

팽생이모자반 추출물의 기능성 원료 표준화를 위한 Fucose 분석법 개발 및 검증

박슬기¹ · 양형기¹ · 김영경² · 장내인² · 엄애선³

¹이제아바이오 기업부설연구소

²(사)한국건강기능식품협회

³한양대학교 생활과학대학 식품영양학과

Development and Validation of an Analytical Method for Quantification of Fucose in *Sargassum horneri* Extracts for Standardization of Functional Ingredients

Seulgi Park¹, Hyunki Yang¹, Young Kyoung Kim², Nae In Chang², and Ae-Son Om³

¹izeabio Corporate Research Institute

²Korea Functional Food Institute

³Department of Food and Nutrition, College of Human Ecology, Hanyang University

ABSTRACT This study developed and validated a high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis method for the quantification of fucose in *Sargassum horneri* extracts. HPLC was performed using a YMC-Pack ODS-AQ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with a flow rate of 1.0 mL/min at 40°C, and detection was conducted at a wavelength of 250 nm. The validation of the method was assessed by evaluating specificity, accuracy, precision, limit of detection, limit of quantitation, and linearity. With respect to specificity, the retention time of the fucose standard solution matched that of the fucose in the *Sargassum horneri* extract. The linearity exhibited a correlation coefficient (R^2) above 0.998. The accuracy assessment revealed a recovery rate ranging from 94.0±2.5% to 95.6±0.4% for different concentrations. The overall relative standard deviation (%RSD) for precision was 0.94%, indicating good repeatability, and the mean value over three days of analysis was 9.69±0.05 mg/g with a %RSD of 0.47%, demonstrating reproducibility. The limits of detection and quantitation were determined as 2.04 μg/mL and 6.19 μg/mL, respectively. Based on these results, the developed HPLC analysis method for fucose in *Sargassum horneri* extract could be considered reliable and reproducible.

Key words: *Sargassum horneri*, fucose, HPLC, validation, fucose analysis method

서 론

팽생이모자반(*Sargassum horneri*)은 갈조식물문(phaeophyta)의 모자반과(*sargassaceae*)에 속하는 갈조류로 주로 우리나라 남해안 연안 및 일본, 중국 연안에 폭넓게 분포하고 있다. 바닷가 암반에서 자라다가 1~2월 중 떨어져 나가 바다 위를 떠다니며 자란 뒤 수온이 높아지는 7월 사라지는 특성을 보인다(Choi 등, 2020). 중국은 지난 2011년부터 저장성 저우산군도 인근 해역에 바다숲을 조성하고 치어 서식에 유리한 팽생이모자반을 대량 양식하고 있다. 저장성 연안에서 자라던 모자반이 쿠로시오 난류를 만나 북상하다가 지류인 대만난류에 실려 그 일부가 제주도 주변 바다에 대량 유입되고 있다.

2016년 국립수산물과학원은 팽생이모자반의 식품학적 성분분석자료, 전통 식용 사례나 식품으로서의 가치를 증명할 수 있는 국내의 자료를 분석해 모자반류의 식품원료 등록을 신청하여 식품의약품안전처 고시 제2023-56호 [별표1] 식품에 사용할 수 있는 원료로 등록하였다. 최근 연구를 통해 팽생이모자반의 면역, 항산화, 체지방 감소, 피부질환 개선 등 다양한 생리활성이 확인(Kang 등, 2020; Kim 등, 2018; Kim 등, 2020; Kwon 등, 2019)되어 기능성 원료로 가능성이 확인되었다. 팽생이모자반에는 기능성 다당류의 일종인 후코이단(fucoidan), 알긴산(alginic acid), 라미나란(laminaran) 등이 활성 성분으로 함유되어 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 보고되었다(Ermakova 등, 2011; Sanjeeva 등, 2017; So 등, 2007). 후코이단은 주로 갈조류에 함유된

Received 5 June 2023; Revised 5 October 2023; Accepted 9 November 2023

Corresponding author: Aeson Om, Department of Food and Nutrition, College of Human Ecology, Hanyang University, 222, Wangsimni-ro, Seongdong-gu, Seoul 04763, Korea, E-mail: aesonom@hanyang.ac.kr

© 2023 The Korean Society of Food Science and Nutrition.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

세포벽의 구성 성분으로 L-fucose를 기본 구성당으로 $\alpha(1 \rightarrow 2)$ 또는 $\alpha(1 \rightarrow 3)$ 배당결합을 갖고 있다(Mian과 Percival, 1973).

