

복합가공 과정에 의한 대마 뿌리 추출물의 항염증 활성 증진에 관한 비교 연구

유가람^{1,2}, 진혜린¹, 김다훈³, 노중균⁴, 김혁^{1,2,3}, 임동우^{1,2,3*}

¹동국대학교 한의과대학 진단학교실, ²동국대학교 한의과대학 한의학연구소, ³토포랩 주식회사, ⁴사단법인 한국대마산업협회

A comparative study on enhanced anti-inflammatory activity of Cannabis root extract prepared by combined processing process

Ga-Ram Yu^{1,2}, Hye-Lin Jin¹, Da-Hoon Kim³, Jay Kyun, Noah⁴, Hyuck Kim^{1,2,3}, Dong-Woo Lim^{1,2,3*}

¹Department of Diagnostics, College of Korean Medicine, Dongguk University

²Institute of Korean Medicine, Dongguk University, ³TOPO Lab., Co., Ltd.

⁴The Korean Cannabis Industry Association

Objectives: Cannabis root is a medicinal plant that has been used in traditional medicine around the world. However, in previous studies using simple extracts, the biological activity was not relatively prominent compared to other herbal medicines. The aim of the present study is to confirm the enhancement of anti-inflammatory activity and bioactive compound of Cannabis root extract prepared by combined processing process.

Methods: A series of processes including repeated steam and dry, fermentation, hydrothermal extraction and ethanol extraction was applied to Cannabis root. The antioxidant content of cannabis root extracts obtained through a combined processing process was investigated by analyzing the total phenolic, tannin, and flavonoid contents. Anti-inflammatory effects were tested in LPS-treated RAW264.7 cells. The anti-inflammatory mechanism was examined by western blot. Finally, the component profile of Cannabis root extract was analyzed using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Thin layer chromatography (TLC).

Results: The cannabis root extract prepared by complex processing process had higher antioxidant and anti-inflammatory effects than simple extract. Total phenolic and tannin contents were significantly increased, and DPPH free radical inhibition activity was strengthened by combined processing process. Increased NO production and iNOS expression in LPS-treated RAW264.7 cells were decreased in a concentration-dependent manner upon extract treatment by complex processing process. Additionally, the Stigmasterol content of Cannabis root extract was increased through a complex processing process.

Conclusions: Further research is needed on the mechanisms and substances that exhibit the anti-inflammatory effects of Cannabis roots extract prepared by complex processing process.

Key Words : Combined processing process, Cannabis root, Stigmasterol, anti-inflammatory effect, Thin layer chromatography

• Received : 15 April 2024

• Revised : 1 May 2024

• Accepted : 7 May 2024

• Correspondence to : Dong-Woo Lim

Department of Diagnostics, College of Korean Medicine, Dongguk University, Dongguk-Ro 32, Goyang 10326, Republic of Korea

Institute of Korean Medicine, Dongguk University, Dongguk-Ro 32, Goyang 10326, Goyang, Republic of Korea

TOPO Lab., Co., Ltd., Dongguk University, Dongguk-Ro 32, Goyang 10326, Goyang, Republic of Korea

Tel : +82-31-961-5833, Fax : +82-31-961-5835, Email : greatwoodong@dongguk.edu

서론

삼 또는 대마 (*Cannabis sativa* L.)는 삼과 (Cannabaceae)에 속하는 한해살이 식물로 중앙아시아가 원산지이고, 국내에는 기원전 1세기 무렵부터 재배되었다고 알려져 있다¹⁾. 대마는 인류 역사와 가장 밀접한 관련성을 가진 식물 중 하나로, 대마의 섬유질은 옷감, 실 등을 만드는데 이용되며, 종자는 오일의 원료로 사용된다²⁾. 대마의 환각 작용은 주로 꽃과 잎에 함유되어 있는 항정신성 성분인 delta-8-THC (tetrahydrocannabinol), delta-9-THC에 의한 것으로³⁾, 종실에도 소량 함유되어 있는데, 종실을 제거하여 기능성 식품 소재로 이용되고 있다⁴⁾. 대마는 THC 이외에도 CBD (Cannabidiol)와 같은 100종 이상의 칸나비노이드(Cannabinoids)를 함유하고 있으며, Terpene 및 Phenolic compounds와 같이 생체 활성을 조절할 수 있는 다량의 2차 대사산물을 포함하고 있다⁵⁾. 대마에는 항염증, 통증완화, 우울증 개선, 신경보호, 항산화, 혈전증 개선과 같은 유용 생리활성이 보고되고 있음에도 불구하고⁶⁾, 국내의 경우 대마 규제법인 ‘마약류 관리에 관한 법률’을 중심으로 의료 및 연구 목적의 대마 사용이 제한적으로 허용되고 있다. 반면에 성숙한 대마의 줄기와 뿌리의 경우 THC의 함량이 극히 낮아 마약류에서 제외되고 있다⁷⁾.

만성 염증은 인체의 정상적인 기능의 불균형 중 하나로, 이로 인한 병리학적 반응이 촉발된다. 염증은 생체 내 항상성을 유지하기 위해 필수적이지만 과한 염증반응은 무분별한 세포의 기능장애와 괴사를 일으켜 만성염증으로 이어질 수 있다. 면역 반응 및 조직 손상으로 인해 방출되는 활성산소종(ROS)은 염증반응에 중요한 역할을 하는데, 과도한 ROS의 생성은 세포에 손상을 주어 DNA 손상 및 돌연변이를 일으킨다. 결과적으로 산화 스트레스는 노화, 염증 및 기타 만성 질환을 악화시킬 수 있다. 대식세포는 사이토카인과 iNOS (Inducible nitric oxide synthase)에 의해 합성되는 NO (Nitric oxide)와 같

은 전염증 매개체를 방출하여 염증과정을 조절하는 면역세포이다. iNOS는 전염증 매개체로 염증 수준을 평가하는데 중추적인 역할을 한다. 대식세포의 사이토카인에 의해 활성화되면 iNOS의 발현이 증가하고, NO를 방출하게 된다. 지속적이고 과도한 NO의 방출은 DNA 돌연변이, 세포사멸, 괴사 등 세포 변형을 유발하여 암, 죽상동맥경화증 등의 질병을 유발할 수 있다^{8,9,10,11,12)}.

항염증 및 기타 생리활성 효능을 증가시키기 위한 방법으로 한약재에 다양한 가공방법이 활용될 수 있다. 한약재 수치법 중의 하나인 구증구포(九蒸九曝)는 찌고 말리는 과정을 반복하는 것을 뜻한다¹³⁾. 대표적으로 인삼을 이용한 홍삼 및 흑삼 제조에 이용되고 있으며, 구증구포 과정을 거침으로서 함유된 인삼 사포닌(Ginsenoside)의 종류와 함량이 변화하고¹⁴⁾, 기존의 백삼이나 홍삼에 비하여 일부 생리활성능력이 증가하는 연구결과가 있다¹⁵⁾. 이러한 특징으로 도라지, 구기자, 숙지황, 녹차 등에도 구증구포가 적용되어 추출물의 활성을 증가시키는 많은 연구들이 진행되고 있다^{13,16-17)}.

