

## 원저

## 월별 봉독의 함량 비교 분석

• 권기록\* · 곡경승\* · 이장호\* · 김민기\*\* · 차배천\*\*\*  
 \* 상지대학교 한의과대학 침구학교실  
 \*\* 원광대학교 대학원  
 \*\*\* 상지대학교 응용동물과학부

## Component Analysis of Bee Venom from June to September

Ki Rok, Kwon\* · Ching Seng Chu\* · Jang Ho Lee\* · Min Ki Kim\*\* · Bae Chun Cha\*\*\*  
 \* Dept. of Acupuncture & Moxibustion, Oriental Medical College, Sangji University  
 \*\* Graduate School, Won-Kwang University  
 \*\*\* Division of Animal resources and life science, Sangji University

## ABSTRACT

**Objectives** The aim of this study was to observe variation of Bee Venom content from the collection period.  
**Methods** Content analysis of Bee Venom was rendered using HPLC method by standard melittin  
**Results** Analyzing melittin content using HPLC, 478.97mg/g at June, 493.89mg/g at July, 468.18mg/g at August and 482.15mg/g was containing in Bee Venom at September. So the change of melittin contents was no significance from June to September.  
**Conclusion** Above these results, we concluded carefully that collecting time was not important factor for the quality control of Bee Venom, restricted the period from June to September.

**Key word** Bee Venom, melittin, HPLC, collection period

## 1. 서론

벌의 독을 이용하여 질병을 치료하는 방법인 봉약침요법은 항염<sup>1)</sup>, 진통<sup>2)</sup>, 면역기능 강화<sup>3)</sup> 그리고 항암작용<sup>4)</sup> 등의 효과가 있어서 임상적으로 매우 광범위하게 사용되고 있고 특히 요추간판탈출증<sup>5)</sup>, 근위축증<sup>6)</sup>, 류마티스 관절염<sup>7, 8)</sup>, 슬관절염<sup>9)</sup> 등에 유효한 것으로 보고되고 있다.

봉독은 大熱有毒 辛甘鹹<sup>10)</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>11)</sup>이 있다. 봉독의 주요 성분은 약 40가지로, peptide, enzymes, physiologically active amines, carbohydrates, Lipids, amino acids 등으로 나누어 볼 수 있으며<sup>12-13)</sup> 이 중 重要한 役割을 하는 Peptide

로는 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.

현재 봉약침의 원료로 사용되고 있는 봉독은 국내의 양봉 산업에서 가장 많이 이용하고 있는 서양종(*apis mellifera*)의 일벌로부터 전기 자극법을 사용하여 얻고 있다.

일벌의 일령에 따라 봉독의 함량이 차이가 있음은 보고된 바<sup>14)</sup> 있으나 채취시기에 따라 봉독이 어떠한 차이를 나타내는가는 보고된 바 없다.

이에 저자는 봉독의 채취시기인 6월부터 9월까지 월별로 봉독을 모은 후 불순물을 제거하고 봉독의 가장 주요한 성분인 melittin의 함량을 분석하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 봉독 및 시약

봉독은 전기영동법으로 추출된 순수건조봉독을 6월부터 9월까지 채취하여 불순물은 제거한 후 동결건조하여 실험에 사용하였다(Fig. 1). 성분 함량의 지표물질로 사용한 melittin은 Sigma(USA)에서 구입하였다.

성분 분석을 위하여 HPLC(High Performance Liquid Chromatography 9012, Varian)를 사용하였으며, 장치는 Varian 9300과 510형 pump, U6K injector, 441형 UV



Fig. 1 Aspect of Bee Venom collection using BV collector and purified

<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.	
Autosampler	9300	Autosampler, Varian Co.	
Column	Capcell Pak C18 (150 × 4.6mm: 5 $\mu$ )	Shiseido Co.	
Operating condition			
UV Absorbance	215 nm		
Column temp.	35°C		
Injection vol.	20 $\mu$ l		
Mobile phase A	0.22% TFA in Water		
Mobile phase B	0.2% TFA acid in Acetonitrile		
Gradient profile			
Time(min)	%A	%B	Folliw(ml/min)
0:00	100	0	1.0
20:00	50	50	1.0
50:00	100	0	1.0

absorbance detector(Waters, U.S.A.) Computing Integrator D520A(영인과학, 한국)를 사용하였다.

