pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 37, No. 3, pp. 143~148 (2022)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2022.37.3.143

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

곰피추출물의 지표성분 Dieckol의 분석법 개선 및 검증

한웅호[1] · 최선일[1] · 문효[1] · 이세정[1] · 오건[1] · 진희구[2] · 오현지[2] · 김은진[3] · 김종욱[3] · 이부용[2] · 이옥환[1]*

[1]강원대학교 식품환경융합학과
[2]차의과학대학교 식품생명공학과
[3]㈜네추럴웨이

Modification and Validation of an Analytical Method for Dieckol in *Ecklonia Stolonifera* Extract

Xionggao Han[1], Sun-Il Choi[1], Xiao Men[1], Se-jeong Lee[1], Geon Oh[1], Heegu Jin[2], Hyun-Ji Oh[2], Eunjin Kim[3], Jongwook Kim[3], Boo-Yong Lee[2], Ok-Hwan Lee[1]*

[1]*Department of Food Biotechnology and Environmental Science, Kangwon National University, Chuncheon, Korea*
[2]*Department of Food Science and Biotechnology, College of Life Science, CHA University, Seongnam, Korea*
[3]*Naturalway Co. Ltd, Pocheon, Gyeonggi, Korea*

(Received April 14, 2022/Revised June 10, 2022/Accepted June 10, 2022)

ABSTRACT - This study was to investigate an analytical method for determining dieckol content in *Ecklonia stolonifera* extract. According to the guidelines of International Conference on Harmonization. Method validation was performed by measuring the specificity, linearity, precision, accuracy, limit of detection (LOD), and limit of quantification (LOQ) of dieckol using high-performance liquid chromatography–photodiode array. The results showed that the correlation coefficient of calibration curve (R^2) for dieckol was 0.9997. The LOD and LOQ for dieckol were 0.18 and 0.56 μg/mL, respectively. The intra- and inter-day precision values of dieckol were approximately 1.58-4.39% and 1.37-4.64%, respectively. Moreover, intra- and inter-day accuracies of dieckol were approximately 96.91-102.33% and 98.41-105.71%, respectively. Thus, we successfully validated the analytical method for estimating dieckol content in *E. stolonifera* extract.

Key words: *Ecklonia stolonifera*, Dieckol, HPLC-PDA, Method validation

곰피(*Ecklonia stolonifera*)는 다년생 갈조류로, 갈조식물문 갈조강 다시마목 다시마과에 속하며, 우리나라 동해안과 남해안을 따라 분포하며, 2-10 m 수심의 해안에서 주로 서식하고 있다. 우리나라에서는 다시마, 미역 등과 함께 오래전부터 식용으로 이용해오고 있는 해조류이다[1].

최근 곰피는 항균, 항염증 활성, 간세포 및 간 독성 보호, 간 섬유화 억제, 혈중 콜레스테롤 개선, 고혈당 완화 및 혈중 지질 산화도 저하, 장내 포도당 흡수 억제, 항균 활성과 같은 다양한 생리활성에 대한 연구가 보고되었으며 우수한 기능성 원료로 주목받고 있다[2-7]. 특히, 곰피추출물은 체지방 축적을 억제함과 동시에 갈색지방화를 통한 에너지대사 활성의 증가로 효과적인 항비만 효능을 보이는 것으로 보고되었다[8]. 곰피의 주요 기능성 성분으로는 dieckol을 비롯한 phlorotannin류인 phloroglucinol, eckstolonol, eckol, phlorofucofuroeckol A 및 스테롤 유래의 대사물질인 fucosterol 등이 있다[9-11]. 이중에서도 곰피의 다양한 생리활성은 2차 대사산물인 phlorotannin과 dieckol 성분에 기인하는 것으로 알려져 있다[12].

