

원저

Sweet BV의 함량분석과 시술 부위별 LD⁵⁰ 관찰

- 권기록* · 곽경승* · 박희수* 상지대학교 한의과대학 침구학교실
- 김민기** 원광대학교 대학원
- 차배천*** · 이은*** 상지대학교 응용동물과학부

Experimental Studies of quantitative evaluation using HPLC and safety of Sweet Bee Venom

Ki Rok, Kwon* · Ching Seng Chu* · Hee Soo Park* · Min Ki Kim** · Bae Chun Cha*** · Eun Lee***

* Dept. of Acupuncture & Moxibustion, Korean Medical College, Sangji University

** Graduate School, Won-Kwang University

*** Devision of Animal resourses and life science, Sangji University

ABSTRACT

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

Methods Content analysis was done using HPLC, measurement of LD⁵⁰ was conducted intravenous, subcutaneous, and intramuscular injection to the ICR mice.

Results 1. According to HPLC analysis, removal of the enzymes containing phospholipase A2 was successfully rendered on Sweet Bee Venom.

And analyzing melittin content, Sweet Bee Venom contained 12% more melittin than Bee Venom.

2. LD⁵⁰ of ICR mice with Sweet Bee Venom was more than 20mg/kg in subcutaneous injection and intravenous injection, between 15mg/kg and 20mg/kg in muscular injection.

3. LD⁵⁰ of ICR mice with Bee Venom was between 6 and 9mg/kg in subcutaneous injection and intravenous injection, and more than 9mg/kg in muscular injection.

Conclusion Above results indicate that Sweet Bee Venom was more safe than Bee Venom and the process of removing enzymes was well rendered in Sweet Bee Venom.

Key word Sweet Bee Venom, Bee Venom, LD⁵⁰, HPLC analysis, melittin

1. 서론

독성실험은 의약품 등의 시험물질 안정성 평가를 위하여 중요한 기초자료이며 필수적이라고 할 수 있다.¹⁾

독성 연구의 주요 목적은 신약의 안정성을 평가하여 임상적 용약의 안전을 확보하기 위하여 시행하는 것으로 크게 급성독성 실험(단회 투여 독성시험), 아급성 독성 실험(1개월 반복 투여 독성시험), 그리고 만성독성시험(3개월 이상 반복투

여 실험)으로 나눈다.²⁾

이중, 급성 독성실험은 산화적 물질에 대해 제일먼저 시행하는 독성시험으로 실험동물에 검체를 비교적 대량으로 1회 투여하여 중독량, 치사량, 중독현상 및 다른 연구를 하기 위한 용량범위를 조사하는 실험이다.

급성 독성 실험 중 LD⁵⁰은 50% 치사량 측정을 말하는데 검체를 실험동물에 투여하였을 때 실험동물의 절반이 죽는 검체투여량을 말한다.³⁾

약재의 독성을 평가하는데 중요한 기준으로 사용되고 경구 투여시에는 14일, 주사시에는 7일간 관찰을 하는 것이 보

통이다.

현재 임상에서 사용되고 있는 다양한 약침제제들은 독성이 거의 없다고 보고되고 있으나⁴⁻⁶⁾ 벌의 독을 이용한 봉약침은 독성이 매우 강한 약침제제이다⁷⁾. 저자들은 봉약침의 시술시에 발생하는 allergy 반응이 종종 의료사고의 원인으로 작용하고 있고, 이로 인한 문제점을 근본적으로 해결하고자 allergy의 항원역할을 하는 효소를 봉독에서 원천적으로 제거한 효소제거봉독(이하 Sweet Bee Venom-Sweet BV)을 개발하였고⁸⁾, 선행 연구를 통하여 봉약침에 의한 아나필락시 반응과 국소 즉시형 과민반응의 위험을 낮추고 있음을 보고⁹⁻¹⁰⁾한 바 있다.

이에 저자들은 Sweet BV의 안정적 품질관리를 위하여 HPLC를 이용한 함량분석과 시술 부위별 LD⁵⁰을 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험방법 및 결과

1. Sweet BV의 정량분석

1) Melittin과 apamin의 함량분석

(Table 1) HPLC condition for analysis of melittin and apamin

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	20μl		
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

① 검량선 작성

표준물질로는 melittin과 apamin을 여러 농도로 희석하여 20μl를 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, 표준물질을 이용한 분석 결과 얻어진 검량선은 Fig. 1-2와 같다. Melittin의 상관계수(Correlation efficient)는 r²=0.9992(p<0.001)이었고, apamin의 상관계수는 r²=0.9996(p<0.001)이었다.