또한 발효 과정은 수세기 동안 다양한 유형의 식품 및 한약재에 활용되었으며, 가장 경제적인 식품 가공 및 저장 방법 중 하나이다¹⁸⁾. 발효는 추가적인 건강상의 이점을 제공할 수 있는 잠재력을 가지고 있는데, 일부 발효 식품은 미생물의 대사과정에 의해 항고혈압, 항당뇨, 항암 및 항염증 등의 활성이 증가하고 활성물질의 추출 수율이 증가되기도 한다¹⁹⁻²⁰⁾. 사용하는 재료와 미생물의 차이로 인해 각 조건에 따른 발효식품의 건강 증진 활성을 면밀히 평가할 필요성이 있다^{8,9,10,11,12)}.

대마의 뿌리는 세계 각국의 전통의학에서, 발열, 염증, 통풍, 관절염 등 다양한 질병에 사용했다는 수많은 보고가 있다.²¹⁾ 동의보감에 대마의 뿌리는 마근(麻根)으로 표현되어, 거어(祛瘀), 지혈(止血) 효능이 있어 객혈(咯血), 붕루(崩漏), 태루하혈(胎漏下血), 토혈(吐血)과 같은 한의병증에 사용된 기록이 있다²²⁾.

현대에 Triterpenoids, Monoterpenes, Alkaloids, Sterols, Amides 및 Choline 계열에 다양한 화합물이 포함되어 있는 것으로 알려져 있으며, 항염증, 항당뇨, 항산화, 혈중 콜레스테롤 조절 등 다양한 약리작용을 하는 것으로 알려져 있는 대표적인 Phytosterol인 Stigmasterol을 다량 함유하고 있다^{23,24}. 그러나 대마 뿌리의 단순 추출물을 이용한 선행 연구에서, 다른 한약재 추출물에 비해 상대적으로 생리 활성이 뛰어나지 않았고, 그 추출 수율 또한 낮게 나타나는 문제점이 있었다²². 추출물의 효능 증대를 통해 대마 뿌리 소재의 의학적, 산업적 활용 가치를 높일 필요성이 제기되었다.

본 연구에서는 대마 뿌리의 복합가공 과정에서 항산화 물질의 함량 변화와 자유라디칼 소거능을 평가하고, 지질다당체 (Lipopolysaccharide)에 의해 염증반응이 유도된 대식세포모형을 이용하여 항염증 효과를 비교하였다.

대상 및 방법

1. 대마 뿌리 복합가공 추출물 준비

본 연구에 사용된 대마(*Cannabis sativa* L.)의 뿌리는 안동시 임하면에 소재한 사단법인 한국대마산업협회 재배농지로부터 제공받아 사용하였다. 대마를 수확한 후 뿌리털을 분리하여 세척 및 건조하고, 약 0.2 cm 이하로 분쇄하였다. 뿌리 100 g을 3차 증류수 1.5 L에 넣어 Autoclave를 이용하여 98℃, 15 psi로 고압 증기 가열하고, 60℃에서 3시간 건조하기를 4회 반복하였다. 1 M의 구연산을 이용하여 pH를 4.0로 적정하고, 121℃, 15 psi에서 100분간 멸균하였다. 미리 MRS 배지에서 배양하여 준비된 *Lactobacillus rhamnosus* 균주를 볼륨의 0.3% 농도로 접종하여 밀폐 상태로 교반배양기를 이용하여 37℃, 60 rpm에서 7일간 발효 공정을 수행하였다. 발효 공정 후에 환류추출기에서 60분간 열수추출을 거친 후, 추출물에 에탄올을 첨가하여 70% 농도의 에탄올에서 추출

을 3일간 하였다. 에탄올 추출물은 8 μ m pore size Whatman filter paper를 사용하여 여과하고, 감압농축기(Buchi, Flawil, Switzerland)에서 농축한 다음 동결건조기를 통해 건조하여 회수하였다. 각 단계에서 CSR-Nt(알코올 추출), CSR-4SD(고압 증기 및 건조 4회 + 알코올 추출), CSR-F-Lr(발효 + 알코올 추출), CSR-4SD-F-Lr(고압 증기 및 건조 4회 + 발효 + 알코올 추출) 추출물을 얻었다(Table 1). 분말화 된 추출물은 건조물의 수율을 측정한 후 -20℃에 보관하면서 본 실험에 사용하였다. 세포실험에서 Phosphate buffered saline(PBS)에 녹인 후 0.22 μ m syringe 필터로 여과하여 사용하였다.

2. 총 폴리페놀, 탄닌, 플라보노이드 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu법을 응용하였다. 각 추출물을 70% 에탄올에 녹여 10 mg/ml의 농도로 준비하고, 40 μ l을 Sigma Aldrich사의 Folin-Ciocalteu 용액 200 μ l와 증류수 1.16 ml를 첨가하여 혼합하였다. 3분간 실온에서 반응하고, 2% Na₂CO₃을 600 μ l 첨가하여 2시간 추가 반응시킨 후 Microplate spectrophotometer(VersaMax, Molecular Devices, CA, USA) 장비를 이용하여 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 다양한 농도의 Gallic acid을 표준물질로 이용하여 표준검량곡선 실험에 사용하였다. 총 탄닌 함량은 각 추출물을 15 μ l에 증류수를 6985 μ l 넣어 총 부피가 7 ml이 되도록 맞추었다. 이후 Sigma Aldrich사의 Folin-Denis용액 0.5 ml, Na₂CO₃을 1 ml 및 증류수 1.5 ml를 혼합하여 반응 후에 Microplate spectrophotometer 장비를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 다양한 농도의 Tannic acid을 표준물질로 이용하여 표준검량곡선 실험에 사용하였다. 총 플라보노이드 함량은 Aluminium chloride colorimetric assay 방법을 이용하였다. 증류수 1 ml에 추출물 250 μ l, NaNO₂을 75 μ l를 혼합하여 6분간 방치하고, 0.3 ml AlCl₃ 6H₂O를 첨가하고 6분간 반응하고, 1 M NaOH 500

μl 을 넣어 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 다양한 농도의 Catechin을 표준물질로 이용하여 표준검량곡선 실험에 사용하였다.

3. 자유 라디칼 소거활성 측정

추출물의 자유 라디칼 소거활성을 확인하기 위해 Bondet법을 응용하여, Sigma Aldrich사의 DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, Sigma 1898-66)시약을 이용하여 실험하였다²⁵⁾. 추출물을 70% 에탄올에 0, 1.25, 2.5, 5 및 10 mg/ml의 농도로 녹이고, 300 μM 의 DPPH와 1:9 비율로 혼합하고, 암실에서 30분간 반응하여 Microplate spectrophotometer 장비를 이용하여 517 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 추출물을 첨가하지 않은 대조군의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인 IC_{50} (50% Inhibitory concentration)값으로 나타내었다. 다양한 농도의 Ascorbic acid를 표준 물질로 이용하여 표준검량곡선 실험에 사용하였다.