후코이단은 fucose 57%, sulfate 38%, galactose 4%, xylose 1.5%, uronic acid 등으로 구성되어 있다(Berteau와 Mulloy, 2003; Kim 등, 2011). 해조류 유래 후코이단은 항염, 항산화, 혈행 개선, 심혈관 질환 개선, 체지방 감소 등과 같은 다양한 생리활성이 있는 것으로 보고되고(Kim과 Lee, 2012; Palanisamy 등, 2017; Ryu와 Chung, 2016; Sanjeewa 등, 2019; Xu 등, 2018) 있다.

그러나 후코이단의 시험법 개발 및 검증에 관한 연구는 미비하여 팽생이모자반에 함유된 후코이단의 함량을 표준화하기 어려운 실정이다. 지표성분은 원료 내 화학적으로 규명된 성분 중에서 품질관리의 목적으로 정한 성분으로 원료 표준화를 위해서는 지표물질의 선정 및 시험법 개발이 요구된다. 현재 팽생이모자반의 기능성 성분 중 후코이단의 분석법이 보고되었으나(Dische와 Shettles, 1948; Gibbons, 1955; Zhao 등, 2016), 대부분 정확성이나 정밀성, 회수율 등의 유효성 검증이 되지 않아 실제 제품에 적용하기 어려운 실정이다(Hong 등, 2019). 이를 확인한 선행연구(Hong 등, 2019)에서 팽생이모자반 유래 후코이단 분석을 위해 3-methyl-1-phenyl-5-pyrazolone을 유도체화한 후 UPLC-DAD/TOF-MS를 이용하였다. 본 연구에서는 분석의 용이성을 위해 범용장비인 HPLC를 이용하여 분석법을 개발 및 검증하였다.

본 연구에서는 팽생이모자반을 활용하여 기능성 소재 및 제품을 개발하기 위해 지표성분을 후코이단 구성 단당류 중 57%로 가장 많은 함량을 차지하고 있는 fucose를 지표물질로 선정하고 원료 표준화를 위한 분석법 확립 및 유효성을 검증(validation)하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 실험에 사용한 팽생이모자반은 2022년 5월 제주도 하도리와 이호리 해상에서 채취하였다. 채취한 팽생이모자반은 3회 세척하여 염분을 제거한 후 열풍건조기(Khd-100, Korea Bio Solutions., Ltd.)에서 65°C, 48시간 건조 후 분쇄하였다. 분쇄한 팽생이모자반에 30배의 정제수를 가하여 90°C에서 6시간 동안 열수 추출하였다(Cosmos 700, Kyungseo E&P Co.). 추출물은 -65°C의 온도에서 농축기(Rotavator R-300, Bunch Co.)를 이용하여 추출물 용량이 10 L가 될 때까지 농축하였다. 농축 후 동결건조기(Lp300, Ilsinbiobase Co.)에서 -80°C, 4일간 동결건조한 팽생이모자반을 분말화하여 사용하였다. 분석에 사용한 fucose의 표준물질(Fig. 1)은 L-(-)-Fucose(Sigma-Aldrich Co.)를 구입하여 사용하였다.

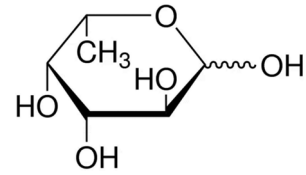


Fig. 1. Chemical structure of fucose.

표준용액의 재료

표준품인 fucose 약 2.5 mg을 정밀하게 달아 25 mL의 정용플라스크에 취한 후 정제수를 가해 초음파 추출기에서(Powersonic 620, Hwashin Instrument) 10분간 완전히 녹여 사용하였다. 상기 용액을 방랭 후 정용하여 표준원액으로 하였고 표준원액은 정제수로 적절히 희석하여 검량선 작성을 위한 표준용액으로 조제하였다.

