

원저

봉독침의 봉독함량분석과 LD₅₀ 및 조직학적 소견 관찰

장성봉 · 권기록*

* 상지대학교 한의과대학 침구학 교실

Experimental Studies of quantitative evaluation using HPLC and safety of Bee Venom Acupuncture.

Seong Bong Jang* · Ki Rok Kwon*

* Department of Acupuncture & Moxibustion, Oriental Medical College, Sangji University

Abstract

Objectives : This study was conducted to carry out quantitative evaluation and safety of Bee Venom Acupuncture.

Methods : Content analysis was done using HPLC, measurement of LD₅₀, and histological observations were made on the skin and muscles.

Results :

1. According to HPLC analysis, each BVA-1 contained approximately 0.36 μ g, and BVA-2 contained approximately 0.54 μ g. But the volume of coating was so minute, slight difference exists between each needle.
2. LD₅₀ of mouse with BVA-1 was 16 counts and this is equivalent to 640 needles/kg, making Bee Venom Acupuncture safe treatment apparatus.
3. Regardless of the number of needles, there was no sign of blood stasis or inflammation detected on the skin and muscle tissues.

Conclusion : 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.

1. 서론

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

봉약침요법은 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 사용하여 경혈이나 질병과 유관한 부위에 주입하는 방법을 사용하고 있는데, 이는 다음과 같은 아쉬움이 있다. 첫째, 취혈의 정확도에서 정교함이 부족하고, 둘째, 임상에서 봉약침을 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

※ 교신저자 : 권기록, 강원도 원주시 우산동 283 상지대학교
부속 한방병원 침구과
(Tel: 033-741-9257 E-mail: beevenom@paran.com)

양의 봉약침이 주입되면서 유발되는 통증으로 인하여 pain shock과 같은 문제를 야기할 가능성이 있다. 이러한 문제를 개선하고자 하는 목적으로 봉독침이 개발되었다.

아직은 연구단계이지만 침과 약침의 중간단계의 치료법으로 한국한의학의 새로운 의료도구로 발전할 가능성이 많은 시도로 판단되며, 보다 나은 품질관리와 치료효능에 대한 많은 연구가 이루어져야 할 것이다.

따라서 그 첫 번째 시도로서 HPLC를 이용한 봉독침의 봉독함량분석과 up-down법을 이용한 LD₅₀ 측정, 그리고 H-E stain을 이용한 피부와 근육의 조직학적 소견을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험방법 및 결과

1. 봉독침의 정량분석

1) 봉독침

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

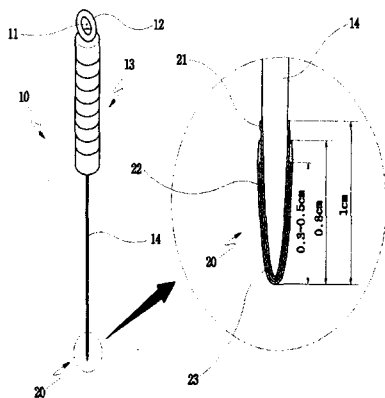


Fig. 1 The structure of Bee Venom Acupuncture

Stainless still의 침침과 봉독층 사이의 첫 번째 층, 봉독층, 그리고 봉독과 외부의 접촉을 차단하기 위한 층으로 구성되어 있으며, 침이 피부층을 통과할 때 닳이거나 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.

2) Melittin의 함량분석

① 검량선 작성

표준물질인 melittin을 여러 농도로 희석하여 20 μ 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.

