

Sweet BV의 조제물 농도분석 및 안정성 확인을 위한 시험적 연구

강계성* · 권기록*

* 상지대학교 한의과대학 침구학교실

Received : 09. 10. 29

Accepted : 09. 11. 12

Key Words:Sweet Bee Venom,
melittin, validation,
stability, HPLCExperimental studies of validation and stability of
Sweet Bee Venom using HPLC

Kye Sung, Kang* · Ki Rok, Kwon*

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

ABSTRACT

Objectives : This study was conducted to confirm validation and stability of concentration analysis method of pure melittin (Sweet Bee Venom-Sweet BV) extracted from the bee venom by utilizing protein isolation method of gel filtration.

Methods : All experiments were conducted at Biototech, a non-clinical studies authorized institution, under the regulations of Good Laboratory Practice (GLP). Standard solutions of melittin (SIGMA, USA) and test substances were dispensed and were analyzed with HPLC for Sweet BV to secure the validation of analysis.

Results :

1. Measurement of system suitability of Sweet BV satisfied criterion of below 3%.
2. Confirming Linearity of Sweet BV in 10-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ solution yielded correlation coefficient (r) of 0.995 and accuracy of 85-115% which satisfy criterion.
3. Measurement of Specificity of Sweet BV didn't yield any substance affecting the peak of test substances, but detected at 21.22min verified as the test substance.
4. Confirming Intra-day of Sweet BV, accuracy and precision of 0.1, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ were 105.70, 95.81 and 0.66, 0.73, respectively, satisfying both criteria of accuracy (85-115%) and precision (within 10%).
5. To measure Stability in autosampler, all samples used in Intra-day reproducibility sat in the autosampler for five hours and were re-analyzed. Both variability and precision satisfied the criteria.
6. Homogeneity of Sweet BV (0.1, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) at upper, middle, and lower layers all satisfied the accuracy and precision criteria.
7. Stability of Sweet BV (0.1, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) at room temperature for four hours and refrigerated for 7 days all satisfied the criterion.
8. For the measurement of Quality control, QC samples measured on the first and eighth day all satisfied accuracy and precision criteria.

Conclusion : Above experiment data satisfies validation and stability of concentration analysis method of Sweet BV.

I. 서론

Melittin은 벌의 독에서 건조 중량 40-50%를 차지하는 분자량 2840의 수용성 물질로 26개의 아미노산으로 구성된 peptide이다¹⁾. 국내에서는 이미 오래 전부터 약침요법이 개발되어 환자의 진료에 사용되고 있으며, 그 중 봉약침은 벌의 독을 이용하여 질병을 치료하는 약침요법 중의 한 치료기술이다²⁾. 봉약침의 원료인 봉독은 크게 효소, 펩티드, 저분자 유기물질로 구성되어 있고 현재까지 약 40여개의 물질이 함유되어 있는 것으로 보고되고 있다.

봉약침은 살아있는 꿀벌(서양종 일벌-*Apis mellifera*) 독낭에서 봉독을 추출, 가공하여 약침제제로 만든 후, 변증을 통하여 선정된 혈위에 적정량 주입함으로써 침 자극과 봉독의 약리학적 자극을 동시에 응용하는 치료법으로²⁾ 그동안의 연구 보고에 의하면 진통 및 소염효과³⁻⁴⁾가 있어 퇴행성 슬관절염⁵⁻⁶⁾이나 고관절염⁷⁾ 등에 유효하고, 면역계에 작용하여 류마티스 관절염⁸⁻¹⁰⁾ 등의 치료에 우수한 효과가 있으며, 그 외 요추간판 탈출증¹²⁻¹⁴⁾, 중풍 후유증¹⁵⁻¹⁶⁾ 등의 질환이나 다발성 경화증¹⁷⁾, 근위축성 측삭경화증¹⁸⁾, 그리고 근이영양증¹⁹⁾과 같은 난치성 질환에도 유의한 치료효과가 있음이 보고되고 있다.

그러나 대부분의 독과 같이 벌의 독에 노출되었을 때도 과민한 면역반응이 나타날 수 있고, 특히 치명적인 아나필락시 반응은 봉약침의 임상 사용에 중요한 걸림돌이 되고 있어²⁰⁻²²⁾ 이러한 문제를 개선하고자 벌의 독에서 가장 주된 성분인 melittin만을 분리 정제한 Sweet BV(특허 제 10-0744755)가 개발되었고²³⁾, 선행 연구를 통하여 봉약침에 의한 아나필락시 반응의 위험과 국소 알레르기 반응을 낮출 수 있음이 보고²⁴⁻²⁵⁾된 바 있다.

본 연구는 단백질 분리기법을 이용하여 벌의 독에서 정제하여 얻어진²³⁾ melittin(Sweet BV)의 조제물 농도 분석 validation과 안정성을 확보하기 위하여 식품의약품 안전청의 비임상시험 관리기준을 근거로 이에 대한 HPLC(High Performance Liquid Chromatography) 분석을 시행하여 유의한 결과를 얻어 보고하는 바이다.

II. 실험방법

1. 재료

1) 시약 및 용매

본 연구에서 사용한 표준물질인 melittin은 SIGMA(MA, U.S.A)에서 구입하였고, 시험물질인 Sweet BV는 (주)지앤브이에서 공급을 받아 냉동 보관 후 사용하였다. 그 외에 사용한 시약과 용매는 초순수(Milli-Q Gradient, France), acetonitrile (HPLC Grade, Burdick&Jackson, U.S.A.), Trifluoroacetic acid (Reagent grade, Sigma-aldrich, U.S.A.) 등이 있고, 이동상의 조제물로는 0.22% Trifluoroacetic acid/초순수를 A용액으로, 0.2% Trifluoroacetic acid/Acetonitrile을 B용액으로 사용하였다. 희석용매는 50% acetonitrile을 사용하였다.

2) 기기 및 기구

고속 액체 크로마토그래프(HPLC)의 분석시스템의 사양은 Table 1.과 같다.

3) 검량선 용액의 조제

시험물질 2.0mg을 chemical balance를 이용하여 칭량 후 10ml volumetric flask에 넣고 희석용매를 표선까지 첨가하였다(이론농도 200µg/ml). 이것을 stock solution으로 사용하였으며 희석용매를 이용하여 아래와 같이 계열 희석하여 검량선 용액으로 사용하였다.

Calibration solution taken	Volume of Calibration solution taken(µl)	Final Volume (µl)	Final Concentration (µg/ml)
(a)	5000	10000 →	100 ... (b)
(b)	5000	10000 →	50 ... (c)
(b)	1000	10000 →	20 ... (d)
(c)	1000	10000 →	10 ... (e)

(a) Stock solution : 200 µg/ml

4) 표준용액의 조제

표준물질 1.5mg에 희석용매 1.0ml를 첨가(이론농도 1,500µg/ml)하여 stock solution으로 사용하였고 희석용매를 이용하여 아래와 같이 계열 희석하여 표준용액으로 사용하였다.

Calibration solution taken	Volume of Calibration solution taken(µl)	Final Volume (µl)	Final Concentration (µg/ml)
(a)	1000	10000 →	150 ... (b)

(a) Stock solution : 1500 µg/ml

5) Quality control 시료

검량선 용액의 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도를 사용하였다.

6) 시험물질의 조제 (SOP/FOA/140)

시험물질의 필요량을 chemical balance를 이용하여 측정한 후 조제병에 넣고 부형제인 생리식염주사액을 넣어 교반기로 교반하여 용해시켰다. 부형제를 가하여 규정농도로 조제한 후 7일간(냉장) 및 4시간(실온) 안정성 시험을 위하여 준비하였고, 시료의 농도는 각 100 및 0.1 mg/mL 로 하였다.

7) 분석조건

Sweet BV에 대한 HPLC의 분석 조건은 Table 2.와 같다.

8) 조제물의 처리

조제물을 교반하면서 일정량의 샘플을 취한다. 희석용매로 조제물의 최종농도를 검량선 범위 이내의 농도로 희석한다.

9) 정량방법

조제물의 정량값은 피크면적을 검량선 ($y=ax+b$) 식에 대입하여 계산한다. 검량선은 x축에 농도를 y축에 피크면적을 이용하여 최소자승법으로 산출한다.

*조제물의 정량값=측정값 \times 희석배율

정밀성, 정확성 및 변동율은 아래와 같이 산출하였다.