시험용액 조제

팽생이모자반 추출물 25 mg을 15 mL conical tube (Falcon)에 취한 후 4 M trifluoroacetic acid(Sigma-Aldrich Co.) 4 mL를 넣고 90°C heating block(Wisblook-Bath™ SHB-96D, SciLab Korea Co.)에서 2시간 반응시킨 후 상온에서 방랭하였다. 위 용액을 중성화하기 위해 4 M NaOH 4 mL를 넣고 방랭 후 정제수를 이용하여 10 mL로 정용하였다. 시험용액과 표준품의 유도체화를 위하여 표준용액과 시험용액을 각각 test tube에 1 mL씩 넣고 0.3 M NaOH 1 mL와 메탄올에 용해한 0.5 M 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazoline-5-one(Sigma-Aldrich Co.) 시약 1 mL를 혼합하였다. 용액을 70°C heating block에서 30분간 반응시켜 상온에서 방랭 후 0.3 M HCl을 1 mL 첨가하여 중화하였다. 이후 chloroform 2 mL를 넣어 물 층과 분리 추출한 후 물 층을 분리하여 chloroform 2 mL를 넣어 한 번 더 분리 추출하였다. 층 분리를 충분히 한 후 물 층을 얻어 0.45 μ m nylon filter(Whatman)로 여과 후 기기분석에 사용하였다.

분석 조건

팽생이모자반의 지표성분인 fucose의 분석을 위해 diode array detector(DAD)가 장착된 HPLC(1260 Infinity II, Agilent Technologies)를 사용하였고, 분석 칼럼은 YMC ODS-AQ(250×4.6 mm, 5 μ m)(YMC Co.)를 이용하였다. 팽생이모자반 분석을 위한 이동상 조건은 Table 1에서와 같은 조건으로 분석하였다. 시료 주입량은 10 μ L이고, 1.0 mL/min의 유속으로 UV 250 nm 파장에서 측정하였다.

분석물질의 fucose의 함량 계산

Fucose 표준용액의 피크 면적으로 검량선을 작성하고 검량선 식을 이용하여 시험용액 중의 fucose의 농도를 구한 후 아래 식을 이용하여 함량을 계산하였다.

Table 1. HPLC conditions for analysis of fucose

Instrument	Agilent 1260 Infinity II		
Detector	DAD		
Wavelength	250 nm		
Oven temperature	40°C		
Injection volume	10 µL		
Column	YMC-Pack ODS-AQ (250 mm×4.6 mm, 5 µm)		
Mobile phase	A: 0.05 M potassium dihydrogen phosphate (pH 6.9) : acetonitrile = 85:15 (v/v)		
	B: 0.05 M potassium dihydrogen phosphate (pH 6.9) : acetonitrile = 60:40 (v/v)		
	Time (min)	A (%)	B (%)
	0	90	10
	9	86	14
	30	36	64
Flow rate	1.0 mL/min		

$$\text{Fucose의 함량}(\mu\text{g}/\text{mg}) = \frac{A \times B \times C \times D}{E}$$

A: 시험용액 중의 fucose의 농도(µg/mL)

B: 시험용액의 전량(mL)

C: 표준품 순도

D: 회석배수

E: 시료 채취량(mg)

정량분석법 검증

팽생이모자반의 fucose 분석법 개발은 AOAC(2016)와 건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정 (식품의약품안전처 고시 제2021-66호; MFDS, 2021)에 따라 특이성(specificity), 정확도(accuracy), 정밀도(precision), 정량한계(limit of quantification), 직선성(linearity)의 parameter를 결정하였으며, Shabir 문헌(2004)을 참고하여 검증하였다.

특이성은 공시험 용액을 분석하여 표준용액, 시험용액의 분석에 간섭현상이 있는지를 확인하고 표준용액, 시험용액의 머무름시간, 스펙트럼이 일치하는지 여부를 확인하였다. 정확도 측정을 위해 3개 이상 농도 범위의 표준용액을 제조하고, 이에 대해 Table 2와 같이 시험용액 중 검출농도가 5.948, 11.895, 23.790 µg/mL가 되도록 spiking을 하였다. 표준물질 spiking은 시료 약 25 mg을 취한 후, 시료 중에 함유된 지표(기능)성분의 함량이 약 50%, 100%, 200%의

농도가 되도록 표준용액(237.9 µg/mL)을 0.25 mL, 0.5 mL, 1 mL씩 첨가하여 회수율을 측정하였다. 정밀도는 반복성과 재현성을 확인하였다. 정밀도는 시료량의 약 50%, 100%, 200%에 해당하는 양인 12.5 mg, 25 mg, 50 mg을 정량하고 5회 이상 반복 측정하여 반복성을 측정하였다. 재현성 확인을 위해 시료량을 정량하고 시험자, 기기, 일자를 달리 하여 5회 이상 반복 측정하여 상대표준편차를 구하였다. 정량한계 분석을 위해 직선성을 통해 확인된 검량선의 기울기와 y-절편의 표준편차에 근거하는 방법으로 계산하였다. 직선성 확인을 위해 3.5313~120.5000 µg/mL 농도 범위 내에서 5개 농도의 표준용액을 제조하여 3회 분석한 후 각각의 검량선을 확인하였다. 모든 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)는 표준편차를 평균으로 나누어 백분율(%)로 계산하였다.