분석용 HPLC column은 CapPak 5 $\mu$  C18 300Å(4.6mm ×150mm, i.d., 5 $\mu$ m, Waters, U.S.A.)을 사용하였으며, guard column은 Bonndapak<sup>R</sup> C<sub>18</sub>(37-50 $\mu$ m, Waters, U.S.A.)을 충전제로 사용하였다. 검량선 작성을 위하여 표준 용액은 Melittin을 증류수에 녹여 사용하였다. 분석조건은 Table 1.과 같다.

### 2. 정량곡선

표준물질인 melittin은 여러 농도로 희석하여 20 $\mu$ l를 HPLC에 주입하여 얻은 크로마토그램의 피크 면적은 X값으로 표준물질의 농도는 y값으로 하여 표준검량 곡선을 작성하였으며, 샘플은 1ml 중 20 $\mu$ l를 HPLC에 주입하여 얻은 크로마토그램을 표준검량 곡선에 대비하여 계산하였다.

HPLC 분석 조건은 Table 1.과 같다.

## III. 결과

### 1. Standard melittin을 이용한 검량선의 작성

봉약침과 Sweet BV의 정량분석을 위하여 먼저 melittin 표준물질을 이용하여 melittin의 chromatogram을 얻었다(Fig. 2). 이후 다양한 농도로 희석하여 melittin의 검량선을 얻었다(Fig. 3). 검량선의 상관계수(Correlation eoefficient)는  $r^2=0.9992(p<0.001)$ 이었다.

### 2. 월별 봉독의 melittin 함량 분석

이후 HPLC 분석으로 얻어진 표준검량선을 이용하여 peak면적과의 일차함수 관계를 통하여 6월부터 9월까지 봉독의 melittin 함량을 분석하였다.

그 결과 다음과 같은 함량 분석결과를 얻었다.

6월 봉독의 실험을 통하여 얻은 크로마토그램을 보면 22.764분에서 melittin을 확인할 수 있었으며, 이때 면적이 1424201를 나타내어 1g당 478.97mg이 함유되었음을 알 수 있었다(Fig. 4).

7월 봉독의 실험을 통하여 얻은 크로마토그램을 보면 22.871분에서 melittin을 확인할 수 있으며 이때, 면적이

1468539를 나타내어 1g당 493.89mg이 함유되었음을 알 수 있었다(Fig. 5).

8월 봉독의 실험을 통하여 얻은 크로마토그램을 보면 22.807분에서 melittin을 확인할 수 있으며 이때, 면적이 1392132를 나타내어 1g당 468.18mg이 함유되었음을 알 수 있었다(Fig. 6).

9월 봉독의 실험을 통하여 얻은 크로마토그램을 보면 22.792분에서 melittin을 확인할 수 있으며 이때, 면적이 1433670를 나타내어 1g당 482.15mg이 함유되었음을 알 수 있었다(Fig. 7).

이상의 결과를 보면 계절에 따른 봉독의 함량은 비교적 큰 차이를 나타내지 않는 것으로 나타나 채취 시기는 봉독의 품질 관리를 위하여 중요한 요소가 아님을 알 수 있었다(Fig. 8).

