

< Original Article >

주사제 사용을 위한 봉독의 균질성 및 안정성 평가

한상미* · 김세건 · 홍인표 · 우순옥 · 장혜리 · 이경우¹

국립농업과학원 농업생물부, 건국대학교 동물자원과학과¹

Experimental studies of homogeneity and stability honeybee venom using ultra-high performance liquid chromatography

Sang Mi Han*, Se Gun Kim, In Phyong Hong, Soon Ok Woo, Hye Ri Jang, Kyung Woo Lee¹

Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Science, RDA, Wanju 55365, Korea

¹Department of Animal Science and Technology, Konkuk University, Seoul 05029, Korea

(Received 14 March 2016; revised 20 May 2016; accepted 23 May 2016)

Abstract

Honeybee venom (BV) from *Apis mellifera* L. has been used as natural antimicrobial compounds in pigs, cows, dairy cattle and chicken farms in Korea. The purpose of this study was conducted to confirm homogeneity and stability of BV dissolved with distilled water or saline solution. Melittin was analyzed with ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) for BV to secure the validation of analysis. BV at concentration of 1 mg/mL was dissolved with distilled water or saline solution at room temperature. Homogeneity of BV dissolved with distilled water or saline solution at upper, middle, and lower layers all satisfied the accuracy and precision criteria. Stability of BV dissolved with distilled water or saline solution for 7 days all satisfied the criterion both light and dark storage condition. BV has satisfied with homogeneity and stability in distilled water or saline solution at room temperature under light or dark condition. The results of this study suggest that BV has a possibility as the substitute of natural antimicrobial agents for the animal drugs and feed additives.

Key words : Honeybee venom, Melittin, UPLC, Homogeneity, Stability

서 론

순수 천연물질이면서 강력한 항균, 항염증 및 면역증강 등의 효과를 갖는 봉독은 부작용과 잔류에 대한 위험성이 적어 봉침요법으로 오래 전부터 관절염, 통풍 등의 질환에 사용되어 오고 있다. 서양종꿀벌(*Apis mellifera* L.) 일벌의 독인 봉독은 다양한 성분이 복합적으로 구성되어 있으며, 주 성분인 멜리틴(melittin)은 항염증과 항균작용, 강력한 진통작용, 면역증강 등의 역할을 한다고 알려져 있다(Habermann과 Reiz, 1965; Fennelle 등, 1967; Piek, 1984). 본 연구팀에서는 2005년 봉독채집장치와 채집된 봉독으로부터 이물질

을 제거할 수 있는 봉독정제법을 개발하였다(한 등, 2007). 이로써 국내에서도 봉독 채집이 가능하게 되었으며, 화장품과 의약품의 원료로 정제봉독이 상용화되었다. 정제봉독은 멜리틴 함량이 50~70% 범위로 꿀벌이 갖고 있는 순수 봉독으로 히스타민을 비롯하여 히알루리다아제, 포스포리파아제 등 꿀벌의 봉독 성분을 온전히 갖고 있는 상태의 봉독이다. 최근 봉독이 여드름유발 원인균인 *Propionibacterium acnes*는 물론 피부상재균인 *Staphylococcus epidermidis* 등에 대한 항균효과 및 항염증 효과가 구명되었으며, 이를 유효성분으로 하는 여드름 치료제는 식품의약품안전처로부터 임상2상 시험을 허가 받은 상태이다(Han 등, 2007; Kim 등, 2015). 또한 봉독은 자돈 및 양계에 처리했을 때 체중 및 생존율 증가와 같은 생

*Corresponding author: Sang Mi Han, Tel. +82-63-238-2896, Fax. +82-63-238-3832, E-mail. sangmih@korea.kr