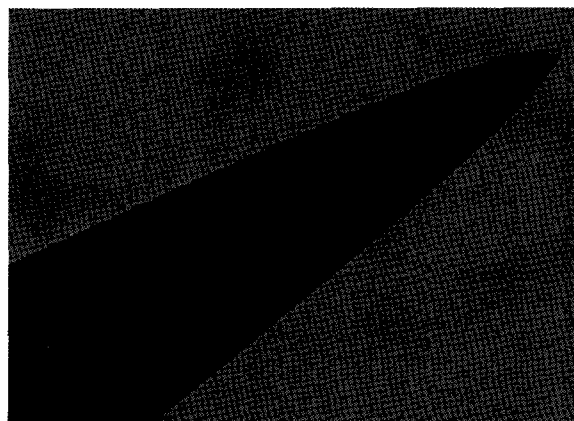


Fig. 2 Needle tip of Bee Venom Acupuncture

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(150×4.6mm: 5μ), Shiseido Co.		
Operating condition			
UV absorbance 215nm			
Column temp. 35°C			
Injection volume 20 μl			
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

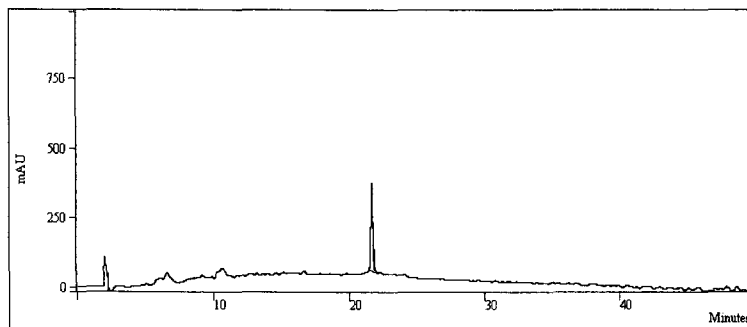


Fig. 3 HPLC chromatogram of standard melittin

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

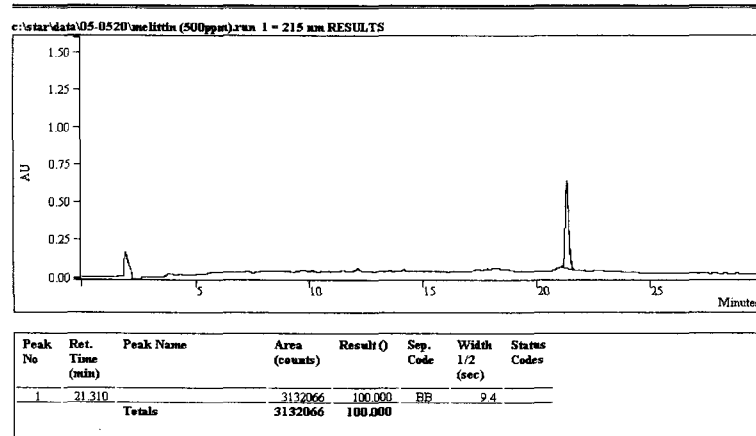


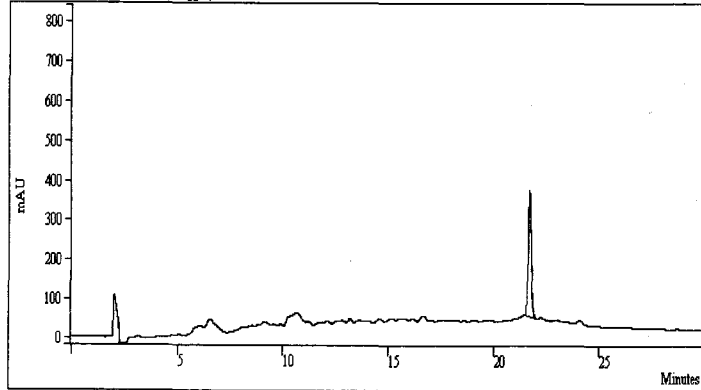
Fig. 4 HPLC chromatogram of melittin(500ppm)

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:
 Instrument (In): Varian Star #1

