

원저

## HPLC를 이용한 봉약침의 주요 성분에 관한 연구

이진선<sup>1)</sup> · 권기록<sup>1)</sup> · 최호영<sup>2)</sup>

- <sup>1)</sup> 상지대학교 부속한방병원 침구과  
<sup>2)</sup> 경희대학교 한의과대학 본초학교실

### Abstract

## A Study on Major Components of Bee Venom Using HPLC

Jin-Seon, Lee<sup>1)</sup> · Gi-Rok, Kwon<sup>1)</sup> · Ho-Young, Choi<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Acupuncture & Moxibustion  
Sang Ji Oriental Medicine Hospital, Sang Ji University

<sup>2)</sup> Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University

This study was designed to study on major components of various Bee Venom(Bee Venom by electrical stimulation in Korea; K-BV I, Bee Venom by Microwave stimulation in Korea; K-BV II, 0.5 mg/ml, Fu Yu Pharmaceutical Factory, China; C-BV, 1mg/ml, Monmouth Pain Institute, Inc., U.S.A.; A-BV) using HPLC(High performance liquid chromatography).

The results were summarized as follows :

1. HPLC method is useful for analysis of Bee Venom when solution rate is above 1:4000.
2. Analysis of Apamin using HPLC, the Retention time was 8.7min, and standard measurement curve was a function of  $y=4E+06x+21245$ .
3. Analysis of Melittin using HPLC, the Retention time was 29.0 min, and standard measurement curve was a function of  $y=4E+06x+23015$ .
4. Concentration of Melittin was about 297times than Apamin in K-BV I, and about 329times in K-BV II at same 1:500 solution rate, abnormally about 12 times in C-BV at 1:4000 solution rate.
5. Chinese Bee Venom using HPLC, the point from 5 to 7min(Retention time) showed a big extraordinary peak.

These data from the study can be applied to establish the standard measurement of Bee Venom and prevent pure bee venom from mixing of another components. I think it is desirable to study more about safety of Bee Venom as time goes by.

**Key words** : Bee Venom(BV), HPLC, Apamin, Melittin, Acua acupuncture.

· 접수 : 2000년 11월 2일 · 수정 : 11월 11일 · 채택 : 11월 15일

· 교신저자 : 권기록, 강원도 원주시 우산동 283 상지대학교 부속한방병원 침구과(Tel: 033-741-9257)

## I. 서론

蜂藥鍼療法이란 살아있는 서양벌(*Apis mellifera*)중 일벌<sup>1)</sup>의 독낭에 들어있는 독을 인위적으로 추출·가공하여 질병과 유관한 부위 및 경혈(經穴)에 주입함으로써 자침(刺鍼)의 효과와 벌의 독이 지니고 있는 생리 생화학적 약리작용을 질병의 치료에 이용하는 신침요법(新鍼療法)<sup>2)</sup>이다.

蜂藥鍼療法은 벌침요법 혹은 봉침요법<sup>3)</sup>(Bee Acupuncture Therapy)이라 하여 이미 오래 전부터 살아있는 벌을 환부나 경혈에 자극하여 질병을 치료하는 방법으로 사용되어 왔고, 현재 국내에서도 상당수의 한의사들이 질병의 치료에 사용하고 있다.

또한 미국을 비롯하여 러시아, 동유럽 등에서는 봉침요법과 더불어 蜂毒療法<sup>4)</sup>(Bee Venom Therapy)이라 하여 사용되고 있으며 현재 대체의학의 한 분야로 적용되고 있다.

벌의 독은 이미 2500년 전<sup>5)</sup>부터 동양에서 질병의 치료에 이용되었고, 현재 국내에서 임상에 사용하는 한의사도 점차 증가하고 있으나 이에 대한 기초 학문적 연구가 많이 부족한 실정이다.

특히 외국에서 생산된 봉약침에 대한 효능이나 신뢰도 등에 문제점이 제기될수 있다.

외국에서는 Benton등<sup>6)</sup> 많은 학자들이 성분분석을 하였으나, 국내에서는 1994년 이 등<sup>7)</sup>이 약침용 봉독액의 안전성 평가에 대한 연구를 위하여 HPLC를 이용한 봉약침의 성분을 분석하고 급성독성 시험을 하였으나, 주요성분의 명확한 분리를 이뤄내지 못하였고 특히 중국산 봉약침에 대한 Apamin의 측정이 불가능하다는 보고를 하여, 각국의 봉약침에 대한 Melittin과 Apamin 함량측정에 그치고 있어, 현재 사용되는 봉약침을 검량할수 있는 객관적 지표가 없고 연구가 부족한 실정이다.