해조류에 함유 되어 있는 phlorotannin 성분은 phenyl과 phenoxy기를 가지는 phloroglucinol을 기본단위로 하는 polyphenols로서 phlorotannin은 phloroglucinol (1,3,5-trihydroxybenzene)의 중합체 형태로서 갈조류에 널리 분포하는 주요 지표성분 중에 하나이다[13]. 곰피에 함유된

*Correspondence to: Dr. Ok-Hwan Lee, Professor, Dept. of Food Biotechnology and Environmental Science, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea
Tel: +82-33-250-6454; Fax: +82-33-259-5561
E-mail: loh99@kangwon.ac.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution,and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

phlorotannin류 중에서 dieckol은 항산화, 항염증 및 항암 활성 뿐만 아니라 마우스모델에서 에탄올에 의해 유발된 지방간에 대한 보호효과를 나타낸다고 보고된바 있다[14].

건강기능식품의 시장규모가 점차 성장하고 있고 새로운 기능성 원료에 대한 지속적인 연구가 요구되고 있는 시점에서 곰피와 같은 우수한 생리적 기능성을 가진 국내산 원료를 활용하여 건강기능식품 기능성 원료 개발을 위해서는 원료의 표준화를 위한 지표성분의 선정과 분석법의 유효성, 타당성 및 신뢰성 검증에 대한 연구가 필요하다[15-17]. 현재 dieckol의 분석법에 대한 일부 연구결과들이 보고되고는 있으나[18,19], 이들 논문에서는 감태 내 dieckol 분석법의 유효성 검증에 관한 연구이다. 또한 Goo 등[20]은 곰피 내 주요한 phlorotannin인 eckol, dieckol, phlorofucofuroeckol-A에 대한 동시분석법에 관한 연구가 보고 되였으나 분석법 시간이 긴 단점이 존재한다. 따라서 본 연구에서는 곰피추출물의 지표성분인 dieckol 분석법에 대한 정확성 및 정밀성, 회수율 등의 유효성 검증 및 검출한계와 정량한계에 대한 기초자료를 확보하고자 분석법 개선 및 ICH 가이드라인을 활용하여 분석법 검증을 실시하였다.

Materials and Methods

실험재료 및 시약

본 실험에 사용한 곰피추출물은 Naturalway Co., Ltd. (Pocheon, Korea)으로부터 제공 받아 사용하였다. 곰피 원물을 70% 에탄올로 9시간 추출하고 여과 후 40°C에서 진공도 -500-600 mmHg 조건으로 회전농축기(Tokyo Rikakikai Co., Ltd, Tokyo, Japan)를 사용하여 진공농축하였고 -47°C에서 48 시간 이상 동결건조하여 곰피추출물을 제조하였다. 표준물질 dieckol은 Avention Co., Ltd (Songdo, Korea)에서 구입하여 사용하였고 순도는 98%이다. 분석에 사용한 formic acid 등의 시약들은 Sigma (St. Louis, MO, USA.)에서 구입하였으며 acetonitrile, ethanol, methanol은 J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)에서 구입하여 사용하였다.

지표성분 dieckol 분석

Dieckol의 HPLC 분석을 위하여 Bang 등[14]의 분석방법을 변형하여 진행하였으며 분석에 사용한 기기는 Waters 996 Photodiode Array Detector (Waters, Milford, MA, USA)가 장착된 Waters 2695 Separation Module HPLC system (Waters, Milford, MA, USA)을 사용하였고 분석컬럼은 Capcell pak C_{18} (250×4.6 mm, 5 μm, Osaka soda, Osaka, Japan)을 사용하였다. 이동상은 0.1% formic acid (A)와 acetonitrile (B)을 0-15 min: A;74%, B;26%, 15-18 min: A;0%, B;100%, 18-20 min: A;74%, B;26%의 이동상 조건으로 분석시간은 20 min 하였고 검출 파장은 230 nm, 컬럼 온도 25°C, 이동상 유속은 1 mL/min, injection volume은 10 μL로 설정하였다(Table 1).