4. 세포주 배양

마우스 대식세포주(Mouse macrophage cell line)인 RAW264.7세포는 한국세포주 은행(Korea cell line bank, Seoul, Korea)에서 분양 받아 사용하였다. RAW264.7 세포는 1% Penicillin-streptomycin과 10% Fetal bovine serum (FBS)를 첨가한 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO_2 인큐베이터에서 배양하였다.

5. 세포 독성 측정

세포 독성 평가는 EZ-Cytox kit (DaeilLab, Seoul, Korea, EZ-3000)을 사용하여 제조사가 권장하는 방법에 따라 측정하였다²⁶⁾. RAW264.7세포를 96 well cell culture plate에 FBS를 함유한 DMEM 배지를 이용하여 최종농도가 5×10^3 cells/well가 되도록 분주하여 37°C, 5% CO_2 인큐베이터에서 24시간 배양하고, 추출물(100, 200, 300, 400, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 다

양한 농도로 처리하여 배지에서 24시간 배양하였다. 이후, EZ-Cytox 시약을 10% 포함하는 배지로 갈아준 후에 30분간 동안 배양한 다음 Microplate spectrophotometer장비로 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 결과를 확인하였다.

6. NO(Nitric oxide) 생성 억제능 측정

RAW264.7세포에서 Lipopolysaccharide(LPS)로 인한 Nitrite 생성에 대한 추출물의 억제 효과를 조사하기 위해 Griess시약 반응을 이용하였다. 세포를 6 well cell culture plate에 FBS를 함유한 DMEM 배지를 이용하여 5×10^5 cells/well의 세포를 분주하여 37°C, 5% CO_2 인큐베이터에서 24시간 배양하고, LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 추출물을 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. Griess A reagent (5% phosphoric acid, 1% sulfanilamide)와 Griess B reagent (0.1% N-ethylene-diamine)을 동일한 비율로 혼합하여 같은 양의 상등액과 반응시키고 Microplate spectrophotometer 장비로 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 결과를 확인하였다. 이때 다양한 농도의 NaNO_3 을 표준물질로 이용하여 표준검량곡선 실험에 사용하였다.

7. Western blot 분석

RAW264.7세포에서 추출물에 의한 염증과 관련된 단백질의 발현 수준을 비교하였다. 세포를 6 well cell culture plate에 5×10^5 cells/well의 세포를 분주하여 24시간 배양하고, LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 추출물을 함께 처리하여 24시간동안 배양하였다. 처리가 완료된 세포를 DPBS로 세척하고 Protease and Phosphatase inhibitor cocktail (Gendepot, Barker, TX, USA)을 첨가한 RIPA buffer (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)을 이용하여 단백질을 추출시킨 후에 BCA kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)을 이용하여 단백질 정량을 수행하였다. 동량의 단백질(40 μg)을 10% SDS-PAGE gel을 이용하여 크기 별로 분리한 후 PVDF

(polyvinylidene difluoride) membrane에 전이하였다. 이후 Tween 20을 0.1% 함유한 TBS-T (Tris-buffered saline)로 3회 세척하고, 5% BSA에 1시간 동안 Blocking하였다. 1차 항체를 1:500~1:1000의 비율로 3% BSA에 희석하여 Membrane에 처리하여 4℃에서 밤새 반응시킨 후 TBS-T를 이용하여 10분간 3회 세척을 하였다. 2차 항체는 1:2000~4000의 비율로 1% BSA에 희석하여 사용하였고, 2시간동안 반응시키고 3회 세척하였다. ECL buffer (Supersignal west pico, Thermo fisher scientific, USA)을 처리하고 Fusion solo (Vilber lourmat, Collegien, France)을 이용하여 단백질 발현을 확인하였다. 1차 항체 iNOS (sc-651), β -actin (sc-69879) 및 2차 항체 (Mouse IgG, sc-2005)는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)사 제품을 사용하였다.

8. HPLC-DAD-UV 분석

추출물은 10 mg/ml의 농도로 Acetonitrile에 희석하여 37℃에서 30분간 녹이고, 0.22 μ m syringe 필터로 여과하여 사용하였다. HPLC 이동상은 A, B 두 용액계의 농도를 Isocratic으로 분석하였다. 이동상 A용액은 Pure water (HPLC grade)에 0.05% Formic acid를 첨가한 수용액이었고, B 용액은 100% Acetonitrile에 0.05% Formic acid를 첨가하여 사용하였으며 모든 용매는 사용 전 필터로 여과 후 사용하였다. 칼럼의 유속은 1.0 ml/min이었으며 분석 시간은 0분에서 30분까지 이동상 A를 30%로 고정하여 용리하였고, 시료 주입은 10 μ l를 주입하고, 칼럼의 온도는 28℃ 설정하고, UV detector는 230 nm 파장으로 설정하였다. Agilent Eclipse XDB-C18 chromatographic column (150 \times 4.6mm, 5 μ m pore size) 컬럼을 이용한 HPLC system (Agilent 1260 infinity HPLC, Agilent, CA, USA)을 사용하여 분석을 수행하였다.

9. TLC (Thin layer chromatography) 분석
추출물 및 분획물을 Methanol에 100 mg/ml의 농도로 녹인 후에 TLC silica gel 판 (TLC silica gel 60 aluminium sheet, Merck, Darmstadt, Germany)에 점적하고, Chloroform/Methanol(98.5 : 1.5)을 이용하여 전개하였다. 이후 H₂SO₄ 용액을 19%농도로 분무하고, 105℃에서 10분간 가열을 통해 화합물을 발색시켜 UV lamp 조명상에서 Stigmasterol의 함량을 비교 분석하였다. 표준품으로 Stigmasterol은 Sigma Aldrich사의 제품을 사용하였다.

10. 통계처리

실험의 모든 데이터는 평균값과 표준편차 값의 차이 (mean \pm deviation)로 나타내었고, GraphPad Prism version 5.0 (La Jolla, CA, USA)를 이용하여 각 군별 결과의 유의성을 unpaired t-test의 통계 분석법으로 판단하였으며 P 값이 0.05 미만일 경우를 기준으로 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

결 과

1. 대마 뿌리 복합가공 추출물의 총 폴리페놀, 탄닌 및 플라보노이드 함량 변화

대마 뿌리 가공법에 따른 4가지 추출물의 총 폴리페놀 함량은 CSR-4SD-F-Lr (49.33 μ g/ml), CSR-F-Lr (45.25 μ g/ml), CSR-4SD (34.66 μ g/ml), CSR-Nt (32.89 μ g/ml)순으로 높게 나타났으며, 총 탄닌 함량은 CSR-4SD-F-Lr (64.26 μ g/ml), CSR-F-Lr (58.26 μ g/ml), CSR-4SD (54.6 μ g/ml), CSR-Nt (46.15 μ g/ml)순으로 높게 나타났다. 총 플라보노이드 함량은 유의미한 차이를 보이지 않았다(Figure 1).

