(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0118407
(43) 공개일자 2014년10월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01N 65/24 (2009.01) *A01P 17/00* (2006.01)
A01P 1/00 (2006.01) *A01P 13/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0034247
(22) 출원일자 2013년03월29일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)
(72) 발명자
홍용기
부산광역시 해운대구 해운대해변로 85, 우동경동아파트103동703호
신현웅
충청남도 아산시 서부북로 973, 102동 1302호 (배미동,서진배미마을아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
박병석, 서장찬

전체 청구항 수 : 총 8 항

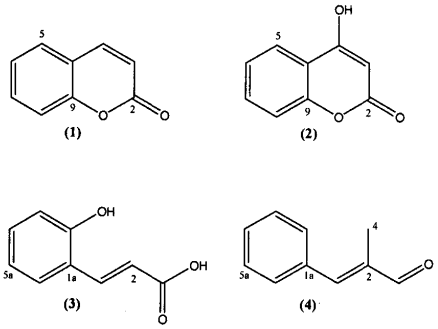
(54) 발명의 명칭 **계피식물 신나모뭄 로우레이로이에서 분리된 쿠마린 또는 이의 유도체를 포함하는 방오용 조성물 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

활성 방오 화합물인 쿠마린과 이의 유도체를 계피나무 *신나모뭄 로우레이로이(Cinnamumum loureiroi)*로부터 분리하였다. 방오활성은 *울바 페르투사(Ulva pertusa)* 및 *나비쿨라 안넥사(Navicula annexa)*와 같은 대표적인 연성 부착생물 유기체에 대해 측정하였다. 방오활성을 나타내는 화학 성분은 핵 자기 공명, 및 고 분해 질량 분광기 데이타의 해석에 의해 쿠마린, 하이드록시쿠마린, 쿠마르산, 및 신남알데하이드로 확인되었다. 이들 화합물은 조(crude) 신나모뭄 아종 메탄올 추출물 1.09g으로부터 분리되어 각각 18.4mg, 6.3mg, 9.8mg, 및 14.7mg의 쿠마린, 하이드록실쿠마린, 쿠마르산, 및 신남알데하이드로 수득되었다. 이들 화합물들은 구멍갈파래 포자를 0.13 내지 0.25㎍/mL의 EC_{50} 값으로 억제할 수 있으며 미세조류(N. annexa)를 0.21 내지 0.81㎍/mL의 EC_{50} 값으로 억제할 수 있다.

대 표 도 - 도1

계피 추출물로부터 분리한 쿠마린 및 이의 유도체의 구조



(1): 쿠마린
(2): 하이드록시쿠마린
(3): 쿠마르산
(4): 신남알데하이드

(72) 발명자

조지영

충청남도 아산시 신창면 온천대로 (
아모르원룸B-302)

김영도

인천광역시 계양구 동양로 100, 103동 1104호(동양동,주공뜨란채아파트)

특허청구의 범위

청구항 1

쿠마린, 하이드록실쿠마린, 쿠마르산 및 신남알데하이드로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 성분을 포함함을 특징으로 하는 방오용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 쿠마린, 하이드록실쿠마린, 쿠마르산 및 신남알데하이드가 계피로부터 추출되는 방오용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 쿠마린을 포함하는 방오용 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서, 하이드록실쿠마린을 포함하는 방오용 조성물.

청구항 5

제2항에 있어서, 신남알데하이드를 포함하는 방오용 조성물.

청구항 6

제2항에 있어서, 수중환경에서 연성 부착생물의 부착을 억제하는 방오용 조성물.

청구항 7

제7항에 있어서, 연성 부착생물이 *울바 페르투사(Ulva pertusa)* 및 *나비큘라 안넥사(Navicula annexa)*인 방오용 조성물.

청구항 8

계피로부터 추출된 쿠마린, 하이드록실쿠마린, 쿠마르산 및 신남알데하이드로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 성분을 첨가함을 특징으로 하는, 방오용 조성물의 제조방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 계피의 추출물에서 분리된 쿠마린 및 이의 유도체들 중의 하나 이상을 포함하는 친환경 방오용 조성물 및 당해 방오용 조성물의 제조방법에 관한 것이다.

[0002] 본 발명은 2012년 대한민국 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행되었다(한국연구재단-C1ABA001-201200029960).