Table 1. HPLC analytical conditions for dieckol content of *Ecklonia stolonifera* extract

Instrument	Conditions		
Column	Capcell pak C_{18} UG120 (5.0 ìm, 4.6 mm×250 mm)		
Column temp.	25°C		
Mobile phase (Gradient)	Time (min)	A[a] (%)	B[b] (%)
	0	74	26
	15	74	26
	18	0	100
	20	74	26
Detector	Waters 996 Photodiode Array Detector (230 nm)		
Flow rate	1.0 mL/min		
Injection volume	10 μL		
Run time	20 min		

[a] 0.1% formic acid in water.
[b] Acetonitrile.

표준용액 및 시험용액의 조제

Dieckol 표준물질을 10 mg을 칭량 한 뒤, 10 mL 정용플라스크를 이용하여 methanol로 정용하여 1000 μg/mL 농도의 stock solution을 제조하였다. Working solution은 dieckol stock solution을 이용하여 각각 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μg/mL이 되도록 methanol로 희석하여 사용하였다. 시험용액은 곰피추출물 25 mg을 취한 뒤 25 mL 정용플라스크를 이용하여 70% methanol로 정용한 후 30 min 동안 sonicator로 처리한 후, 원심분리하여 상층액을 0.45 μm syringe filter (Whatman, Maidstone, UK)로 여과하여 시험용액으로 하였다.

지표성분 분석법 유효성 검증

ICH (International Conference for Harmonization) 가이드라인을 근거로 하여 개선된 분석법의 특이성(specificity), 직선성(linearity), 정밀성(precision), 정확성(accuracy), 검출한계(limit of detection, LOD) 및 정량한계(limit of quantification, LOQ)를 측정하여 유효성을 확인하였다[21].

특이성

Dieckol 표준물질 및 곰피추출물을 HPLC-PDA로 분석하여 얻은 chromatogram을 비교하여 dieckol의 머무름시간을 확인하였으며 동일한 spectrum을 나타내는지 photodiode-array (PDA) spectrum을 통해 확인하였다.

직선성

Dieckol 표준물질을 1.56-100 μg/mL으로 7 point 농도로 희석한 working solution으로 HPLC-PDA를 이용하여 3회 반복 측정했다. 분석한 표준물질의 농도와 peak 면적에 대한 비의 관계를 나타내는 표준검량선을 작성하고 검량선에서 얻은 검량선의 상관계수(correlation coefficient, R^2) 값을 통해 직선성을 확인하였다.

정밀성 및 정확성

곰피추출물을 1000 μg/mL의 농도로 제조한 후 표준용액 dieckol을 저농도(2.5 μg/mL), 중간농도(5 μg/mL), 고농도(10 μg/mL)가 되도록 첨가하였다. 일내(Intra-day) 정밀성 및 정확성을 확인하기 위해 HPLC-PDA를 이용하여 하루 동안에 3회 반복 분석하였다. 일간(Inter-day) 정밀성 및 정확성은 3일간 반복하여 확인하였다. 분석하여 얻어진 표준물질과 시료의 peak 머무름 시간(retention time)과 PDA spectrum의 일치함을 비교하여 표준물질을 분석하였고 dieckol 표준용액으로 작성한 검량선에 2.5, 5, 10 μg/mL의 농도로 제조한 시험용액의 peak 면적을 대입하여 dieckol의 농도를 계산하였다.

결과 값의 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)로 일내 및 일간 정밀성을 확인했으며, 정확성은 다음 식을 이용하여 첨가한 농도에 대비하여 분석된 농도의 회수율을 산출하여 정확성을 확인하였다.

$$\% \text{ recovery} = \frac{(C_f - C_u)}{C_a} \times 100$$

C_f: Concentration of spiked sample
C_u: Concentration of sample
C_a: Concentration of standard

검출한계 및 정량한계

곰피추출물에서 dieckol의 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)는 검량선의 기울기와 표준편차를 근거하여 다음 식을 이용하여 확인하였다.