2. 대마 뿌리 복합가공 추출물의 DPPH radical 소거활성 변화

대마 뿌리 가공법에 따른 4가지 추출물의 DPPH

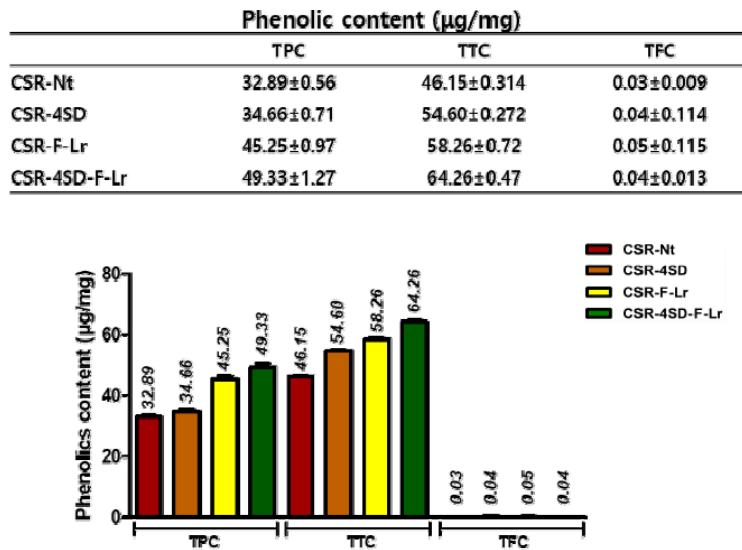


Fig. 1. Total phenolic content, tannin content, flavonoid content of Cannabis root extract prepared by combined processing process.

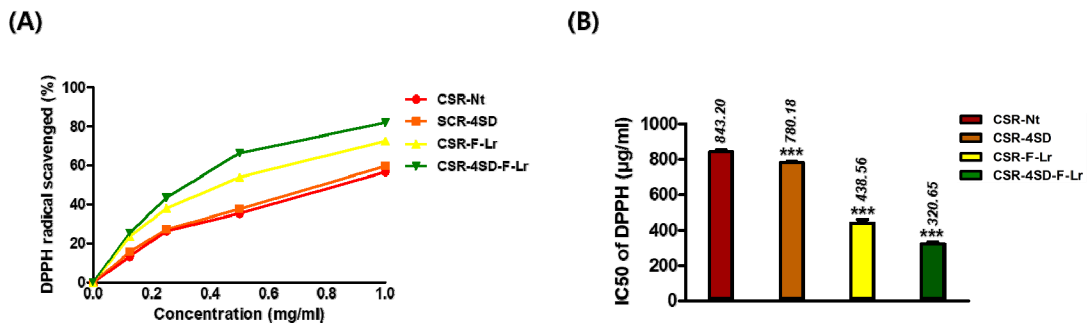


Fig. 2. DPPH radical scavenging activity of Cannabis root extract by combined processing process. (A) DPPH radical scavenging effects for various concentration (B) IC50 values of DPPH assay. The values are significantly different at * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

radical 소거능은 CSR-4SD-F-Lr, CSR-F-Lr, CSR-4SD, CSR-Nt 순으로 높게 나타났으며 (Figure 2A), IC50의 수치는 CSR-Nt (843.2 µg/ml), CSR-4SD (780.18 µg/ml), CSR-F-Lr (438.56 µg/ml), CSR-4SD-F-Lr (320.65 µg/ml)로 CSR-4SD-F-Lr에서 가장 뛰어난 항산화 효능을 나타내었다(Figure 2B).

3. 대마 뿌리 복합가공 추출물이 RAW264.7 세포생존율에 미치는 영향

대마 뿌리 가공법에 따른 4가지 추출물은 시험 농도 내에서 RAW264.7세포에서 세포독성을 나타내지 않았다. 최고 농도인 500 µg/ml에서 CSR-Nt (114.00%), CSR-4SD (114.83%), CSR-F-Lr (107.13)은 세포생존율이 증가하였으며, CSR-4SD-F-Lr에서 102.06%

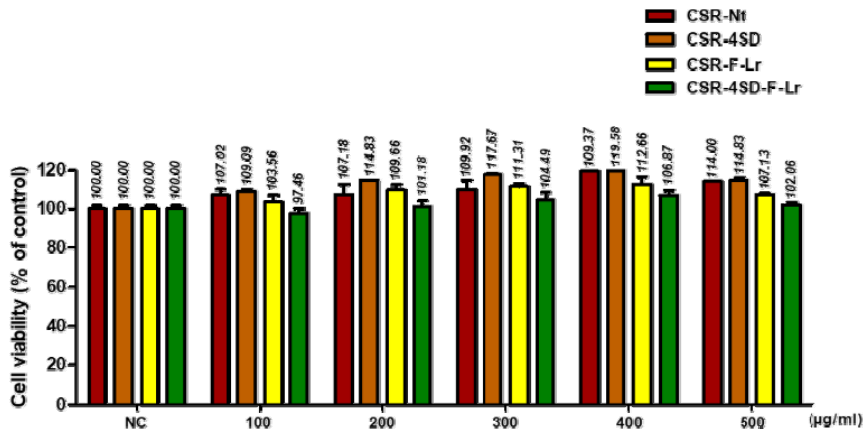


Fig. 3. Effect of Cannabis root extract by combined processing process on RAW264.7 cell viability. RAW264.7 cells were incubated with different concentration of Cannabis root extract (0–500 µg/ml) for 24 h. Cell viability was measured by EZ-Cytox assay as described in materials and methods. Results are the means ± SDs of three independent experiments.

의 세포생존율을 보였다. 따라서 본 실험에서 수행할 시료의 농도를 모든 추출물에서 세포독성이 나타나지 않는 250, 500 µg/ml의 농도로 설정하여 연구를 진행하였다(Figure 3).

4. 대마 뿌리 복합가공 추출물이 Nitrite 생성에 미치는 영향

대마 뿌리 가공법에 따른 항염증 작용 효과를 알아보기 위해 RAW264.7세포에서 LPS 자극에 의한 NO 생성에 미치는 영향을 조사하였다. LPS 자극에 의한 NO 생성은 13.59 µM로 증가하였으며, 500 µg/ml 농도에서 CSR-Nt (8.94 µM), CSR-4SD (6.79 µM), CSR-F-Lr (6.34 µM), CSR-4SD-F-Lr (5.05 µM)의 순으로 높은 NO 생성이 억제하였다(Figure 4A). NO 생성에 관여하는 효소인 iNOS의 단백질 발현을 추가적으로 확인한 결과, LPS 자극에 의한 iNOS의 발현은 1에서 7.08로 증가하였으며, 고농도의 추출물에서 CSR-4SD-F-Lr (0.72), CSR-F-Lr (2.03), CSR-4SD (2.85), CSR-Nt (4.38)순으로 iNOS의 발현이 억제되었으며, NO 생성과 일치하는 결과를 얻었다(Figure 4B).