- 1) 6월 봉독:  $x$  (melittin 농도) =  $(1424201 - 990.8) \div 7428.5 = 191.59\mu\text{g}/0.4\text{mg} \rightarrow 478.97\text{mg}/\text{g}$
- 2) 7월 봉독:  $x$  (melittin 농도) =  $(1468539 - 990.8) \div 7428.5 = 197.55\mu\text{g}/0.4\text{mg} \rightarrow 493.89\text{mg}/\text{g}$
- 3) 8월 봉독:  $x$  (melittin 농도) =  $(1392132 - 990.8) \div 7428.5 = 187.27\mu\text{g}/0.4\text{mg} \rightarrow 468.18\text{mg}/\text{g}$
- 4) 9월 봉독:  $x$  (melittin 농도) =  $(1433670 - 990.8) \div 7428.5 = 192.86\mu\text{g}/0.4\text{mg} \rightarrow 482.15\text{mg}/\text{g}$

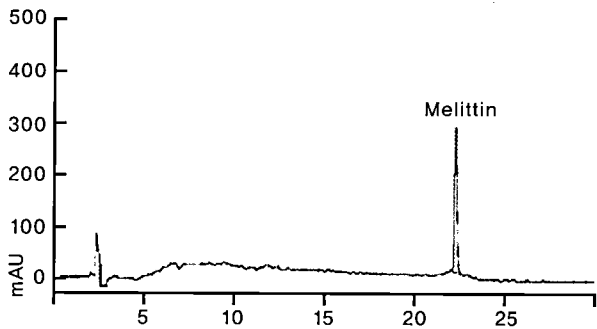


Fig. 2 HPLC chromatogram of standard melittin

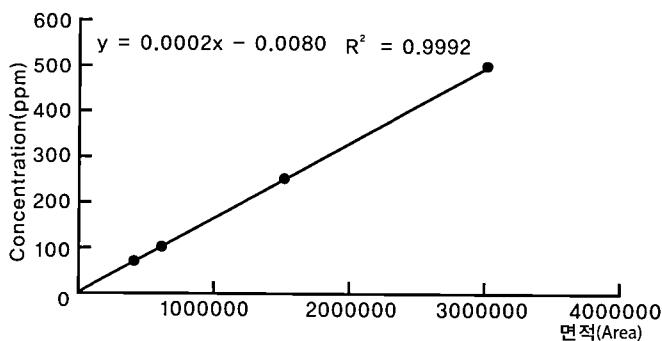
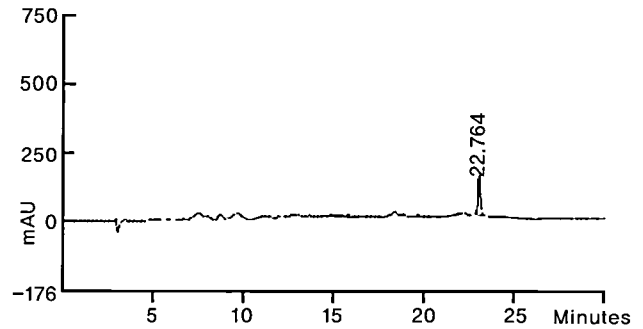


Fig. 3 Calibration curve of melittin

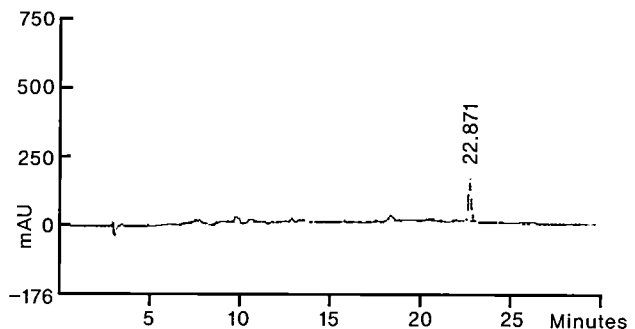
Sample Name : sample(6, JUN)400ppm							
Injection Date : 06-11-29 04:56:51 PM							
Run Time : 32.868				Run Mode : Analysis			
Instrument : Varian Star #1				Peak Measurement : Peak Area			
Data File : c:\star\data\melittin\06-1129\sample(6jun)400ppm.run							
calculation Type : Percent							