Run Mode: Analysis
 Peak Measurement: Peak Area
 Calculation Type: Percent

c:\star\data\05-0520\melittin (250ppm).run 1 = 215 nm RESULTS



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

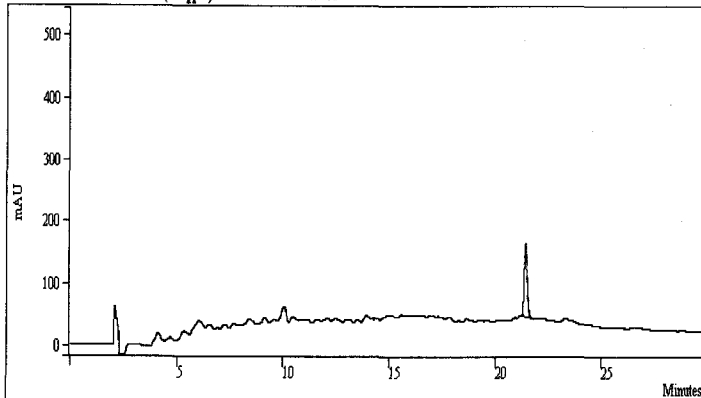
Fig. 5 HPLC chromatogram of melittin(250ppm)

Sample Name: melittin (100ppm)

Operator (In):
 Injection Date: 05-05-20 05:37:15 PM
 Calc Date: 05-05-20 06:27:17 PM
 Run Time (min): 49.982
 Workstation:
 Instrument (In): Varian Star #1

Run Mode: Analysis
 Peak Measurement: Peak Area
 Calculation Type: Percent

c:\star\data\05-0520\melittin (100ppm).run 1 = 215 nm RESULTS



Peak No	Ret. Time (min)	Peak Name	Area (counts)	Result (%)	Sep. Code	Width (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 (Inj):
 Injection Date: 05-05-20 06:48:22 PM
 Calc Date: 05-05-20 07:36:20 PM
 Run Time (min): 41.697
 Workstation:
 Instrument (Inj): Varian Star #1

Run Mode: Analysis
 Peak Measurement: Peak Area
 Calculation Type: Percent

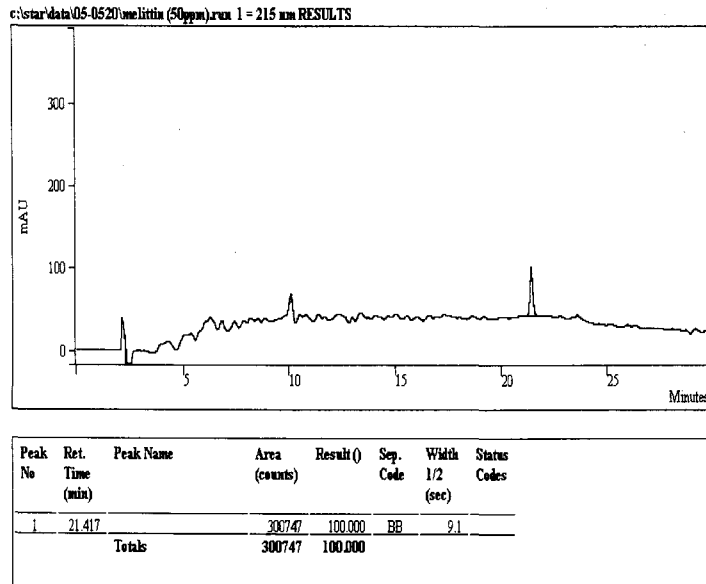


Fig. 7 HPLC chromatogram of melittin(50ppm)