배 경 기 술

[0003] 해수 및 담수 환경에서 생물의 부착현상은 인공구조물이나 배의 선체, 발전소와 공장의 냉각장치, 양식장의 그물 등에 부착하게 되어 시설물의 기능저하를 일으키며 기술적, 경제적 손실을 야기시킨다(참조: Callow and Edyvean, 1990). 당해 분야에서는 부착방지를 위해 기존에 주석을 함유한 방오제를 사용하여 왔으나, 국제해사기구(International Maritime Organization)(참조: IMO, 2001)의 사용규제로 인하여 이가롤(Igarol), 디크롤로플루아니드(dichlofluanid), 디우론(diuron) 등과 같은 물질이 대체 물질으로서 사용되고 있다(참조: Voulvoulis et al. 2000; Yamada 2007; 및 Cresswell et al. 2006). 그러나, 최근의 연구에 따르면, 이들 물질 또한 비표적 생물에 대한 독성을 지니며 한국 연안에서도 오염이 확인되고 있다. 이가롤과 디우론의 경우

식물에 대한 강한 독성(참조: Fernandez-Alba et al. 2002)과, 성게에 대해 배아독성(embryotoxicity)를 나타내고(참조: Manzo et al., 2006), 디클로플루아니드의 경우 발암성을 나타내는 것으로 보고되고 있다(참조: Fernandez-Alba et al. 2002). 또한 문헌[참조: Lee et al. (2010)]의 연구에 의하면, 한국연안에서 이르가롤의 오염은, 2006년도 조사에서는 23.80 ng/L였으며, 2009년의 경우는 67.64 ng/L로 증가하였고, 디클로프루아니드는 61.69 ng/L에서 74.79 ng/L로 오염도가 증가하고 있는 것으로 보고되었다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0004]

(비특허문헌 0001) Aguirre-Pranzoni C, Orden AA, Bisogno FR, Ardanaz CE, Tonn CE and Kurina-Sanz M. 2011. Coumarin metabolic routes in Aspergillus spp. Fungal Biol 115, 245-252. http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2010.12.009.

(비특허문헌 0002) Ali SM, Khan AA, Ahmed I, Musaddiq M, Ahmed KS, Polasal H, Rao LV, Habibullah CM, Sechi LA and Ahmed N. 2005. Antimicrobial activities of Eugenol and Cinnamaldehyde against the human gastric pathogen Helicobacter pylori. Annal Clinic Microbiol Antimicro 4, 1-7. http://dx.doi.org/10.1186/1476-0711-4-20.

(비특허문헌 0003) Callow ME and Edyvean RGV. 1990. Algal fouling and corrosion. In: Introduction to applied phycology. Akatsuka I, ed. SPB Academic Publishing, Netherlands, 369-387.

(비특허문헌 0004) Cho JY. 2012. Antifouling steroids isolated from red alga epiphyte filamentous bacterium Leucothrix mucor. Fish Sci 78, 683-689. http://dx.doi.org/10.1007/s12562-012-0490-8.

(비특허문헌 0005) Cho JY, Kwon EH, Choi JS, Hong SY, Shin HW and Hong YK. 2001. Antifouling activity of seaweed extracts on the green alga Enteromorpha prolifera and the mussel Mytilus edulis. J App Phycol 13, 117-125.

(비특허문헌 0006) Clare AS, Rittschof D, Gerhart DJ and Maki JS. 1992. Molecular approaches to nontoxic antifouling. Invertebr Reprod Dev 22, 67-76.

(비특허문헌 0007) Cralg WJ. 1999. Health-promoting properties of common herbs. Amer J Clin Nutr 70, 4915-4995.

(비특허문헌 0008) Cresswell T, Richards JP, Glegg GA and Readman JW. 2006. The impact of legislation on the usage and environmental concentrations of Irgarol 1051 in UK coastal waters. Marine Pollution Bulletin 52, 1169-1175. http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.01.014.

(비특허문헌 0009) El-Gendy MMA, Shaaban M, EL-Bondkly AM and Shaaban KA. 2008. Bioactive benzopyrone derivatives from new recombinant fusant of marine Streptomyces. Appl Biochem Biotechnol 150, 85-96. http://dx.doi.org/ 10.1007/s12010-008-8192-5.

(비특허문헌 0010) Faix S, Faixova Z, Placha I and Koppel J. 2009. Effect of Cinnamomum zeylanicum essential oil on antioxidative status in broiler chickens. Act Vet Brno 78, 411-417. http://dx.doi.org/10.2754/avb200978030411.