→ 정밀성(%)=정량값의 표준편차 \div 정량값의 평균 $\times 100$

→ 정확성(%)=정량값의 평균 \div 이론농도 $\times 100$

→ 변동율(%)=(보존 후의 정량값 평균-시료조제 직후의 정량값 평균) \div 시료조제 직후의 정량값 평균 $\times 100$

10) 수치의 취급

보고서에 기재하는 수치는 아래와 같이 취급하였다. 수치는 (n+1)자리의 수를 반올림하여 n자리로 표기를 하였다.

수치	단위	수치의 기록방법
피크 면적값 (y)	기록치	소수점 이하 2자리
Retention time (RT)	min	소수점 이하 2자리
농도 (x)	$\mu\text{g}/\text{mL}$	유효숫자 4자리
기울기 (a)	-	소수점 이하 4자리

절편(b)	-	소수점 이하 4자리
상관계수 (r)	-	소수점 이하 4자리
조제물의 정량값	mg/mL	유효숫자 4자리
조제물의 평균값 (Mean)	mg/mL	유효숫자 4자리
표준편차 (SD)	-	평균치와동일한소수점자리
정밀성 (CV)	%	소수점 이하 2자리
변동율 (Variation)	%	소수점 이하 2자리
정확성 (Accuracy)	%	소수점 이하 2자리

11) 재측정의 경우

다음 사항에 해당되는 경우에 실시한다.

- ① 검량선용 시료의 측정결과가 허용범위를 만족하지 못하는 경우
- ② 시료처리과정의 문제
- ③ 기기고장
- ④ 크로마토그램이 비정상적으로 나타난 경우
- ⑤ 시험책임자가 재측정이 필요하다고 판단하는 경우

2. 조제물 분석

1) 시스템 적합성 (System suitability)

QC 시료를 6회 반복 측정하여 정밀성을 산출하였다. 판정기준은 피크면적과 retention time의 정밀성이 3%이 하인 것으로 하였다.

2) 직선성 (Linearity)

10~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 검량선 용액을 각 1회 측정하여, 검량선 용액의 농도와 피크 면적의 상관계수를 산출하였다. 판정 기준은 상관계수 r이 0.995이상이고, 정확성은 85~115%인 것으로 하였다. 직선성 확인을 위해 사용된 결과는 안정성 분석을 위한 검량선으로 사용하였다.

3) 특이성 (Specificity)

희석용매, 이동상, 부형제, 표준용액 및 저농도의 조제물을 각 1회 측정하여 시험물질의 retention time과 동일한 위치에서 간섭피크의 유무를 확인하였다. 판정기준은 시험물질의 피크가 정량에 충분한 형상을 나타내며, 시험물질과 동일한 retention time에서 간섭 피크가 없는 것으로 하였다.

4) 일내 재현성 (Intra-day)

조제물의 중층에서 2회 채취하여 샘플당 1회 측정하였다. 판정기준은 정량값의 정밀성은 10% 이하, 정확성은 85~115%인 것으로 하였다.

5) Autosampler 내에서의 안정성 (Stability in autosampler)

Autosampler 내에서의 안정한 시간을 확인하기 위해 일내 재현성에서 사용한 시료를 Autosampler 내에 일정 시간 방치 후, 이를 재분석하였다. 판정기준은 정량값의 정밀성은 10% 이하, 초기농도에 대한 변동율은 $\pm 20\%$ 이내인 것으로 하였다.

6) 균질성 (Homogeneity)

균질성 분석은 조제물의 상층, 중층 및 하층에서 각 2회 채취하여 각 샘플당 1회 분석하였다. 중층의 결과는 일내 재현성의 결과로 사용하였고 판정기준은 정량값의 정밀성은 10% 이하, 정확성은 85~115%인 것으로 하였다.

7) 안정성 (Stability)

(1) 실온 4시간 안정성

Sweet BV를 실온에서 4시간 동안 방치 후, 중층에서 각 2회 채취하고 샘플당 1회 측정하여 안정성을 확인하였다. 조제 직후 분석결과는 일내 재현성의 결과를 취하며 판정 기준은 정량값의 정밀성은 10% 이하, 초기농도에 대한 변동율은 $\pm 20\%$ 이내인 것으로 하였다.

(2) 냉장 7일간 안정성

Sweet BV를 7일간 냉장 조건($2\sim 8^{\circ}\text{C}$)하에 보관 후, 중층에서 각 2회 채취하고 샘플당 1회 측정하여 7일간 냉장안정성을 확인하였다. 조제 직후 분석결과는 일내 재현성의 결과를 취하며 판정 기준은 정밀성은 10% 이하, 초기농도에 대한 변동율은 $\pm 20\%$ 이내인 것으로 하였다.

8) QC (Quality Control)

QC 시료인 Sweet BV를 측정 종료 시에 2회 분석하고, 판정기준은 분석결과의 정밀성은 10% 이하, 정확성은 85~115%인 것으로 하였다.

III. 결과

1. 시스템의 적합성 (System suitability)

시스템의 적합성이란 Sweet BV의 분석에 대한 객관성을 확보할 수 있는 본 연구 장비의 적합성을 의미한다²⁶⁾. 본 연구에서 quality control 시료의 peak area 및 RT의 6회 주입재현성은 아래와 같이 확인되어 판정기준인 3% 이하를 만족하였다(Table 3., Fig. 1-4).

2. 직선성 (Linearity)

직선성이란 실험방법이 일정 범위에 있는 검체 중 분석 대상 물질의 양(또는 농도)에 대하여 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는 능력을 말한다²⁶⁾. 본 연구에서 Sweet BV는 $10\sim 200\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 검량선 용액에서 얻은 상관계수와 정확성이 아래와 같이 확인되어 판정기준(상관계수 0.995 이상, 정확성 85~115%)을 모두 만족하였다(Table 4., Fig. 5).

3. 특이성 (Specificity)

특이성이란 불순물, 분해물, 배합 성분 등의 혼재 상태에서 분석대상 물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는 능력을 말한다²⁶⁾. 본 연구에서 시험물질의 피크에 영향을 주는 성분은 희석용매, 이동상, 부형제 및 조제물 등에서 모두 검출되지 않았다. 또한 표준물질 melittin은 21.22min에서 검출되었고 동일하게 Sweet BV에서 확인되었다.

4. 일내 재현성 (Intra-day)

일내 재현성이란 하루 중에 나타나는 변화를 측정하는 것을 말한다²⁶⁾. 본 실험의 Sweet BV($0.1, 100\text{mg}/\text{ml}$)에 대한 일내 재현성 측정에서 정확성 및 정밀성은 105.70, 95.81% 및 0.66, 0.73%로 확인되어 판정기준(정확성 85~115%, 정밀성 10% 이내)을 모두 만족하였다(Table 5., Fig. 6-7).

5. Autosampler 내에서의 안정성 (Stability in autosampler)

Sweet BV($0.1, 100\text{mg}/\text{ml}$)의 Autosampler내에서의 안정한 시간을 확인하기 위해 일내 재현성에서 사용한 시료를 Autosampler 내에 5시간 방치 후 재분석하여 초기농도에 대한 변동율 및 정밀성을 측정하였다.

그 결과 - 0.66, - 0.73% 및 0.00, 0.49%로 확인되어 판정기준(초기농도에 대한 변동율 $\pm 20\%$, 정밀성 10% 이내)을 모두 만족하였다.(Table 6.)

6. 균질성 (Homogeneity)

조제물 (0.1, 100mg/ml)에 대한 상층, 중층 및 하층의 균질성의 정확성 및 정밀성을 확인하기 위하여 각각의 sample을 확보한 후 분석을 시행한 결과 104.90, 94.87% 및 2.29, 0.94%로 확인되어 판정기준(정확성 85~115%, 정밀성 10% 이내)을 모두 만족하였다.(Table 7.)

7. 안정성 (Stability)

1) 실온 4시간 안정성

조제물 (0.1, 100 mg/ml)의 실온에서 4시간 안정성 측정 결과 초기농도에 대한 변동율은 - 0.66, - 1.94%로 나타났으며, 정밀성은 3.81, 0.90%로 확인되어 판정기준(초기농도에 대한 변동율 $\pm 20\%$, 정밀성 10% 이내)을 모두 만족하였다(Table 8., Fig. 8-9).

2) 냉장 7일간 안정성

Sweet BV (0.1, 100mg/ml)의 냉장에서 7일간 안정성 측정을 시행한 결과 초기농도에 대한 변동율은 -17.22, - 8.35%로 나타났으며, 정밀성은 5.37, 1.51%로 확인되어 판정기준(초기농도에 대한 변동율 $\pm 20\%$, 정밀성 10% 이내)을 모두 만족하였다(Table 9., Fig. 10-11).