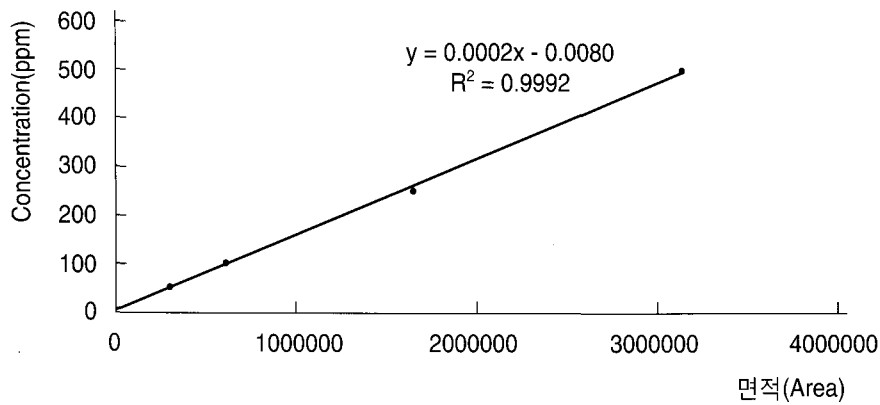


Fig. 8 Calibration Curve of Melittin

② BVA-1의 Melittin 분석

침을 5개, 10개, 20개씩으로 하여 H₂O 100 μl에 1시간 이상 녹인 후 30분 동안 40°C에서 incubation하였다. 그 결과 5개와 10개에서는 피크를 얻을 수 없었고, 20개에서 피크를 얻을 수 있었다. 이를 검량곡선에 대입하여 20개의 침에 7.21562 μg/ml의 봉독이 있음을 알 수 있었다. 이를 다시 침 1개의 양으로 나눈 결과 침 1개에는 약 0.36 μg의 melittin이 들어있음을 알 수 있었다(Table 2).

③ BVA-2의 Melittin 분석

10개의 침을 H₂O 100 μl에 1시간 이상 녹인 후 30분 동안 40°C에서 incubation하였다.

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

Table 2. Melittin contents of Bee Venom Acupuncture-1

Sample	함량 (μg/20needles)	함량 (μg/1needle)
BVA-1	7.21562	0.36078

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

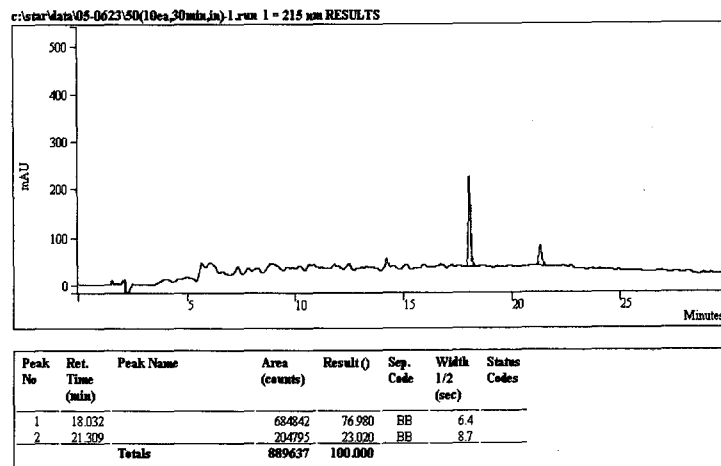


Fig. 9 HPLC chromatogram of melittin in Bee Venom Acupuncture-1

Table 3. Melittin contents of Bee Venom Acupuncture-2

Sample	함량 (μg,10개)	함량 (μg,1개)
BVA-2	5.4441	0.54441

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

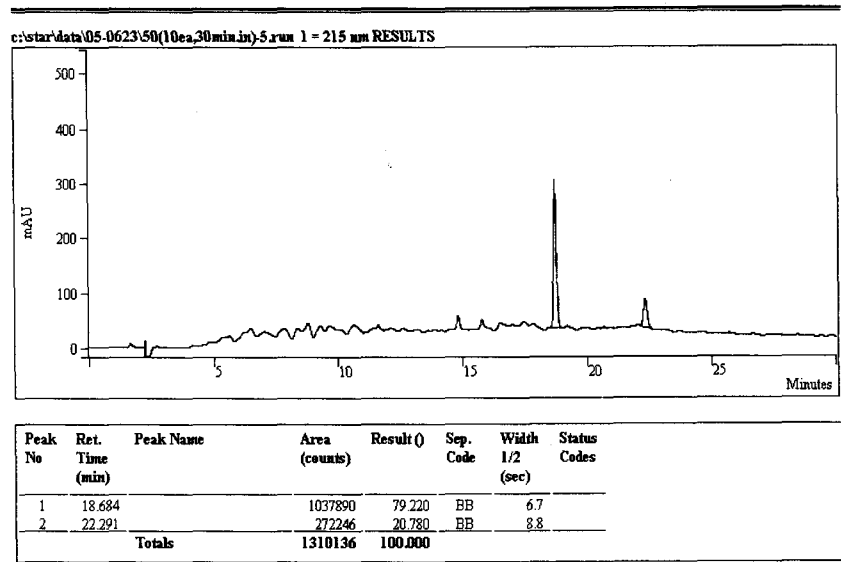


Fig. 10 HPLC chromatogram of melittin in Bee Venom Acupuncture-2

2. LD₅₀의 측정

LD₅₀의 산출방법은 Up and Down 방식을 이용하였다. 이는 단 시간에 소규모의 실험동물을 이용해서 빠르고 정확하게 값을 산출할 수 있는 특징이 있어 독성 및 안전성 검사에서 많이 응용되는 방법이다.

