

# 김으로부터 Porphyra 334의 양산 및 분석법 밸리데이션에 관한 연구

장성주, 이삭, 허경연, 이정훈, 모상현\*  
(주)바이오프디엔씨 식물세포연구소

## Study on Mass Production of Porphyra 334 from Laver and its Analytical Method Validation

Sung Joo Jang, Sak Lee, Kyoung Yeon Heo, Jeong Hun Lee, Sang Hyun Moh\*  
Plant Cell Research Institute, BIO-FD&C Co., Ltd.

**요약** 김에는 다양한 종류의 미코스포린 유사 아미노산이라는 물질이 함유되어 있으며 이러한 물질들 중 특히 높은 함량으로 함유된 물질 중 하나가 바로 Porphyra 334이다. 항산화, 상처 치유, 주름 개선, 자외선 흡수 등 다양한 효능이 확인된 이 물질은 화장품 원료로 사용하기 위해 많은 화장품 회사들이 연구 개발 중에 있다. 이를 위해서는 우선 Porphyra 334의 원료 확보가 필요한 실정인데, 현재까지는 대량 생산 방법이 정립되어 있지 않다. 본 연구에서는 김에서부터 Porphyra 334를 산업적으로 정제·생산하는 데 있어 생산 수율을 높이기 위한 다양한 방법의 추출을 수행하였다. 최적의 처리 방법을 찾고자 용매, 시간 및 온도와 같은 여러 조건을 확인하여 최적의 추출 공정을 찾았고, 확립한 방법으로 대량 추출한 후 액체 크로마토그래피를 통해 Porphyra 334의 단일 화합물을 정제 및 생산하였다. 이렇게 생산된 Porphyra 334를 이용하여 정량분석에 필요한 분석 방법을 연구하였고, 분석법 밸리데이션을 실시하였으며, 그 결과 특이성, 직선성, 정밀성, 정확성, 안정성이 확보된 분석법을 확립함으로써 분석법 검증을 완료하였다. 결론적으로 본 연구를 통해 확인된 대용량 추출 공정을 거쳐 Porphyra 334를 생산하였고 분석법까지 확립함으로써 본 생산 공정은 산업적으로 적용이 가능함을 확인하였다.

**Abstract** Laver comprises large amounts of mycosporine-like amino acids, one of the high-content substances being Porphyra 334. Since this compound reportedly exerts anti-aging effects such as anti-oxidant, wound healing, wrinkle improvement, and UV absorption, it is under constant research and development by cosmetic companies for varied applications as a cosmetic ingredient. However, to date, there is no commercialized Porphyra 334, and there is an unmet necessity to develop a technology for mass production. In this study, extraction was achieved under varied conditions to increase the yield of Porphyra 334, and the optimal solvent, time, and temperature conditions were confirmed. Additionally, a high content of Porphyra 334 was purified from laver extract using liquid chromatography. A quantitative analysis method of Porphyra 334 was devised, and the analytical method was validated by evaluating the specificity, linearity, precision, accuracy, and stability. In conclusion, our study achieved optimizing the bulk extraction process for Porphyra 334. Moreover, the analysis method was established and validated for future industrial applications.

**Keywords** : Mycosporine-like Amino Acid, Porphyra 334, Purification, Mass Production, Cosmetic Ingredient, Analytical Method Validation

본 논문은 해양수산부의 재원으로 해양수산과학기술진흥원 해양바이오 전략소재개발 및 상용화지원사업의 지원을 받아 수행되었음(20210281).

\*Corresponding Author : Sang Hyun Moh(BIO-FD&C Co., Ltd.)

email: shmoh@biofdnc.com, biofdnc@gmail.com

Received September 21, 2022

Revised October 25, 2022

Accepted December 7, 2022

Published December 31, 2022

## 1. 서론

김은 홍조식물문 김파래홍조강에 속하는 홍조류로서 우리나라 전 연안에 분포한다. 우리나라의 대표적인 김의 종류로는 참김(*Porphyra tenera* Kjellman), 방사무늬돌김(*Porphyra yezoensis* Ueda), 쿠니에다돌김(동근김, *Porphyra kuniedae* Kurogi), 모무늬돌김(*Porphyra seriata* Kjellman), 동근돌김(*Porphyra suborbiculata* Kjellman) 등이 있으며, 양식 김에는 주로 *P. yezoensis*가 주를 이루고 있다[1]. 식품으로 활용된 우리나라 김의 역사는 수백년이지만, 양식이 본격화되지 않았던 1960년대 이전에는 특산품 정도로만 인식되었다. 그 이후에 양식 기술이 발달하면서 고급식품, 대중적인 식품을 거쳐 2000년대 이후에 기능성 건강식품으로 자리를 잡았다[2].

김에 함유된 영양성분으로는 단백질, 다당류, 핵산, 타우린, 클로로필, 카로티노이드 등이 있으며[3], 이러한 1차대사물질 이외에 김에는 자외선으로부터 피부를 보호하기 위해 미코스포린 유사 아미노산(MAAs: Mycosporine-like Amino Acids, 이하 MAAs)이라는 물질이 존재한다. 이 MAAs의 종류로는 Porphyra 334, Asterina 330, Palythanol, Palythine, Palythene, Shinorine, Palythenic acid 등 약 30가지 이상이 알려져 있다[4,5]. 이 MAAs는 일반적으로 분자량이 400 Da 이하인 무색의 수용성 물질로서 cyclohexenone이나 cyclohexenimine이라는 공통 구조에 아미노산 또는 기타 치환기가 붙은 형태이다[6,7]. 몇 가지 대표적인 MAAs의 종류를 Fig. 1에 나타내었다[8].

MAAs의 효능으로 지금까지 알려진 것은 자외선 흡수를 통한 외부 스트레스 억제, 세포 이동을 촉진을 통한 상처 치유, 항산화, 자외선 조사로 인한 피부 광노화 방지, 하이드록시프롤린과 콜라겐의 감소 억제, 항염, 주름 개선 등인데[8-12], 이러한 기능으로 인해 자외선에 의한 피부 손상 및 노화로부터 피부를 보호하는 소재로서 가치가 있다고 할 수 있겠다. 천연물에 함유된 2차 대사산물의 효능들이 알려지면서 천연물로부터 유래한 기능성 성분의 관심도 및 활용도가 높아짐에 따라 김에서도 이러한 2차 대사산물인 MAAs에 의한 다양한 생리활성 기능에 대한 연구가 진행되고 있다. 삶의 질이 높아진 지금, 김은 단순히 식품으로 뿐만 아니라 이를 활용한 건강기능성 식품, 항산화-항노화 소재로 활용하고 있다. 이러한 분위기 속에 기능성 화장품 원료로서의 관심도 역시 높아져 화장품 업계에서는 김을 이용한 피부 노화 개

선 등의 효능을 지닌 신소재들을 지속적으로 찾고 있는 등 자연에서 오는 다양한 물질들은 항상 연구 대상이 되어 왔다.