8. QC (Quality Control)

1일과 8일째에 QC를 위해 준비된 Sweet BV의 정확성 및 정밀성을 분석한 결과 판정기준(정확성 85~115%, 정밀성 10% 이내)을 모두 만족하였다(Fig. 12).

IV. 고찰

의약품이란 대한약전에 수재된 물품으로서 의약외품이 아닌 것, 사람 또는 동물의 질병의 진단·치료·경감·처치 또는 예방을 목적으로 사용되는 물품으로서 기구·기기 또는 장치가 아닌 것, 사람 또는 동물의 조직기

능에 약리학적 영향을 주기 위한 목적으로 사용되는 물품으로서 기구, 기기 또는 장치가 아닌 것으로 정의하고 있다²⁷⁾.

특히 의약품 제 38조 제 1항, 제 42조 제 4항 및 같은 법 시행규칙 제 43조 및 [별표2] “의약품제조 및 품질관리 기준”의 규정에 의한 적격성 평가 및 밸리데이션에 관하여 그 적용범위, 종류 및 실시 방법 등 세부사항을 정함으로써 의약품 등 제조 및 품질관리에 적정을 기함을 목적으로 하고 있다²⁸⁾.

의약품 등 밸리데이션 실시에 관한 규정은 목적과 용어의 정의, 적격성 평가의 실시, 공정, 시험방법, 세척, 제조지원설비, 컴퓨터 시스템의 밸리데이션과, 연구책임자, 문서에 대한 규정, 위·수탁 제조 및 시험에 관한 규정을 매우 엄격하게 제시하고 있다.

毒(poison, toxin, toxicant)이란 “여러 가지 경로를 통해서 소량이 체내로 들어오면, 생체조직에 기능적 혹은 형태적으로 장애를 주거나 혹은 치사작용을 일으키는 물질”로 정의된다²⁸⁾. 봉약침은 살아있는 꿀벌(*Apis mellifera*) 독낭에서 봉독을 추출, 가공하여 약침제제로 사용하는 치료법으로 가장 전형적인 “以毒治病”의 한방 치료기술이다.

봉약침의 원료인 봉독의 주요 성분은 크게 효소, 펩티드, 저분자 유기물질로 나눌 수 있고 현재까지 약 40여개의 물질이 보고되고 있다¹⁾. 대부분의 독과 같이 벌의 독에 노출되었을 때도 치명적인 아나필락시스 반응과 같은 과민한 반응이 나타날 수 있고, 이러한 부작용은 봉약침의 임상 사용에 중요한 걸림돌이 되고 있는 것이 사실이다²⁰⁻²²⁾.

따라서 이와 같은 문제를 개선하고자 벌의 독에서 알레르기 발생의 항원역할을 하는 효소인 phospholipase A₂(이하 PLA2)나 hyaluronidase 등과 histamine 등을 제거하고, 벌의 독에서 가장 주된 성분인 melittin만을 분리 정제한 Sweet BV가 개발되어²⁵⁾ 현재 임상에서 사용되고 있다. 벌의 독에서 건조 중량 40-50%를 차지하는 가장 중요한 성분인 melittin은 26개의 아미노산으로 구성된 peptide로 분자량 2840의 수용성 물질로¹⁾ 벌의 독에서 가장 중요한 allergen인 PLA2를 활성화시키고 세포막에 구멍을 뚫어 파괴시키는 작용이 있는 것으로 알려져 있고²⁹⁾, 이러한 작용은 암세포의 사멸이나 우수한 진통, 소염효과와 관련이 있을 것으로 보고되고 있다. 향후 한국 한의학의 치료기술을 한 단계 발전시키는데 기여할 수 있으리라 기대되는 치료제이다.

따라서 본 연구는 Sweet BV가 의약품으로 발전할 수

있는 단초를 제공하기 위하여 조제물의 농도분석법 validation 및 안정성 확인 시험을 (Good Laboratory Practice (GLP) 규정을 준수하여 진행하였다. 이미 이전의 연구에서도 HPLC가 melittin이나 벌의 독을 정량적으로 측정하는데 유효함이 보고³⁰⁾된 바 있다.

본 연구에서 시도된 시스템의 적합성 평가에서는 HPLC를 이용한 Sweet BV의 peak area 및 RT의 6회 주입재현성이 판정기준인 3% 이하를 만족하였다.

실험방법이 일정 범위에 있는 검체 중 분석 대상 물질의 양(또는 농도)에 대하여 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는 능력인 직선성을 평가한 결과 Sweet BV는 10~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 검량선 용액에서 얻은 상관계수와 정확성이 상관계수 0.995 이상, 정확성 85~115%로 확인되어 판정기준을 모두 만족하였다.

불순물, 분해물, 배합 성분 등의 혼재 상태에서 분석대상 물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는 능력인 특이성을 평가한 결과 Sweet BV는 시험물질의 피크에 영향을 주는 성분인 희석용매, 이동상, 부형제 및 조제물 등이 모두 검출되지 않았고, 표준물질인 melittin과 Sweet BV는 모두 21.22min에서 검출되었다.

하루 중에 나타나는 변화를 측정하는 일내 재현성 측정에서 Sweet BV의 정확성 및 정밀성은 105.70, 95.81% 및 0.66, 0.73%로 확인되어 판정기준인 정확성 85~115%, 정밀성 10% 이내를 모두 만족하였다.

Autosampler 내에서의 안정한 시간을 확인하기 위해 일내 재현성에서 사용한 시료를 Autosampler 내에 5시간 방치 후 재분석하여 초기 농도에 대한 변동율 및 정밀성을 측정하여 결과 -0.66, -0.73% 및 0.00, 0.49%로 확인되어 판정기준을 모두 만족하였다.

조제물에 대한 상층, 중층 및 하층의 균질성의 정확성 및 정밀성을 확인한 결과 Sweet BV는 104.90, 94.87% 및 2.29, 0.94%로 확인되어 판정기준을 모두 만족하였다.

실온에서 4시간 안정성 측정결과 Sweet BV의 초기농도에 대한 변동율은 -0.66, -1.94%로 나타났으며, 정밀성은 3.81, 0.90%로 확인되어 판정기준을 모두 만족하였다.

냉장에서 7일간 안정성 측정을 시행한 결과 초기농도에 대한 변동율은 -17.22, -8.35%로 나타났으며, 정밀성은 5.37, 1.51%로 확인되어 판정기준을 모두 만족하였다.

1일과 8일째에 QC를 위해 준비된 Sweet BV의 정확성 및 정밀성을 분석한 결과 역시 판정기준을 모두 만족

하였다.

이상의 연구 내용을 바탕으로 HPLC를 이용한 validation 분석법과 안정성의 측정에서 Sweet BV는 의약품의 품질관리에 필요한 기준을 모두 만족함을 알 수 있었다.

V. 결론

본 연구는 단백질 분리 기법인 gel filtration을 통하여 벌의 독에서 추출한 순수 melittin(이하 Sweet BV)의 농도 분석법 보증을 위해 Good Laboratory Practice (GLP) 규정을 준수하여 표준용액인 melittin(SIGMA, USA)과 시험물질의 조제 후 HPLC로 조제물(Sweet BV)을 분석하여 분석법 validation을 확보하고자 시행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Sweet BV의 System suitability를 측정한 결과 판정기준인 3% 이하를 만족하였다.

2. 10-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 용액에서 Sweet BV의 직선성 (Linearity)을 확인한 결과 상관계수(r)가 0.995 이상이고, 정확성은 85-115%를 나타내어 판정기준을 모두 만족하였다.

3. Sweet BV의 특이성(specificity)을 측정한 결과 시험물질의 peak에 영향을 주는 성분은 검출되지 않았고, 21.22min에서 검출되어 시험물질로 확인되었다.

4. Sweet BV의 일내 재현성(Intra-day)을 확인한 결과 0.1, 100 mg/ml 의 일내 재현성의 정확성 및 정밀성은 105.70, 95.81 및 0.66, 0.73을 나타내어 판정기준(정확성 85-115%, 정밀성 10% 이내)을 모두 만족하였다.

5. Stability in autosampler를 측정하기 위하여 일내 재현성에서 사용한 시료를 autosampler에 5시간 방치 후 재분석을 시행한 결과 초기 농도에 대한 변동율 및 정밀성에서 모두 판정기준을 만족하였다.