Peak No.	Ret Time (min)	Peak Name	Area (counts)	Result()	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1	22.764	1424201	142,4201	BB	9.3		
Totals			1424201	100,000			

Fig. 4 HPLC chromatogram of Bee Venom collected June using BV collector

Sample Name : sample(7, JUL)400ppm							
Injection Date : 06-11-29 07:20:05 PM							
Run Time : 30.057				Run Mode : Analysis			
Instrument : Varian Star #1				Peak Measurement : Peak Area			
Data File : c:\star\data\melittin\06-1129\sample(7jul)400ppm.run							
calculation Type : Percent							



Peak No.	Ret Time (min)	Peak Name	Area (counts)	Result()	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1	22.871		1,468,539	100,000	9.7		
Totals			1468539	100,000			

Fig. 5 HPLC chromatogram of Bee Venom collected June using BV collector

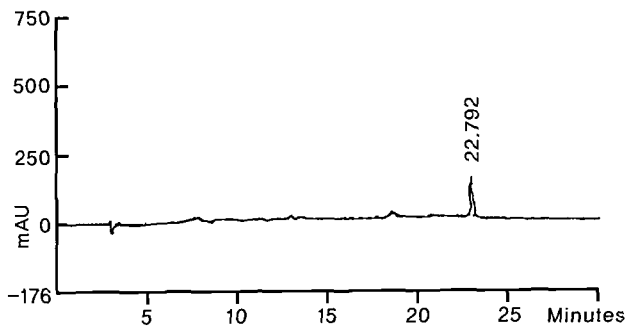
Sample Name : sample(8, AUG)400ppm  
 Injection Date : 06-11-29 09:01:43 PM  
 Run Time : 34.987 Run Mode : Analysis  
 Instrument : Varian Star #1 Peak Measurement : Peak Area  
 Data File : c:\star\data\melittin\06-1129\sample(6jun)400ppm.run  
 calculation Type : Percent



Peak No.	Ret Time (min)	Peak Name	Area (counts)	Result()	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1	22.807		1392132	100,000	BB	10.1	
Totals			1392132	100,000			

Fig. 6 HPLC chromatogram of Bee Venom collected June using BV collector

Sample Name : sample(9, SEP)400ppm  
 Injection Date : 06-11-29 10:18:21 PM  
 Run Time : 34.987 Run Mode : Analysis  
 Instrument : Varian Star #1 Peak Measurement : Peak Area  
 Data File : c:\star\data\melittin\06-1129\sample(6jun)400ppm.run  
 calculation Type : Percent



Peak No.	Ret Time (min)	Peak Name	Area (counts)	Result()	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1	22.792		1433670	100,000	BB	9.8	
Totals			1433670	100,000			

Fig. 7 HPLC chromatogram of Bee Venom collected June using BV collector

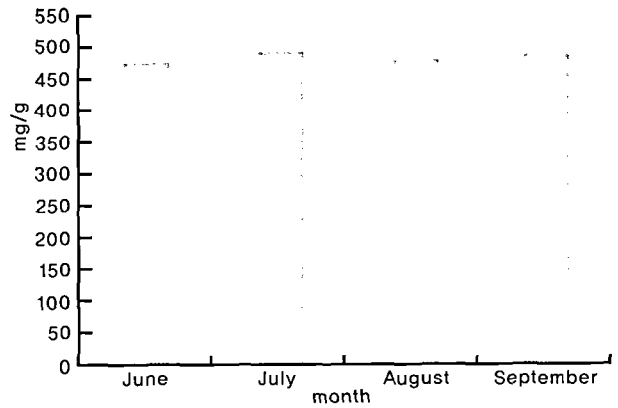


Fig. 8 Content of melittin to the Bee Venom from June to september using HPLC analysis

#### IV. 고찰

약침요법은 침구·경락과 본초이론에 의하여 각종의 한약재를 일정한 방법으로 조제한 후 경혈 등에 주입하여 자침과 약물효과를 바탕으로 질병을 치료하는 신침요법이다<sup>15)</sup>. 이중 봉약침요법은 살아 있는 꿀벌의 독낭 안에 들어 있는 독을 치료에 사용한다는 점에서 다른 약침요법과 차별성을 가진다.