Limit of detection (LOD) Limit of quantitation (LOQ)

$$LOD = \frac{3.3\sigma}{S} \qquad LOQ = \frac{10\sigma}{S}$$

σ: The standard deviation of the response
S: The slope of the calibration curve

Results and Discussion

지표성분 dieckol의 크로마토그램을 이용한 특이성 확인

곰피추출물에 함유된 지표성분 dieckol을 분석하기 위하여 기존의 보고된 Bang 등[14]의 분석법으로 dieckol 분석을 재현해 본 결과, 분석시간이 80 min이지만 dieckol의 peak 머무름 시간은 11 min 때로 검출되어 불필요한 분석시간이 있는 문제점을 발견하여 최적 분석조건을 위해 기기조건을 일부 개선하였다(Table 1). 개선한 분석조건으로 HPLC-PDA를 이용하여 dieckol 표준물질에 대한 최대흡수파장을 검토하였고, 그 결과 dieckol은 202 nm, 232.6 nm, 290.6 nm에서 최대흡수 파장을 나타내었다(Fig. 1). 최적 면적값을 나타내는 파장 값은 202 nm이었으나, 저파장대 영역이기 때문에 간섭물질로 인해 안정적인 peak를 얻기 위해서 최적분석 파장을 230 nm로 설정하였다. 특이성은

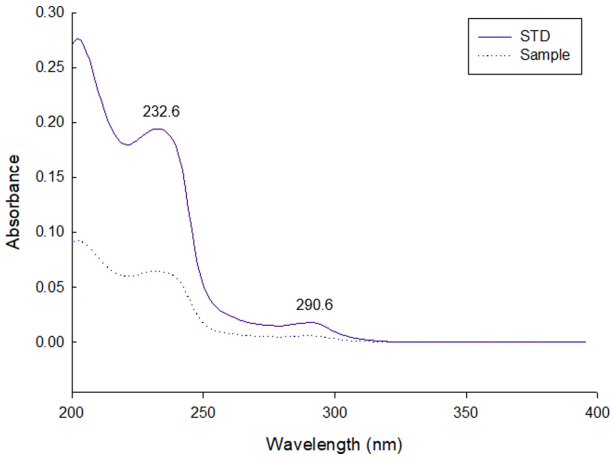

Fig. 1. PDA spectrums of dieckol in STD and *Ecklonia stolonifera* extract

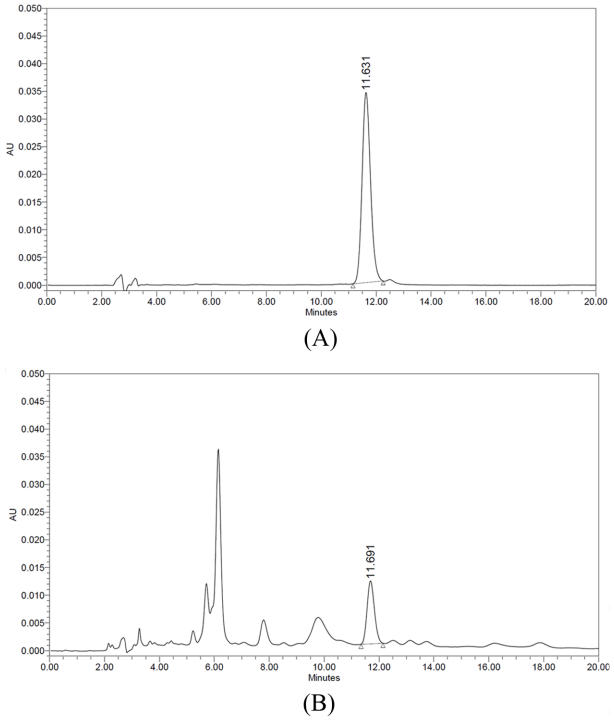

Fig. 2. HPLC chromatograms of dieckol. Standard (A), *Ecklonia stolonifera* extract (B).