6. Sweet BV(0.1, 100 mg/ml)의 상층, 중층 및 하층의 균질성의 정확성과 정밀성은 모두 판정기준을 만족하였다.

7. Sweet BV(0.1, 100mg/ml)의 실온 4시간 안정성과 냉장 7일간 안정성을 측정한 결과 모두 판정기준을 만족하였다.

8. Quality Control을 위해 1일과 8일째 측정한 QC sample의 정확성과 정밀성은 모두 판정기준을 만족하였다.

이상의 연구 결과를 바탕으로 HPLC를 이용한 Sweet BV의 조제물 농도 분석법 validation과 안정성 확인은 분석법 보증의 판정기준을 만족함을 알 수 있었다.

VI. 참고문헌

- Barbara & Rudolf. Chemistry and Pharmacology of Honey Bee venom. Academic Press. 1986; 329-402.
- 대한약침학회 학술위원회. Pharmacopunctureology. Elsevier Korea. 2008; 167-199.
- Kwon KR, Koh HK. An Experimental Study with Bee Venom Therapy on Anti-inflammatory and Analgesic Effects. The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society. 1998 ; 15(2) : 97-103.
- Ko HK. Experimental Studies on the Effect of Bee Venom Therapy on the Analgesic, Antipyretic and Anti-inflammatory Action. Korean Journal of Oriental Medicine. 1992 ; 13(1):283-292.
- Lee SN, Hong SY, Jo HC, Byeon IJ, Song HS, Kim GH, The Clinical Study on Bee Venom Acupuncture Treatment on Osteoarthritis of Knee Joint. The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society. 2003 ; 20(5) : 73-8.
- Wang WH, Ahn KB, Lim JK, Jang HS, Clinical Investigation Compared with the Effects of the Bee Venom-Acupuncture on Knee Joint with Osteoarthritis. The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society. 2001 ; 18(3) : 35-47.
- Kim TH, Kang KS, Kwon KR. Three cases of affections of the hip treated with Korean Bee-Venom therapy. Journal of Korean Pharmacopuncture Institute. 2001; 4(3): 122-130.
- Park HJ, Lee SH, Son DJ, Oh KW, Kim KH, Song HS, et al. Antiarthritic effect of Bee Venom. Arthritis & Rheumatism. 2004; 50(11): 3504-3515.
- Park HJ, Lee HJ, Choi MS, Son DJ, Song HS, Song MJ, et al. JNK pathway is involved on the inhibition of inflammatory target gene expression and NF- κ B activation by melittin. J. Inflammation. 2008; 5(7): 1-13.
- Lee SH, Lee HJ, Baek YH, Kim SY, Park JK, Hong SJ, Yang HI, Kim KS, Lee JD, Choi DY, Lee DI. Effects of Bee Venom on the pain, edema, and acute inflammatory reactant of Rheumatoid Arthritis patients. The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society. 2003 ; 20(2) : 77-84.
- Lee SH, Hong SJ, Kim SY, Yang HI, Lee JD, Choi DY, Lee DI, Lee YH. Randomized Controlled Double Blind Study of Bee Venom Therapy on Rheumatoid Arthritis. The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society. 2003 ; 20(6) : 80-88.
- Kin KU, Seo BM, Yun JS, Lee YK, Choi SH, Lee KM, Lim SC, Seo JC, Jung TY, Han SW. The Comparison of Bee Venom Herbal-acupuncture Therapy between Neighboring Acupuncture Points and Neighboring-Remote Acupuncture Points on the Treatment of Lumbar Spine Herniation of Nucleus Pulpous. The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society. 2005 ; 22(6) : 181-187.
- Lee KM, Lee KS, Yem SC, Jang JH, Yun JY, Hwang BC, Kug YS, Jang JY, Choi JS, Kim YJ, Park JU. A Clinical study of Bee-venom acupuncture treatment on protrusion disc Patients. The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society. 2004 ; 21(5) : 13-25.

14. Jun HJ, Hwang U, Kim JS, Nam SS, Kim YS. Clinical Evaluation of Herniation of nucleus purposus patients treated by Bee venom therapy. The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society. 2003 ; 20(5) : 63-72.
15. Lee DY, Lee KM, Yeom SC, Kim DH, Kim DJ. A Clinical Study of Bee Venom Acupuncture Therapy on Shoulder Pain Patients in Stroke Sequelae. The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society. 2006 ; 23(4) : 69-80.
16. Jeoung KS, Kim SH, Park SK, Lim HJ, Yoon HS, Ahn HJ. Clinical Study on the Effect of Bee Venom Acupuncture Therapy on the Post-stroke Pain. The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society. 2005 ; 22(3) : 69-75.
17. Kang KS, Kwon KR. Clinical Studies on 5 Cases of Multiple Sclerosis by Acupuncture Therapies. The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society. 2003; 20(1) : 209-217.
18. Kwon KR. Clinical Studies of Amyotrophic Lateral Sclerosis(ALS) through Korean Medicine. The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society. 2003; 20(3) : 209-216.
19. Lee JS, An CS, Kwon KR. A Clinical Study on the case of Fascioscapulothoracic (FSH) Muscular Dystrophy Treated with Traditional Korean Medicine. The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society. 2001; 18(3) : 227-238.
20. Hwang YJ, Lee BC. Clinical Study of Anaphylaxis on Bee-Venom Acupuncture. The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society. 2000 ; 17(4) : 149-159.
21. Youn HM. The Clinical Observation of Anaphylaxis on Bee-Venom Acupuncture. The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society. 2005 ; 22(4) : 179-188.
22. Robert L, Ronald D, William S. Allergy, Hypersensitivity, Anaphylaxis. Emergency Medicine. Mosby Year Book. 1998; 2759-2766.
23. Kwon KR, Choi SH, Cha BC. Component Analysis of Sweet BV and Clinical Trial on Antibody Titer and Allergic Reactions. Journal of Korean Pharmacopuncture Institute. 2006; 9(2): 79-86.
24. Lee JS, Lee JY, Kwon KR, Lee HC. A Study on Allergic response between Bee Venom and Sweet Bee venom Pharmacopuncture. Journal of Korean Pharmacopuncture Institute. 2006; 9(3): 61-77.
25. Choi YC, Kwon KR, Choi SH. Purification of Peptide Components including Melittin from Bee Venom using gel filtration chromatography and propionic acid/urea polyacrylamide gel electrophoresis. Journal of Korean Pharmacopuncture Institute. 2006; 9(2): 105-112.
26. 식품의약품안전청 고시 제 2008-5호. 의약품 등 벨리테이션 실시에 관한 규정
27. <http://kfda.go.kr>. 식품의약품안전청 용어집.
28. 허인회. 독성학. 신일상사. 1993; 9-10, 185-186.
29. Renata MS, Jorge A, Hugo V. Structural and functional behavior of biologically active monomeric melittin. J Molecular Graphics and Modelling. 2007; 25: 767-772.
30. Kwon KR, Chu CS, Park HS, Kim MK, Cha BC, Lee Eun. Experimental studies of quantitative evaluation using HPLC and safety of Sweet Bee Venom. Journal of Korean Pharmacopuncture Institute. 2007; 10(2): 81-86.

Table 1. HPLC system for analysis of melittin

System	agilent 1100 Series, Agilent Technologies Ltd., U.S.A
Degasser	G1379A
Binary pump	G1312A
Autosampler	G1329A
Column oven	G1316A
Detector	G1315B (Diode Array Detector)
Data process	Chemstation, Agilent Technologies
Ultra pure water system(Milli-Q Gradient, MILLIPORE, France)	
Hole pipette (BRAND, Germany)	
Chemical balance (Sartorius,Germany)	
Stirrer (DAIHAN Scientific, Korea)	

Table 2. HPLC condition for analysis of melittin

Column	Capcell pak C18 UG120 (4.6 × 150 mm, particle size 5 μm), Shiseido Co., Ltd. Japan												
Column temperature	35 °C												
Mobile phase (gradient)	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A %</th> <th>B %</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>50</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table> <p>post time :10 min</p>	Time (min)	A %	B %	0	100	0	20	50	50	50	100	0
Time (min)	A %	B %											
0	100	0											
20	50	50											
50	100	0											
Flow rate	1.0 mL/min												
Run Time	50 min												
Wavelength	215 nm												
Injection volume	20 μL												
Autosampler temperature	Ambient temperature												