봉독을 얻기 위해 사용하는 꿀벌로는 서양벌(*Apis mellifera*)중 일벌<sup>10)</sup>로, 채취방법으로는 전기자극법이 사용된다. 즉, 미세한 전류로 벌을 자극하면 흥분하면서 독낭 안에 있는 독을 밖으로 방출하는 원리를 이용하여 봉독을 추출, 정제, 가공하여 건조한 봉독을 약침으로 이용하고 있다.

역사적으로 볼 때 B.C 2,000년 전 이집트 파피루스에서도 벌의 침을 아픈 곳에 쓰이거나 문질러 치료했다는 내용을 확인 할 수 있고, B.C 4-5C에 히포크라테스도 봉침을 신비한 치료제<sup>16)</sup>라고 하였으며, 전한시대 이전의 의학 저서로 추정되는 馬王堆 醫書에서도 봉독을 질병의 치료에 이용<sup>17)</sup>하였음을 알 수 있다.

봉독은 무색으로 투명하며 점성이 있는 액체로 강한 쓴맛이 나는 방향성 물질이며, 건조 상태에서는 회백색 또는 황백색의 과상이거나 분말상이다. 봉독액의 비중은 1.13이며 산도(PH)는 5.2-5.5범위이다. 이것은 쉽게 물과 산에 용해되지만 알콜에는 거의 용해되지 않는다. 봉독액은 상온에서 공기 중에 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>16-17)</sup>.

그동안의 많은 연구를 통하여 봉약침이 관절염을 포함한 다양한 질환에 광범위한 효과를 가지고 있는 것으로 보고된 바 있다<sup>1-9)</sup>. 이는 자연계의 독을 치료에 이용하는 특성상 품질관리 또한 엄격해야 한다.

이 전의 연구 보고에서 벌의 일령에 따라 독의 성분이 변화함은 보고된 바<sup>10)</sup> 있으나 채취시기에 따라 함량의 차이를 분석한 것은 없었다.

이에 저자는 채취시기에 따라 봉독의 성분에 어떠한 차이를 나타내는지 알아보기로 본 연구를 기획하였다. 먼저 봉독채취기를 이용하여 봉독을 채취하는 시기인 6월부터 9월까지 월별로 봉독을 채취하여 정제과정을 거친 후 순수한 봉독을 얻었다. 이후 standard melittin을 이용하여 검량선을 작성한 후 봉독의 주요 성분인 melittin 함량을 분석·비교하였다.

HPLC(High Performance Liquid Chromatography)는 정밀한 성분 분리가 가능하고<sup>18)</sup> 용량이 적은 경우나 부분적으로 정제한 경우에 효과적이며, 봉독으로부터 순수한 peptide를 최종적으로 분리해낼 때 그 순도를 측정하는 방법으로 쓰인다. 저자는 이미 HPLC가 봉독의 성분분석에 용이함을 보고한<sup>19)</sup> 바 있다.

그 결과 6월 봉독에는 1g당 478.97mg이 함유되어 있었고, 7월 봉독에는 493.89mg이 함유되어 있었으며, 8월 봉독에는 468.18mg이 함유되어 있었고, 9월 봉독에는 482.15mg이 함유되었음을 알 수 있었다.

이는 봉독의 채취시기에 따른 melittin의 함량은 비교적 큰 차이를 나타내지 않는 것으로 나타나 채취 시기는 봉독의 품질 관리를 위하여 중요한 요소가 아님을 추정할 수 있었다.