실험에 사용된 동물은 체중 20.0g±2.0g의 ICR계 음성 mouse를 실험실 환경에서 2주간 적응시킨 후 사용하였다.

실험방법은 mouse의 배부에 침관을 이용하여 가볍게

자침(BVA-1)하였고, 침의 개수를 조절하면서 각 개체마다 일주일간 생존과 사망을 관찰하였다. 그 결과 BVA-1의 LD₅₀은 16개로 나타났고, 이는 640needles/kg으로 매우 안전한 치료도구임을 알 수 있었다.

* LD₅₀의 계산 :

$$\frac{(1 * 6) + (2 * 6) + (3 * 1)}{13} = \frac{21}{13} = 1.6$$

$$\log LD_{50} = \log 10 + 1.6(\log 20 - \log 15) = 1 + 1.6(1.301 - 1.176) = 1.2$$

$$\therefore LD_{50} = 10^{1.2} \approx 16(\text{개})$$

Table 4. LD₅₀ of Bee Venom Acupuncture-1 using the up & down methods

Grade	Needle	No. of mouse														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	12	14	
3	25														D	
2	20			D		D		D		L		D		D		
1	15		L		L		L		L				L		L	
0	10	(L)														

L: Live, D: Death

3. 조직학적 소견

체중 $20.0g \pm 2.0g$ 의 ICR계 웅성 생쥐를 실험실 환경에서 2주간 적응시킨 후 사용하였다. 실험방법은 mouse의 배부에 침관을 이용하여 가볍게 자침(BVA-1)한 후 1시간가량 방치하여 충분히 봉독이 체내에서 흡수되게 하였다. 침의 시술 개수에 따른 조직의 변화를 관찰하기 위하여 10개, 20개, 30개를 시술한 후 치사하여 피부와 근육을 취한 후 paraffin을 처리하였다. 이 후 embedding center의 warming chamber에서 $60^{\circ}C$ 로 2hr 동안 방치하여 impregnation한 후 조직을 잘라 균등하게 냉각 후 냉동실에 보관하였다. 이를 $4-5\mu m$ 두께로 자른 후, 박절된 조직을 붓으로 조심히 떼어내어 50% 알콜에 띄워 floating bath로 옮겨서 잘된 절편을 albumin이 얇게 발라진 slide위에 접착하여 labelling하였다. 완전히

물방울을 제거한 뒤 60° 의 부란기에 2-3시간 방치하여 조직을 고착시켜 현미경으로 관찰하였다. 염색법은 mercuric oxide를 산화제로 사용하여 hematoxylin을 숙성시키는 Harris-Hematoxylin stain을 사용하였다.

1) Skin에 미치는 영향

육안적으로는 피부의 충혈을 확인하였으나 현미경적 소견으로는 어떠한 조직 손상이나 변형도 확인할 수 없었다.

2) Muscle에 미치는 영향

근육층에도 봉독침의 시술로 인한 조직학적 변화는 관찰할 수 없었다.