이에 중국산, 미국산 및 채취방법이 다른 한국산 봉약침 2종에 대해 임상에 사용되고 있는 봉약침을 검량할수 있는 객관적 지표를 마련하고자 본 연구에 임하게 되었다. 이에, 각 봉약침에 대하여 HP-LC(High Performance Liquid Chromatography)<sup>7),8),9),10)</sup>로 성분 분석을 시행하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 材料

#### 1) 試料

分析試驗에 사용된 試料는 전기자극법으로 국내에서 채취한 봉독(Korean Bee Venom I, 이하 K-BV I)과 전자과자극법으로 국내에서 생산된 봉독((Korean Bee Venom II, 이하 K-BV II) 및 현재 외국에서 사용되고 있는 미국산 Apitoxin<sup>TM</sup>(American Bee Venom, 이하 A-BV: 1mg/ml, Monmouth Pain Institute, Inc., U.S.A.)과 중국산 봉독주사액(Chinese Bee Venom, 이하 C-BV: 0.5 mg/ml, Fu Yu Pharmaceutical Factory, China)을 사용하였다. 분석에 사용된 시료는 생리식염수와 증류수로 분석에 적절한 농도로 사용하였다.

Table 1. Abbreviation and Origin.

Abbr.	Origin.
1. K-BV I	Bee Venom by electrical stimulation in Korea.
2. K-BV II	Bee Venom by Microwave stimulation in Korea.
3. C-BV	0.5mg/ml, Fu Yu Pharmaceutical Factory, China.
4. A-BV	1mg/ml, Monmouth Pain Institute, Inc., U.S.A.

#### 2) 試藥

試藥은 HPLC용 메탄올, 아세토니트릴과 증류수(Fisher Scientific, U.S.A.)를 사용하였으며, HP-LC 分析用 標準品(Standard)으로는 Melittin(SI-

GMA M-4171, Sigma Chemical Co., U.S.A.)과 Apamin(SIGMA A-1289, Sigma Chemical Co., U.S.A.)을 사용하였다.

2. 方法

1) HPLC 분석.

HPLC(High Performance Liquid Chromatography 9012, Varian)를 사용하였으며, 장치는 V-arian 9300과 510형 pump, U6K injector, 441형 UV absorbance detector(Waters, U.S.A.) Computing Integrator D520A(영인과학, 한국)를 사용하였다.

분석용 HPLC column은 Delta-Pak 5µ C18 300 Å(3.9mm×300mm, i.d., 4µm, Waters, U.S. A.)을 사용하였으며, guard column은 Bonndapak<sup>R</sup> C18(37~50µm, Waters, U.S.A.)을 충전제로 사용하였다. 검량선 작성을 위하여 표준용액의 조제는 Apamin과 Melittin을 증류수에 녹여 100µg/ml, 40µg/ml, 10µg/ml 및 4µg/ml로 만들어 사용하였다(Table 2).

Table 2. Analytical Condition for Measuring of Apamin and Melittin in Bee Venom

Item	Condition
Column	Delta-Pak 5µ C18 300Å (3.9mm×300mm, i.d., 4µm, Waters, U.S.A.)
guard column	BonndapakR C18(37~50µm, Waters, U.S.A.)
Mobile phase	A : 0.1% TFA 2L B : 0.1% TFA in acetonitrile : water(80:20)
Gradient	5%B ~ 80%B at 40 min
Flow-rate	1.5ml/min
Wave-length	220nm
Sample volumn	20.0µl

III. 결 과

1. HPLC에 의한 蜂藥鍼의 주요 성분분석

1) HPLC에 의한 Apamin 표준용액의 검량선

표준 Apamin용액의 농도를 100µg/ml, 40µg/ml, 10µg/ml 및 4µg/ml로 하여 분석하였다(Fig. 1). 농도를 다르게 주입한 Apamin용액의 Retention time은 약 8.7분이었다.

검량선은 상관계수가 R<sup>2</sup>가 0.9994로 높은 상관

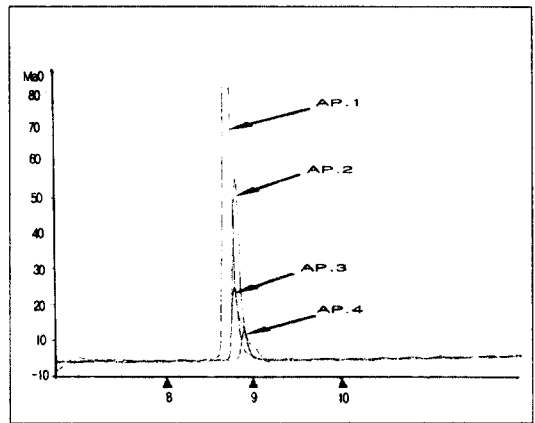


Fig. 1. HPLC chromatogram of standard Apamin Injection ; AP.1: 100µg/ml, AP.2: 40µg/ml, AP.3: 10µg/ml, AP.4: 4µg/ml  
\*AP : Apamin

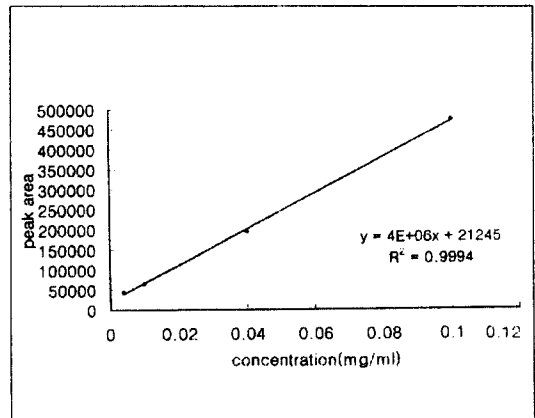


Fig. 2. Calibration curve of Apamin

관계를 나타냈으며, 원점을 지나는  $y=4E+06x+21245$ 의 일차함수 관계를 나타내어, 농도와 peak 면적은 거의 비례 함을 알 수 있었다(Fig. 2).