산성 향상과 질병 감소에 효과를 나타낸다고 보고되었다(Han 등, 2009a, 2009b; Han 등, 2010a). 또한, 봉독을 분만 전 교소혈(交巢穴)에 투여한 경우 분만 소요시간 단축과 후산 정체율 감소 등 분만효율이 개선되었으며, 발정 재귀일수와 분만간격의 단축과 봉독을 투여한 어미소로부터 출생한 신생송아지의 체중 증가와 질병이 감소하는 것으로 보고되었다(Han 등, 2010b). 뿐만 아니라 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 등 유방염 원인균에 의해 유발된 젖소 유방염의 경우 봉독 투여로 체세포수가 크게 감소하는 것으로 확인되었고, 유방염에 걸린 젖소로부터 채취한 원유에서 분리한 균에 대한 항균력이 우수한 것으로 보고된 바 있다(Han 등, 2007). 또한 젖소에 봉독을 투여한 후 3일째는 물론 투여 후 1일째에도 우유에서 봉독 성분이 검출되지 않아 천연물질인 봉독은 축산물 내에 잔류하지 않는 것으로 확인되었다(Han 등, 2015). 가축 또는 인체에 사용되는 봉독은 매우 적은 양으로 증류수 또는 생리식염수에 녹여 액상으로 사용할 경우 봉독 성분이 전체에 고르게 분포하는지가 제품 개발에 있어 중요한 문제이다.

따라서 본 연구에서는 가축 질병의 예방과 치료에 효과적이며, 축산물 내 잔류 및 내성에 문제가 없는 봉독을 가축 사료 첨가제와 동물용의약품으로 개발했을 때 제제 내 봉독 성분의 균질성과 안정성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

봉독 시료 및 시약

봉독은 서양종 꿀벌에 봉독 채집장치(청진테크, 한국)를 이용하여 채취 분리한 다음 간이정제방법으로(Han 등, 2007) 정제한 정제봉독을 구입하여 사용하였

Table 1. Chromatographic conditions for analysis of melittin from honeybee venom

| Item | Conditions |
|--------------------|---|
| Column | Halo ES-18 (4.6*100 mm, 2.7 μ m) |
| Column temperature | 50°C |
| Flow rate | 1.5 mL/min |
| Injection volume | 4 μ L |
| Wave length | 220 nm |
| Mobile solvent | (A) 20 mM TFA/MeCN, (B) 20 mM TFA/H ₂ O (A) 0~6 min, 42~48% |

다(한국정제봉독협동조합, 한국). Acetonitrile (MeCN) 및 H₂O는 Burdick & Jackson (Muskegon, MI, USA)사의 HPLC급 용매를 사용하였다. 표준품인 멜리틴은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 분석에 사용하였다.

분석기기 및 조건

봉독의 주요성분인 멜리틴 분석은 Waters (Minneapolis, MN, USA)사의 diode array detector가 장착된 UPLC I class 모델을 사용하였으며, 컬럼은 Halo ES-18 (4.6*100 mm, 2.7 μ m, Advanced materials technology, Wilmington, DE, USA)을 사용하였다. UPLC 분석조건은 유속 1.5 mL/min, 주입량 4 μ L, 검출파장 220 nm, 컬럼온도 50°C이었으며, 이동상은 (A) 20 mM trifluoroacetic acid/MeCN, (B) 20 mM trifluoroacetic acid/H₂O의 용매를 사용하여 (A) 42~48%; 0~6분으로 설정하였다(Table 1).

균질성 시험

봉독을 멸균증류수와 생리식염수(0.9% NaCl w/v)에 녹여 각각 1 mg/mL로 만든 후 50 mL conical tube에 정제봉독 용액 30 mL을 넣었다(Fig. 1). 균질성은 상층부(25 mL 눈금부분), 중층부(15 mL 눈금부분), 하층부(5 mL 눈금부분)에서 6시간 마다 취하여 봉독 내 멜리틴 함량을 측정하였다. 균질성시험은 모두 압 조건에서 수행하였으며 모든 조건은 3반복하였다. 정제봉독 용액의 정량값은 피크면적을 검량선($y=ax+b$)식에 대입하여 계산하였으며, 정밀성과 정확성을 아

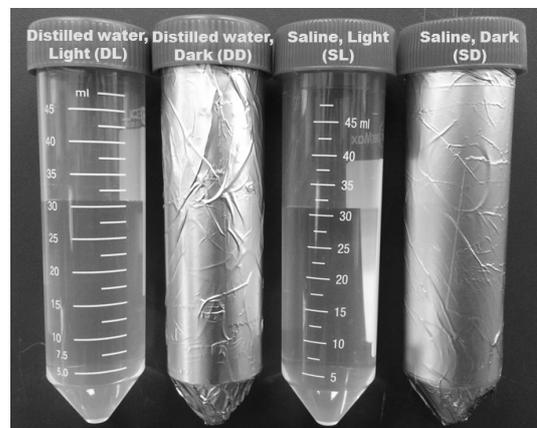


Fig. 1. Photograph on dissolution of honeybee venom by different solvents and storage condition.