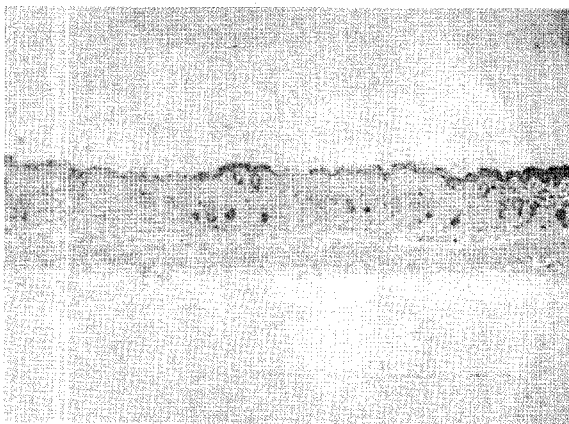


Fig. 11 Skin of mouse treated with 10 needles of BVA-1($\times 40$)

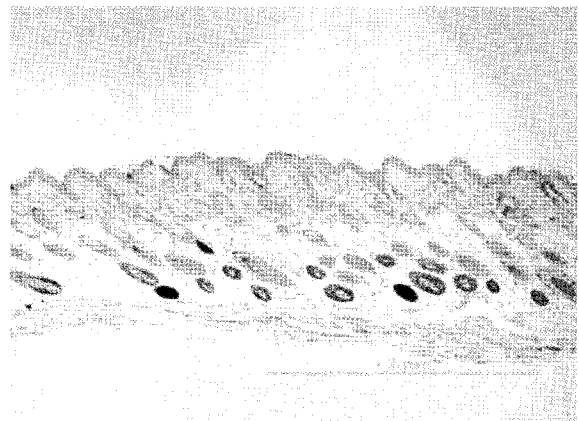


Fig. 12 Skin of mouse treated with 20 needles of BVA-1 ($\times 40$)

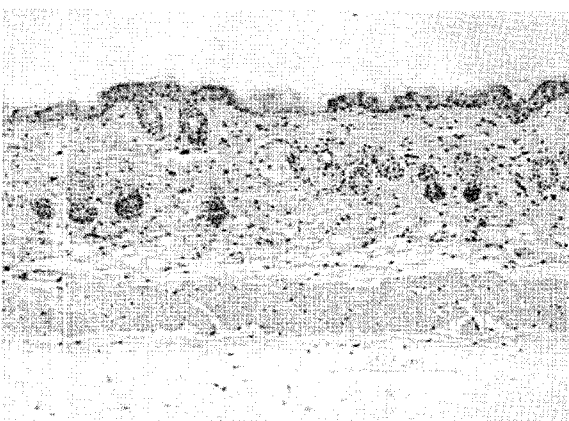


Fig. 13 Skin of mouse treated with 10 needles of BVA-1 ($\times 100$)

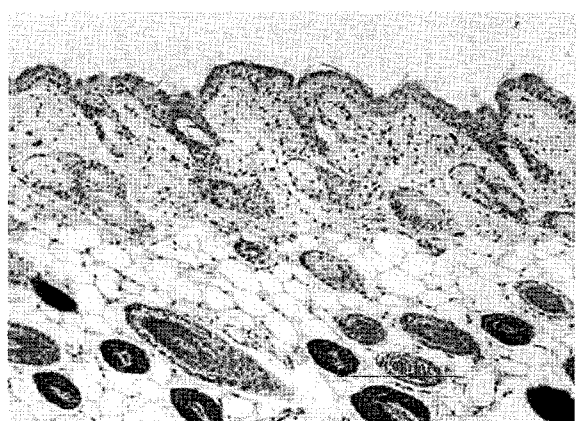


Fig. 14 Skin of mouse treated with 20 needles of BVA-1 ($\times 100$)



Fig. 15 Muscle of mouse treated with 10 needles of BVA-1 (×100)

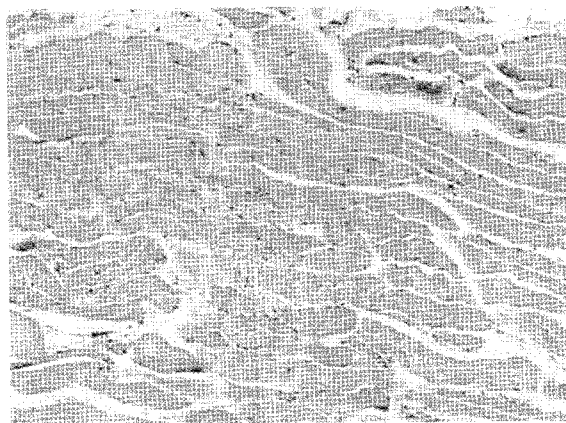


Fig. 16 Muscle of mouse treated with 20 needles of BVA-1 (×100)