Phospholipase A₂(이하 PLA₂)는 검출의 유무만 확인하였다.

② 봉독과 Sweet BV의 함량 비교 분석

상기 검량선을 바탕으로 2000ppm의 봉독과 Sweet BV의 함량을 비교 분석한 결과 봉독에서는 melittin이 592.11mg/g, apamin은 19.20mg/g이었다.

Sweet BV에서는 melittin이 776.30mg/g, apamin은 16.09mg/g이었다.

18.15min에서 검출된 Phospholipase A₂는 Sweet BV에서는 검출이 되지 않아 Sweet BV에서 효소 성분의 제거가 잘 수행되었음을 알 수 있었고, 저분자 물질인 apamin의 함량이 봉독에 비하여 줄어든 것은 공정상에서 저분자 물질에 대한 분리과정 중 일부성분이 같이 제거되고 있음을 추정할

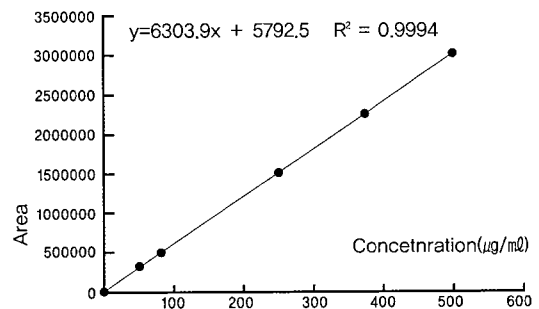


Fig. 1 Calibration Curve of Melittin

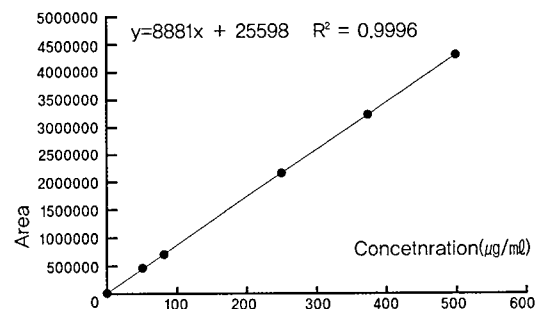


Fig. 2 Calibration Curve of Apamin

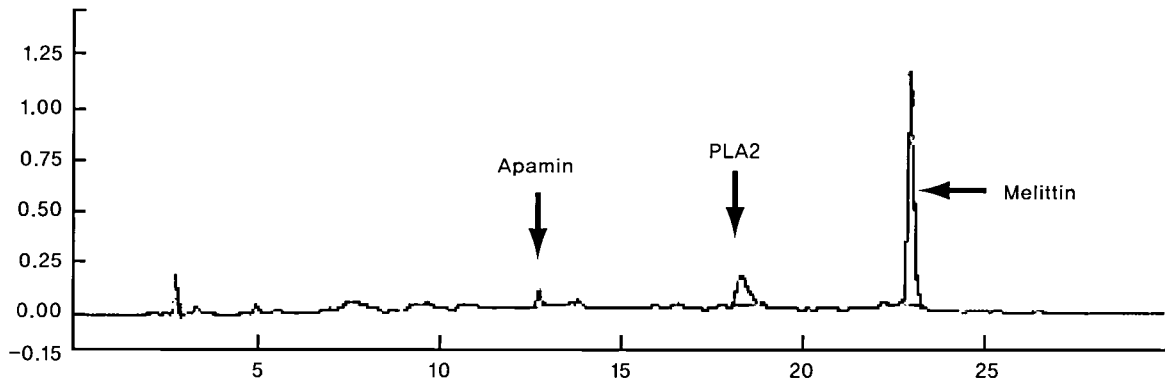


Fig. 3 Chromatogram of Bee Venom

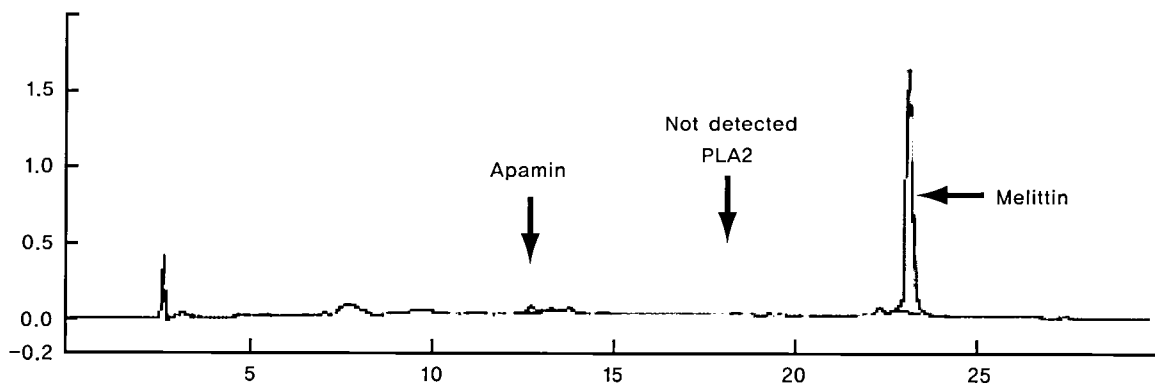


Fig. 4 Chromatogram of Sweet Bee Venom

This graph showed that Sweet Bee Venom was free from Phospholipase A2

수 있었다(Fig. 3-4).

2. 봉독과 Sweet BV의 LD⁵⁰ 측정

Sweet BV의 LD⁵⁰의 산출을 위하여 체중 20.0±2.0g의 ICR계 웅성 mouse를 실험실 환경에서 2주간 적응시킨 후 용량별로 한 군을 3마리로 하여 사용하였다. Sweet BV의 용량은 5mg/kg, 10mg/kg, 15mg/kg 그리고 20mg/kg으로 하였다.

대조군으로는 순수 정제 봉독을 사용하였고, 봉독의 용량은 이전의 연구 보고를 바탕으로 3mg/kg, 6mg/kg, 그리고 9mg/kg으로 정하였다.

실험방법은 mouse를 피하주입군(subcutaneous injection), 근육층 주입군(im), 그리고 정맥주입군(iv)으로 나누어 실험을 진행하였고 각 개체마다 일주일간 생존과 사망을 관찰하였다.

그 결과 Sweet BV에서 피하주입군의 LD⁵⁰은 20mg/kg 이상이었으며, 근육 내 주입군에서의 LD⁵⁰은 15-20mg/kg 사이였으며, 정맥 주입군에서의 LD⁵⁰은 20mg/kg 이상이었다(Table

2 & 4).