Table 2. Correlation coefficients of the calibration curves, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), and recoveries of dieckol from *Ecklonia stolonifera* extract spiked at three different concentrations

Analyte	Range (μg/mL)	Slope	Intercept	Correlation coefficient (R^2)	LOD (μg/mL)	LOQ (μg/mL)		Concentration (μg/mL)	Mean±SD (μg/mL)	RSD (%)	Recovery (%)
Dieckol	1.56-100	7352.89	-4233.57	0.9997	0.18	0.56	Intra -day	2.5	2.42±0.11[1)]	4.39	96.91
								5	5.10±0.19	3.82	101.90
								10	10.23±0.16	1.58	102.33
							Inter -day	2.5	2.46±0.03	1.37	98.41
								5	5.09±0.24	4.64	101.90
								10	10.57±0.45	4.30	105.71

[1)]Values are mean±SD in triplicate (n=3).

분석대상 물질이 추출물, 불순물, 분해물 등이 혼합되어 있는 시료에서 분석 대상물질을 선택적으로 측정할 수 있는 능력을 말하며 분석대상물질이 기타 물질들과의 간섭없이 분리되고 인접한 피크와의 분리도(resolution)를 산출하여 특이성을 확인한다. 표준용액과 곰피추출물의 chromatogram을 비교하여 dieckol의 peak가 분리됨을 확인한 결과 Fig. 2와 같다. Dieckol은 다른 물질의 간섭없이 분리되었으며 dieckol의 표준용액과 곰피추출물에서의 머무름 시간(Retention time, RT)이 일치하는 것을 확인하였다. 또한 Fig. 1에서의 dieckol의 PDA spectrum 결과에서도 표준용액과 곰피추출물에서 동일한 spectrum을 나타내어 분석법의 특이성을 확인할 수 있다.

검량선을 이용한 직선성 확인

Dieckol 표준용액을 1000 μg/mL 농도의 stock solution을 제조한 후 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μg/mL 농도로 단계적으로 희석하여 HPLC-PDA로 분석한 결과 dieckol의 표준검량선은 y=7352.89x-4233.57으로 나타났으며 상관계수(R^2) 값은 0.9997로 우수한 직선성을 보였다(Table 2).

정밀성 및 정확성

정밀성이란 균질화 된 시료에 대해 일정한 조건에서 일련의 연속적인 분석하였을 때 얻은 각 측정 값 사이의 근접성을 표현하며 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)를 산출함으로써 평가하였다. 곰피추출물에서 dieckol의 정밀성은 Table 2와 같이 일내(intra-day) 정밀성에서 1.58-4.39%를 나타내었고 일간(inter-day) 정밀성에서는 1.37-4.64%로 5% 이하의 우수한 정밀성을 나타내었다.

농도를 알고 있는 곰피추출물(1000 μg/mL)에 dieckol 표준용액을 최종농도가 각각 저농도(2.5 μg/mL), 중간농도(5 μg/mL), 고농도(10 μg/mL)가 되도록 첨가한 뒤 회수율을 측정하여 정확성을 평가하였다. 그 결과는 Table 2와 같이 곰피추출물에서 dieckol의 일내 정밀성은 96.91-102.33%를 나타내었으며, 일간 정확성은 98.41-105.71%로 우수한 정확성을 나타내었다.

Table 3. Content of dieckol in *Ecklonia stolonifera* extract

Compounds (mg/g dry weigh)		
Sample	Analytes	Mean±SD
Ecklonia stolonifera extract	Dieckol	27.39±0.50

검출한계 및 정량한계

ICH 가이드라인에 근거하여 반응의 표준편차와 기울기로부터 산출한 검출한계와 정량한계의 결과는 검출한계(LOD) 값은 0.18 μg/mL로 측정 되었으며 정량한계(LOQ) 값은 0.56 μg/mL로 나타났다. 이상의 결과를 통해 곰피추출물에서 dieckol은 제시된 분석방법을 이용하여 정량분석이 가능한 것으로 나타났다(Table 2).