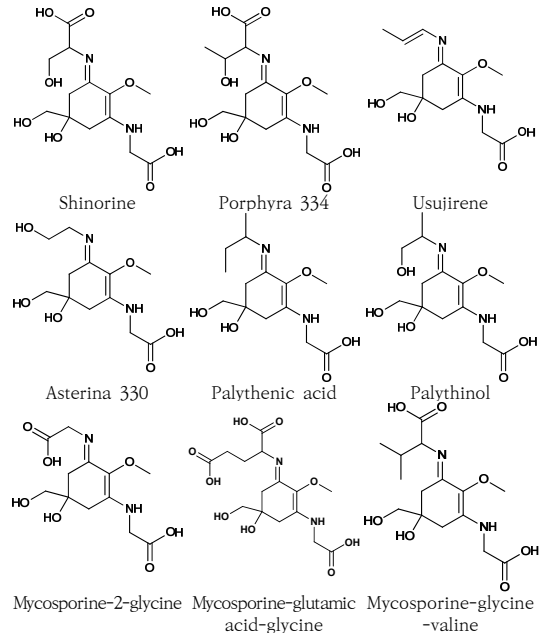


Fig. 1. Several Mycosporine-like Amino Acids (MAAs)

앞서 언급하였듯이 우리나라에서 양식하는 김은 대부분 방사무늬돌김(*Porphyra yezoensis*)인데, 방사무늬돌김으로부터 얻은 추출물은 대한화장품협회 한글성분명 "방사무늬돌김추출물" 및 미국화장품협회(PCPC: Personal Care Products Council)의 성분명(INCI: International Nomenclature of Cosmetic Ingredients) "Porphyra Yezoensis Extract"로 이미 화장품 소재로 활용중에 있다. 그러나 방사무늬돌김에 함유된 주된 MAAs의 일종인 Porphyra 334[13] 역시 화장품 성분으로 등록은 되어 있지만, 물질의 확보가 어려워 화장품 소재로 사용하기가 현재까지는 쉽지 않다. 물론 연구실에서 연구를 위해 소량 정제하는 것은 오래 전부터 진행되어 왔고[14-17], 산업적으로 생산하는 일은 아직 미흡한 상태이며, 많은 업체들이 이 Porphyra 334를 얻기 위해 김에서 추출하여 정제하는 방법을 연구하고 있지만, 대량 생산을 위한 최적의 추출, 분리, 정제 기술은 아직 부족한 것이 현실이다.

이러한 배경 하에서 본 연구를 통해 김으로부터 Porphyra 334의 효율적인 추출 방법을 모색하였고, 최적의 추출 방법으로 Porphyra 334를 대량 생산하였다.

또한 이 물질의 생산, 관리, 판매를 위해서는 품질관리가 필요한데, 가장 중요한 것 중 하나가 분석법을 설정하는 것이다. 이에 본 물질의 분석법을 설정하고, 해당 분석법이 적합한지의 여부를 분석법 밸리데이션을 실시하여 검증하였다.

## 2. 연구 방법

### 2.1 재료 및 기기

Porphyra 334를 추출, 정제하기 위해 전남 완도에서 생산 및 건조된 방사무늬돌김(*Porphyra yezoensis*)을 사용하였다. 물은 정제수 제조기(PURELAB Option-Q, ELGA Lab Water, UK)로 직접 제조하였고, 메탄올, 에탄올, 아세트니트릴은 삼전순약(주)로부터, NMR 시험을 위한 D<sub>2</sub>O는 Sigma사로부터 구입하였으며, trifluoroacetic acid(이하 TFA)는 Alfa Aesar 제품을 사용하였다. 또한 여과에 사용된 membrane filter 및 syringe filter는 GVS 사의 Cellulose Acetate 재질 filter(pore size 0.45 μm)를 사용하였다. 분석법 밸리데이션에 사용된 Porphyra 334 표준물질은 reference[18]에 의한 방법을 통해 자체적으로 정제한 물질(순도 99.9 %)을 사용하였다.

화장품 원료에 적용하기 위한 Porphyra 334를 정제 생산하기 위해 정제용 LC(Prep-LC system, HANBON Science, China)를 통해 해당 물질을 분획하였고, 함량 분석 및 분석법 검증을 위해 HPLC(1260 Infinity II system, Agilent Technologies, USA.)를 사용하였다. 또한 MS/MS system (AB SCIEX 3200 QTRAP MS/MS, Applied Biosystems, USA.) 및 NMR (ADVANCE III 700 MHz NMR spectrometer, Bruker, Germany)을 통해 정제한 물질의 구조를 확인하였다.

### 2.2 최적 추출 조건 확인

#### 2.2.1 추출 용매 설정

건조된 김 5 g에 0 - 100 % 메탄올을 각각 60배수 첨가하여 40 °C에서 1시간 추출하였다. 각 추출액을 10 mL씩 취해 syringe filter로 여과한 후 여액을 농축 및 건조하였다. 각 건조물에 다시 10 mL의 물을 첨가하여 완전히 녹인 후 HPLC로 분석하여 Porphyra 334의 피크면적을 확인하였다. 또한 위의 각 추출액을 100 mL씩 취해 membrane filter(가로, 세로 각 6.5 cm)로 여과

하면서 여과가 완료되는 시간을 측정하였다. 위의 전 과정을 동일한 방법으로 메탄올 대신 에탄올로 추출 용매를 바꿔 실시하였다.

#### 2.2.2 추출 조건 설정

추출 용매를 설정 후 추출 용매의 첨가량, 추출 온도 및 시간 등의 조건을 변화시키면서 추출되는 Porphyra 334의 양을 확인하였다.

#### 2.2.3 통계분석

모든 실험은 3회 반복으로 실시하였고, 추출 용매별 여과 시간을 제외한 모든 실험에서 얻은 결과 값은 각 control 군과의 t-test 검정을 통해 통계적 유의성 (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001)을 검증하였다.