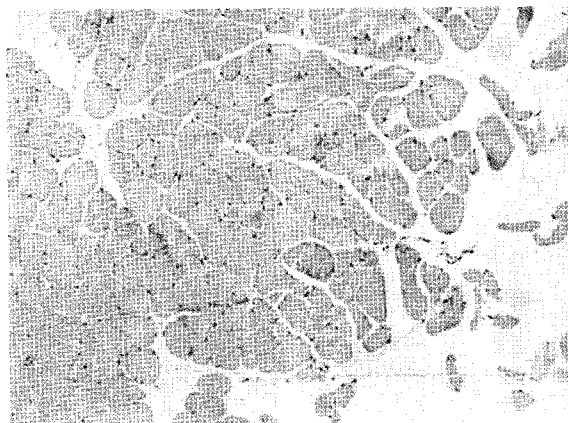


Fig. 17 Muscle of mouse treated with 30 needles of BVA-1 (×100)

III. 고찰

봉약침요법은 살아 있는 꿀벌의 독낭 안에 들어 있는 봉독을 전기 자극 등⁹⁾으로 추출하여 건조한 후, 정제 가공하여 辨證施治하는 新鍼療法이다.

봉독은 大熱有毒 辛甘鹹⁹⁾하며 補益精氣 除中益氣하고, 通經活絡 消腫排膿 清熱涼血의 효능⁹⁾이 있다. 봉독의 주요 성분은 약 40가지로, peptide, enzymes, physiologically active amines, carbohydrates, Lipids, amino acids 등으로 나누어 볼 수 있으며^{5,6)}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 항염⁷⁾, 진통⁸⁾, 면역기

능 강화⁹⁾ 그리고 항암작용¹⁰⁾ 등이 있었고, 임상적인 연구로는 요추간판탈출증¹¹⁾, 근위축증¹²⁾, 류마티스 관절염^{13,14)}, 슬관절염¹⁵⁾ 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 침체에 코팅되어 있는 봉독의 양을 HPLC를 이용하여 정량적으로 평가하였고, up & down법⁴⁾으로 LD₅₀을 산출하였으며 봉독침 시술 후의 조직손상을 관찰하기 위하여 H-E stain으로 피부층과 근육층을 살펴보았다.

HPLC는 정밀한 성분 분리가 가능하고¹⁶⁾ 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 μ g의 melittin이, BVA-2에는 약 0.54 μ g의 melittin이 들어있음을 알 수 있었다. 하지만 코팅된 양이 극히 미량이라서 개체간의 차이가 있음을 알 수 있었다. 이는 앞으로 보완해야 될 기술적인 부분으로 생각되었다.

봉독침의 LD₅₀을 산출하기 위하여 체중 20.0g \pm 2.0g의 ICR계 웅성 mouse의 배부에 침관을 이용하여 가볍게 자침(BVA-1)한 후 각 개체의 일주일간 생존과 사망을 관찰하였다. 그 결과 mouse의 BVA-1에 대한 LD₅₀은 16개로 나타났고, 이는 640needles/kg으로 독성이 매우 약하여 안전한 치료도구임을 알 수 있었다. 봉독침에 함유된 봉독의 양을 계산하면 melittin이 봉독의 약 50%를 차지한다고 하여도 0.46mg/kg으로 이는 봉약침의 LD₅₀ 보고¹⁷⁾에 비하여 현저하게 낮은 양임을 알 수 있었다. 이는 아마도 침의 자극이 mouse의 사망원인을 크게 높인 것으로 추정할 수 있었다.

봉독침 시술 후의 조직손상을 관찰하기 위하여 H-E stain으로 피부층과 근육층을 살펴보았다. 그 결과 봉독침의 개수와 상관없이 피부와 근육의 조직에는 아무런 울혈반응이나 염증반응을 일으키지 않음을 알 수 있었

다.