곰피추출물의 dieckol 함량분석

개선된 분석법을 이용하여 곰피추출물 내 dieckol의 함량을 분석한 결과는 Table 3와 같이, dieckol은 27.39 ± 0.50 mg/g dry weigh의 함량을 함유하고 있는 것으로 분석되었다. 이는 식품의약품안전처에서 건강기능식품 기능성 원료 표준화시 지표성분 함량 표시량의 경우 분석오차를 고려하여 표시하고자 하는 값에 대한 하한치와 상한치를 설정하며 추출물의 경우는 표시량의 80-120%를 원칙으로 하므로 곰피추출물의 지표성분 dieckol 함량 분석 결과는 향후 곰피추출물의 기준 규격 설정시 지표성분 함량 설정에 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다. Jin 등[22)]의 연구에서 곰피추출물 중 dieckol의 함량이 23.7± 0.21 mg/g dry weigh으로 보고되었으며 이는 본 논문에서 측정한 dieckol 함량과의 차이가 80-120%이내 이다. 또한 본 연구진은 개선된 분석법을 이용하여 곰피추출물을 함유한 인체적용시험식품에 대한 항비만 연구에서 인체적용시험식품 중의 dieckol 함량을 분석하므로 개선된 분석법의 활용성을 확인하였다[23)].

Acknowledgement

이 논문은 2021년 해양수산부 재원으로 해양수산과학기술진흥원(곰피추출물을 이용한 체지방 감소 개별인정형 소재 개발 및 제품 상용화), 2021년도 교육부의 재원(NRF-2021R1A6A1A03044242)과 한국연구재단의 4단계 두뇌한국21 사업(4단계 BK21 사업)(4299990913942)의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

국문요약

본 연구에서는 곰피추출물을 이용하여 건강기능식품 개발 시 원료의 표준화를 위하여 HPLC-PDA를 이용하여 지표성분 dieckol의 분석법 개선 및 검증을 실시하였다. 분석법의 유효성 검증은 ICH가이드라인에 근거하여 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성, 검출한계 및 정량한계를 통해 신뢰성 및 타당성을 검증하였다. 지표성분 dieckol 분석을 위하여 0.1% formic acid가 첨가된 water와 acetonitrile을 이동상으로 사용하였고 컬럼은 Capcell pak C_{18}을 사용하여 HPLC를 이용한 분석방법에서 표준용액과 곰피추출물의 지표성분 dieckol 피크 머무름 시간 일치하고 다른 물질의 간섭을 받지 않는 것을 확인하였으며, PDA spectrum이 일치하므로 특이성을 확인하였다. Dieckol의 검량선의 상관계수(R^2)은 1에 가까운 높은 상관계수 값 0.9997로 높은 직선성을 확인할 수 있었으며 분석에 적합함을 알 수 있었다. 농도를 알고 있는 곰피추출물에 dieckol 표준용액을 최종농도가 각각 저농도(2.5 μg/mL), 중간농도(5 μg/mL), 고농도(10 μg/mL)가 되도록 첨가하여 정밀성 및 정확성을 계산하였다. 정밀성은 일간, 일내 정밀성으로 확인하였으며, intra-day 및 inter-day 분석에서 RSD는 각각 1.58-4.39%, 1.37-4.64% 수준으로 5% 이하의 우수한 정밀성을 보였다. 정확성 측정결과 intra-day 및 inter-day 분석에서 회수율은 각각 96.91-102.33% 및 98.41-105.71%로 우수한 정확성을 나타내었다. 검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ)는 0.18 μg/mL, 0.56 μg/mL로 각각 확인되였으며 낮은 농도에서도 검출이 가능함을 보였다. 확립된 분석법은 특이성, 직선성, 정밀성, 정확성, 검출한계 및 정량한계에 대한 분석법 검증결과가 모두 우수한 분석방법임을 증명하였다. 또한 검증된 분석법을 이용하여 곰피추출물 중 함유한 dieckol 함량을 분석한 결과 27.39±0.50 mg/dry weight g로 분석되었다. 본 연구는 HPLC-PDA를 이용한 곰피추출물의 지표성분인 dieckol의 분석방법을 개선 및 유효성 검증을 진행하여 과학적으로 신뢰성이 있는 적합한 분석방법임이 검증되었다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Xionggao Han	https://orcid.org/0000000250577401
Sun-Il Choi	https://orcid.org/0000000174006286
Xiao Men	https://orcid.org/0000000311015796
Se-Jeong Lee	https://orcid.org/0000000187387559
Geon Oh	https://orcid.org/0000000328085467
Heegu Jin	https://orcid.org/0000000241014017
Hyun-Ji Oh	https://orcid.org/0000000246912772
Eunjin Kim	https://orcid.org/0000000284175419
Jongwook Kim	https://orcid.org/0000000151288938
Boo-Yong Lee	https://orcid.org/0000000273481859
Ok-Hwan Lee	https://orcid.org/0000000168553136