2) HPLC에 의한 Melittin 표준용액의 검량선

표준 Melittin용액의 농도를  $100\mu\text{g/ml}$ ,  $40\mu\text{g/ml}$ ,  $10\mu\text{g/ml}$  및  $4\mu\text{g/ml}$ 로 하여 분석하였다(Fig. 3). 농도를 다르게 주입한 Melittin용액의 Retention time 은 약 29.0분이었다.

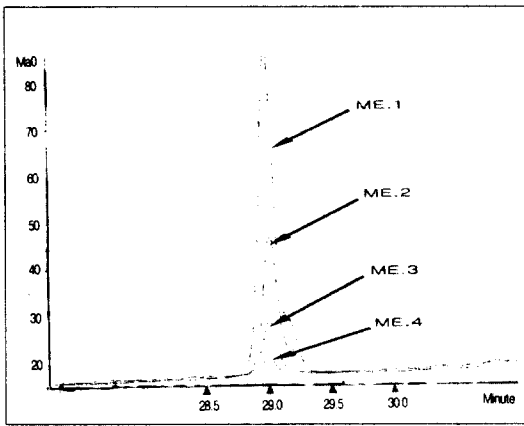


Fig. 3. HPLC chromatogram of standard Melittin  
Injection : ME.1:  $100\mu\text{g/ml}$ , ME.2:  $40\mu\text{g/ml}$   
ME.3:  $10\mu\text{g/ml}$ , ME.4:  $4\mu\text{g/ml}$

검량선은 상관계수가 0.9981로 높은 상관관계를

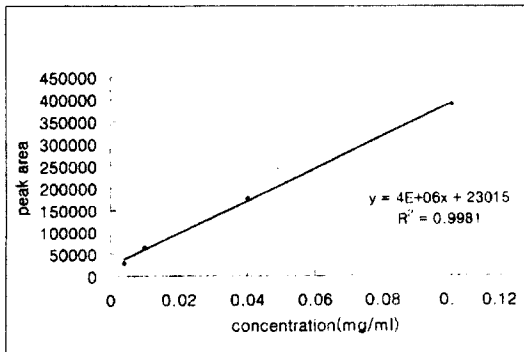


Fig. 4. Calibration curve of Melittin

나타냈으며, 원점을 지나는  $y=4E+06x+23015$ 의 일차함수 관계를 나타내어, 농도와 peak 면적은 거의 비례 함을 알 수 있었다(Fig. 4).

3) 각 蜂藥鍼 중의 Apamin과 Melittin의 농도 비교

HPLC 분석으로 얻어진 표준검량선을 이용하여 peak면적과의 일차함수 관계를 통하여 Melittin과 Apamin의 농도를 측정하였다.(Table 3)

K-BV I에는 Apamin과 Melittin의 농도가 각각  $46.756\mu\text{g/ml}$ ,  $13890.33\mu\text{g/ml}$ 으로 나타나 Melittin이 약 297배 높게 검출되었고, K-BV II에는 Apamin과 Melittin의 농도가 각각  $38.361\mu\text{g/ml}$ ,  $12607.13\mu\text{g/ml}$ 으로 나타나 Melittin이 약 329배 더 높게 검출되었으며, C-BV는 각각  $0.643\mu\text{g}$ ,  $7.135\mu\text{g}$ 으로 Melittin의 양이 약 12배 많게 검출되었다. 한국산 K-BV I과 K-BV II를 비교해볼 때 동일한 농도에서는 K-BV I에서 Melittin의 함량이 더 많음을 알 수 있었다. C-BV는 농도를 고려하더라도 K-BV I과 K-BV II에 비해 Melittin : Apamin이 약 12 : 1의 분포로 나타나 Random Sampling을 통한 재분석이 요구됨을 알 수 있었다.

4) K-BV I 蜂藥鍼의 HPLC 分析(농도; 1:4000)

한국산 전기자극법으로 채취된 K-BV I을 H-PLC 分析한 결과 Apamin은 Retention time 8.77분으로 측정되고, Melittin은 Retention time 28.9

Table 3. Concentration of the apamine and melittin.

Sample	Apamin( $\mu\text{g/ml}$ )	Melittin( $\mu\text{g/ml}$ )	Solution Rate
K-BV I <sup>1)</sup>	46.756	13890.33	1 : 500
K-BV II <sup>2)</sup>	38.361	12607.13	1 : 500
C-BV <sup>3)</sup>	0.643	7.135	1 : 4000

- 1) Bee Venom by electrical stimulation in Korea.
- 2) Bee Venom by Microwave stimulation in Korea.
- 3) Chinese Bee Venom( $0.5\text{mg/ml}$ , Fu Yu Pharmaceutical Factory).

분에서 측정되었다(Fig. 5).