**V. 결론**

봉독이 채취시기에 따라 어떠한 함량 변화를 나타내는지 알아보기 위하여 6월부터 9월까지 봉독을 채취한 후 HPLC로 melittin의 함량 분석을 시행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 6월 봉독에는 1g당 478.97mg이 함유되어 있었고, 7월 봉독에는 493.89mg이 함유되어 있었으며, 8월 봉독에는 468.18mg이 함유되어 있었고, 9월 봉독에는 482.15mg이 함유되었음을 알 수 있었다.
2. 채취시기에 따라 봉독의 함량은 melittin에서 큰 차이

를 나타내지 않아 품질관리를 위해 채취시기를 설정할 필요성은 없을 것으로 추정되었다.

**참고문헌**

1. 권기록, 고흥균. 봉독약침요법의 항염, 진통작용에 미치는 효능에 관한 실험적 연구, 대한침구학회지, 1998; 15(2): 317-331.
2. 고흥균. 봉독약침요법의 항염, 진통작용에 미치는 효능에 관한 실험적 연구, 대한한의학회지, 1992; 13(1): 283-292.
3. 권기록, 고흥균. 봉약침요법의 면역반응에 관한 임상적 연구. 대한침구학회지, 2000; 17(1): 169-174.
4. 권기록. 봉독약침자극이 3-MCA 유발 상피종에 대한 항암 및 면역반응에 미치는 영향, 대한침구학회지 1997; 14(2): 151-172.
5. 전형준, 황욱, 김정신, 남상수, 김용석. 봉약침으로 치료한 요추간판탈출증 환자의 임상적 평가, 대한침구학회지, 2003; 20(5): 63-72.
6. 권기록. 한방치료를 통한 근위축성 측삭경화증의 임상적 연구, 대한침구학회지, 2003; 20(3): 209-216.
7. 권기록. 봉독요법의 류마티스성 관절염 치료에 대한 임상적 연구, 전국한의학 학술대회지, 1998; 130-131.
8. 이상훈, 홍성재, 김수영, 양형인, 이재동, 최도영, 이두익. 무작위 대조 이중맹검 시험을 통한 봉독약침의 류마티스 관절염 치료효과, 대한침구학회지, 2003; 20(6): 80-87.
9. 이성노, 홍서영, 조현철, 변임정, 송호섭, 김기현. 봉약침 치료의 퇴행성 슬관절염에 대한 임상적 고찰, 대한침구학회지, 2003; 20(5): 73-81.
10. 권기록. 蜂針에 대한 考察. 대한 침구학회지, 1994; 11(1):160.
11. 인창식, 고흥균. 봉독요법에 대한 한의학 최초의 문헌 기록: 마왕퇴의서의 봉독요법 2례, 대한 침구학회지, 1998; 15(1):143.
12. Barbara & Rudolf, Chemistry and Pharmacology of Honey Bee venom, Academic Press, 1986; 329-402.
13. Herberman, R.B. and Ortaldo, J.R.. Natural killer cells. their role in defenses against disease.

- Science, 1981; 214:24.
14. 최승윤 : 양봉, 꿀벌과 벌통, 오성출판사, 1987; 351-352.
  15. 대한약침학회. 약침요법 시술 지침서, 대한약침학회, 서울, 1999; 133-135.
  16. Tom piek. Venom of the Hymenoptera, Academic Press, London, 1986; 107- 120.
  17. 김문호. 봉독요법과 봉침요법, 서울, 한국교육기획, 1996; 20-37, 41-42, 57, 70, 72, 133-149, 171-176.
  18. Gyszokan, J. Horvath, M. Alman, S, etc, Liquid chromatographic analysis and separation of polypeptide components from Honey Bee Venoms. J. Liquid Chromatography, 1994; 17(16): 3333-3349.
  19. 이진선, 권기록, 최호영. HPLC를 이용한 봉약침의 주요 성분에 관한 연구. 대한침구학회지. 2000; 17(4): 120-129.
-