5. 대마 뿌리 복합가공 추출물의 HPLC 분석 결과

대마 뿌리 가공법에 따른 4가지 추출물의 HPLC 분석 결과는 (Figure 5A)와 같이 나타났다. 8개의 물질 peak area를 세밀하게 비교하였을 때, CSR-4SD에서 CSR-Nt보다 증가된 peak area (RT: 2.327, 4.791, 5.009, 8.348, 8.903, 11.612)를 확인하였으며, CSR-F-Lr에서 CSR-Nt와 비교하여 감소된 peak area (RT: 2.327, 2.514, 4.791, 5.009, 8.348, 8.903)가 관찰되었다. CSR-4SD-F-Lr에서도 CSR-Nt보다 대체로 감소된 peak area가 확인되었다. HPLC를 이용한 물질분석에서 CSR-4SD-F-Lr의 유의미한 물질 증가는 확인하지 못하였다(Figure 5B).

6. 대마 뿌리 복합가공 추출물 Stigmasterol 함량 비교

대마 뿌리 가공법에 따른 추출물의 Stigmasterol의 함량을 비교하기 위해 TLC 분석을 하였다 (Figure 6). ① : 100 µg/ml 농도의 Stigmasterol, ② : 100 mg/ml 농도의 대마 뿌리 물 추출물, ③ : 100 mg/ml 농도의 CSR-Nt, ④ : 100 mg/ml 농도의

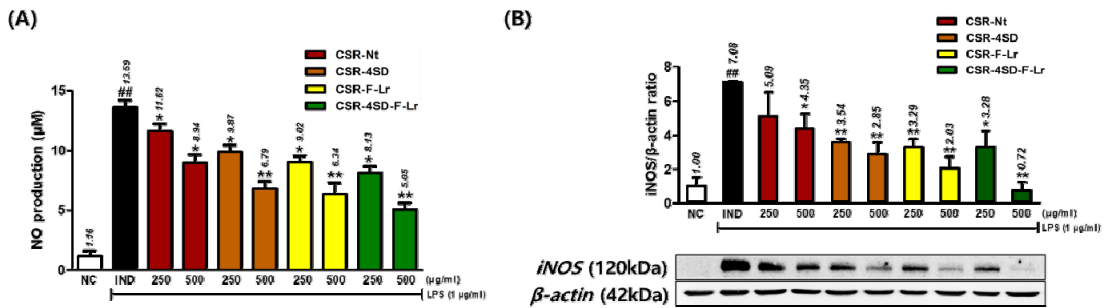


Fig. 4. Comparison of anti-inflammatory effects of Cannabis root extract prepared by combined processing process. RAW264.7 cells were co-treated with LPS (1 µg/ml) and Cannabis root extracts for 24 h. (A) Inhibitory effect of Cannabis root extract by combined processing process on NO production. (B) The levels of iNOS protein expression in LPS-induced RAW264.7 cells were immunoblotted and analyzed. Results are the means ± SDs of three independent experiments. #P<0.05, ##P < 0.01 vs. LPS-untreated controls and *P < 0.05, **P < 0.01 vs. LPS-treated control.

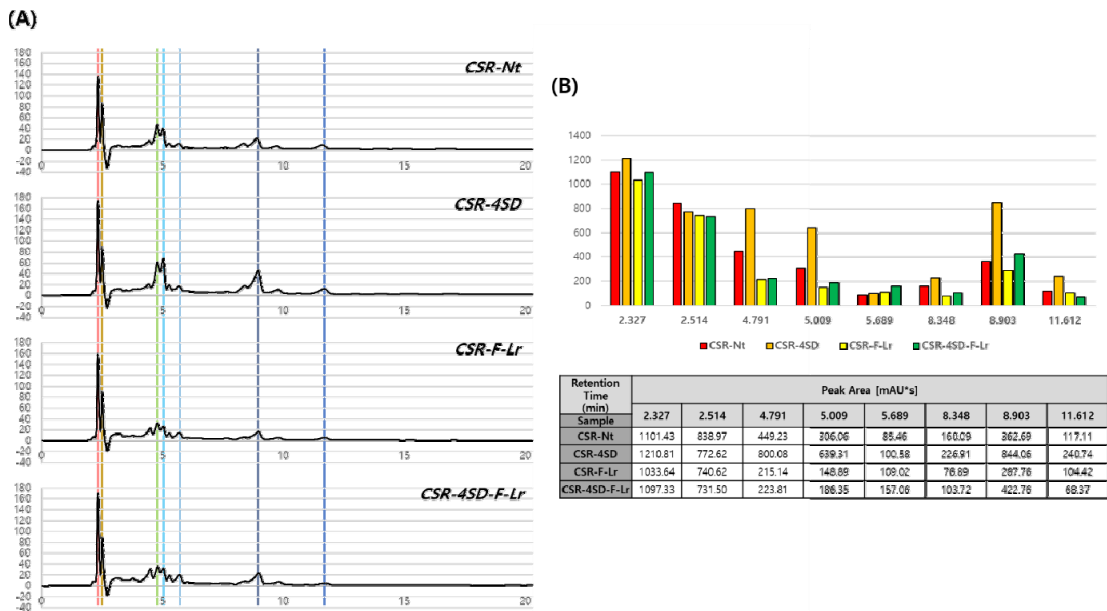


Fig. 5. Comparison of compound peaks of Cannabis root extracts (A) HPLC analysis of all Cannabis root extracts prepared by different processing process. (B) Bar chart of peak area results for comparison.

CSR-4SD, ⑤ : 100 mg/ml 농도의 CSR-F-Lr, ⑥ : 100 mg/ml 농도의 CSR-4SD-F-Lr을 16 cm 전개하였다. 물 추출물에서는 TLC분석 상 성분이 확인되지 않았으며, ④에서 1개, ③, ⑤, ⑥에서 2개의 밴드가 확인되었다. Stigmasterol은 1.06 cm 구간(R_f 값

이 0.066)에서 확인되었으며, 복합가공과정을 거침으로써 Stigmasterol의 함량이 ③, ④, ⑤, ⑥ 순으로 점차 증가하는 것을 확인하였다.