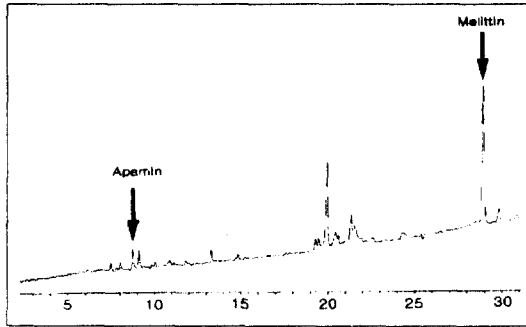


Fig. 5. HPLC chromatogram of K-BV I\*(1:4000) on Delta-Pak 5 $\mu$  C18 300Å(3.9mm $\times$ 300 mm) column(Waters).

\* : Bee Venom by electrical stimulation in Korea.

5) K-BV I 蜂藥鍼의 HPLC 分析(농도; 1:500)

한국산 전기자극법으로 채취된 K-BV I을 500:1의 희석비율에서 HPLC 분석한 결과 Apamin은 Peak면적이 192,124로 측정되고, Melittin의 Peak면적은 4,655,431로 측정되었다. 이를 Apamin은

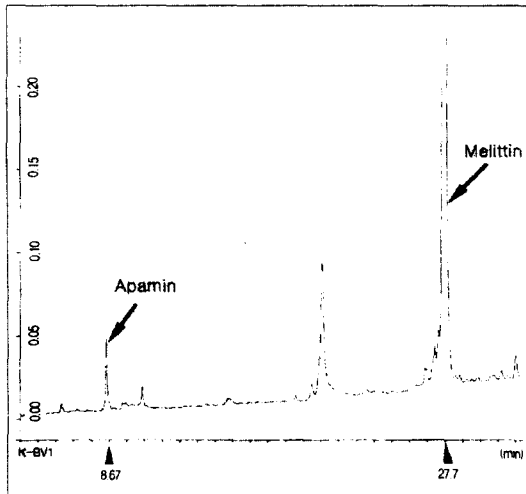


Fig. 6. HPLC chromatogram of K-BV I\*(1:500) on Delta-Pak 5 $\mu$  C18 300Å(3.9mm $\times$ 300mm) column(Waters).

\* : Bee Venom by electrical stimulation in Korea.

$y=335312X-2162.3(R^2=0.9999)$ 의 식에 대입하고, Melittin은  $y=4E+06X+5099.5 (R^2=0.9961)$ 의 식에 대입하여 Table 3의 500:1 희석비율에서의 농도를 측정하게 되었다(Fig. 6).

6) K-BV II 蜂藥鍼의 HPLC 分析(농도; 1:4000)

한국산 전자파자극법으로 채취된 K-BV II를 HPLC 분석한 결과 Apamin은 Retention time 8.71분에서 Peak면적이 58,870으로 측정되고, Melittin은 Retention time 29.1분에서 검출되지 못하여 아래와 같이 peak가 나타나지 않았다(Fig. 7).

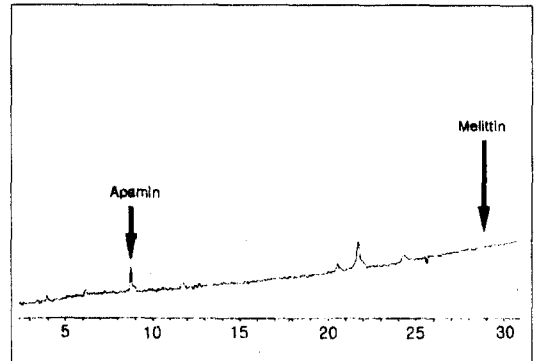


Fig. 7. HPLC chromatogram of K-BV II \*\* (1:4000) on Delta-Pak 5 $\mu$  C18 300Å(3.9mm $\times$ 300mm) column(Waters).

\*\* : Bee Venom by Microwave stimulation in Korea

7) K-BV II 蜂藥鍼의 HPLC 分析(농도; 1:500)

한국산 전기자극법으로 채취된 K-BV II를 500:1의 희석비율에서 HPLC 분석한 결과 Apamin은 Peak면적이 158,548로 측정되고, Melittin의 Peak면적은 4,225,161로 측정되었다. 이를 Apamin은  $y=335312X-2162.3(R^2=0.9999)$ 의 식에 대입하고, Melittin은  $y=4E+06X+5099.5(R^2=0.9961)$ 의 식에 대입하여 Table 3의 500:1 희석비율에서의 농도를 측정하게 되었다(Fig. 8).

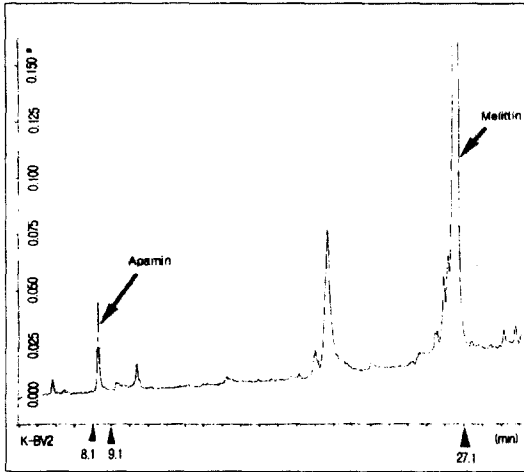


Fig. 8. HPLC chromatogram of K-BVII\*\* (1:500) on Delta-Pak 5 $\mu$  C18 300Å (3.9mm $\times$ 300mm) column (Waters).