봉독에서 피하주입군과 근육 내 주입군의 LD⁵⁰은 6-9mg/kg 사이에 분포하였고, 정맥 주입군에서의 LD⁵⁰은 9mg/kg 이상이었다(Table 3 & 4).

III. 고찰

봉약침요법은 살아 있는 꿀벌의 독낭 안에 들어 있는 봉독을 전기 자극등¹¹⁾으로 추출하여 건조한 후, 정제 가공하여 辨證施治하는 新鍼療法으로 大熱有毒 辛甘鹹¹²⁾하며 補益精氣 除中益氣하고, 通經活絡 消腫排膿 清熱涼血의 효능¹³⁾이 있다.

지금까지 알려진 봉독의 주요 성분은 약 40가지로, peptide, enzymes, physiologically active amines, carbohydrates, Lipids, amino acids 등으로 나누어 볼 수 있으며¹⁴⁻¹⁵⁾이 중 重要한 役割을 하는 Peptide로는 Mellitin, Apamin, Adolapin, 그리고 Mast Cell Degranulating Peptide(MCD

〈Table 2〉 Mortality of mice treated with Sweet Bee Venom

Dose(mg/kg)	Subcutaneous in	Intramuscular in	Intravenous in
5.0	0/3 ^{a)}	0/3	0/3
10.0	0/3	1/3	0/3
15.0	0/3	1/3	1/3
20.0	1/3	2/3	1/3

a: death number during 7 days/total mice

〈Table 3〉 Mortality of mice treated with Bee Venom

Dose(mg/kg)	Subcutaneous in	Intramuscular in	Intravenous in
3.0	0/3 ^{a)}	0/3	0/3
6.0	1/3	1/3	0/3
9.0	2/3	2/3	1/3

a: death number during 7 days/total mice

〈Table 4〉 LD⁵⁰ of Sweet Bee Venom and Bee Venom in ICR mice

	Subcutaneous in	Intramuscular in	Intravenous in
Sweet Bee Venom	20mg/kg<	15< LD ⁵⁰ (20mg/kg	20mg/kg<
Bee Venom	6.0<LD ⁵⁰ (9.0mg/kg	6.0<LD ⁵⁰ (9.0mg/kg	9.0mg/kg<

a: death number during 7 days/total mice

peptide)를 들 수 있다.

봉약침의 효능에 대한 연구로는 항염¹⁶⁾, 진통¹⁷⁾, 면역기능 강화¹⁸⁾ 그리고 항암작용¹⁹⁾ 등이 있었고, 임상적인 연구로는 요추간판탈출증²⁰⁾, 근위축증²¹⁾ 등 다양한 연구가 보고되었으며 그 효능 또한 뛰어난 것으로 알려져 있다.

