안정성 시험 결과, 시간이 경과함에 따른 melittin의 농도 변화가 적게 일어남을 확인하였다.

2. pH 및 염도 보정을 하지 않은 봉약침의 안전성 및 항원성 시험을 진행한 결과, 임상 사용농도에서는 안전한 약침으로 판단되었다.

VI. References

1. Korean Acupuncture & Moxibustion Society Text-book Compilation Committee, Acupuncture and Moxibustion, Gyeonggi : Jipmoondang, 2008 : 408.
2. Kim HW, Kwon YB, Ham TW et al, Acupoint stimulation using bee venom attenuates formalin-induced pain behavior and spinal cord for expression in rats [dissertation], Jeonnam : Jeonnam Univ, 2003, Korean.
3. Kim MH, Bee venom therapy and bee venom herbal acupuncture therapy, Seoul : Korea Educational Planning, 1996 : 20-37, 41-2, 57, 70, 72, 133-49, 171-6.
4. Koh MS, Collection on oriental medicine · oriental medicine of animal origin, Seoul : Yeogang

- Publisher, 1993 : 185-90.
5. Zenon J, Kokot, Jan Matysiak. Simultaneous determination of major constituents of honeybee venom by LC-DAD. *Chromatographia*, 2009 ; 69(11-2) : 1401-5.
 6. H Rybak-Chmielewska, T Szczęśna. HPLC study of chemical composition of honeybee(*Apis mellifera* L.) venom. *Journal of Apicultural Science*, 2004 ; 48(2) : 103-9.
 7. Curcio-Vonlanthen V, Schneider CH, Frutig K et al. Molecular parameters in melittin immunogenicity. *J Pept Sci*, 1997 ; 3(4) : 267-76.
 8. Piek T. Venoms of the hymenoptera. London, United Kingdom : Academic press, 1986 : 1-547.
 9. Lee JS, Kwon GR, Lee SB. A study on major components of bee venom using electrophoresis. *Journal of Pharmacopuncture*, 2000 ; 3(2) : 153-68.
 10. Lee JD. Bee-venom therapy: method of clinical approach. *Journal of Korean Medicine*, 2000 ; 21(3) : 3-8.
 11. Kwan DH, Lee JD, Choi DY. The study of anti-cancer effects of bee venom for aqua-acupuncture. *The Acupuncture*, 2001 ; 18(1) : 129-45.
 12. An KW, Kim NY, Seo KY, Kim CG. Melittin content analysis of Korea and another country bee venom using HPLC. *J Apic*, 2010 ; 25(4) : 283-90.
 13. Lee JS, Kwon GR, Choi HY. A study on major components of bee venom using HPLC. *The Acupuncture*, 2000 ; 17(4) : 120-29.
 14. Lee HJ. Introduction to pharmacopuncture and clinical application. Seoul : Iljoongsa Publishing Co, 1999 : 13-4, 17.
 15. Yin CS, Koh HG. The first documental record on bee venom therapy in oriental medicine: 2 prescriptions of bee venom in the ancient mawangdui books of oriental medicine. *The Acupuncture*, 1998 ; 15(1) : 143-7.
 16. Kim MH. Bee venom therapy and bee venom herbal acupuncture therapy. Seoul : Korea Educational Planning, 1992 : 20-37, 41-2, 67-74, 104-12, 134-49, 171-6.
 17. Joo MB. Encyclopedia of practical traditional chinese medicine. Shǎnxī : Shǎnxī Kēxué Jìshù Chūbǎnshè, 1992 : 402.
 18. Jin YS. Comparison of the anti-inflammatory, pain relieving, coagulation alteration and acute toxicity of bee venom and bee venom peptide. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine*, 1993 ; 4 : 45-8.
 19. Kwon KR, Koh HK. The clinical observation of immune response by korean bee venom therapy. *The Acupuncture*, 1999 ; 17(1) : 169-74.
 20. Kwon GL, Koh HK. An experimental study with bee venom therapy on anti-inflammatory and analgesic effects. *The Acupuncture*, 1998 ; 15(2) : 97-103.
 21. Kwon KR, Koh HK, Kim CH. The study of the introduction of bee venom acupuncture, biochemistry and pharmacology have been obtained the following results. *The Acupuncture*, 1994 ; 11(1) : 159-71.
 22. Joo MB. Encyclopedia of practical traditional chinese medicine. Shǎnxī : Shǎnxī Kēxué Jìshù Chūbǎnshè, 1982 : 402.
 23. Monthly Yangbonggye. *Yangbonggye*. Daegu : Monthly Yangbonggye, 1967-99.
 24. Barbara, Rudolf. Chemistry and pharmacology of honey bee venom. London : Academic Press, 1986 : 329-402.
 25. Whittle BF. The use of changes in capillary in mice to distinguish between narcotic and nonnarcotic analgesics. *Brit J Pharm*, 1964 ; 22(2) : 246.
 26. Gerst JE, Salomon Y. Inhibition by melittin and fluphenazine of melanotropin receptor function and adenylate cyclase in M2R melanoma cell membranes. *Endocrinology*, 1987 ; 121(5) : 1766-72.
 27. Neumann W, Habermann E, Amend G. Zur papiererelektrophoretischen fraktionierung tierischer gifte. *Naturwissenschaften*, 1952 ; 39(12) : 286-7.
 28. Ruckenstein E, Shulgin IL. Effect of salts and organic additives on the solubility of proteins in aqueous solutions. *Adv Colloid Interface Sci*, 2006 ; 16(123-6) : 97-103.
 29. Kang JW, Park DS, Lee SH, Lee JD. A study on bee sting therapy: based on 'research on bee sting therapy' of monthly yangbonggye. *The Acupuncture*, 2009 ; 26(1) : 135-51.