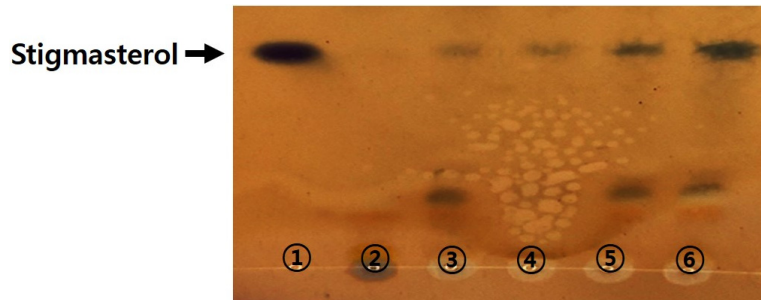


Fig. 6. TLC(Thin-layer chromatography) of the different extracts of Cannabis root showing the content of Stigmasterol. Spot ① indicates Stigmasterol, and Spot ② indicates water extract of Cannabis root, and Spot ③ indicates CSR-Nt, and Spot ④ indicates CSR-4SD, and Spot ⑤ indicates CSR-F-Lr, and Spot ⑥ indicates CSR-4SD-F-Lr, respectively.

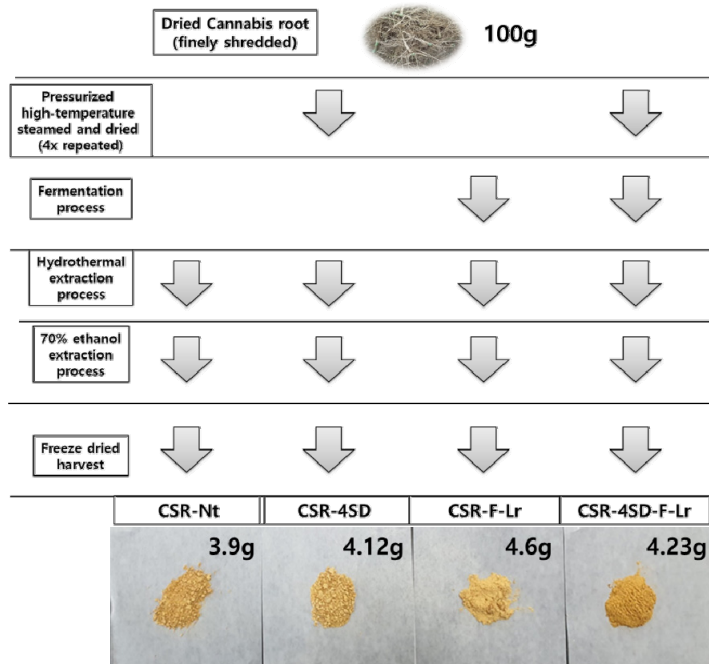


Table 1. Schematic diagram of the combined processing process and yield of each processed Cannabis root extract.

고찰

대마에 포함된 칸나비노이드에 관한 약리학적 측면에서의 연구들이 활발하게 진행되고 있으나, 대마의 뿌리는 칸나비노이드의 함량이 적거나 검출이 되

지 않는다²⁷⁾. 그럼에도 불구하고 세계적으로 전통의학에서 사용되어 온 뿌리는 Friedelin, Epifriedelanol, β -Sitosterol, Stigmasterol와 같은 다양한 생리활성 물질을 포함하고 있어 약리학적 가능성이 다분하다²⁸⁾. 선행연구에 따르면 대마 뿌리의 에탄올 추출물은 세

포독성이 보이지 않는 농도에서 간세포에서 당 흡수력을 증가시키고, 염증을 감소시키는 것으로 보고하였다²²⁾. 대마 농업에서 부산물로 버려지는 대마 뿌리의 복합가공이 약리학적 개발 가능성을 제시할 수 있을 것으로 기대하였다.

본 연구에서는 대마의 뿌리의 복합가공 과정에서 Phenolic content의 함량 변화를 비교하고, 항산화 및 항염증 효과를 측정하였다. 각각의 공정별 추출 수율을 측정한 결과, 건조 뿌리 100g당 수율은 CSR-F-Lr (4.6 g), CSR-4SD-F-Lr (4.23 g), CSR-4SD (4.12 g), CSR-Nt (3.9 g) 순으로 높았으며, CSR-F-Lr에서 4.6 %의 수율로 가장 높았다(Table 1). 발효와 구증구포 공정 모두 대마 뿌리 추출물의 수율을 증가시키는데 기여한 것으로 보인다. 많은 연구에 따르면 발효에 사용되는 재료, 균주, 온도 등의 발효조건에 따라 추출물의 성분 프로파일 및 수율의 변화가 발생한다고 알려져 있다²⁹⁾. 또한 다양한 미생물과 균주에 의해 식물 유래 천연 화합물이 대사되어 생성된 대사산물은 대개 낮은 분자량과 극성도로 생리활성도(Bioavailability)가 크게 증가하는 것으로 알려져 있다³⁰⁾. 락토바실러스 속 균주 4종 (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*)을 대마 뿌리에 접종한 선행연구에서, 가장 큰 pH 변화를 보인 *Lactobacillus rhamnosus*를 발효공정에 활용하는 것이 가장 적절한 것으로 판단되어 *L.rhamnosus* 균주를 이용하여 가공 공정을 하였고, 폴리페놀 및 탄닌 함량이 유의미하게 증가하였다. 선행 조사 결과, *Lactobacillus plantarum* 균주를 여과의 발효에 활용하여 stigmasterol 성분의 수율을 크게 증가시킨 연구를 확인할 수 있었다³¹⁾. 또한 건조 대마 뿌리에 추가적으로 찌고 말리는 과정이 포함되면서 표면적이 증가되고, 발효의 효율이 증가하여 페놀성 물질이 더욱 증가하였다.

식물에 포함된 천연 항산화 물질에는 대표적으로 폴리페놀, 플라보노이드, 카로티노이드 및 토코페롤

등이 존재하며, 총 폴리페놀 함량은 항산화 능력을 결정하는 중요한 요소 중 하나이다. 페놀성 물질의 Phenolic hydroxyl이 거대분자와 결합하여 항암, 항균, 항산화 작용 등 생리활성기능을 갖는 것으로 알려져 있다³²⁻³³⁾. DPPH radical 소거능 결과도 페놀성 물질 함량변화와 흡사한 경향성을 보이는 것을 보아, 복합가공과정은 대마 뿌리의 항산화 물질의 용출을 증가시킴으로써 생리활성기능 및 항산화 능력을 증강시키는 것으로 사료된다. 네 가지 공정별 추출물은 LPS로 유도된 RAW264.7 대식세포에서 NO생성을 농도의존적으로 억제하였으며, 가공과정에 따라 억제율이 유의적으로 증가하였다. NO생성에 관여하는 iNOS단백질 발현을 추가적으로 확인한 결과, 흡사한 경향성으로 발현이 억제되는 것을 확인하였다. 추출물의 효능의 순서는 항산화 및 항염증 항목 모두에서 1) Nt, 2) 4SD, 3) F-Lr, 4) 4SD-F-Lr 순으로, 이후 TLC로 확인한 Stigmasterol 검출량의 경향과도 유사한 결과를 확인할 수 있었다.