Table 3. System suitability for analysis of Sweet BV

Concentration of QC sample (μg/ml)	Classification	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6	Mean	SD	CV(%)
50	Peak area	649.66	648.38	646.17	647.59	649.37	636.73	646.32	4.86	0.75
	RT	21.34	21.34	21.34	21.32	21.31	21.28	21.32	0.02	0.09

Table 4. Confirming Linearity of Sweet BV from the concentration

측정일	회귀방정식	상관계수(r)	정확성(%)
Validation	$y=13.7873x-52.6155$	0.9997	96.36~110.08
Stability 8day	$y=14.5735x-13.5834$	0.9999	91.40~101.70

Table 5. Confirming Intra-day of Sweet BV

Formulated concentrations of test substance($\mu\text{g/ml}$)	Measured concentration ($\mu\text{g/ml}$)		Meam ($\mu\text{g/ml}$)	SD	CV(%)	Accuracy(%)
	No. 1	No. 2				
0.1	0.1052	0.1062	0.1057	0.0007	0.66	105.70
100	95.31	96.30	95.81	0.70	0.73	95.81

Table 6. Stability of Sweet BV in autosampler

Time(hr)	Formulated concentrations of test substance($\mu\text{g/ml}$)	Measured concentration ($\mu\text{g/ml}$)		Meam ($\mu\text{g/ml}$)	SD	CV(%)	Accuracy(%)	Variation(%)
		No. 1	No. 2					
0	0.1	0.1052	0.1062	0.1057	0.0007	0.66	105.70	-
	100	95.31	96.30	95.81	0.70	0.73	95.81	-
5	0.1	0.1050	0.1050	0.1050	0.0000	0.00	105.00	-0.66
	100	94.77	95.44	95.11	0.47	0.49	95.11	-0.73

Table 7. Homogeneity of Sweet BV (0.1, 100 $\mu\text{g/ml}$) at upper, middle, and lower layers

Formulated concentrations of test substance ($\mu\text{g/ml}$)		Measured concentration ($\mu\text{g/ml}$)		Meam ($\mu\text{g/ml}$)	SD	CV(%)	Accuracy(%)
		No. 1	No. 2				
0.1	Upper	0.1062	0.1040	0.1049	0.0024	2.29	104.90
	Middle	0.1052	0.1062				
	Lower	0.1005	0.1071				
100	Upper	93.62	94.76	94.87	0.89	0.94	94.87
	Middle	95.31	96.30				
	Lower	94.56	94.68				

Table 8. Stability of Sweet BV (0.1, 100 μ g/ml) at room temperature for four hours

Time(hr)	Formulated concentrations of test substance(μ g/ml)	Measured concentration (μ g/ml)		Meam (μ g/ml)	SD	CV(%)	Accuracy(%)	Variation(%)
		No. 1	No. 2					
1	0.1	0.1052	0.1062	0.1057	0.0007	0.66	105.70	-
	100	95.31	96.30	95.81	0.70	0.73	95.81	-
4	0.1	0.1020	0.1080	0.1050	0.0040	3.81	105.00	-0.66
	100	93.35	94.55	93.95	0.85	0.90	93.95	-1.94

Table 9. Stability of Sweet BV (0.1, 100 μ g/ml) at refrigerated for 7 days

Time(hr)	Formulated concentrations of test substance(μ g/ml)	Measured concentration (μ g/ml)		Meam (μ g/ml)	SD	CV(%)	Accuracy(%)	Variation(%)
		No. 1	No. 2					
0	0.1	0.1052	0.1062	0.1057	0.0007	0.66	105.70	-
	100	95.31	96.30	95.81	0.70	0.73	95.81	-
8	0.1	0.09080	0.08420	0.08750	0.00470	5.37	87.50	-17.22
	100	86.87	88.75	87.81	1.33	1.51	87.81	-8.35

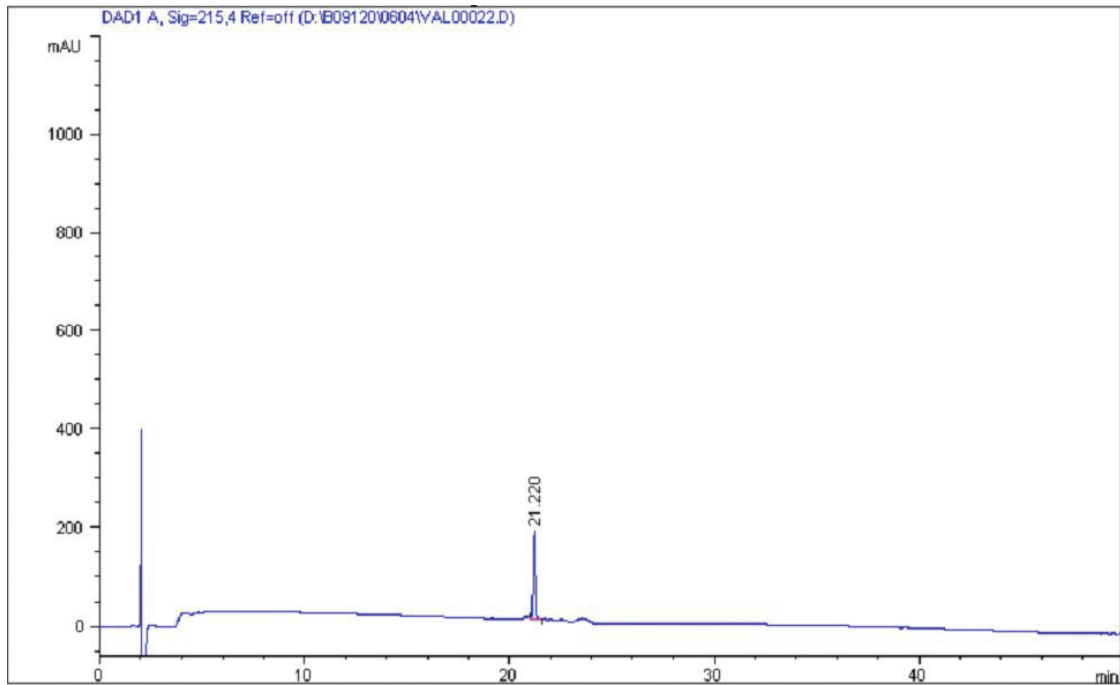


Fig. 1 Specificity of standard solution (concentration: 150 mg/ml) using HPLC

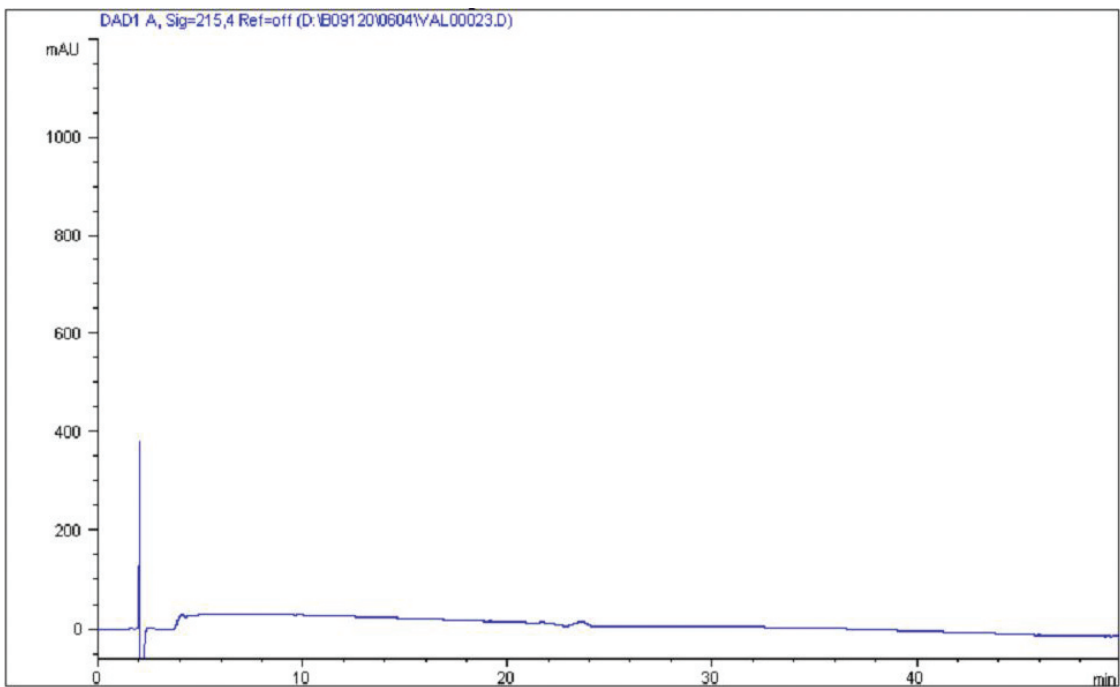


Fig. 2 Specificity of dilution solution (50% acetonitrile)