### 2.3 Porphyra 334의 정제 및 물질 확인

#### 2.3.1 Porphyra 334의 대용량 생산

Porphyra 334를 화장품 원료로 사용하기 위해 대용량으로 생산을 진행하였다. 건조된 김 5 kg으로 추출 및 정제를 진행하였고, 추출은 본 연구를 통해 설정된 최적 추출 조건을 활용하였다. 추출 후 여과, 농축, 건조 공정을 진행하였고, 이 추출물은 파우더 상태로 보관하면서 정제 공정 당일에 물에 재용해하여 정제에 사용하였다. 정제시 Table 1의 기기 조건으로 Porphyra 334 피크를 분획하였고, 해당 분획물은 동결건조를 진행하여 최종 파우더를 수득하였다. 본 대용량 생산은 총 3개의 룩트를 진행하였다.

Table 1. Prep-LC Conditions for the Fractionation of Porphyra 334

Resin	Daisogel RP18, 10 μm (Osaka Soda, Japan)
Flow Rate	600 mL/min
Mobile Phase A	Water
Mobile Phase B	Acetonitrile
Mobile Phase Gradient	0min (0%B) → 17min (0%B) → 19min (90%B) → 29min (90%B) → 31min (0%B)
Injection Volume	100 mL
Detector	UV 330 nm

#### 2.3.2 Porphyra 334의 물질 확인

대용량으로 정제한 Porphyra 334는 mass spectrometry (ESI/positive, AB SCIEX 3200 QTRAP MS/MS,

Applied Biosystems, USA.)를 통해 분자량을 확인하였고, NMR spectrum(<sup>1</sup>H - 700 MHz, <sup>13</sup>C - 175 MHz, ADVANCE III 700 MHz NMR spectrometer, Bruker, Germany)을 해석하여 그 구조를 확인하였다.

### 2.4 Porphyra 334의 분석법 검증

Porphyra 334의 정량분석을 위해 HPLC를 이용하였고 Table 2와 같은 기기 조건으로 진행하였다. 분석법 검증을 위해 실시한 밸리데이션은 ICH guideline[19]에 따라 진행하여 특이성, 직선성, 정밀성(반복성, 재현성), 정확성, 안정성의 항목에 대해 평가하였다. 분석법 검증을 위해 Porphyra 334 표준물질을 물에 1000 mg/L 농도로 녹인 표준원액을 조제하여 -75 °C에 보관하며 사용하였고, 분석 범위는 80 - 120 mg/L로 하였다.

Table 2. Instrumental Conditions using HPLC

Column	Shim-Pack GIST C <sub>18</sub> (4.6×250 mm, 5 μm, Shimadzu, Japan)
Column Temp.	30 °C
Flow Rate	1 mL/min
Mobile Phase A	Water (containg 0.2 % TFA)
Mobile Phase B	Acetonitrile (containg 0.2 % TFA)
Mobile Phase Gradient	0min (0%B) → 8min (0%B) → 38min (60%B) → 40min (0%B) → 50min (0%B)
Injection Volume	20 μL
Detector	Diode Array Detector (@ UV 330 nm)

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1 최적 추출 조건 확인

#### 3.1.1 추출 용매 설정

건조된 김 5 g에 0 - 100 % 메탄올 또는 에탄올을 각각 60배수 첨가하여 40 °C에서 1시간 추출 및 전처리하여 HPLC로 확인한 결과(3반복 시험)는 Fig. 2와 같고, 이 때, 각 추출 용매별 여과 시간은 Table 3에 나열하였다.

수용성인 Porphyra 334를 추출시 물 이외에 메탄올 또는 에탄올을 일정 비율 첨가하여 추출하였을 때 물이 전혀 함유되어 있지 않은 용매(100 % 메탄올, 100 % 에탄올)를 제외하면 일정 수준 이상 Porphyra 334가 추출됨을 확인할 수 있었다.

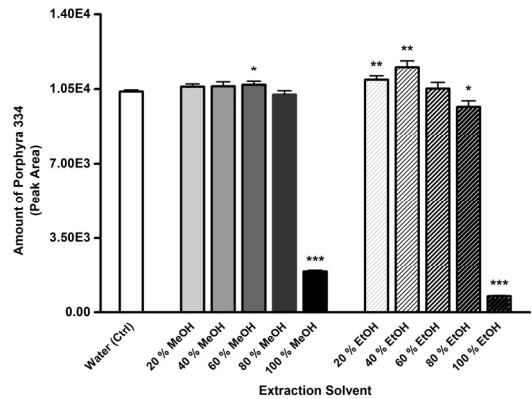


Fig. 2. Amount of Porphyra 334 by Extraction Solvent

Table 3. Filtration Time by Extraction Solvent

Extraction Solvent (containg MeOH)	Filtration Time	Extraction Solvent (containg EtOH)	Filtration Time
Water (Control)	> 2 hr	Water (Control)	> 2 hr
20 % methanol	> 2 hr	20 % ethanol	> 2 hr
40 % methanol	15-16 min	40 % ethanol	18-19 min
60 % methanol	5-6 min	60 % ethanol	6-7 min
80 % methanol	17-20 sec	80 % ethanol	23-26 sec
100 % methanol	-	100 % ethanol	-

각 추출물의 여과 시간 확인시 추출 용매에 메탄올 또는 에탄올 함유량이 적은 경우 여과가 잘 되지 않거나 여과 시간이 길어지고, 반대로 함유량이 증가하게 되면 시간이 단축되는 것으로 확인되었다. 특히 80 % 메탄올 및 80 % 에탄올 추출물에서는 짧은 시간 내 여과가 가능한 것을 확인하였다. 단, 여과 시간의 경우 용매의 특성상 메탄올이나 에탄올보다는 물의 함유량이 높을수록 여과 시간이 길어지는 것이 일반적이지만, 김에서부터 추출된 추출물들에 의해 특히 유기용매 함유량이 적은 용매로 추출시 여과 공정에 큰 지장을 주는 것으로 확인되었다. 또한, 100 % 메탄올 및 100 % 에탄올로 추출 후 피크 면적 확인 결과 Porphyra 334의 추출률이 다른 용매에 비해 현저히 낮기에 본 여과시험 측정은 실시하지 않았다.