복합과정을 거치며 성분의 차이가 발생하는지 확인하기 위해 HPLC를 진행하였으나, 복합가공 과정을 거치며 유의미하게 증가하거나 새로 발견된 peak는 발견하지 못하였다. 대마 뿌리에 다량 포함된 Stigmasterol의 변화를 확인하기 위해 TLC를 진행하였다. 발효과정에 의해 증가한 결과를 얻었으며, 추가적으로 찌고 말리는 과정이 포함되면서 더욱더 높은 증가를 확인하였다. Stigmasterol은 면역세포에서 TLR4/NF κ B 경로 조절을 통해 M1/M2 분극화를 조절하고 염증을 억제하는 것으로 알려져 있으며³⁴⁾, 그 외에도 ROS에 의한 신경손상 보호, LDL콜레스테롤 수치 개선, 인슐린 저항성 개선 등의 연구들이 보고되고 있다³⁵⁻³⁶⁾. 이 결과들은 복합가공과정으로 인해 대마 뿌리의 Stigmasterol의 함량이 증가하고, 항산화 및 항염증 효과가 증가한 것으로 추측된다. 또한 복합가공 추출 방식을 통해 기존에 생리활성 효능이 부족한 다른 한약재 추출물의 효과를 개량시킬 수 있을 것으로 보인다.

본 연구는 복합 공정을 거친 대마 뿌리 추출물의 산화적 스트레스 및 염증반응에 미치는 영향을 비교 연구하여 원 재료의 추출물에 비해 복합가공을 거친 추출물의 뛰어난 효능을 확인하였다. 복합공정의 적용을 통해 생리활성 효능이 증가된 대마 뿌리 추출물의 작용기전과 생리활성 물질에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론

1. 대마의 뿌리는 세계 각지의 전통의학에서 오랜 기간 다양한 효능으로 활용되었으나, 일반 열수 추출물은 실험적으로 생리 활성 효능이 충분하게 나타나지 않는 문제점이 있다.
2. 반복 증숙, 발효, 가열 추출로 구성된 복합가공 과정을 적용한 대마 뿌리 추출물은 일반 추출물에 비해 증가한 항산화 및 항염증 효과를 보였다.
3. 복합가공 과정을 거치며 총 페놀성 물질과 탄닌의 함량 증가를 확인하였고, 그 결과로 DPPH 라디칼 소거능도 함께 증가하는 것으로 보임.
4. 특히 TLC로 분석한 결과 Stigmasterol 함량이 복합가공과정을 거치며 대폭 증가하였고, Stigmasterol에 의한 NO 생성 및 iNOS 발현 억제력을 보여 항염증 효과가 함께 증가하는 것으로 판단됨.
5. 복합가공 대마 뿌리 추출물의 추가적인 물질 분석 및 세포 내 항염증 작용기전에 대한 연구가 필요할 것으로 생각됨.

감사의 글

이 논문은 2023년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임 (No. 2022R1A6A3A01087626), 한국의료대마운동본부 상임고문 김성복 목사님의 노고에 의해 결실을 맺게 되었으므로 감사의 말씀을 드립니다.

참고문헌

1. Brand, E. J. & Zhao, Z., (2017), Cannabis in Chinese medicine: are some traditional indications referenced in ancient literature related to cannabinoids? *Frontiers in pharmacology* 8, 238535.
2. Rupasinghe, H. V., Davis, A., Kumar, S. K., Murray, B. & Zheljzkov, V. D., (2020), Industrial hemp (*Cannabis sativa* subsp. *sativa*) as an emerging source for value-added functional food ingredients and nutraceuticals. *Molecules* 25 (18), 4078. <https://doi.org/10.3390/molecules25184078>
3. Pertwee, R., (2008), The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabivarin. *British journal of pharmacology* 153 (2), 199-215. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707617>
4. Jang, E., Kim, H., Jang, S., Lee, J., Baek, S., In, S., Kim, E., Kim, Y.-u. & Han, E., (2020), Concentrations of THC, CBD, and CBN in commercial hemp seeds and hempseed oil sold in Korea. *Forensic science international* 306, 110064. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.110064>
5. Aizpurua-Olaizola, O., Soydaner, U., Oztürk, E., Schibano, D., Simsir, Y., Navarro, P., Etxebarria, N. & Usobiaga, A., (2016), Evolution of the cannabinoid and terpene content during the growth of *Cannabis sativa* plants from different chemotypes. *Journal of natural products* 79 (2), 324-331. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00949>
6. Machado Bergamaschi, M., Helena Costa

- Queiroz, R., Waldo Zuardi, A. & Crippa, A. S., (2011), Safety and side effects of cannabidiol, a Cannabis sativa constituent. *Current drug safety* 6 (4), 237-249. <https://doi.org/10.2174/157488611798280924>
7. Han, K., Lee, M.-J. & Kim, H., (2016), Understanding of medical cannabis and its regulations: a suggestion for medical and scientific needs. *Journal of Korean Medicine for Obesity Research* 16 (2), 124-132. <https://doi.org/10.15429/jkomor.2016.16.2.124>
8. Murakami, M. & Hirano, T., (2012), The molecular mechanisms of chronic inflammation development. *Frontiers in immunology* 3, 37825. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00323>
9. Chelombitko, M., (2018), Role of reactive oxygen species in inflammation: a minireview. *Moscow University Biological Sciences Bulletin* 73, 199-202. <https://doi.org/10.3103/S009639251804003X>
10. Chatterjee, S., Oxidative stress, inflammation, and disease. In *Oxidative stress and biomaterials*, Elsevier: 2016; pp 35-58.
11. Anavi, S. & Tirosh, O., (2020), iNOS as a metabolic enzyme under stress conditions. *Free Radical Biology and Medicine* 146, 16-35. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.10.411>
12. Gabriels, K., Hoving, S., Gijbels, M. J., Pol, J. F., te Poele, J. A., Biessen, E. A., Daemen, M. J., Stewart, F. A. & Heeneman, S., (2014), Irradiation of existing atherosclerotic lesions increased inflammation by favoring pro-inflammatory macrophages. *Radiotherapy and Oncology* 110 (3), 455-460. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2014.01.006>
13. 이현정, 유찬미, 이다경, 김종덕 & 마승진, (2019), 구증구포 제다공정에 따른 차의 성분 변화와 관능적 특성. *한국차학회지* 25 (1), 39-48.
14. Nam, K.-Y., Lee, N.-R., Moon, B.-D., Song, G.-Y., Shin, H.-S. & Choi, J.-E., (2012), Changes of ginsenosides and color from black ginsengs prepared by steaming-drying cycles. *Korean Journal of Medicinal Crop Science* 20 (1), 27-35. <https://doi.org/10.7783/KJMCS.2012.20.1.027>
15. 김도완, 이연진, 민진우, 김유진, 노영덕 & 양덕춘, (2009), 인삼의 구증구포에 의한 산성다당체, 페놀성화합물의 변환 및 항산화능. *동의생리병리학회지* 23 (1), 121-126.
16. 김진우, 하미애 & 신용욱, (2016), 흑도라지의 천식 동물모델에 대한 면역조절효과. *J. Korean Soc. People Plants Environ. Vol* 19 (4), 335-344.
17. 김다희, 오다래, 백승연 & 김미리, (2019), 숙성 흑 맥문동의 품질특성 및 항산화능. *한국식품저장유통학회지* 26 (5), 505-512.
18. Lee, J. R., Kim, Y. W., Byun, S. H., Kim, S. C. & Park, S. J., (2015), Anti-inflammatory effects of the fermentation extracts consisting of soybean, red ginseng and Citrus Unshiu Peel. *The Korea journal of herbology* 30 (5), 59-65. <https://doi.org/10.6116/kjh.2015.30.5.59>
19. Hur, S. J., Lee, S. Y., Kim, Y.-C., Choi, I. & Kim, G.-B., (2014), Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food chemistry* 160, 346-356. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.112>
20. Gupta, S. & Abu-Ghannam, N., (2012), Probiotic fermentation of plant based products: possibilities and opportunities. *Critical reviews in food science and nutrition* 52 (2), 183-199. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.499779>