결과 및 고찰

특이성 확인

특이성은 불순물, 분해물, 배합성분 등이 많이 혼재된 물질에서 분석대상물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는 능력이다. Table 1과 같이 fucose 표준용액과 팽생이모자반 추출물을 분석한 후, 크로마토그램과 UV 스펙트럼을 비교하였다(Fig. 2). 그 결과 표준용액과 팽생이모자반의 UV 스펙트럼에서 동일한 스펙트럼을 나타냈으며 fucose

Table 2. Accuracy of analytical method for fucose in *Sargassum horneri* extract

Level	Concentration of standard solution (µg/mL)		Recovery (%)	%RSD ²⁾
	Added	Recovered	Mean±SD ¹⁾	
Low (50%)	5.948	5.672	95.4±3.8	4.00
Medium (100%)	11.895	11.180	94.0±2.5	2.69
High (200%)	23.790	22.738	95.6±0.4	0.37

¹⁾Each value was the mean±SD (n=3).

²⁾Relative standard deviation.

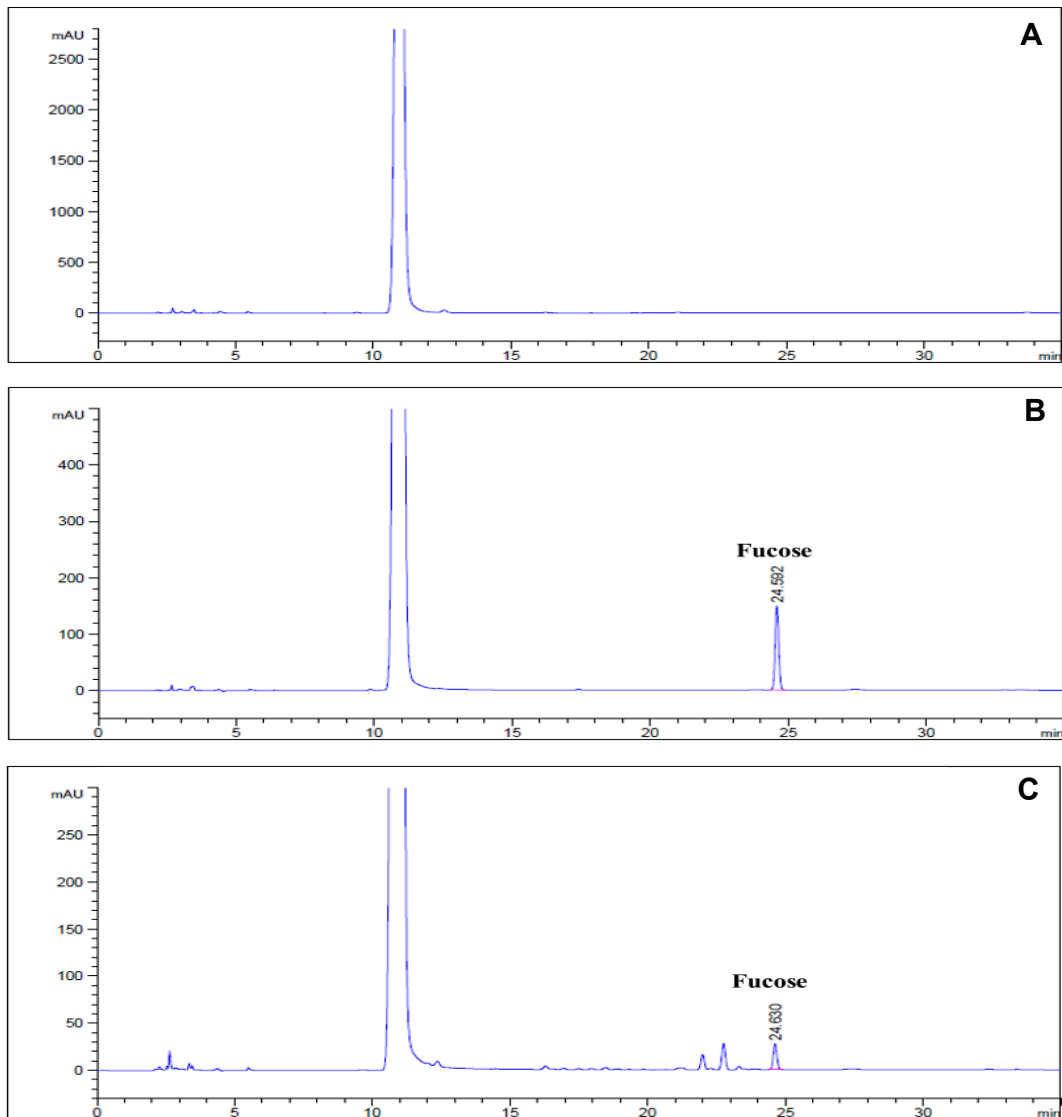


Fig. 2. HPLC chromatogram of (A) blank, (B) standard solution, and (C) *Sargassum horneri* extract.

표준용액과 팽새이모자반 추출물의 피크 유지시간(retention time, RT)은 각각 24.59분과 24.63분으로 일치하였다. 공시험용액을 분석하여 표준용액, 시험용액의 분석에 간섭 현상이 없음을 확인하였고 표준용액, 시험용액의 머무름 시간, 스펙트럼 등이 일치함을 확인하였다(Fig. 2). 또한 표준용액과 팽새이모자반 추출물의 HPLC 분석 결과, λ_{\max} 가 250 nm로 동일한 스펙트럼을 나타내는 것을 확인하였다(Fig. 3). 특이성 분석을 통해 본 분석법은 특이성이 있음을 확인하였다.

직선성 확인