이 결과를 바탕으로 최적 추출 용매 확인 시 물/유기용매의 비율에 따라 추출률이 유의적으로 늘어나는 용매도 있었지만, 여과 시간까지 고려한다면 80 % 메탄올이 적절한 것으로 판단되었다. 특히 타 용매에 비해 추출률도 떨어지지 않고, 여과 시간도 빠르며, 농축 및 건조 시간의 단축이 가능하기에 이 용매로 선정하였다. 80 % 에

탄올은 물 추출 대비 일부 유의적인 추출률 저하가 발생하였고, 일반적으로 에탄올이 메탄올보다는 가격이 고가인 것을 감안하여 생산성 및 효율성 극대를 위해 배제하였다. 이후 시험 및 정제시 메탄올을 첨가한 용매로 진행하였다. 이 때, 추출에 사용된 메탄올은 농축, 건조 및 크로마토그래피를 이용한 정제 공정에서 전부 제거가 되기에 화장품 원료로 사용시 문제가 없을 것으로 사료되었다.

### 3.1.2 추출 조건 설정 - 추출 용매의 양

건조된 김 5 g에 80 % 메탄올을 각각 원재료의 10 - 100배수(각각 50 - 500 mL) 첨가하여 40 °C에서 1시간 교반하며 추출하였고, 이를 전처리하여 HPLC로 확인한 결과는 Fig. 3과 같다. 추출시 용매의 첨가량이 각각 다르기에 추출률 비교를 위해 각 샘플의 피크면적에 각 용매의 첨가량을 곱한 값으로 비교하였다.

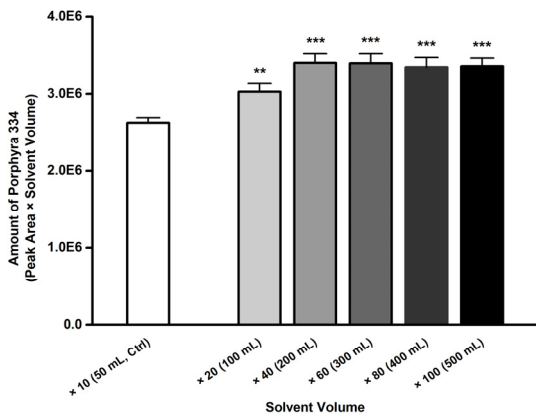


Fig. 3. Amount of Porphyrin 334 by solvent Volume of Extraction Solvent

피크면적에 용매 첨가량을 곱한 값을 확인한 결과 추출 용매량이 증가될수록 Porphyrin 334의 추출량은 유의적으로 증가되었다. 단, 첨가되는 용매량이 원재료의 40배수(200 mL)부터는 용매량을 늘려도 추출량이 더 이상 증가되지 않았기에 추출시 용매 첨가량을 원물의 40 배수로 하는 것이 효율적인 것으로 판단되었다.

### 3.1.3 추출 조건 설정 - 추출 온도

건조된 김 5 g에 80 % 메탄올을 각각 40배수(200 mL) 첨가하여 온도를 20 - 60 °C로 설정한 후 1시간 교반하며 추출하였다. 이를 전처리하여 HPLC로 확인한 결과는 Fig. 4와 같다.

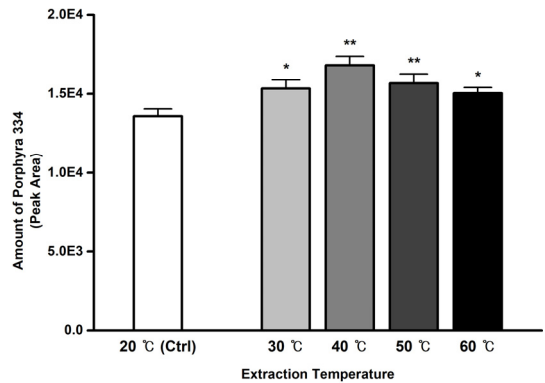


Fig. 4. Amount of Porphyrin 334 by Extraction Temperature

추출 온도를 달리 하여 추출한 경우 40 °C 까지는 추출률이 증가하였고, 그 이후부터는 일정하거나 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 Porphyrin 334가 온도가 상승할수록 안정성이 떨어지는 특성[20]이 있어 낮은 온도보다는 높은 온도로 추출시 Porphyrin 334가 일부 분해되어 나타난 결과로 판단된다. 본 결과를 바탕으로 추출시 적정 온도는 40 °C로 판단되었다.

### 3.1.4 추출 조건 설정 - 추출 시간

건조된 김 5 g에 80 % 메탄올을 각각 40배수(200 mL) 첨가하여 40 °C로 추출하였고, 추출 시간을 15분에서 4시간으로 설정하였다. 이를 전처리하여 HPLC로 확인한 결과를 Fig. 5에 나타내었다.

추출 시간을 달리 하여 추출한 경우 30분만 추출하여도 15분 추출 대비 추출량이 유의적으로 증가되었고, 1시간 이후부터는 거의 일정 수준의 추출량이 확인되어 1시간 가량 추출시 거의 대부분의 Porphyrin 334가 추출 되는 것으로 판단되었다.

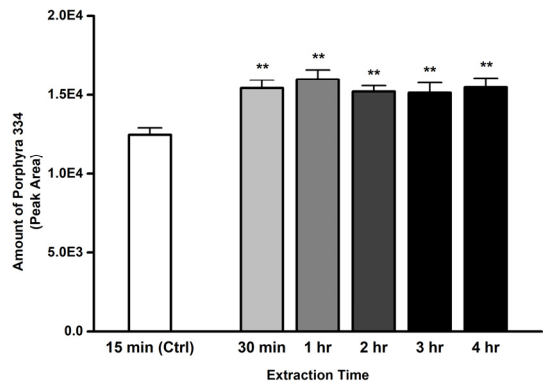


Fig. 5. Amount of Porphyrin 334 by Extraction Time

위의 결과들을 바탕으로 하여 김으로부터 Porphyra 334를 추출하는 최적 조건은 건조 김에 80 % 메탄올을 40배수 첨가하여 40 ℃에서 1시간 추출하는 것으로 설정하였다.

### 3.2 Porphyra 334의 정제 및 물질 확인

#### 3.2.1 Porphyra 334의 대용량 생산

설정된 추출 조건을 스케일업 하여 대용량 생산시 적용하였다. 건조된 김 5 kg에 80 % 메탄올을 200 L 투입하여 40 ℃로 설정 후 1시간동안 추출을 진행하였다. 추출물 확인을 위해 추출이 끝난 샘플을 10 mL씩 취해 전처리 과정을 거쳐 HPLC로 피크 확인을 실시하였다. 3개의 룯트에 대해 확인한 결과 각 룯트별 Porphyra 334의 추출량은 24.2 - 25.3 g이었기에 Porphyra 334는 일정한 수준으로 추출됨이 확인되었다.