\*\* : Bee Venom by Microwave stimulation in Korea

8) C-BV 蜂藥鍼의 HPLC 分析(농도; 1:4000)

중국산 蜂毒注射液(C-BV: 0.5mg/ml, Fu Yu P-harmaceutical Factory, China)을 HPLC 分析한 결과 Apamin은 Retention time 8.69분에서 Peak 면적이 23,816으로 측정되고, Melittin은 Retention time 29.1분에서 51,556으로 검출되어 아

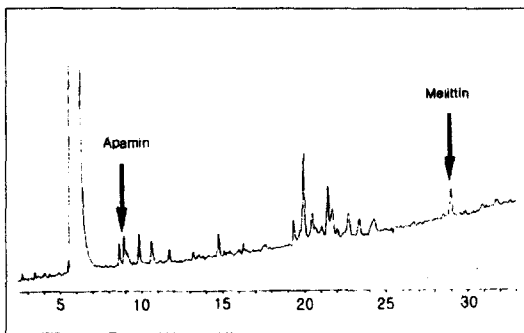


Fig. 9. HPLC chromatogram of C-BV\*\*\* (1:4000) on Delta-Pak 5 $\mu$  C18 300Å (3.9mm $\times$ 300mm) column (Waters).

\*\*\* : Chinese Bee Venom (0.5mg/ml, Fu Yu Pharmaceutical Factory)

래와 같은 peak가 나타났고, Retention time 5~7분에서 다른 봉약침에서는 검출되지 않는 이상 peak가 나타남을 알 수 있었다(Fig. 9).

IV. 고찰

蜂藥鍼療法은 살아 있는 꿀벌의 독낭 안에 들어 있는 蜂毒을 電氣刺戟<sup>4)</sup>이나 電磁波刺戟<sup>11)</sup> 등으로 추출하여 건조한 후, 정제 가공하여 약침요법과 같이 經絡理論을 바탕으로 穴位를 선택하여 질병을 치료하는 신침요법의 일종이다.

봉약침의 재료인 꿀벌로는 서양벌(*Apis mellifera*)중 일벌<sup>1),12)</sup>만이 사용되며, 독의 채취가 어려울 때에는 벌의 침을 뽑아서 취혈하는 拔鍼法과 벌을 혈위에 놓아 자극하는 直鍼法이 활용되었으나, 최근에는 電氣抽出法<sup>4)</sup>이나 電磁波刺戟法<sup>9)</sup>으로 봉독을 추출 가공하여 건조한 봉독을 주사용 Ample, 연고 등으로 임상 및 연구용으로 이용되고 있다.

歷史的으로 볼 때 B.C 2,000年前 이집트 파피루스에서 벌의 鍼을 아픈 곳에 쏘이거나 문질러 치료했다는 내용을 確認 할 수 있고, B.C 4~5C에 히포크라테스도 蜂鍼을 神秘한 治療劑<sup>3)</sup>라고 하였으며, 前漢時代 以前の 醫學 著書로 推定되는 馬王堆 醫書에서도 蜂毒을 疾病의 治療에 利用<sup>5)</sup>하였음을 알 수 있다.

봉독은 무색 투명하며 점성이 있는 액체로 강한 쓴맛이 나는 방향성 물질이며, 건조 상태에서는 회백색 또는 황백색의 괴상이거나 분말상이다. 봉독액의 비중은 1.13이며 산도(PH)는 5.2~5.5범위이다. 이것은 쉽게 물과 산에 용해되지만 알콜에는 거의 용해되지 않는다. 봉독액은 상온에서 공기에 노출되면 재빨리 마르고 액 중량의 70%를 손실한다. 봉독은 냉동 상태에서 장기간 활성을 유지할 수 있다. 그러나 봉독은 산화성 물질에 의해서 쉽게 파괴되는 경향이 있다<sup>4),13)</sup>.

봉독의 性味는 大熱有毒 辛甘鹹<sup>14)</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>5)</sup>이 있다. 蜂毒의 主要 成分은 약 40가지 程度로, peptide, enzymes, physiologically active amines, carbohydrates, Lipids, amino acids 등으로 나누어 볼 수 있다. 이 중 重要な 役割을 하는 Peptide로는 Mellitin, Apamin, Adolapin, 그리고 Mast Cell Degranulating Peptide(MCD peptide)를 들 수 있고 全體的으로 抗炎, 抗菌, 解熱作用과 함께 ACTH 分泌 促進, 血管 透過性 促進의 作用이 있다.