래와 같이 산출하여 균질성을 평가하였다. 판정기준은 정밀성은 10% 이하, 정확성은 85~115%인 것으로 하였다(식약처, 2008).

$$\text{정밀성}(\%) = (\text{정량값의 평균} / \text{정량값의 표준편차}) \times 100$$

$$\text{정확성}(\%) = (\text{이론농도} / \text{정량값의 평균}) \times 100$$

안정성 시험

정제봉독 용액의 안정성 시험은 균질성 시험에서 사용한 농도와 같은 방법으로 조제하여 명, 암조건으로 실온에서 7일간 보관하였다(Table 2, Fig. 1). 분석 시료는 중층에서 채취하여 멜리틴 함량을 분석하고, 모든 시험은 3반복으로 수행하였으며, 판정 기준은 정량값의 정밀성은 10% 이하, 초기 농도에 대한 변동율은 20% 이내인 것으로 하였다. 변동율은 아래와 같은 방법으로 구하였다(식약처, 2008).

$$\text{변동율}(\%) = [(\text{시료조제 직후의 정량값 평균} / \text{보존 후의 정량값 평균} - \text{시료조제 직후의 정량값 평균})] \times 100$$

통계처리

실험에서 얻어진 결과의 통계적 유의성은 SPSS (18.0 version., USA) 통계 프로그램을 이용하여 분석하였으며, 그 결과는 평균±표준오차(mean±SEM)로 표시하였다. 안정성에 대한 유의성은 analysis of variance (ANOVA)의 Duncan's multiple range test를 이용하여 $P < 0.05$ 에서 검증하였다.

결 과

용액 내 봉독의 균질성

멸균증류수와 생리식염수를 이용하여 정제봉독을 1 mg/mL의 농도로 희석한 후 조제물에 대한 상층,

중층 및 하층의 균질성을 확인하고자 하였다. Table 3에서 보는 바와 같이 멸균증류수에 희석했을 경우 정제봉독은 상층, 중층 그리고 하층에서의 정밀성은 희석 직후 각각 0.090%, 0.500%, 0.429%를 나타냈으며, 정확성은 102.2%, 101.6%, 그리고 100.3%로 확인되어 균질성 판정기준(정밀성은 10% 이하, 정확성은 85~115%)을 만족하였다. 희석 후 6시간, 12시간, 18시간 그리고 24시간 후에도 상층의 정밀성은 0.197%에서 0.303%, 중층은 0.152%에서 0.503%, 그리고 하층은 0.444%에서 0.809%의 범위로 균질성의 판정기준인 10% 이하의 정밀성을 갖고 있었다. 정확성에 있어서도 모든 층에서 100.1%에서 101.7%의 범위로 판정기준인 85~115%를 모두 만족하였다(Table 3).

Table 4와 같이 생리식염수에 희석했을 경우에도 정제봉독 내 멜리틴 성분의 정밀성은 상층, 중층 그리고 하층에서의 정밀성은 0.031%에서 0.789%의 범위로 모두 10% 이하였으며, 정확성은 98.4%에서 99.9%로 균질성 판정기준을 모두 만족하였다. 정제봉

Table 3. Homogeneity of melittin from purified bee venom at upper, middle, and lower layers in distilled water (n=3)

| Time (hr) | Layers | Mean±SEM (µg/mL) | Coefficient of variation (%) | Accuracy (%) |
|-----------|--------|------------------|------------------------------|--------------|
| 0 | Upper | 0.66±0.006 | 0.090 | 102.2 |
| | Middle | 0.66±0.003 | 0.500 | 101.6 |
| | Lower | 0.65±0.002 | 0.429 | 100.3 |
| 6 | Upper | 0.65±0.001 | 0.288 | 101.4 |
| | Middle | 0.65±0.003 | 0.503 | 100.9 |
| | Lower | 0.65±0.002 | 0.444 | 100.5 |
| 12 | Upper | 0.65±0.002 | 0.303 | 101.4 |
| | Middle | 0.65±0.001 | 0.152 | 101.0 |
| | Lower | 0.65±0.003 | 0.507 | 100.1 |
| 18 | Upper | 0.66±0.001 | 0.197 | 101.8 |
| | Middle | 0.66±0.001 | 0.227 | 101.7 |
| | Lower | 0.65±0.005 | 0.789 | 101.4 |
| 24 | Upper | 0.65±0.001 | 0.259 | 100.9 |
| | Middle | 0.65±0.001 | 0.275 | 100.6 |
| | Lower | 0.65±0.005 | 0.809 | 100.8 |