직선성을 확인하기 위해 fucose(3.5313~120.5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 농도 범위 내에서 5개 농도의 표준용액을 제조하여 3회 분석한 후 각각의 검량선을 작성하였다. 그 결과 검량선의 결정계수(R^2)는 3회 분석 모두 0.998 이상 확인되어 높은

직선성을 나타냈다(Fig. 4). 직선성은 적절한 정밀도, 정확도를 충분히 제시할 수 있는 일정 범위에 있는 검체 중 분석 대상물질의 양(또는 농도)에 대하여 직선적인 측정값을 얻을 수 있는 능력으로 검량선의 결정계수 확인을 통해 직선성이 있음을 확인하였다.

정확도 확인

첨가된 표준용액 fucose 이론농도는 저농도에서 5.948 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 중농도 11.895 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 고농도 23.790 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이며 첨가된 표준물질 검출농도는 농도별 3회 반복실험 결과 평균 5.672 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 11.180 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 22.738 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타났다. 평균 회수율은 저농도에서 95.4%, 중농도 94.0%, 고농도 95.6%로 각각 나타났다. AOAC 기준($\geq 1\%$ (1 g/100 g)일 때, 92~105%)에 충족하였다. 정확도는 측정값이 이미 알고 있는 참값이나 표준값에 근접한 정도를 뜻하며 본 분석법에

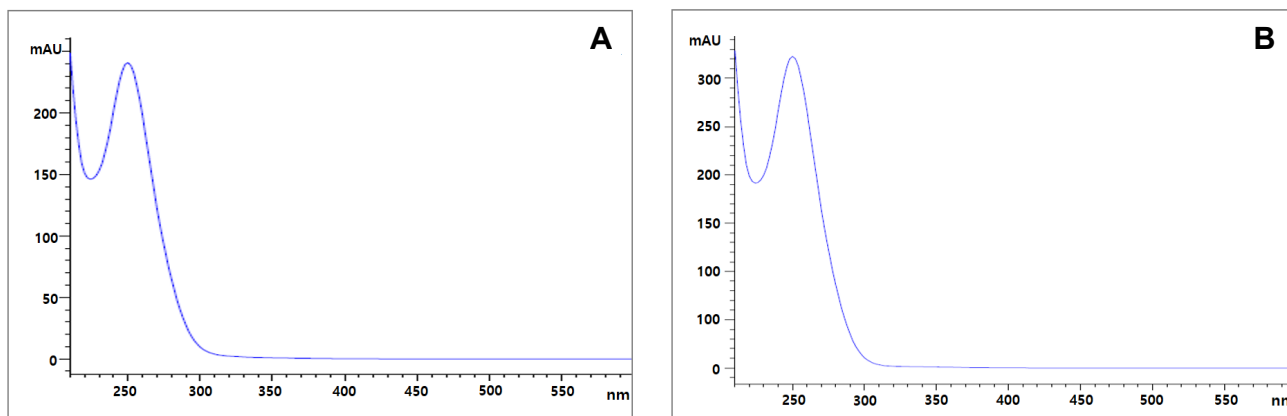


Fig. 3. Photo spectrum of (A) fucose standard solution and (B) fucose in *Sargassum horneri* extract.