References

1. Manandhar, B., Wagle, A., Seong, S. H., Paudel, P., Kim, H. R., Jung, H. A., Choi, J. S., Phlorotannins with potential anti-tyrosinase and antioxidant activity isolated from the marine seaweed *Ecklonia stolonifera*. *Antioxidants*, **8(8)**, 240 (2019)
2. Kuda, T., Kunii, T., Goto, H., Suzuki, T., Yano, T., Varieties of antioxidant and antibacterial properties of *Ecklonia stolonifera* and *Ecklonia kurome* products harvested and processed in the Noto peninsula, Japan. *Food Chem.*, **103(3)**, 900-905 (2007)
3. Kim, A. R., Shin, T. S., Lee, M. S., Park, J. Y., Park, K. E., Yoon, N. Y., Kim, H. R., 2009. Isolation and identification of phlorotannins from *Ecklonia stolonifera* with antioxidant and anti-inflammatory properties. *J. Agric. Food Chem.*, **57(9)**, 3483-3489 (2009).
4. Iwai, K, Antidiabetic and antioxidant effects of polyphenols in brown alga *Ecklonia stolonifera* in genetically diabetic KK-Ay mice. *Plant Foods Hum. Nutr.*, **63(4)**, 163-169 (2008).
5. Yoon, N. Y., Chung, H. Y., Kim, H. R., Choi, J. E., Acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitory activities of sterols and phlorotannins from *Ecklonia stolonifera*. *Fish Sci.*, **74(1)**, 200-207 (2008).
6. Yoon, J. S., Kasin Yadunandam, A., Kim, S. J., Woo, H. C., Kim, H. R., Kim, G. D., Dieckol, isolated from *Ecklonia stolonifera*, induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma Hep3B cells. *J. Nat. Med.*, **67(3)**, 519-527 (2013).
7. Moon, H. E., Islam, M. N., Ahn, B. R., Chowdhury, S. S., Sohn, H. S., Jung, H. A., Choi, J. S., Protein tyrosine phosphatase 1B and α-glucosidase inhibitory phlorotannins from edible brown algae, *Ecklonia stolonifera* and *Eisenia bicyclis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75(8)**, 1472-1480 (2011).
8. Jin, H., Lee, K., Chei, S., Oh, H. J., Lee, K. P., Lee, B. Y., *Ecklonia stolonifera* extract suppresses lipid accumulation by promoting lipolysis and adipose browning in high-fat diet-induced obese male mice. *Cells*, **9(4)**, 871 (2020).
9. Choi, J. S., Han Y. R., Byeon, J. S., Choung, S. Y., Sohn, H. S., Jung, H. A., Protective effect of fucosterol isolated from the edible brown algae, *Ecklonia stolonifera* and *Eisenia*