하지만 과민반응을 포함한 allergy 반응은 시술 당사자인 한의사로 하여금 진료에 위축감을 유발할 수 있으므로 이에 대한 해결 방안으로 봉독의 가장 큰 allergen인 PLA2를 포함한 효소를 제거한 봉독인 Sweet BV를 개발하였다. Sweet BV의 정제방법은 gel filtration chromatography와 propionic acid/urea polyacrylamide gel electrophoresis를 이용하여 분자량 10,000 이상의 성분을 제거한 것으로 전신즉시형 과민반응 뿐만 아니라 국소즉시형 과민반응도 현저히 억제하고 있음을 보고한 바 있다⁹⁻¹⁰⁾.

따라서 본 연구는 Sweet BV와 봉독이 함량과 독성에서는 어떠한 차이를 나타내는지를 알아보고자 시도되었다.

실험방법은 봉독의 주요 성분인 melittin과 apamin, 그리고 PLA2의 함량을 HPLC를 통하여 Sweet BV와 비교 분석하였고, 시술 부위에 따른 독성을 비교하기 위하여 ICR mouse를 이용하여 피하, 근육 내, 그리고 정맥 주입을 하여 LD⁵⁰을 산출하고자 하였다.

HPLC는 정밀한 성분 분리가 가능하고 용량이 적은 경우

나 이미 부분적으로 정제한 경우에 효과적이며, 봉독으로부터 순수한 Peptide를 최종적으로 분리해낼 때 그 순도를 측정하는 방법으로도 쓰인다.

봉독과 Sweet BV의 함량을 분석한 결과 Sweet BV에서 PLA2와 같은 효소 성분의 제거가 잘 수행되어 HPLC로도 발견할 수 없음을 알 수 있었다. Melittin의 함량 분석에서는 Sweet BV가 봉독에 비하여 약 33.4% 함량이 많음을 알 수 있었다.

이는 이전의 연구보고²³⁾에서 밝힌 것과 비교하여 볼 때 봉독의 melittin 함량이 570.0mg/g이었던 것에 비하여 이번 분석에서는 592.11mg/g을 나타내어 함량이 많이 증가한 것을 알 수 있었다.

Apamin의 함량은 봉독에 비하여 Sweet BV가 약 20% 적은 것으로 나타났는데 이는 효소의 제거 과정에서 저분자 물질이 제거되는 예상치 못한 결과가 발생한 것으로 추정되어 향후 이에 대한 개선 방안이 이루어져야 할 것으로 판단되었다.

봉독과 Sweet BV의 LD⁵⁰을 산출하기 위하여 체중 20.0g ±2.0g의 ICR계 웅성 mouse를 시술 부위별로 나누어 시술한 후 각 개체의 일주일간 생존과 사망을 관찰하였다. 그 결과 Sweet BV에서 피하주입군의 LD⁵⁰은 20mg/kg 이상이었고, 근육 내 주입군에서의 LD⁵⁰은 15-20mg/kg 사이였으며, 정맥 주입군에서의 LD⁵⁰은 20mg/kg 이상이였다.

봉독에서 피하주입군과 근육 내 주입군의 LD⁵⁰은 6-9mg/kg 사이에 분포하였고, 정맥 주입군에서의 LD⁵⁰은 9mg/kg 이상이었다. 이는 이전의 연구 결과인 복강 내의 5.25mg/kg에 비하여 상대적으로 안전한 양이었는데 이는 아마도 시술 부위에 따른 차이라고 추정되었다.

이상의 내용을 종합해보면 Sweet BV는 봉독에 비하여 2배 이상 독성이 약한 것으로 나타났고, 특히 임상에서 종종 발생할 수 있는 정맥 내에 주입이 피하나 근육층의 시술에 비하여 오히려 안전한 것으로 나타났다. 향후 다양한 방법으로 추가적인 연구가 진행되기를 바란다.

IV. 결론

봉독과 Sweet BV의 HPLC를 이용한 함량분석과 LD₅₀ 측정을 시행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. HPLC 분석결과 Sweet BV에서 PLA2와 같은 효소 성분의 제거가 잘 수행되어 HPLC로 측정이 불가능하였다. Melittin의 함량 분석에서는 Sweet BV가 봉독에 비하여 약 12% 함량이 많음을 알 수 있었다.
2. 시술 부위에 따른 Sweet BV의 LD⁵⁰은 피하주입에서 20mg/kg 이상이었으며, 근육 내 주입에서는 15-20mg/kg 사이였으며, 정맥 주입에서는 20mg/kg 이상이었다.
3. 봉독에서 피하주입군과 근육 내 주입군의 LD⁵⁰은 6-9mg/kg 사이에 분포하였고, 정맥 주입군에서의 LD⁵⁰은 9mg/kg 이상이었다.