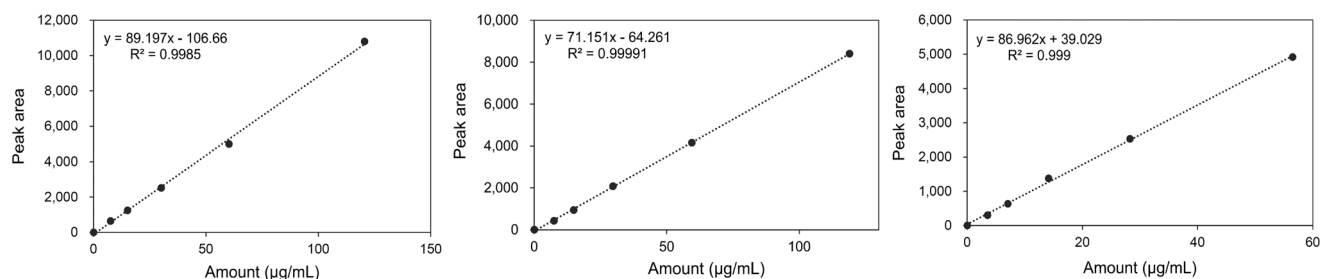


Fig. 4. Calibration curve of fucose standard solution.

서 높은 회수율을 나타내 정확도를 확인하였다(Table 2).

정밀도 확인

반복성: 제시된 시험방법에서 시료량의 50%, 100%, 200%에 해당하는 양인 12.5 mg, 25 mg, 50 mg을 정량하여 5회 이상 반복 측정하여 반복성을 측정하였다. 12.5 mg, 25 mg, 50 mg에서 각각 9.49±0.47 mg/g, 9.64±0.31 mg/g, 9.47±0.45 mg/g으로 측정되었으며 전체평균은 9.53±0.09 mg/g으로 나타났다. 정밀도는 균일한 검체로부터 여러 번 채취하여 얻은 시료를 정해진 조건에 따라 측정하였을 때 각각의 측정값들 사이의 근접성(분산 정도)을 나타낸다. 전체 %RSD는 0.94%로 나타나 AOAC 기준(1%(1 g/100 g)일 때, RSD 2%)으로 반복성이 있음을 확인하였다(Table 3).

재현성: 시료량을 정량하여 시험자, 기기, 일자를 달리하여 5회 이상 반복 측정하여 상대표준편차를 구하였다. 3일간 반복하여 분석한 결과 전체 평균값은 9.69±0.05 mg/g,

상대표준편차(%RSD)는 0.47%로 나타났다. 이는 AOAC 재현성(1%(1 g/100 g)일 때, RSD 4%) 범위 이내에 있음을 확인하였다(Table 4).

검출한계 및 정량한계 확인

검출한계는 균질화된 검체 중 존재하는 분석대상물질의 최소한의 검출 가능한 양을 뜻하며 정량한계는 적절한 정밀성과 정확성을 가진 검체 중 정량값으로 표현할 수 있는 분석대상물질의 최소량을 나타낸다. 검출한계와 정량한계는 각각 2.04 µg/mL와 6.19 µg/mL로 나타났다(Table 5).

검출한계 및 정량한계 확인 팽생이모자반 추출물의 fucose 함량

팽생이모자반의 건강기능식품 기능성 원료 인정을 위해 후소하단 구성 단당류인 fucose를 범용적 장비인 HPLC를 사용하여 분석하였고 UV detector를 이용하여 기존 당류

Table 3. Content of fucose according to sample weight in *Sargassum horneri* extract

Sample weight (mg)	Content of fucose in <i>Sargassum horneri</i> extract			
	Mean±SD ¹⁾ (mg/g)	%RSD ²⁾	Mean±SD (mg/g)	%RSD
12.5 (50%)	9.49±0.47	4.95	9.53±0.09	0.94
25 (100%)	9.64±0.31	3.20		
50 (200%)	9.47±0.45	4.80		

¹⁾Each value was the mean±SD (n=5).

²⁾Relative standard deviation.

Table 4. Content of fucose according to interday precision in *Sargassum horneri* extract

Interday precision ¹⁾	Content of fucose in <i>Sargassum horneri</i> extract			
	Mean±SD ²⁾ (mg/g)	%RSD ³⁾	Mean±SD (mg/g)	%RSD
A (1 day)	9.73±0.28	2.86	9.69±0.05	0.47
B (2 day)	9.64±0.31	3.20		
C (3 day)	9.70±0.14	1.47		

¹⁾Interday: three times analysis of fucose per day for 3 days.