각 룯트별 추출물은 여과 후 60 ℃에서 감압 농축 및 진공 건조 공정을 거쳐 김 추출물 파우더 740 - 780 g을 제조하였다. 정제시에는 물 20배수를 첨가하여 정제용 LC로 Porphyra 334 피크만 분획하였고, 해당 분획물은 동결건조를 통해 룯트별 15.3 - 16.2 g(원물 대비 수득률 0.32 %)의 분말을 얻었다.

Table 4에 각 공정별 수율(최초 Porphyra 334의 추출량 대비 각 공정별 회수율, 회수율 및 원물 대비 Porphyra 334의 수득률)을 정리하였다. 공정이 진행될 수록 회수율 및 회수량은 점점 감소하여 최종 파우더의 경우 최초 추출량 대비 회수율이 63.6 %였는데, 이는 농축 및 건조시 고온에 노출되어 생기는 일부 분해 또는 함량감소, 정제용 LC로 분획시 피크의 양쪽 끝단은 제외하고 중간부분만의 분획을 통한 손실 등이 원인이라고 판단되는 바, 향후 공정 개선시 고려되어야 될 상황 중 하나이다.

Table 4. Amount and Recovery of Porphyra 334 by Each Process Step

Process step	Porphyra 334		
	Amount	Recovery	
		Compared to Initial Extraction	Compared to Raw Material
Extraction	24.2-25.3 g	-	0.50 %
Concentration	20.6-21.5 g	85.1 %	0.42 %
Drying (Extract Powder)	17.1-18.0 g	70.9 %	0.35 %
Final Product	15.3-16.2 g	63.6 %	0.32 %

#### 3.2.2 정제된 Porphyra 334의 물질 확인

정제된 Porphyra 334에 대한 질량분석(mass spectrometry)을 통해  $[M+H]^+=347.3$ 의 분자량 피크를 확인하였다(Fig. 6). 또한 NMR spectrum( $^1H$ ,  $^{13}C$ )에서 확인되는 각 피크(chemical shift;  $\delta H$  /  $\delta C$ )를 해석하여 물질 구조상 H, C의 위치와 매칭함으로써 Porphyra 334의 구조를 해석하였다(Table 5). 분자량 확인 및 NMR spectroscopic data 확인 결과 정제된 물질은 Porphyra 334의 구조와 일치하여 Porphyra 334임을 확인하였다.

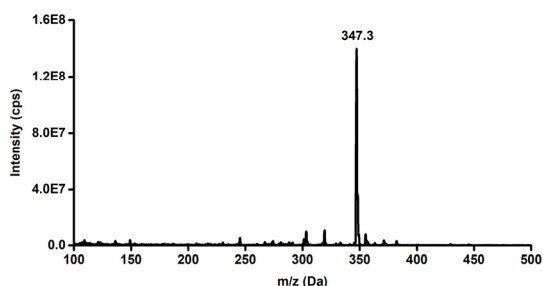


Fig. 6. Mass Spectrum of Purified Porphyra 334

Table 5. Identification of Porphyra 334 Structure through NMR Spectroscopy

Structure	NMR spectroscopic data		
	position	$\delta H$ mult., (Hz)	$\delta c$ mult.
<p>Porphyra 334</p>	1	1.25 d(6.3)	19.2 q
	2	4.37 m	67.8 d
	3	4.22 d(4.2)	63.4 d
	4	-	174.3 s
	5	-	159.4 s
	6	-	125.8 s
	7	-	160.9 s
	8	2.84 d(17.5), 2.78 d(17.5)	32.8 t
	9	-	71.0 s
	10	2.91 d(17.5), 2.76 d(17.5)	33.2 t
	11	3.69 s	59.3 q
	12	3.57 s	67.3 t
	13	4.16 d(5.6)	45.8 t
	14	-	173.7s

### 3.3 Porphyra 334의 분석법 검증

#### 3.3.1 특이성

희석용매의 내인성 간섭물질은 확인되지 않았고, 특이성 시험용 표준용액 및 시험용액의 크로마토그램에서 Porphyra 334 피크와 겹치는 다른 피크는 존재하지 않

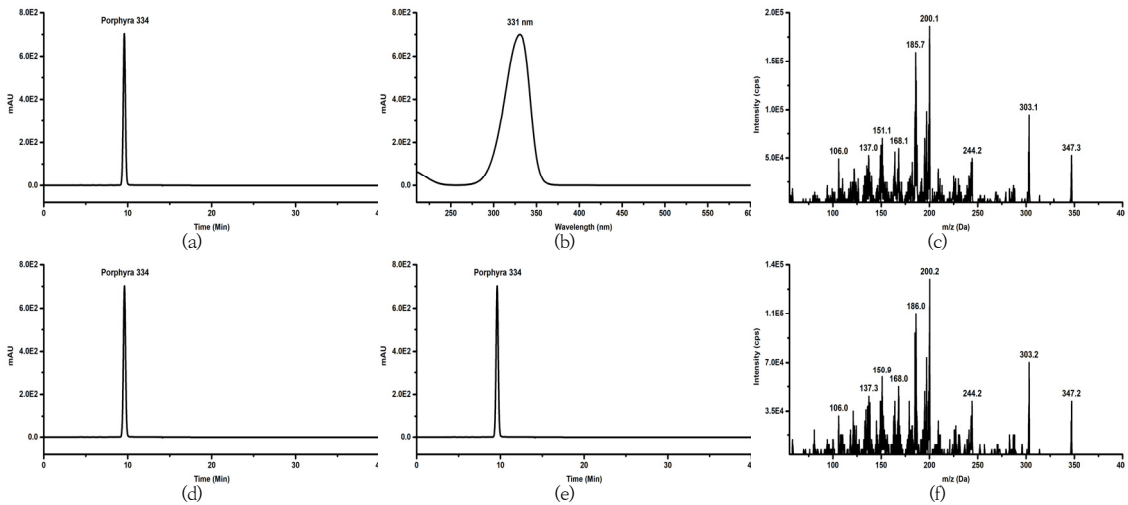


Fig. 7. Specificity in Assay of Porphyra 334

(a) Chromatogram of Porphyra 334 Authentic Compound (b) UV Spectrum of Porphyra 334 Authentic Compound (c) MS/MS of Porphyra 334 Authentic Compound (d) Chromatogram of Purified Porphyra 334 (e) UV Spectrum of the Peak of Purified Porphyra 334 (f) MS/MS of the Peak Fraction of Purified Porphyra 334

았다. 또한 시험용액에서 나온 피크는 표준용액의 피크와 UV Spectrum 및 mass spectrum (MS/MS)이 일치하였기에 해당 피크는 Porphyra 334임을 확인하였다 (Fig. 7).