이상의 결과로 보아 Sweet BV는 효소 제거가 잘 되었고, 봉독에 비하여 안전성이 더욱 뛰어난 약침제제임을 알 수 있었다. 향후 효능에 대한 비교 연구가 더욱 많이 이루어지길 기원한다.

參考文獻

1. 김양강. 독성학. 동화기술. 1994; 15-18.
2. 식품의약품 안전본부. '의약품 독성시험 기준' 제 98. 1998; 116호.
3. 허인회. 독성학. 신일상사. 1993; 37.
4. 권기록, 조아라, 이선구. 정맥주입용 산삼약침의 급성 아급성 독성실험 및 Sarcoma-180 항암효과에 관한 실험적 연구. 대한약침학회지. 2003; 6(2): 7-28.
5. 안창석, 권기록, 이선구. 홍화자약침의 급성 아급성 독성실험 및 Sarcoma-180 항암효과에 관한 실험적 연구. 대한약침학회지. 2002; 5(1): 7-26.
6. 강계성, 최성모, 권기록, 이선구. 호도약침의 급성 아급성 독성실험 및 Sarcoma-180 항암효과에 관한 실험적 연구. 대한약침학회지. 2002; 5(1): 43-52.
7. 권기록, 장성봉, 최영근. 봉약침의 LD₅₀ 변화보고. 대한약침학회지. 2005; 8(1): 41-44.
8. 최영근, 권기록, 최석호. Gel filtration chromatography와 propionic acid/urea polyacrylamide gel electrophoresis를 이용한 봉독 성분의 분리. 대한약침학회지. 2006; 9(2): 105-112.
9. 권기록, 최석호, 차배천. Sweet BV의 성분분석과 항체 역가 및 allergy 반응에 대한 임상적 연구. 대한약침학회지. 2006; 9(2): 79-86.
10. 이진선, 이종영, 권기록, 이희춘. 봉약침과 Sweet Bee Venom의 Allergy 반응에 대한 연구. 대한약침학회지. 2006; 9(3): 105-112.
11. 대한약침학회. 약침요법 시술 지침서. 대한약침학회. 1999; 133-135.
12. 권기록. 蜂針에 대한 考察. 대한 침구학회지. 1994; 11(1):160.
13. 인창식, 고흥균. 봉독요법에 대한 한의학 최초의 문헌 기록: 마왕퇴의서의 봉독요법 2례, 대한 침구학회지, 1998; 15(1):143.
14. Barbara & Rudolf, Chemistry and Pharmacology of Honey Bee venom, Academic Press. 1986; 329-402.
15. Herberman, R.B. and Ortaldo, J.R.. Natural killer cells. their role in defenses against disease. Science. 1981; 214:24.
16. 권기록, 고흥균. 봉독약침요법의 항염, 진통작용에 미치는 효능에 관한 실험적 연구, 대한침구학회지, 1998; 15(2):317-331.
17. 고흥균. 봉독약침요법의 항염, 진통작용에 미치는 효능에 관한 실험적 연구, 대한한의학학회지. 1992; 13(1):283-292.
18. 권기록, 고흥균. 봉약침요법의 면역반응에 관한 임상적 연구. 대한침구학회지. 2000; 17(1):169-174.

19. 권기록, 고흥균, 김용석, 박영배, 김창환, 강성길. 봉독 약침자극이 3-MCA 유발 상피종에 대한 항암 및 면역 반응에 미치는 영향, 대한침구학회지 1997; 14(2):151-172.
 20. 전형준, 황욱, 김정신, 남상수, 김용석. 봉약침으로 치료한 요추간판탈출증 환자의 임상적 평가, 대한침구학회지. 2003; 20(5):63-72.
 21. 권기록. 한방치료를 통한 근위축성 측삭경화증의 임상적 연구, 대한침구학회지. 2003; 20(3):209-216.
 22. 권기록. 봉독요법의 류마티스성 관절염 치료에 대한 임상적 연구, 전국한의학 학술대회지. 1998; 130-131.
 23. 권기록, 장성봉, 최영곤. 봉약침의 LD⁵⁰ 변화량 보고. 대한약침학회지. 2005; 8(1):41-44.
-