蜂毒의 治療 作用은 全身的, 局所의 作用과 經穴 作用으로 나누어 생각해 볼 수 있는데<sup>14)</sup>, 全身作用은 蜂毒이 身體의 免疫系에 變化를 招來하고 시상하부-뇌하수체-부신피질 軸에 作用하여 cortisone을 促進시키는 作用 등을 疾病의 治療에 利用하는 것이고, 局所作用은 筋骨絡係 疾患의 경우에 蜂毒이 그 投與 部位에 일으키는 局所의 效果로 抗炎症, 鎮痛效果이다. 經穴 作用은 蜂毒 刺戟 部位를 鍼灸學理論에 따라 選穴한 經穴의 刺戟에 의한 鍼의 效果와 蜂毒 自體의 效果가 上升作用이 일어나는 것을 말한다. 이는 疏通氣血, 活血化癆의 作用으로 稱할 수 있으며, 蜂毒 刺戟은 經穴에 加해지는 機械的 刺戟 外에도 局所 反應인 發赤, 發熱, 腫脹에 의한 溫熱刺戟의 意味도 包含한다. 蜂藥針 療法은 上記한 局所的 作用과 經穴 作用을 利用하여 治療하는 것이다.

봉침에 대한 최초의 임상보고로는 1870년대 영국의 Dr. Rucumkis<sup>15)</sup>가 reumatoid arthritis와 gout을 대상 질환으로 하여 논문 발표한 이후 통풍<sup>16)</sup>, 신경통<sup>17)</sup>, 항암작용<sup>3)</sup> 등에 대한 발표가 있었다. 국내에 보고된 봉약침의 임상논문으로는 권<sup>18)</sup>은 봉독요법이 류마티스성 관절염 치료에 임상적으로 유의한 결과를 보고한바 있으며, 또 봉독요법의 면역반응에 관한 임상적 현상에 대하여 분석하여 보고<sup>11)</sup>한 바 있다. 이 등<sup>19)</sup>은 봉약침을 장기간 사용하여도 간이나 신장에 나쁜 영향을 미치지 않는다고

보고하였다. 봉약침에 대한 실험논문으로는 1992년 이 등<sup>7)</sup>은 中腕穴, 足三里穴에 상당하는 위치에 봉독과 생리식염수를 주입한 후 혈위, 주입량, 시간경과에 따른 진통효과를 초산법으로 측정된 실험에서, 유의한 진통효과를 나타내었다고 보고하였다. 1993년 권 등<sup>20)</sup>은 봉독의 소염 및 활혈작용에 대한 실험 결과 급·만성 염증에 유의한 부종억제 효과와 소염작용을 나타냈다고 보고했다. 1995년 이 등<sup>7)</sup>은 약침용 봉독액의 안전성 평가를 위한 한국산 봉독액의 항원성 시험, 발열성시험 결과를 보고했으며, 1997년 권<sup>21)</sup>은 3-MCA 유발 상피종실험에서 봉약침이 면역기능에 관련된 백혈구, T-Cell, B-Cell의 증가를 유도하고 암세포를 억제한다고 보고했고, 1998년 권 등<sup>22)</sup>은 蜂鍼자극군, 刺鍼자극군에 의해 나누어 초산법에 의한 진통효과를 측정된 결과 봉침자극군에서 유의한 진통효과가 관찰되었으며 carrageenin 부종 억제효과는 봉침자극군은 90분과 120분에서, 자침자극군에서는 120분에서 유의한 결과를 보였으며, adjuvant유발 관절염에 의한 부종에 대해서는 억제효과가 관찰되지 않았다고 보고했다. 또 1998년 김 등<sup>23)</sup>은 봉독요법의 소염·진통 작용에 관한 실험적 연구를 통해, carrageenin유발 급성부종, adjuvant 관절염으로 인한 종창, 백혈구 유주, 모세혈관 투과성 등이 유의하게 감소되었고, 초산법에 의한 진통효과, 열판법에 의한 진통효과, in vitro bioassay법을 이용한 trypsin 저해효과, 용혈효과 등에서 유의한 효과를 확인했다고 보고했다. 2000년 김 등<sup>24)</sup>은 봉독약침자극이 뇌간 신경세포와 Serotonin성 신경세포를 활성화시킨다고 보고하였으며, 박 등<sup>25)</sup>은 약침용 봉독액이 흑색종세포에 영향을 미쳐 항암효과가 있음을 보고하였다

본 실험에 사용된 표준시약인 Apamin(SIGMA A-1289(Apamin from Bee Venom, Purity 99%)), Phospholipase A<sub>2</sub> (SIGMA P-9279 (Pho-

spholipase A<sub>2</sub> from Bee Venom : *Apis mellifera*) 그리고 Mellitin(SIGMA M-4171 (Mellitin from Bee Venom, Purity 99%))은 봉독의 주요성분이다.

봉약침의 성분을 분리해내는 데에는 투석, 용해, 여과, 이온교환 크로마토그래피, HPLC 등 여러 가지 방법<sup>4)</sup>을 응용하게 되는데, 특히 HPLC는 정밀한 성분 분리가 가능하고<sup>26)</sup> 용량이 적은 경우나 이미 부분적으로 정제한 경우에 효과적이며, 봉독으로부터 순수한 Peptide를 최종적으로 분리해낼 때 그 순도를 측정하는 방법으로도 쓰인다.