Table 2. Test solution of honeybee venom

| Test solution | Solvent | Honeybee venom concentration (mg/mL) | Melittin concentration (mg/mL) | Volume (mL) | Storage condition | |
|---------------|-----------------|--------------------------------------|--------------------------------|-------------|-------------------|-----------------|
| | | | | | Temperature | Light intensity |
| DL | Distilled water | 1 | 0.65 | 30 | RT* | Light |
| DD | Distilled water | 1 | 0.65 | 30 | RT | Dark |
| SL | Saline solution | 1 | 0.65 | 30 | RT | Light |
| SD | Saline solution | 1 | 0.65 | 30 | RT | Dark |

*RT is room temperature from 15°C to 28°C.

독은 생리식염수에 희석했을 때 보다 멸균증류수에서 좀 더 균질하게 나타나는 것으로 보였으며, 희석 후 24시간 이내에는 균질성에 있어 차이를 나타내지 않는 것으로 확인되었다.

용액 내 봉독의 안정성

멸균증류수와 생리식염수로 각각 희석 후 정제봉독을 실온에서 7일간 암, 명조건으로 보관 후 안정성을 측정하였다. 멸균증류수와 생리식염수 모두 보관 기간 및 빛으로 인한 멜리틴 함량의 변화는 확인되지 않았다(Fig. 2). Table 5에서와 같이 멸균증류수에서는 멜리틴의 함량 변화가 관찰되지 않았으며 또한 빛의 조건과는 무관하게 나타났다. 반면 생리식염수에는 멜리틴의 변동율이 광조건에서는 ±0.1%, 암조건에서

는 ±0.8%로 나타났으나 안정성의 판정기준인 초기농도에 대한 변동율 ±20%에는 크게 못 미치는 미미한 수준의 변동으로 관찰되었다. 멸균증류수와 생리식염수 각각에 희석된 정제봉독은 실온에서 7일간 보관했을 경우 정밀성에 있어서도 0.254%에서 0.694%의 범위로 모두 만족하여 안정성이 확인되었다.

고 찰

봉독은 살아있는 벌을 이용한 봉침요법으로 오래 전부터 인체 및 가축의 질병 치료에 사용되어 왔다. 최근 봉독채집장치의 개발과 봉독정제법이 개발됨에 따라 정제봉독은 화장품의 원료로 사용되고 있으며, 의약품과 동물용의약품, 사료첨가제 등으로 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 자돈의 경우 1 mg/두 이하의 용량으로, 젖소 유방염 질환 치료에 10 mg/두 이하 농도의 주사제로 이용하고 있다(Han 등, 2009a, 2009b). 양계에는 급수구를 통해 음수로 제공되며 이때의 봉독 1,000 ppm 농도 이하로 사용하고

Table 4. Homogeneity of melittin from purified bee venom at upper, middle, and lower layers in saline solution (n=3)

| Time (hr) | Layers | Mean±SEM (µg/mL) | Coefficient of variation (%) | Accuracy (%) |
|-----------|--------|------------------|------------------------------|--------------|
| 0 | Upper | 0.64±0.001 | 0.094 | 98.7 |
| | Middle | 0.65±0.005 | 0.789 | 99.4 |
| | Lower | 0.64±0.002 | 0.342 | 99.0 |
| 6 | Upper | 0.64±0.001 | 0.172 | 98.6 |
| | Middle | 0.65±0.002 | 0.357 | 99.2 |
| | Lower | 0.64±0.002 | 0.264 | 99.0 |
| 12 | Upper | 0.64±0.002 | 0.235 | 98.0 |
| | Middle | 0.65±0.003 | 0.387 | 99.3 |
| | Lower | 0.64±0.002 | 0.422 | 98.4 |
| 18 | Upper | 0.65±0.002 | 0.232 | 99.4 |
| | Middle | 0.65±0.002 | 0.262 | 99.8 |
| | Lower | 0.65±0.000 | 0.031 | 99.9 |
| 24 | Upper | 0.64±0.003 | 0.389 | 98.9 |
| | Middle | 0.64±0.001 | 0.155 | 99.1 |
| | Lower | 0.64±0.001 | 0.218 | 99.0 |