21. Ryz, N. R., Remillard, D. J. & Russo, E. B., (2017), Cannabis roots: a traditional therapy with future potential for treating inflammation and pain. *Cannabis and cannabinoid research* 2 (1), 210-216. <https://doi.org/10.1089/can.2017.0028>
22. Jin, H.-L., Yu, G.-R., Kim, H., Cho, K.-H., Kim, K.-H. & Lim, D.-W., (2023), A Comparative Study on the Efficacy and Mechanism of Improving Glucose Uptake of Cannabis Root and Stem Extracts. *Journal of Korean Medicine for Obesity Research* 23 (2), 51-59. <https://doi.org/10.15429/jkomor.2023.23.2.51>
23. Elhendawy, M. A., Wanas, A. S., Radwan, M. M., Azzaz, N. A., Toson, E. S. & ElSohly, M. A., (2019), Chemical and biological studies of Cannabis sativa roots. *Medical cannabis and cannabinoids* 1 (2), 104-111. <https://doi.org/10.1159/000495582>
24. Almeida Neto, J., Amando Nery, D., Simoni Bezerra Lima, K., Eduarda Gomes da Cruz Silva, M., Cícero de Lima Araújo, T., Andrezza Carvalho de Souza, N., Hideki Vicente Nishimura, R., de Souza Araújo, C., Paula de Oliveira, A. & Roberto Guedes da Silva Almeida, J., (2023), Phytochemical characterization of Cannabis sativa L. roots from Northeastern Brazil. *Chemistry & Biodiversity* 20 (3), e202201039. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202201039>
25. Bondet, V., Brand-Williams, W. & Berset, C., (1997), Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH. free radical method. *LWT-Food Science and Technology* 30 (6), 609-615.
26. Jung, M.-H., Yoo, J.-M., Kang, Y.-J., Lee, H. W., Kim, S. H., Sung, S. H., Lee, Y.-J., Choi, I. & Kim, T.-J., (2010), Idesolide, an isolate of Idesia polycarpa, inhibits apoptosis through induction of intracellular heat shock protein 70 in C2C12 muscle cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 33 (6), 1063-1066.
27. Jin, D., Dai, K., Xie, Z. & Chen, J., (2020), Secondary metabolites profiled in cannabis inflorescences, leaves, stem barks, and roots for medicinal purposes. *Scientific Reports* 10 (1), 3309. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60172-6>
28. Kornpointner, C., Martinez, A. S., Marinovic, S., Haselmair-Gosch, C., Jamnik, P., Schröder, K., Löffke, C. & Halbwirth, H., (2021), Chemical composition and antioxidant potential of Cannabis sativa L. roots. *Industrial Crops and Products* 165, 113422. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113422>
29. Mariod, A. A. & Fatima, A. M., (2022), Properties and advantages of food fermentation. *African Fermented Food Products-New Trends*, 31-36. https://doi.org/10.1007/978-3-030-82902-5_3
30. Lim, D.-W. & Wang, J.-H., (2022), Gut microbiome: the interplay of an “invisible organ” with herbal medicine and its derived compounds in chronic metabolic disorders. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19 (20), 13076. <https://doi.org/10.3390/ijerph192013076>
31. Nguyen, T. T. & Nguyen, H. V., (2020), Effects of fermentation conditions using Lactobacillus plantarum on the charantin, stigmasterol glucoside and β -sitosterol glucoside contents of bitter melon (Momordica charantia L.) Juice. *Plant Foods for Human Nutrition* 75, 656-658.

32. Cai, Y., Luo, Q., Sun, M. & Corke, H., (2004), Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life sciences* 74 (17), 2157-2184. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.09.047>
33. Gönel, A., Akdağ, A. & Yılmaz, M. A., (2018), Identification of phenolic compounds, antioxidant activity and anti-cancer effects of the extract obtained from the shoots of *Ornithogalum narbonense* L. *Cellular and Molecular Biology* 64 (1), 75-83. <https://doi.org/10.14715/cmb/2018.64.1.14>
34. Si, W., Li, X., Jing, B., Chang, S., Zheng, Y., Chen, Z., Zhao, G. & Zhang, D., (2024), Stigmasterol regulates microglial M1/M2 polarization via the TLR4/NF- κ B pathway to alleviate neuropathic pain. *Phytotherapy Research* 38 (1), 265-279. <https://doi.org/10.1002/ptr.8039>
35. Ward, M. G., Li, G., Barbosa-Lorenzi, V. C. & Hao, M., (2017), Stigmasterol prevents glucolipototoxicity induced defects in glucose-stimulated insulin secretion. *Scientific reports* 7 (1), 9536. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10209-0>
36. Feng, S., Dai, Z., Liu, A. B., Huang, J., Narsipur, N., Guo, G., Kong, B., Reuhl, K., Lu, W. & Luo, Z., (2018), Intake of stigmasterol and β -sitosterol alters lipid metabolism and alleviates NAFLD in mice fed a high-fat western-style diet. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1863 (10), 1274-1284. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.08.004>

ORCID

- 유가람 <https://orcid.org/0000-0003-1559-4326>
진혜린 <https://orcid.org/0009-0002-4446-0482>
김다훈 <https://orcid.org/0009-0008-6606-402X>
노중균 <https://orcid.org/0009-0007-0785-3427>
김혁 <https://orcid.org/0000-0002-7017-1521>
임동우 <https://orcid.org/0000-0002-3179-9439>