RP-HPLC(Reversed-phase High performance Liquid chromatography)는 단백질과 단백질의 분석을 위한 가장 강력한 기술중의 하나로 봉독 정제 평가의 중요한 분석법이라<sup>27)</sup>고 하였다. 이에 실험에서는 RP-HPLC를 통해 봉약침을 분석하였다. 分析試驗에 사용된 試料는 전기 자극법으로 국내에서 채취한 봉독(K-BV I)과 전자과 자극법으로 국내에서 생산된 봉독(K-BV II) 및 현재 외국에서 사용되고 있는 미국산 Apitoxin<sup>TM</sup>(A-BV: 1 mg/ml, Monmouth Pain Institute, Inc., U.S.A.)과 중국산 봉독주사액(C-BV: 0.5mg/ml, Fu Yu Pharmaceutical Factory, China)을 사용하였다. 분석에 사용된 시료는 생리식염수와 증류수로 분석에 적절한 농도인 1:100, 1:500, 1:1000 및 임상에 많이 사용되고 있는 1:4000에 대해서도 동일한 농도에서의 비교분석을 위한 시료로 사용하였다.

Apamin을 HPLC를 이용하여 분석한 결과 Retention time은 약 8.7분으로 나타났고, 표준용액 검량선은  $y=4E+06x+21245$ 의 일차함수 관계를 나타내었다(Fig. 4, Fig. 5). Mellitin을 HPLC를 이용하여 분석한 결과 Retention time은 약 29.0분으로 나타났고, 표준용액 검량선은  $y=4E+06x+23015$ 의 일차함수 관계를 나타내었다(Fig. 6, Fig. 7). Phospholipase A<sub>2</sub>의 표준시약을 HPLC를 이용

하여 분석해 본 결과 4개의 Peak를 형성하는 관계로 실험에서 배제시켰으나, Fig. 8에서 Fig. 12까지를 보면, 공통적으로 20분 전후에서 선명한 peak가 관찰되는데, 이것은 Phospholipase A<sub>2</sub>인 것으로 추측된다. MCD peptide 표준시약(SIGMA M-8036, Purity 98%)도 HPLC로 분석하였으나 머무름 시간(Retention time)이 명확하게 나타나지 않는 관계로 배제되었다. 이는 표준 시약이긴 하지만 시간의 경과에 따른 성분 효소의 파괴와도 관련이 있을 것으로 사려된다.

HPLC 분석으로 얻어진 표준검량선을 이용하여 peak면적과의 일차함수 관계를 통하여 Melittin과 Apamin의 농도를 측정하였다(Table 3). K-BV I에는 Apamin과 Melittin의 농도가 각각  $46.756\mu\text{g/ml}$ ,  $13890.33\mu\text{g/ml}$ 으로 나타나 Melittin이 약 297배 높게 검출되었고, K-BV II에는 Apamin과 Melittin의 농도가 각각  $38.361\mu\text{g/ml}$ ,  $12607.13\mu\text{g/ml}$ 으로 나타나 Melittin이 약 329배 더 높게 검출되었으며, C-BV는 각각  $0.643\mu\text{g}$ ,  $7.135\mu\text{g}$ 으로 Melittin의 양이 약 12배 많게 검출되었다. 한국산 K-BV I과 K-BV II를 비교해볼 때 동일한 농도에서는 K-BV I에서 Melittin의 함량이 더 많음을 알 수 있었다. C-BV는 농도를 고려하더라도 K-BV I과 K-BV II에 비해 Melittin : Apamin이 약 12 : 1의 분포로 나타났고, 또한 Fig. 12에서 보면 C-BV의 HPLC 분석결과 Retention time이 5~7분 사이에서 다른 봉약침에서는 관찰되지 않는 이상 Peak가 나타남을 알 수 있었다. 따라서 Random Sampling을 통한 재분석이 요구됨을 알 수 있었다.

봉약침 성분을 분석, 비교하여 봉약침 사용에 있어 증거(準據)를 제시하고자 시행한 본 실험 과정에서 미흡했던 점은 봉약침의 농도에 문제점이 제기 될 수 있다는 것이다. 향후 Random sampling을 통해 각 국가별 또는 산지별로 많은 sample을 재료로 실험을 시행하여 자료를 얻어야 할 것이라고 생



각된다. 또한 채취시기에 따른 봉약침의 성분 및 경시적(經時的)인 안정성 연구도 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사려된다.

## V. 결 론

치료용 봉약침의 성분을 분석, 比較하고 準據를 제시하고자 A-BV(Apitoxin™ : 1mg/ml, Monmouth Pain Institute, Inc., U.S.A.), C-BV(0.5mg/ml, Fu Yu Pharmaceutical Factory, China) 및 채취 방법이 다른 한국산 봉약침(K-BV I, K-BV II)의 成分을 HPLC로 分析하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 1:4000 이하 저농도의 봉약침 분석을 위해서는 HPLC를 이용하는 것이 유의성이 있었다.

2. Apamin의 HPLC 분석 결과, Retention time은 약 8.7분으로 나타났고, 표준용액 검량선은  $y=4E+06x+21245$ 의 일차함수 관계를 나타내었다.

3. Melittin의 HPLC 분석 결과, Retention time은 약 29.0분으로 나타났고, 표준용액 검량선은  $y=4E+06x+23015$ 의 일차함수 관계를 나타내었다.

4. 1:500으로 희석된 K-BV I에는 Melittin이 Apamin보다 약 297배 높은 농도를 가지고 있고, K-BV II에는 약 329배 더 높은 농도이며, C-BV에서는 약 12배를 나타냈다.