### 3.3.2 직선성

검량선 범위를 80 - 120 mg/L로 하여 3회 시험시, 결정계수( $R^2$ : coefficient of determination)는 3회 모두 0.9999, 상대오차(R.E.: relative error)도 -0.2 - 0.2 % 로 기준( $R^2$  0.99 이상, R.E.  $\pm 5$  % 이하)에 적합하였다(Table 6, Fig. 8).

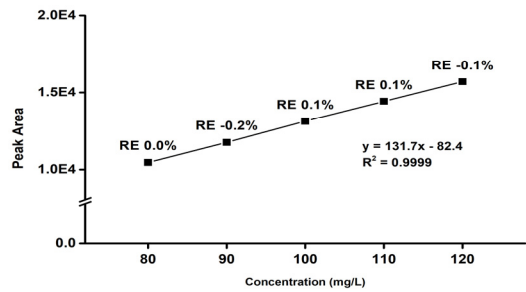


Fig. 8. Calibration Curve in Linearity (batch #1)

### 3.3.3 반복성

3개 농도별 반복성 시험용액을 HPLC에 6회 반복 주입하였을 때 변동계수(C.V.: coefficient of variation)는 0.1 - 0.2 %로 기준(C.V. 5 % 이내)에 적합하였다 (Table 7).

Table 6. Linearity in Assay of Porphyra 334

Batch	Contents	Results
Batch #1	Relative Error	-0.2 - 0.1 %
	Equation	$Y = 131.7x - 82.4$
	$R^2$	0.9999
Batch #2	Relative Error	-0.1 - 0.2 %
	Equation	$Y = 132.1x - 93.6$
	$R^2$	0.9999
Batch #3	Relative Error	-0.1 - 0.2 %
	Equation	$Y = 131.8x - 98.4$
	$R^2$	0.9999

Table 7. Repeatability in Assay of Porphyra 334

Conc.	Contents	Results
Low Conc. (90 mg/L)	Calculated Conc.	90.1 - 90.6 mg/L
	Mean	90.3 mg/L
	C.V.	0.2 %
Middle Conc. (100 mg/L)	Calculated Conc.	99.7 - 100.0 mg/L
	Mean	99.9 mg/L
	C.V.	0.1 %
High Conc. (110 mg/L)	Calculated Conc.	110.2 - 110.8 mg/L
	Mean	110.3 mg/L
	C.V.	0.2 %

### 3.3.4 재현성 및 정확성

재현성 확인시 변동계수는 모든 배치 0.1 %였고, 회수(Recovery)을 통한 정확성 계산시 99.0 - 100.4 %로 확인되어 기준(C.V. 5 % 이내, Recovery 95 - 105 %)에 적합하였다(Table 8).

### 3.3.5 배치간 정밀·정확성

3배치 시험을 통한 배치간 정밀성, 정확성 확인시 그 변동계수가 0.3 - 0.4 %, 회수율은 98.8 - 100.6 %였기에 기준(C.V. 5 % 이내, Recovery 95 - 105 %)에 적합하였다(Table 8).

Table 8. Reproducibility and Accuracy / Inter-batch Precision and Accuracy in Assay of Porphyrin 334

Conc.	Contents	Results	
		Reproducibility and Accuracy	Inter-batch Precision and Accuracy
Low Conc. (90 mg/L)	Recovery	99.8 - 99.9 %	98.9 - 99.9 %
	Mean	99.8 %	99.5 %
	C.V.	0.1 %	0.3 %
Middle Conc. (100 mg/L)	Recovery	99.8 - 99.9 %	98.8 - 99.9 %
	Mean	99.8 %	99.5 %
	C.V.	0.1 %	0.3 %
High Conc. (110 mg/L)	Recovery	100.3 - 100.6 %	99.3 - 100.6 %
	Mean	100.4 %	100.0 %
	C.V.	0.1 %	0.4 %

### 3.3.6 안정성

전처리가 완료한 샘플을 실온에서 48시간 동안 보관 후 안정성(post preparative stability)을 측정된 결과 상대오차가 0.1 - 0.5 %였기에 기준(R.E.  $\pm 5$  % 이하)에 적합하였고(Table 9), 추가적으로 표준원액을 -75 °C에서 3주간 보관하며 안정성을 확인한 결과, 상대오차가 각각 0.1 %였기에 표준원액 역시 해당 보관 조건에서 안정함을 확인하였다.

Table 9. Post-prep. Stability in Assay of Porphyrin 334

Conc.	Contents	Results
Low Conc. (90 mg/L)	Conc. Change	89.1 $\rightarrow$ 89.3 mg/L
	Stability	100.1 %
	R.E.	0.1 %
Middle Conc. (100 mg/L)	Conc. Change	99.0 $\rightarrow$ 99.1 mg/L
	Stability	100.1 %
	R.E.	0.1 %
High Conc. (110 mg/L)	Conc. Change	109.4 $\rightarrow$ 110.0 mg/L
	Stability	100.5 %
	R.E.	0.5 %

### 3.3.7 정제된 Porphyrin 334의 정량분석

분석법 밸리데이션을 통해 본 분석법에 대한 검증이 완료된 바, 앞서 김 원물 5 kg로 정제한 3개 롯트의 Porphyrin 334에 대해 정량분석을 실시하였다. 정량시험 결과 각 롯트별로 95.8( $\pm 0.5$ ) %, 96.7( $\pm 0.6$ ) %, 96.5( $\pm 0.5$ ) %로 확인되어 본 연구로부터 확인된 추출 방법으로 대용량 추출 후 정제하더라도 높은 함량의 Porphyrin 334를 확보할 수 있었다.

## 4. 고찰

앞서 언급했던 것처럼 이전의 연구들에서는 Porphyrin 334를 필요에 따라 소량씩 정제하여 사용한 것[14-17]에 비해 본 연구에서는 산업적으로 실제 화장품에 적용하기 위한 원료를 대용량으로 생산을 하여 품질관리를 위한 분석법 검증까지 한 것에 의의가 있다.