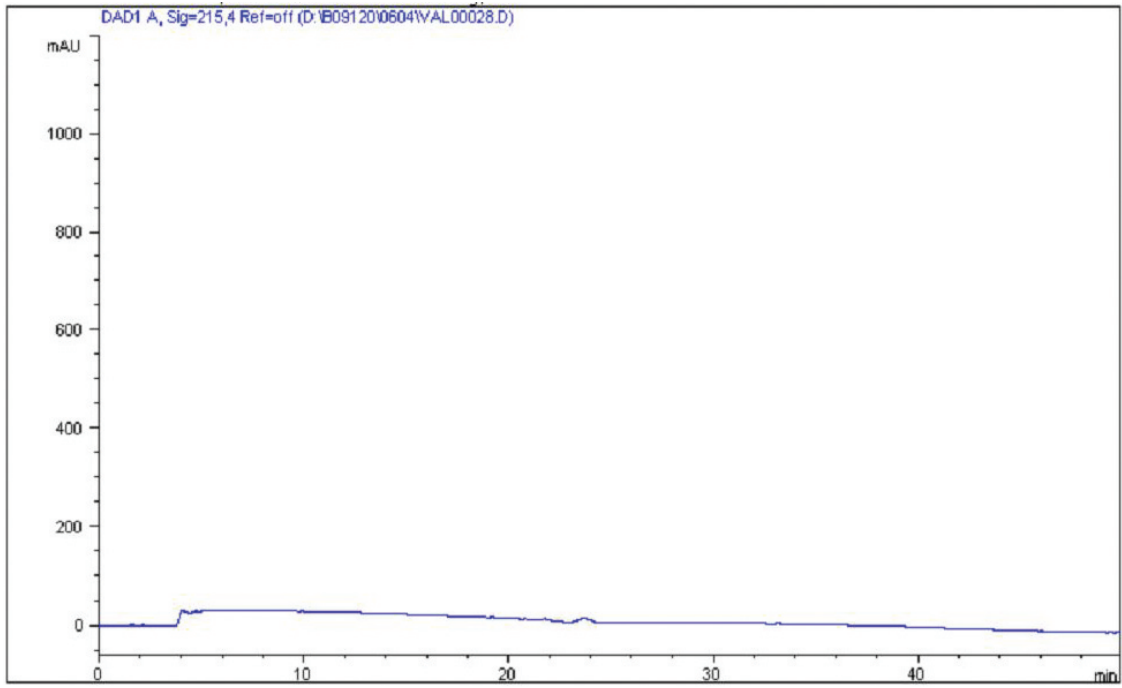


Fig. 3 Specificity of Mobile phase

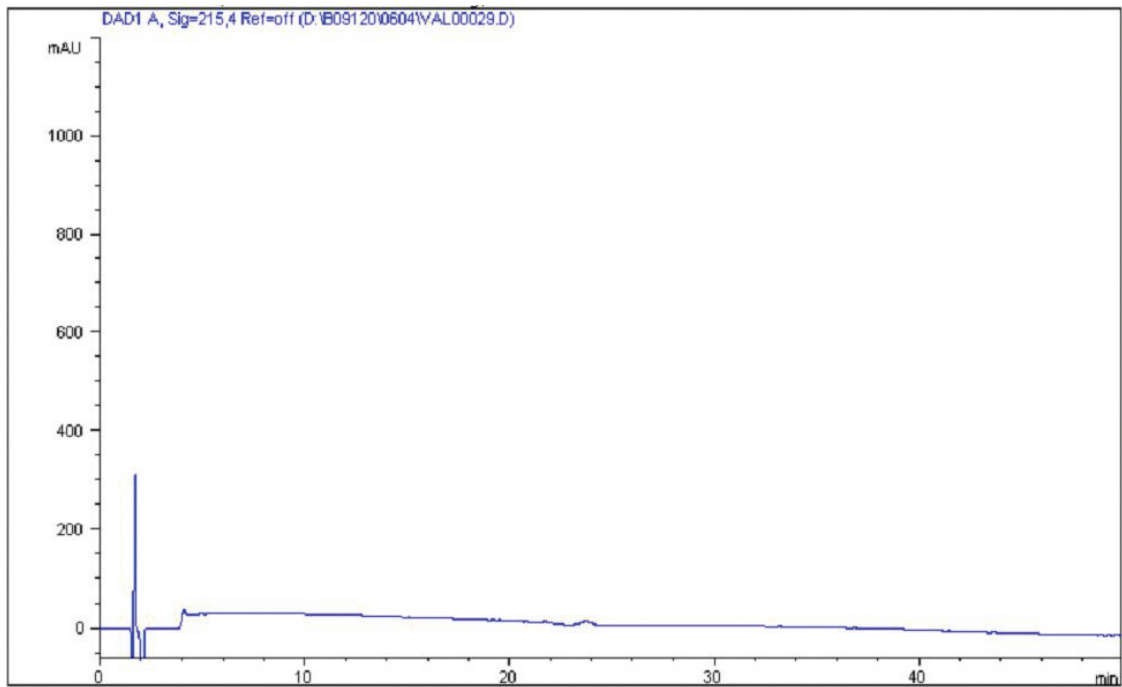


Fig. 4 Specificity of vehicle(Normal saline)