5. C-BV의 HPLC분석에서는 Retention time이 5~7분 사이에서 이상 peak가 나타남을 알 수 있었다.

봉약침 성분을 분석, 比較한 것은 임상적 사용에 있어 準據(準據)를 제시하는데 도움이 될 것으로 사려되며, 향후 봉약침에 대한 경시적(經時的)인 안정성 연구 및 지속적 연구가 이루어지는 것이 바람직하리라 사려된다.

## VI. 참고문헌

1. 崔承允 : 新制養蜂學, 서울, 집현사, PP47~56, 328~330, 1987.
2. 權奇祿 : 蜂針에 대한 考察, 대한 침구학회지, Vol 11, No1, p160, 1994
3. Tom piek: Venom of the Hymenoptera, Academic Press, London, pp.107~120, 1986.
4. 金文昊 : 봉독요법과 봉침요법, 서울, 한국교육기획, PP20~37, 41~42, 57, 70, 72, 133~149, 171~176. 1996.
5. 인창식, 고희균 : 봉독요법에 대한 한의학 최초의 문헌기록: 마왕퇴의서의 봉독요법 2례, 대한 침구학회지, Vol 15, No1, p143, 1998
6. Benton A.W., Morse R.A., Stewart J.D.: Venom collection from honey bees, Science 142: 228~230, 1963
7. 崔甲洵 : 大黃과 酒炒大黃중 SENNOSIDE A와 B의 함량 및 효능에 관한 比較연구, 상지대학교 대학원, p10~11, 1994.
8. 李奉柱, 金護哲, 安德均, 李商仁 : 桃仁의 規格化와 Tricicine의 약효에 關한 研究, 李商仁教授 回甲記念論文集, pp372~373, 1996.
9. 소명섭, 박영광, 노경호, 정성택 : RP-HPLC에서 Deoxyribonucleosides를 분리하기 위한 최적 실험조건, Theories and Applications of Chem. Eng. Vol. 2. No.1, p 341. 1996.
10. 권우혁 : 생균제용 Bifidobacterium supp.의 분자유전학적 동정과 생리적 특징. 상지대학교 대학원, p17, 1999.
11. 崔大鳳 : 養蜂協會報, 한국양봉협회, 서울,

- 12월호, 1986.
12. 崔承允 : 양봉, 꿀벌과 벌통, 五星出版社, 서울, pp117~118, 1987.
  13. 고문수 : 동의학총서·동물성독약, 서울, 여강출판사, pp.185~190, 1993.
  14. 權奇祿 : 봉독요법의 면역반응에 관한 임상적 연구, 전국한의학 학술대회 지, p277, 1999.
  15. 성은찬 : 알기쉬운 봉독요법 108, 전국농업기술자협회 출판부, p28, 1990
  16. 張 震 : 雲南中醫雜誌, 上海, 雲南新華印刷社, 5:39~41, 1990
  17. 朱文峰 : 實用 中醫辭典, 陝西, 陝西科學技術出版社, pp. 9~10. 1978
  18. 권기록 : 봉독요법의 류마티스성 관절염 치료에 대한 임상적 연구, 전국한의학 학술대회지, p 130~131, 1998.
  19. 이병철, 천미나, 양명복 : 봉독약침이 장기환자의 LFT와 RFT에 미치는 영향, pp 11~19, Vol.17, No.2, June, 2000
  20. 권기록, 고흥균, 김창환 : 태충 및 족삼리의 방풍수침과 봉독요법이 소 염 및 활혈자극에 미치는 영향, 경희한의대논문집 16: 297 ~ 323, 1993.
  21. 권기록 : 봉독약침자극이 3-MCA 유발 상피종에 대한 항암 및 면역반응에 미치는 영향, 경희대학교 대학원, 1997년 8월.
  22. 권기록, 고흥균 : 봉독약침요법이 항염, 진통 작용에 미치는 효능에 관한 실험적 연구, 대한침구학회지 15(2): 97~103, 1998.
  23. 김지영, 고흥균, 김용석, 박영배, 김창환, 강성길 : 봉독약침요법의 항염 중 작용에 관한 실험적 연구, 대한침구학회지 15(1): 317~331, 1998.
  24. 김혜남, 고흥균, 박동석, 강서길, 김용석, 최용태 : 봉독약침자극이 뇌간 신경세포와 Serotonin성 신경세포를 활성변화에 미치는 영향, 대한침구학회지 17(2)119~138, 2000
  25. 박찬열, 남상수, 김창환, 이제동, 강성길, 이윤호, 안병철: 약침용봉독액이 흑 색종세포에 미치는 항암효과에 대한 분자생물학적 연구, 17(2) 169~186, 2000.
  26. Neumann W., Habermann E., Amend G. Zur papierelektrophoretischen fraktionierung tierischer gifte, Naturwissenschaften 39: 286~287, 1952.
  27. GY.SZOKAN, J.HORVATH, M . ALMANS, etc, Liquid chromatographic analysis and separation of polypeptide components from Honey Bee Venoms. JOURNAL OF LIQUID CHROMATOGRAPHY, 17(16), 3333~3349, 1994.