대용량 정제와 관련된 이전 연구에서 정제시 효율을 높이기 위해 추출액에 직류전류를 통하게 하여 액상에서 Porphyrin 334를 분리하는 방법[21]이 있지만, 본 연구는 원물인 김으로부터 추출률을 높이는 방안에 좀 더 초점이 맞춰져 있다. 본 연구에서 확인된 추출 방법을 통해 추출 후 직류전류를 걸어 액상에서 분리하는 방법을 접목할 경우 더 빠른 정제 공정이 가능할지 여부도 연구할 만한 가치가 있겠다. 또한 향후 공정 개선을 통해 생산시 손실을 줄이는 방안을 모색하고, 더 큰 용량의 정제용 LC를 통한 보다 더 많은 양의 김 원물로부터 추출 및 정제가 가능한지에 대한 숙제가 남겨졌다.

Porphyrin 334의 분석에 있어, 본 물질을 분석하기 위해 HPLC를 이용한 기존 연구는 이미 다수 존재하고, 그 목적에 따라 NH<sub>2</sub> column을 이용하거나[4] C<sub>8</sub> column으로 시행한 경우도 있지만[11,22], 대부분의 분석시 C<sub>18</sub> column을 이용하여 진행하였기에[3,14,22-24] 본 연구에서도 C<sub>18</sub> column을 활용하여 분석을 실시하였다. 또한, 화장품 제형에 첨가된 상태의 Porphyrin 334의 분석법을 검증한 연구[18]도 기존에 있지만, 본 연구처럼 여러 롯트의 Porphyrin 334를 대용량으로 생산 후 원료 자체로서의 분석법을 검증한 것은 최초이다.



## 5. 결론

해조류로부터 얻을 수 있는 미코스포린 유사 아미노산(MAAs)은 피부 스트레스 억제, 상처 치유, 항산화, 피부 광노화 방지, 항염, 주름개선 등의 기능이 있기에 화장품 소재로 활용 가치가 높다. 이들 MAAs 중 한 종류인 Porphyra 334가 김에 다량 함유되어 있는데, 본 연구를 통하여 김으로부터 Porphyra 334를 대량으로 정제·생산하는 연구를 진행하였다.

Porphyra 334를 생산하는데 필요한 추출 조건을 설정하기 위해 추출 용매의 종류, 용매의 첨가량, 추출 온도 및 시간을 확인하였고, 이 결과들을 바탕으로 찾은 최적 조건은 건조 김에 80 % 메탄올을 40배수 첨가하여 40 ℃에서 1시간 추출하는 것이었다.

본 추출 조건을 바탕으로 김 5 kg를 가지고 대용량 추출 후 정제를 진행하였고, 수득률 0.32 %의 Porphyra 334를 얻었으며, 정제된 Porphyra 334는 MS, NMR로 스펙트럼을 확인함으로써 구조까지 확인하였다.

또한, 품질관리를 위해 분석법을 설정하였고, 분석법 밸리데이션을 통해 특이성, 직선성, 정밀성, 정확성 및 안정성을 확인하여 분석법 검증을 완료하였다. 마지막으로, 대용량 정제하여 얻은 Porphyra 334는 본 분석법을 활용하여 정량분석을 실시하였고 95 % 이상의 함량을 확인하였다.

이로써 김으로부터 Porphyra 334의 대량 생산을 위해 본 추출 방법으로 추출하는 데 있어 적합함을 확인하였고, 이 공정을 거쳐 정제된 Porphyra 334의 구조 확인, 분석방법 확립을 통해 실제 산업적으로 생산이 가능함을 확인하였다.

## References

- J. W. Kang, "Species of Cultivated *Porphyra* in Korea", *Journal of the Korean Fisheries Society*, Vol.3, No.2, pp.77-92, Jun. 1970.
- N. S. Lee, "A Study on the Consumption Pattern of Laver", *Korean Journal of Food Marketing Economics*, Vol.27, No.2, pp.1-23, Jun. 2010.
- S. P. Hong, J. K. Koo, K. S. Jo, D. S. Kim, "Physicochemical Characteristics of Water or Alcohol Soluble Extracts from Laver, *Porphyra yezoensis*", *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, Vol.26, No.1, pp.10-16, Feb. 1997.
- J. I. Carreto, M. O. Carignan, "Mycosporine-Like Amino Acids: Relevant Secondary Metabolites. Chemical and Ecological Aspects", *Marine Drugs*, Vol.9, No.4, pp.387-446, Mar. 2011. DOI: <https://doi.org/doi:10.3390/md9030387>
- S. Bhatia, A. Garg, K. Sharma, S. Kumar, A. Sharma, A. P. Purohit, "Mycosporine and mycosporine-like amino acids: A paramount tool against ultra violet irradiation", *Pharmacognosy Reviews*, Vol.5, No.10, pp.138-146, Dec. 2011. DOI: <https://doi.org/doi:10.4103/0973-7847.91107>
- E. Chrapusta, A. Kaminski, K. Duchnik, B. Bober, M. Adamski, J. Bialczyk, "Mycosporine-Like Amino Acids: Potential Health and Beauty Ingredients", *Marine Drugs*, Vol.15, No.10, pp.326-354, Oct. 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/md15100326>
- R. P. Sinha, S. P. Singh, D. P. Häder, "Database on mycosporines and mycosporine-like amino acids (MAAs) in fungi, cyanobacteria, macroalgae, phytoplankton and animals", *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Vol.89, pp.29-35, Jul. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2007.07.006>
- N. Wada, T. Sakamoto, S. Matsugo, "Mycosporine-Like Amino Acids and Their Derivatives as Natural Antioxidants", *Antioxidants*, Vol.4, No.3, pp.603-646, Sep. 2015. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox4030603>
- J. M. Shick, W. C. Dunlap, "Mycosporine-like amino acids and related gadusols: biosynthesis, accumulation, and UV-protective functions in aquatic organisms", *Annual Review of Physiology*, Vol.64, pp.223-262, Oct. 2002. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.0815.01.155802>
- R. Pangestuti, K. H. Shin, S. K. Kim, "Anti-Photoaging and Potential Skin Health Benefits of Seaweeds", *Marine Drugs*, Vol.19, No.3, pp.172-199, Mar. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/md19030172>
- F. de la Coba, J. Aguilera, F. L. Figueroa, M. V. de Gálvez, E. Herrera, "Antioxidant activity of mycosporine-like amino acids isolated from three red macroalgae and one marine lichen", *Journal of Applied Phycology*, Vol.21, pp.161-169, Apr. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10811-008-9345-1>
- S. S. Suh, J. Hwang, M. Park, H. H. Seo, H. S. Kim, J. H. Lee, S. H. Moh, T. K. Lee, "Anti-Inflammation Activities of Mycosporine-Like Amino Acids (MAAs) in Response to UV Radiation Suggest Potential Anti-Skin Aging Activity", *Marine Drugs*, Vol.12, No.10, pp.5174-5187, Oct. 2014. DOI: <https://doi.org/10.3390/md12105174>
- W. Kim, J. Y. Kim, S. J. Jeong, H. C. Yang, J. Y. Cho, "Physicochemical characteristics and antioxidant activities of laver cultivars harvested at different times", *Korean Journal of Food Preservation*, Vol.28, No.6, pp.705-715, Oct. 2021. DOI: <https://doi.org/10.11002/kjfp.2021.28.6.705>