Table 5. Stability of purified bee venom at room temperature for 7 days (n=3)

| Storage conditions | Mean±SEM (µg/mL) | Coefficient of variation (%) | Accuracy (%) | Variation (%) |
|--------------------|------------------|------------------------------|--------------|---------------|
| DL | 0.65±0.003 | 0.448 | 100.8* | 0.8* |
| DD | 0.65±0.005 | 0.694 | 100.5* | 0.5* |
| SL | 0.64±0.002 | 0.254 | 99.0* | -1.0* |
| SD | 0.64±0.002 | 0.295 | 99.2* | -0.8* |

DL: solvent is distilled water and light condition, DD: solvent is distilled water and dark condition, SL: solvent is saline solution and light condition, SD: solvent is saline solution and dark condition.

*P<0.001.

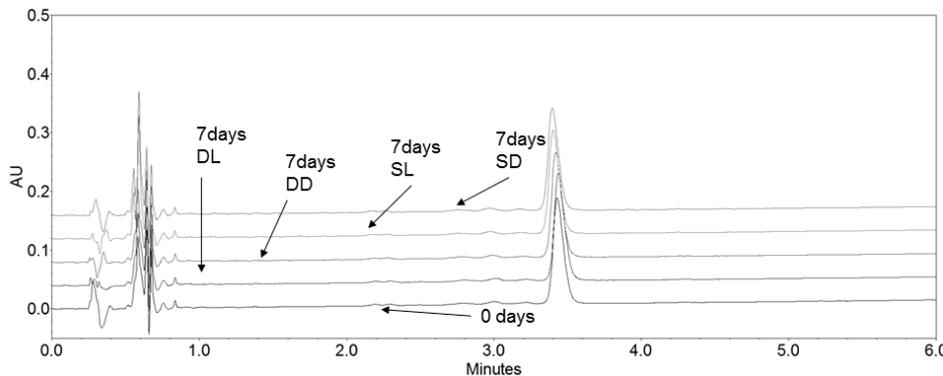


Fig. 2. Stability of purified bee venom at room temperature for 7 days. UPLC chromatography of melittin. DL: solvent is distilled water and light condition, DD: solvent is distilled water and dark condition, SL: solvent is saline solution and light condition, SD: solvent is saline solution and dark condition.

있다(Han 등, 2010a). 이처럼 가축에 사용되는 봉독의 용량은 극소량으로 사료첨가제나 음수, 주사제로 제조할 경우 다른 배합성분들과 혼재 상태에서의 봉독의 균질성과 안정성에 어떠한 변화를 갖고 오는지를 확인하여야 한다. 특히 의약품 등의 제조 및 품질관리 규정에는 원료의 적격성 평가 및 밸리데이션에 관하여 그 적용범위, 종류 및 실시방법 등 세부사항을 정하고 있다. 따라서 본 연구에서는 동물용의약품과 사료첨가제의 원료로서 봉독을 사용하기 위한 균질성 및 안정성에 대한 기초적인 연구를 수행하고자 하였다. 현재까지 밝혀진 봉독을 구성하는 물질은 건조 봉독의 40% 이상을 차지하는 멜리틴을 비롯한 펩티드 11종, 효소 5종, 생리학적 활성 아민 3종 그리고 비펩티드 성분이 4종으로 알려져 있다(Piek, 1986). 봉독의 주요 효능인 항염증 및 항균효과를 나타내는 지표물질로 알려진 멜리틴은 분자량 2,840로 UPLC를 사용하여 검출 가능하다고 알려져 있다(Piek, 1986; Han 등, 2015).

따라서 본 연구에서도 멜리틴의 함량 변화를 봉독의 균질성과 안정성의 기준물질로 설정하여 시험에 사용하였다. 실온에서 봉독을 희석하는 용매로 주로 사용되는 멸균증류수와 생리식염수를 이용하여 조제한 후 조제 직후 그리고 6시간 간격으로 24시간 멜리틴 함량을 분석하였다. 봉독 조제물에 대한 상층, 중층 및 하층의 균질성의 정확성 정밀성은 모두 98.4~102.2% 범위, 0.09~0.7892% 범위로 확인되어 멸균증류수 그리고 생리식염수에서 모두 판정기준을 만족하였다. 또한 실온에서 광, 암조건으로 봉독 조제물을 실온에서 7일간 보관 후 안정성 측정을 시행하였다. 그 결과 광, 암조건, 그리고 멸균증류수, 생리식염수 봉독 조제액 모두 초기농도에 대한 변동율은 -0.8~0.8%로 나타났으며, 정밀성은 99.0~100.8%로 확인되어 판정기준을 모두 만족하였다.