²⁾Each value was the mean±SD (n=5).

³⁾Relative standard deviation.

Table 5. Regression equation for *Sargassum horneri* extract

Compound	Regression equation	Correlation coefficient	LOD ¹⁾ (µg/mL)	LOQ ²⁾ (µg/mL)
Fucose	y = 86.39x - 63.76	0.9993	2.04	6.19

¹⁾Limit of detection.

²⁾Limit of quantitation.

분석에 사용된 RI detector보다 낮은 농도로 검출이 가능함을 확인하였다. 또한 팽생이모자반 추출물의 fucose 분석 방법의 특이성, 직선성, 정확도, 정밀도가 적합함을 확인하였다. 해당 분석법으로 팽생이모자반 추출물의 fucose 함량을 측정된 결과 9.69±0.05 mg/g으로 확인됐다. 본 연구를 통해 팽생이모자반 유래 fucose의 표준화 및 건강기능식품 개별인정을 위한 기초자료로 활용 가능할 것으로 판단된다.

요 약

본 연구는 팽생이모자반의 기능성 원료로 개발하고자 원료 표준화를 위해 지표물질을 선정하여 분석법 개발 및 검증을 실시하였다. 팽생이모자반 추출물의 지표성분을 fucose로 설정하고 이에 대한 HPLC 분석법을 확립하여 유효성 검증을 실시하였다. 분석법 유효성 검증은 특이성, 직선성, 정확도, 정밀도(반복성 및 재현성)를 확인하였다. 그 결과 표준용액과 팽생이모자반 추출물 간의 HPLC 크로마토그램의 UV spectrum의 일치 여부를 확인하였고 다른 물질과 간섭 없이 피크가 분리된 것을 확인하였다. 또한 표준용액 검량선의 결정계수(R²)는 3회 분석 모두 0.998 이상으로 확인되어 적합하였다. 정확도는 시료 약 25 mg을 취한 후, 시료 중에 함유된 지표(기능)성분의 함량이 50%, 100%, 200%의 농도가 되도록 표준용액(237.9 µg/mL)을 0.25 mL, 0.5 mL, 1 mL씩 첨가하여 회수율을 확인한 결과 94.0~95.6%로 나타나 정확도가 있는 것으로 확인되었다. 정밀도 확인에서도 시료량의 50%, 100%, 200%에 해당하는 양을 정량하여 5회 이상 반복 측정된 결과 상대표준편차(%RSD)는 0.94%로 나타났고, 시료량을 정량하여 시험자, 기기, 일자를 달리하여 5회 이상 반복 측정하여 상대표준편차를 구한 결과 상대표준편차(%RSD)는 0.47%로 나타나 재현성이 확인되었다. 이와 같은 분석 결과를 통해 확립된 팽생이모자반의 지표물질인 fucose의 HPLC 분석법은 적합한 시험법인 것으로 검증되었으며 본 시험법은 향후 팽생이모자반의 기능성 원료

개발과 표준화를 위한 자료 및 품질관리를 위한 자료로 활용될 수 있을 것으로 보인다.

감사의 글

본 연구는 중소벤처기업부 지역특화산업육성+(R&D) 사업(S3273153)의 지원을 받아 이루어진 것이며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- AOAC. Appendix K: Guidelines for dietary supplements and botanicals. In: Official Methods of Analysis AOAC International. 20th ed. AOAC International. 2023. p 12-29.
- Berteau O, Mulloy B. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiology*. 2003. 13:29R-40R.
- Choi SK, Oh HJ, Yun SH, et al. Population dynamics of the 'golden tides' seaweed, *Sargassum horneri*, on the Southwestern coast of Korea: The extent and formation of golden tides. *Sustainability*. 2020. 12:2903. <https://doi.org/10.3390/su12072903>
- Dische Z, Shettles LB. A specific color reaction of methylpentoses and a spectrophotometric micromethod for their determination. *J Biol Chem*. 1948. 175:595-603.
- Ermakova S, Sokolova R, Kim SM, et al. Fucoidans from brown seaweeds *Sargassum horneri*, *Eclonia cava*, *Costaria costata*: Structural characteristics and anticancer activity. *Appl Biochem Biotechnol*. 2011. 164:841-850.
- Gibbons MN. The determination of methylpentoses. *Analyst*. 1955. 80:268-276.
- Hong JH, Lee MJ, Moon SJ, et al. Analysis of monosaccharide composition of fucoidan from *Sargassum horneri* using UPLC-DAD-TOF/MS combined with precolumn derivatization by 3-methyl-1-phenyl-5-pyrazolone. *Korean J Food Preserv*. 2019. 26:219-227.
- Kang SM, Lee C, Jeong DH, et al. Evaluation of biological activities of *Sargassum horneri* fermented by microorganisms. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2020. 49:1194-1201.
- Kim DS, Sung NY, Park SY, et al. Immunomodulating activity