- [14] C. Tao, T. Sugawara, S. Maeda, X. Wang, T. Hirata, "Antioxidative activities of a mycosporine-like amino acid, porphyra-334", *Fisheries Science*, Vol.74, No.5, pp.1166-1172, Sep. 2008.  
DOI: <https://doi.org/doi:10.1111/j.1444-2906.2008.01636.x>
- [15] M. Klischa, P. Richtera, R. Puchtab, D. P. Häder, W. Bauer, "The Stereostructure of Porphyra-334: An Experimental and Calculational NMR Investigation. Evidence for an Efficient 'Proton Sponge'", *Helvetica Chimica Acta*, Vol.90, No.3, pp.488-511, Mar. 2007.  
DOI: <https://doi.org/10.1002/hlca.200790052>
- [16] S. Takano, A. Nalanishi, D. Uemura, Y. Hirata, "Isolation and structure of a 334 nm UV-absorbing substance, Porphyra-334 from the red alga *Porphyra tenera* Kjellman", *Chemistry Letters*, Vol.8, No.4, pp.419-420, Apr. 1979.  
DOI: <https://doi.org/10.1246/cl.1979.419>
- [17] M. Orfanoudaki, A. Hartmann, U. Karsten, M. Ganzera, "Chemical profiling of mycosporine-like amino acids in twenty-three red algal species", *Journal of Phycology*, Vol.55, No.2, pp.393-403, Jan. 2019.  
DOI: <https://doi.org/10.1111/jpy.12827>
- [18] S. J. Jang, S. Lee, S. H. Paek, D. S. Shin, J. H. Song, J. Y. Kim, S. J. Lee, S. H. Moh, "Evaluation of Anti-wrinkle Effect of Cosmetic Formulation containing Porphyra 334, One of Mycosporine Derivatives from *Porphyra yezoensis*", *Journal of the Korean Society of Cosmetics and Cosmetology*, Vol.11, No.2, pp.181-193, Sep. 2021.
- [19] International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH), "Validation of Analytical Procedures (Q2 (R2)) - Draft version", ICH Guideline, Mar. 2022.
- [20] Z. Zhang, X. Gao, Y. Tashiro, S. Matsukawa, H. Ogawa, "Researches on the Stability of Porphyra-334 Solution and Its Influence factors", *Journal of Ocean University of China*, Vol.3, No.2, pp.166-170, Oct. 2004.  
DOI: <https://doi.org/10.1007/s11802-004-0029-4>
- [21] S. J. Jang, J. H. Lee, H. H. Seo, S. Lee, J. Y. Kim, D. Y. Kim, S. H. Moh, "Advancement of Mass Purification of Porphyra 334 from *Porphyra yezoensis* by Applying Direct Current", *Journal of Marine Bioscience and Biotechnology*, Vol.12, No.1, pp.66-74, Jun. 2020.  
DOI: <https://doi.org/10.15433/ksmb.2020.12.1.066>
- [22] P. Chaves-Peña, F. de la Coba, F. L. Figueroa, N. Korbee, "Quantitative and Qualitative HPLC Analysis of Mycosporine-Like Amino Acids Extracted in Distilled Water for Cosmetics Uses in Four Rhodophyta", *Marine Drugs*, Vol.18, No.1, 27, Dec. 2020.  
DOI: <https://doi.org/10.3390/md18010027>
- [23] S. Bhatia, K. Sharma, A. G. Namdeo, B. B. Chaugule, M. Kavale, S. Nanda, "Broad-spectrum sun-protective action of Porphyra-334 derived from *Porphyra vietnamensis*", *Pharmacognosy Research*, Vol.2, No.1, pp.45-49, Jun. 2010.  
DOI: <https://doi.org/10.4103/0974-8490.60578>
- [24] M. Yoshiki, K. Tsuge, Y. Tsuruta, T. Yoshimura, K. Koganemaru, T. Sumi, T. Matsui, K. Matsumoto, "Production of new antioxidant compound from mycosporine-like amino acid, porphyra-334 by heat treatment", *Food Chemistry*, Vol.113, No.4, pp.1127-1132, Apr. 2009.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.087>

장 성 주(Sung Joo Jang)

[정회원]



- 2004년 8월 : 중앙대학교 식품공학과 (이학석사)
- 2004년 7월 ~ 2008년 6월 : 중근당 종합연구소 주임연구원
- 2008년 7월 ~ 2010년 2월 : 안전성평가연구소 선임연구원
- 2010년 3월 ~ 2011년 7월 : 한미약품 연구센터 선임연구원
- 2018년 1월 ~ 현재 : (주)바이오프디엔씨 책임연구원

<관심분야>

의약품, 화장품, 식품, 바이오

이 삭(Sak Lee)

[정회원]



- 2017년 2월 : 세명대학교 한방식품과학과 (이학사)
- 2019년 5월 ~ 현재 : (주)바이오에프디엔씨 주임연구원

<관심분야>

의약품, 생명과학, 천연물

허 경 연(Kyoung Yeon Heo)

[정회원]



- 2018년 2월 : 충북대학교 원예과 학과 (학사)
- 2021년 8월 : 충북대학교 원예과 학과 (원예학석사)
- 2018년 8월 ~ 2021년 8월 : (주)웰그린 주임
- 2021년 8월 ~ 현재 : (주)바이오 에프디엔씨 주임

<관심분야>

식물세포배양 및 대량배양

---

이 정 훈(Jeong Hun Lee)

[정회원]



- 2000년 2월 : 고려대학교 생물학과 (이학사)
- 2005년 11월 ~ 현재 : (주)바이오 에프디엔씨 부사장

<관심분야>

바이오, 화장품, 식물세포

---

모 상 현(Sang Hyun Moh)

[종신회원]



- 2003년 8월 : 광주과학기술원 생명과학과 (이학석사)
- 2013년 2월 : 성균관대학교 나노과학기술협동학부 (이학박사)
- 2005년 11월 ~ 현재 : (주)바이오 에프디엔씨 대표이사

<관심분야>

생명과학, 나노과학