이상의 연구 결과로 봉독은 증류수와 생리식염수로 희석할 경우 균질성의 정확성과 정밀성이 모두 확보되었으며 실온에서 7일간 보관하더라도 봉독 성분의 안정성이 유지되는 것으로 확인되었다. 그러나 액상 제제로 봉독 함유 제품을 생산할 경우 유통기한 설정을 위한 연구가 필요하며, 따라서 봉독을 동물용의약품, 사료첨가제, 주사제, 음수로 이용할 경우 증류수 또는 생리식염수를 표준원액으로 제조하여 사용하더라도 봉독 성분의 균질성과 안정성이 확보될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 차세대바이오그린21사업(과제번호: PJ01188201)에 의하여 수행되었습니다.

REFERENCES

- 한상미, 이광길, 여주홍, 우순옥, 권해용. 2007. 봉독 간이정제법. 특허 제 10-0758814호
- 식품의약품안전청 2008. 식품의약품안전청 고시 제2008-5호. 의약품 등 밸리데이션 실시에 관한 규정
- Curcio-Vonlanthen V, Schneider CH, Frutig K, Blaser K, Kalbacher H. 1997. Molecular parameters in melittin immunogenicity. *J Pept Sci* 3(4): 267-276.
- Fennell JF, Shipman WH, Cole LJ. 1967. Antibacterial action of a bee venom fraction (melittin) against a penicillin-resistant *Staphylococcus* and other microorganisms. *Res. Dev Tech Rep* 5: 1-13.
- Habermann E, Reiz KG. 1965. On the biochemistry of bee venom peptides, melittin and apamin. *Biochem Z* 343(2): 192-203.
- Han SM, Lee KG, Yeo JH, Kweon HY, Woo SO, Lee ML, Baek HJ, Kim SY, Park KK. 2007. Effect of honey bee venom on microglial cells nitric oxide and tumor necrosis factor- α production stimulated by LPS. *J. Ethnopharmacol* 111(1): 176-181.
- Kim JY, Lee WR, Kim KH, An HJ, Chang YC, Han SM, Park YY, Pak SC, Park KK. 2015. Effects of bee venom against *Propionibacterium acnes*-induced inflammation in human keratinocytes and monocytes. *Int J Mol Med* 35: 1651-1656.
- Han SM, Lee KG, Yeo JH, Kweon HY, Kim BS, Kim JY, Baek HJ, Kim ST. 2007. Antibacterial activity of the honey bee venom against bacterial mastitis pathogens infecting dairy cows. *Int J Indust Entomol* 14(2): 137-142.
- Han SM, Lee KG, Yeo JH, Hwang SJ, Chenoweth PJ, Pak SC. 2009a. Effects of bee venom treatment on growth performance of young pigs. *Am J Chin Med* 37(2): 833-842.
- Han SM, Lee KG, Yeo JH, Hwang SJ, Chenoweth PJ, Pak SC. 2009b. Somatic cell count in milk of bee venom treated dairy cows with mastitis. *J ApiProduct ApiMed Sci* 1(4): 104-109.
- Han SM, Lee KG, Yeo JH, Oh BY, Kim BS, Lee W, Baek HJ, Kim ST, Hwang SJ, Pak SC. 2010a. Effects of honeybee venom supplementation in drinking water on growth performance of broiler chickens. *Poult Sci* 89: 2396-2400.
- Han SM, Lee KG, Yeo JH, Oh BY, Kim ST. 2010b. Effects of honeybee (*Apis mellifera* L.) venom on the reproductive efficiency of dams and the growth performance, disease occurrence of Hanwoo calves. *Korean J Vet Serv* 33(3): 287-292.

Han SM, Hong IP, Woo SO, Kim SG, Jan HR. 2015. Analysis of bee venom residues in milks of dairy cattle using UHPLC with newly developed pre-processing method.

Korean J Vet Serv 38(1): 25-30.

Piek T. 1986. Venoms of the Hymenoptera. Academic press, London. United Kingdom.