이상의 내용을 종합해보면 봉독침은 아직 기술적으로 보완해야 할 부분이 있고, 지속적인 Quality Control이 이루어져야 하며, 독성은 심하지 않아 임상적 사용에 큰 문제는 없을 것으로 판단되었다. 향후 다양한 방법으로 추가적인 연구가 진행되기를 바란다.

IV. 결 론

봉독침의 HPLC를 이용한 함량분석과 LD₅₀ 측정, 피부 및 근육의 조직학적 관찰을 시행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. HPLC 분석결과 1개의 BVA-1에는 약 0.36 μ g이, BVA-2에는 약 0.54 μ g이 들어있음을 알 수 있었다. 하지만 코팅된 양이 극히 미량이라서 개체간의 차이가 있음을 알 수 있었다.
2. mouse의 BVA-1에 대한 LD₅₀은 16개로 나타났고, 이는 640needles/kg으로 독성이 매우 약하여 안전한 치료도구임을 알 수 있었다.
3. 봉독침의 개수와 상관없이 피부와 근육의 조직에는 아무런 울혈반응이나 염증반응을 일으키지 않음을 알 수 있었다.

이상의 결과로 보아 봉독침은 주사기 사용의 단점을 보완할 수 있는 한방치료도구로 평가되지만 이를 위해서는 보다 다양한 연구가 진행되어야 한다고 생각된다.

參考文獻

1. 대한약침학회. 약침요법 시술 지침서. 대한약침학회. 1999 ; 133-135.
2. 長澤 弘, 藤原公策, 前島一淑, 松下 宏, 山田淳三, 横山 昭. 實驗動物 handbook. 養賢堂. 1983 ; 655-656.
3. 권기록. 蜂針에 대한 考察. 대한 침구학회지. 1994 ; 11(1) : 160.
4. 인창식, 고희균. 봉독요법에 대한 한의학 최초의 문헌기록: 마왕퇴의서의 봉독요법 2례, 대한 침구

- 학회지, 1998 ; 15(1) :143.
5. Barbara & Rudolf, Chemistry and Pharmacology of Honey Bee venom, Academic Press. 1986 ; 329-402.
 6. Herberman, R.B. and Ortaldo, J.R.. Natural killer cells. their role in defenses against disease. Science. 1981 ; 214 : 24.
 7. 권기록, 고희균. 봉독약침요법의 항염, 진통작용에 미치는 효능에 관한 실험적 연구, 대한침구학회지, 1998 ; 15(2) : 317-331.
 8. 고희균. 봉독약침요법의 항염, 진통작용에 미치는 효능에 관한 실험적 연구, 대한한의학회지. 1992 ; 13(1) : 283-292.
 9. 권기록, 고희균. 봉약침요법의 면역반응에 관한 임상적 연구. 대한침구학회지. 2000 ; 17(1) : 169-174.
 10. 권기록. 봉독약침자극이 3-MCA 유발 상피종에 대한 항암 및 면역반응에 미치는 영향, 대한침구학회지 1997 ; 14(2) : 151-172.
 11. 전형준 외. 봉약침으로 치료한 요추간판탈출증 환자의 임상적 평가, 대한침구학회지. 2003 ; 20(5) : 63-72.
 12. 권기록. 한방치료를 통한 근위축성 측삭경화증의 임상적 연구, 대한침구학회지. 2003 ; 20(3) : 209-216.
 13. 권기록. 봉독요법의 류마티스성 관절염 치료에 대한 임상적 연구, 전국한의학 학술대회지. 1998 ; 130-131.
 14. 이상훈 외. 무작위 대조 이중맹검 시험을 통한 봉독약침의 류마티스 관절염 치료효과, 대한침구학회지. 2003 ; 20(6) : 80-87.
 15. 이성노 외. 봉약침 치료의 퇴행성 슬관절염에 대한 임상적 고찰, 대한 침구학회지. 2003 ; 20(5) : 73-81.
 16. 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.
 17. 권기록, 장성봉, 최영근. 봉약침의 LD₅₀ 변화량 보고. 대한약침학회지. 2005 ; 8(1) : 41-44.