bicyclis, on tert-butyl hydroperoxide- and tacrine-induced HepG2 cell injury. *J. Pharm. Pharmacol.*, **67**, 1170-1178 (2015).
10. Goo, H., Choi, J., Na, D., Quantitative determination of major phlorotannins in *Ecklonia stolonifera*. *Arch. Pharm. Res.*, **33(4)**, 539-544 (2010).
11. Kang, H., Chung, H., Kim, J., Son, B., Jung, H., Choi, J., Inhibitory phlorotannins from the edible brown alga *Ecklonia stolonifera* on total reactive oxygen species (ROS) generation. *Arch. Pharm. Res.*, **27** 194–198 (2004).
12. Li, Y. X., Wijesekara, I., Li, Y.,Kim, S. K., Phlorotannins as bioactive agents from brown algae. *Process biochem.*, **46(12)**, 2219-2224 (2011).
13. Waterman, P. G., Mole, S., 1994, Analysis of phenolic plant metabolites. Blackwell Scientific. USA.
14. Bang, C. Y., Byun, J. H., Choi, H. K., Choi, J. S., Choung, S. Y., Protective effects of *Ecklonia stolonifera* extract on ethanol-induced fatty liver in rats. *Biomol Ther.*, **24(6)**, 650 (2016).
15. Kim Y.H., Bae D.B., Park S.O., Lee S.H., Cho O.H., Lee O.H., Method validation for the determination of eleutherosides and β-glucan in Acanthopanax koreanum. *J. Korean. Soc. Food. Sci. Nutr.*, **42**, 1419-1425 (2013).
16. KFDA. 2008. *Guideline for standard of health functional food*. Korea Food & Drug Administration, Korea. p 1-146.
17. Han, X., Kim, W. H., Choi, S. I., Men, X., Lee, S. J., Jin, H., Lee, O. H., Antioxidant and anti-cholesterol activities of standardized *Ecklonia stolonifera* Extract. *J. Food Hyg. Saf.*, **36(4)**, 353-362 (2021).
18. Kim, J., Um, M., Yang, H., Kim, I., Lee, C., Kim, Y., Cho, S., Method development and validation for dieckol in the standardization of phlorotannin preparations. *Fish Aquat Sci*, 1**9(1)**, 1-6 (2016).
19. Xu, Y., Kim, E. S., Lee, J. S., Kim, G. H., Lee, H. G., Validation of an analytical method of dieckol for standardization of Ecklonia cava extract as a functional ingredient. *Korean J. Food Sci. Technol,* **51(5)**, 420-424 (2019).
20. Goo, H. R., Choi, J. S., Na, D. H., Quantitative determination of major phlorotannins in Ecklonia stolonifera. *Arch. Pharm. Res.*, **33(4)**, 539-544 (2010).
21. ICH Harmonised Tripartite Guideline. 2005. *Validation of analytical procedures: text and methodology* Q2(R1). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, p 1-13.
22. Jin, H., Lee, K., Chei, S., Oh, H. J., Lee, K. P., Lee, B. Y., Ecklonia stolonifera extract suppresses lipid accumulation by promoting lipolysis and adipose browning in high-fat diet-induced obese male mice. *Cells*, **9(4)**, 871 (2020).
23. Han, X., Choi, S. I., Men, X., Lee, S. J., Jin, H., Oh, H. J., Lee, O. H., Anti-Obesity Activities of Standardized Ecklonia stolonifera Extract in 3T3-L1 Preadipocytes and High-Fat-Diet-Fed ICR Mice. *Appl. Sci.*, **12(10)**, 5115 (2022).