- of *Sargassum horneri* extracts in RAW264.7 macrophages. *J Nutr Health*. 2018. 51:507-514.
- Kim JH, Kim YH, Kim SK, et al. Properties and industrial applications of seaweed polysaccharides-degrading enzymes from the marine microorganisms. *Korean J Microbiol Biotechnol*. 2011. 39:189-199.
- Kim KJ, Lee BY. Fucoidan from the sporophyll of *Undaria pinnatifida* suppresses adipocyte differentiation by inhibition of inflammation-related cytokines in 3T3-L1 cells. *Nutr Res*. 2012. 32:439-447.
- Kim MJ, Han EJ, Lee K, et al. Effect of *Sargassum horneri* chloroform fraction against skin barrier damage and skin moisture reduction in ultraviolet B-irradiated keratinocytes. *J Chitin Chitosan Sci*. 2020. 25:85-92.
- Kwon DH, Choi YH, Kim BW, et al. Effects of ethanol extract of *Sargassum horneri* on adipocyte differentiation and adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *J Life Sci*. 2019. 29:209-214.
- MFDS. Regulations concerning recognition of functional ingredients and standards and specifications for health functional foods. 2021 [cited 2021 Jul 29]. Ministry of Food and Drug Safety. Available from: https://www.mfds.go.kr/brd/m_211/view.do?seq=14614&srchFr=&srchTo=&srchWord=%EA%B1%B4%EA%B0%95%EA%B8%B0%EB%8A%A5%EC%8B%9D%ED%92%88+%EA%B8%B0%EB%8A%A5%EC%84%B1+%EC%9B%90%EB%A3%8C&srchTp=0&itm_seq_2=0&multi_itm_seq=0&company_cd=&company_nm=&Data_stts_gubun=C9999&page=1
- Mian AJ, Percival E. Carbohydrates of the brown seaweeds *himanthalia lorea* and *bifurcaria bifurcata*: Part II. structural studies of the "fucans". *Carbohydr Res*. 1973. 26:147-161.
- Palanisamy S, Vinosha M, Marudhupandi T, et al. Isolation of fucoidan from *Sargassum polycystum* brown algae: Structural characterization, *in vitro* antioxidant and anticancer activity. *Int J Biol Macromol*. 2017. 102:405-412.
- Ryu MJ, Chung HS. Fucoidan reduces oxidative stress by regulating the gene expression of HO-1 and SOD-1 through the Nrf2/ERK signaling pathway in HaCaT cells. *Mol Med Rep*. 2016. 14:3255-3260.
- Sanjeeva KKA, Jayawardena TU, Kim SY, et al. Fucoidan isolated from invasive *Sargassum horneri* inhibit LPS-induced inflammation via blocking NF-κB and MAPK pathways. *Algal Res*. 2019. 41:101561. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101561>
- Sanjeeva KKA, Lee JS, Kim WS, et al. The potential of brown-algae polysaccharides for the development of anticancer agents: An update on anticancer effects reported for fucoidan and laminaran. *Carbohydr Polym*. 2017. 177:451-459.
- Shabir GA. Step-by-step analytical methods validation and protocol in the quality system compliance industry. *Journal of Validation Technology*. 2004. 10:314-324
- So MJ, Kim BK, Choi MJ, et al. Protective activity of fucoidan and alginic acid against free radical-induced oxidative stress under *in vitro* and cellular system. *Prev Nutr Food Sci*. 2007. 12:191-196.
- Xu Y, Xu J, Ge K, et al. Anti-inflammatory effect of low molecular weight fucoidan from *Saccharina japonica* on atherosclerosis in apoE-knockout mice. *Int J Biol Macromol*. 2018. 118:365-374.
- Zhao X, Guo F, Hu J, et al. Antithrombotic activity of oral administered low molecular weight fucoidan from *Laminaria japonica*. *Thromb Res*. 2016. 144:46-52.