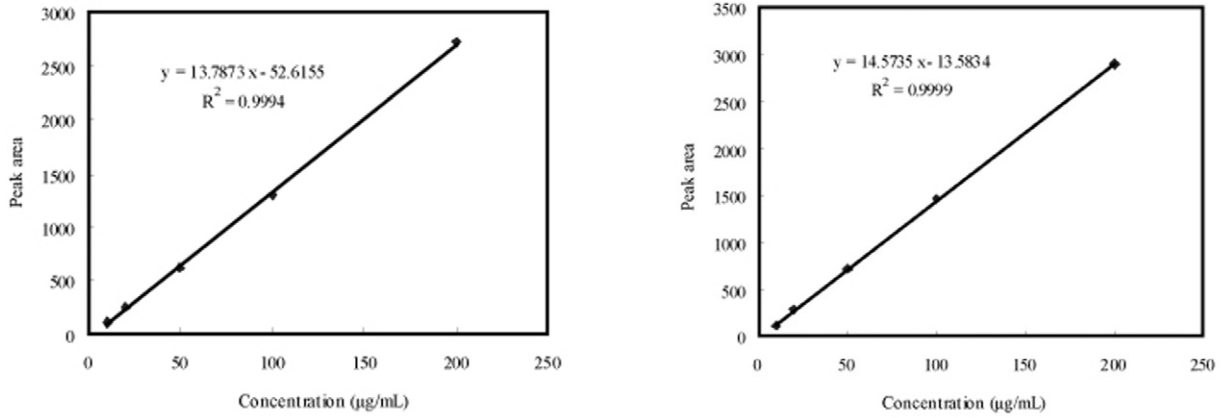


Fig. 5 Calibration curve of Sweet BV

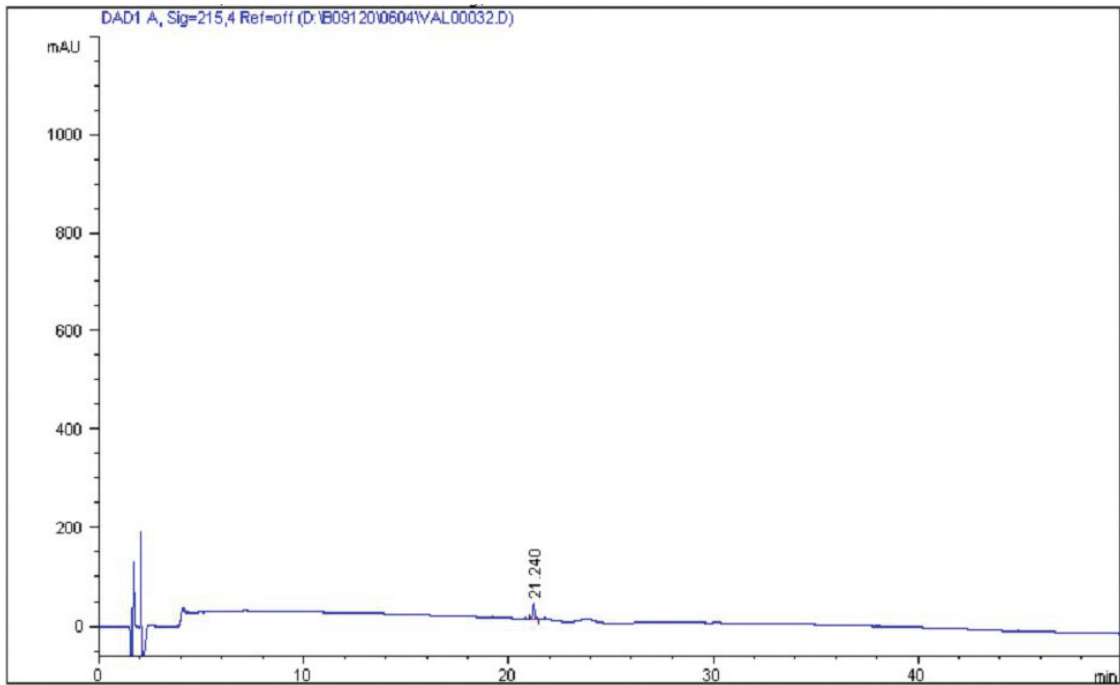


Fig. 6 Confirming Intra-day of Sweet BV in 0.1 mg/mL concentration.

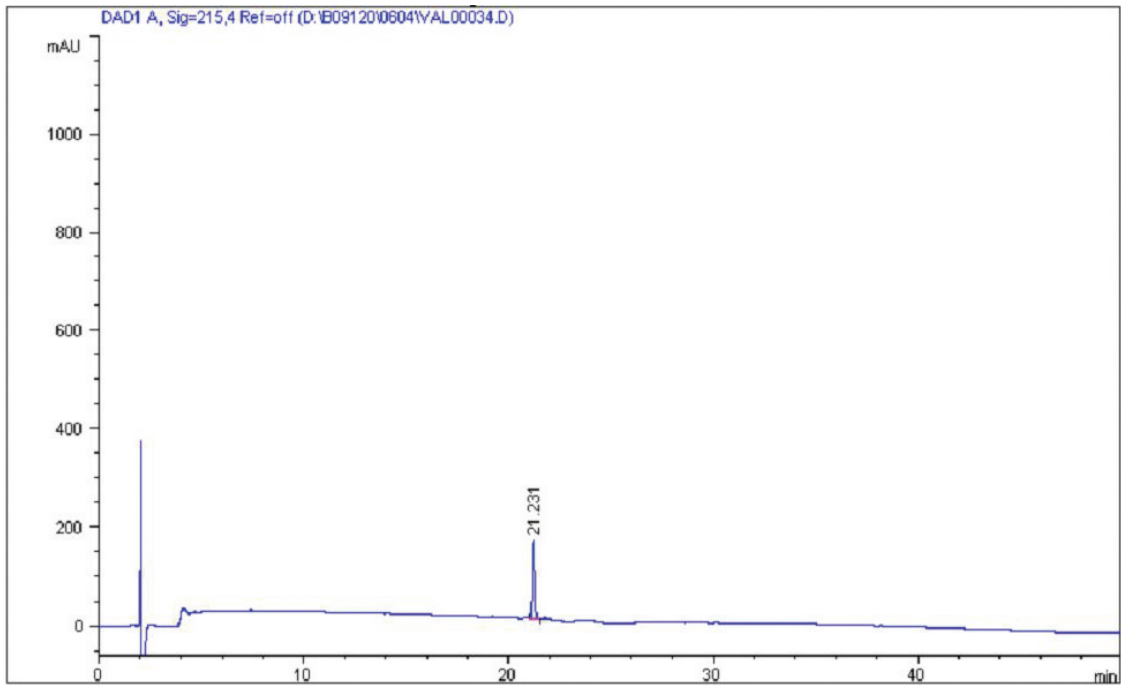


Fig. 7 Confirming Intra-day of Sweet BV in 100 mg/mL concentration.

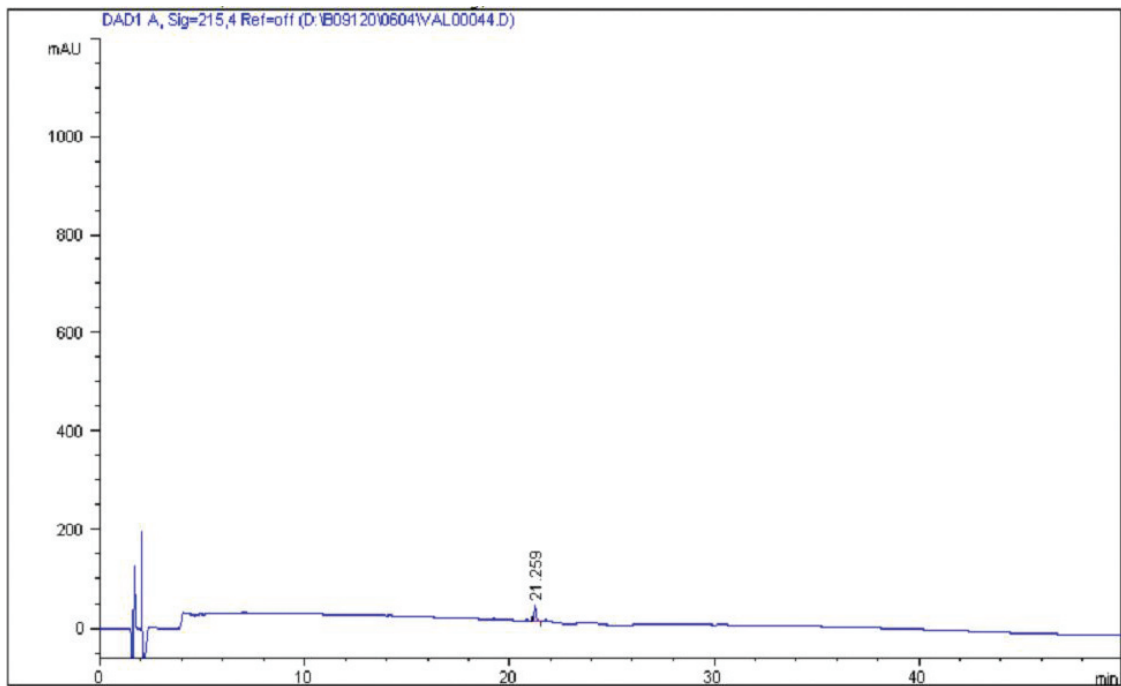


Fig. 8 Stability of Sweet BV (0.1 mg/mL) at room temperature for four hours.

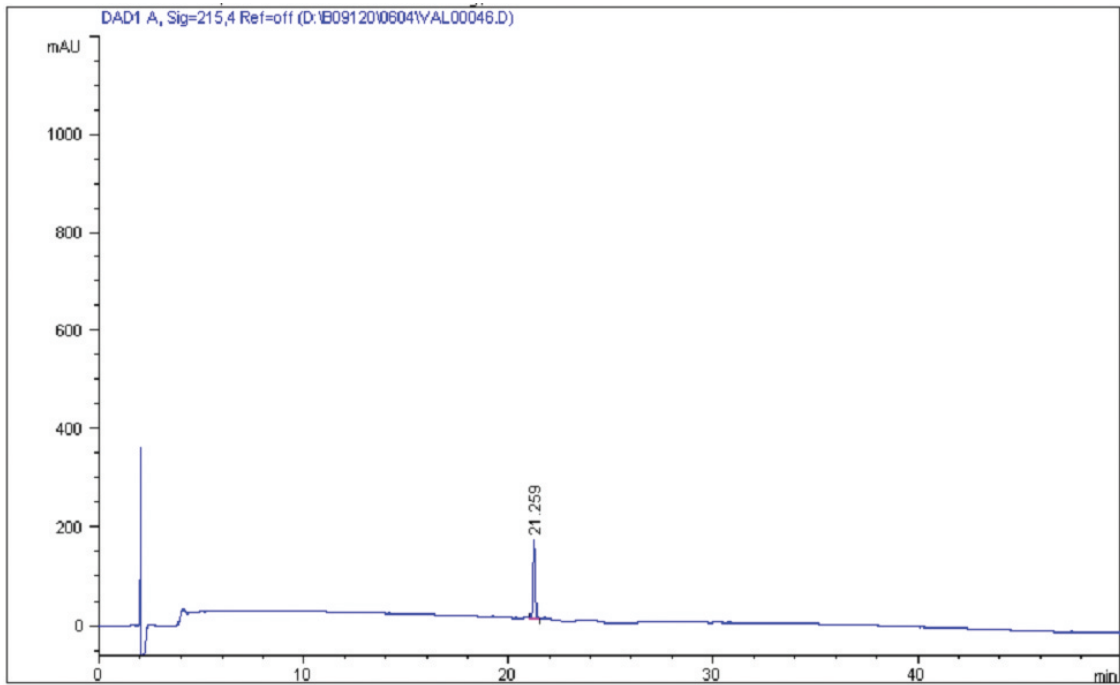


Fig. 9 Stability of Sweet BV (100 mg/ml) at room temperature for four hours.

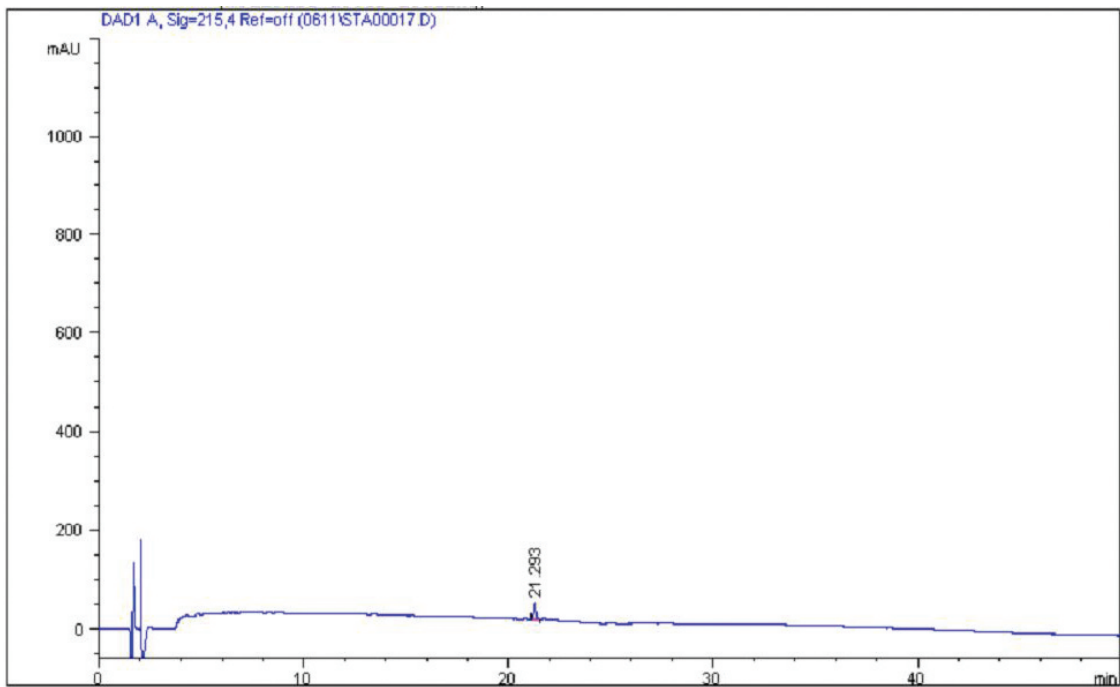


Fig. 10 Stability of Sweet BV (0.1 mg/ml) at refrigerated for 7 days.

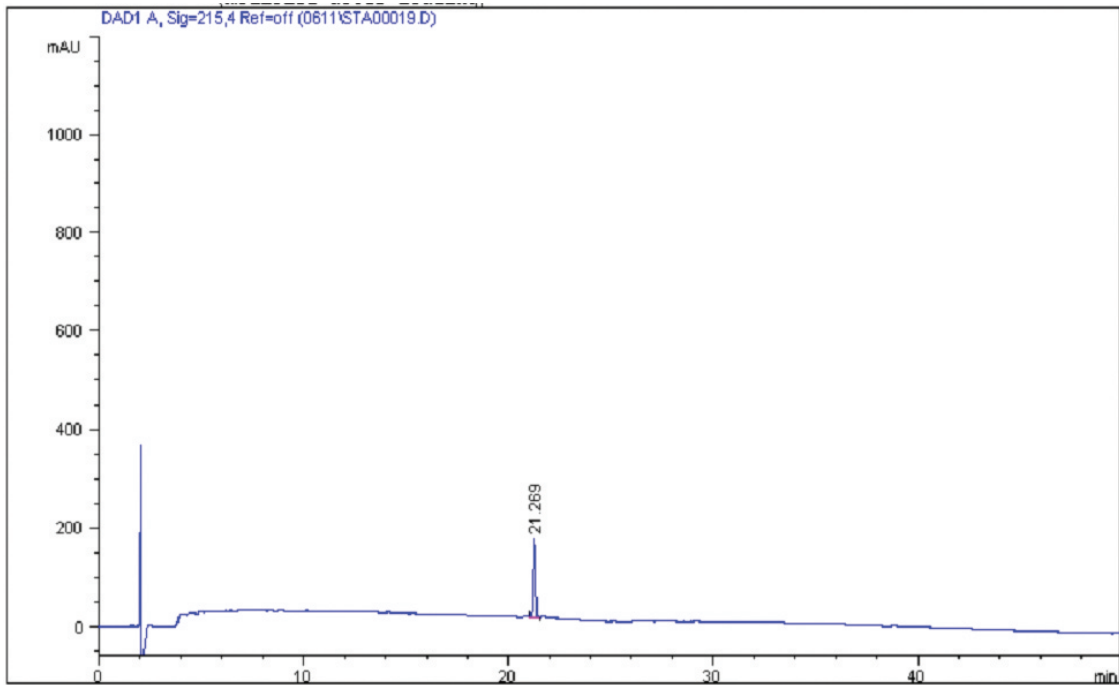


Fig. 11 Stability of Sweet BV (100 mg/mL) at refrigerated for 7 days.

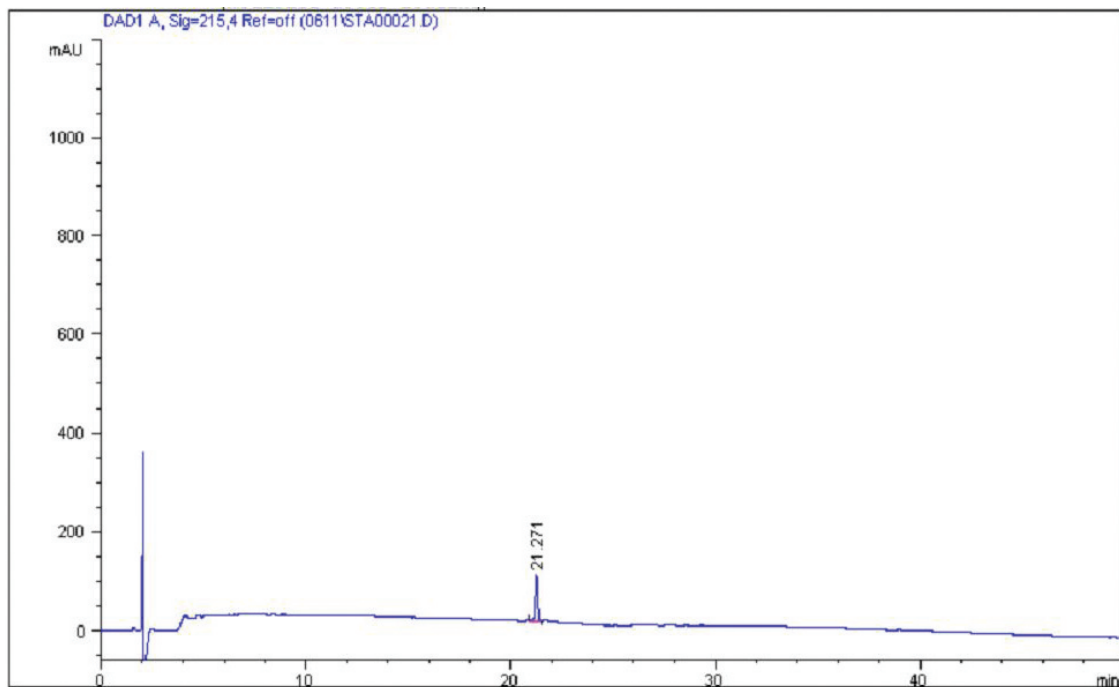


Fig. 12 Quality control of Sweet BV was measured on the first and eighth day.