(비특허문헌 0011) Fernandez-Alba AR, Hernando MD, Piedra L and Chisti Y. 2002. Toxicity evaluation of single and mixed antifouling biocides measured with acute toxicity bioassays. Analytica Chimica Acta 456, 303-312.

(비특허문헌 0012) Fusetani N. 2011. Antifouling marine natural products. Nat Prod Rep 28, 400-410. http://dx.doi.org/10.1039/CONP00034E.

(비특허문헌 0013) Gende, LB, Floris I, Fritz R and Eguaras MJ. 2008. Antimicrobial activity of cinnamon (Cinnamomum zeylanicum) essential oil and its main components against Paenibacillus larvae from Argentine. Bulletin of Insectology 61, 1-4.

(비특허문헌 0014) Guenther H, Prestien J and Joseph-Nathan P. 1975. Carbon-13 NMR spectra of coumarin and methoxycoumarins-a reinvestigation of charge density/Chemical Shift Relations. Organic Magnetic Resonance 7, 339-344.

(비특허문헌 0015) Hadacek F, Muller C, Werner A, Greger H and Proksch P. 1994. Analysis, isolation and insecticidal activity of linear furanocoumarins and other coumarin derivatives from Peucedanum (Apiaceae: Apiodeae). J Chem Ecol 20, 2035-2054.

(비특허문헌 0016) Hoff WD, Dux P, Hard K, Devreese B, Nugteren-Roodzant IM, Crielaard W, Boelens R, Kaptein R, Van Beeumen J and Hellingwerf KJ. 1994. Thiol ester-linked p-coumaric acid as a new photoactive prosthetic group in a protein with rhodopsin-like photochemistry. Biochemistry 33 , 13959-13962.

(비특허문헌 0017) IMO (The International Maritime Organization). 2001. International convention on the control of harmful anti-fouling systems on ships. www.imo.org.

(비특허문헌 0018) Jin HJ, Kim JH, Sohn CH, DeWreede RE, Choi TJ, Tower GHN, Hudson JB and Hong YK. 1997. Inhibition of Taq DNA polymerase by seaweed extracts from British Columbia, Canada and Korea. J Appl Phycol 9, 383-388.

(비특허문헌 0019) Kim HO, Park SW and Park HD. 2004. Inactivation of Escherichia coli O157:H7 by cinnamic aldehyde purified from Cinnamomum cassia shoot. Food Microbiol 21, 105-110.

(비특허문헌 0020) Lacy A and O'Kennedy R. 2004. Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer. Cur Pharm Des 10, 3797-3811.

(비특허문헌 0021) Lake BG. 1999. Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment. Food Chem Toxicol 37, 423-453.

(비특허문헌 0022) Lee SE, Won HS, Lee YW and Lee DS. 2010. Study on the new antifouling compounds in Korean coasts. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 85, 538-543. http://dx.doi.org/10.1007/s00128-010-0145-3.

(비특허문헌 0023) Manzo S, Buono S and Cremisini C. 2006. Toxic effects of Irgarol and Diuron on sea urchin Paracentrotus lividus early development, fertilization, and offspring quality. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 51, 61-68. http://dx.doi.org/10.1007/s00244-004-0167-0.

(비특허문헌 0024) Nohara T, Kashiwada Y and Nishioka I. 1985. Cinncassiole E, a diterpene from the bark of Cinnamomum CASSIA. Phyrochmistry 24, 1849-1850.

(비특허문헌 0025) Ojala T, Remes S, Haansuu P, Vuorela H, Hiltunen R, Haahtela K and Vuorela P. 2000. Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. J Ethnopharma 73, 299-305.

(비특허문헌 0026) Prasad KN, Yang B, Dong X, Jiang G, Zhang H, Xie H and Jiang Y. 2009. Flavonoid contents and antioxidant activities from Cinnamomum species. Innovative Food Science and Emerging Technologies 10, 627-632. http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2009.05.009.

(비특허문헌 0027) Provasoli L. 1968. Media and prospects for the cultivation of marine algae. In A. Watanabe, A Hattori (eds), Cultures and Collections of Algae. Japanese Society Plant Physiology, Hakone: 63-75.

(비특허문헌 0028) Shin HW and Smith CM. 2001. Antifouling activity of six nontoxic chemicals on spore attachment of Ulva fasciata. J Environ Biol 22, 145-151.

(비특허문헌 0029) Subash Babu P, Prabuseenivasan P and Ignacimuthu S 2007. Cinnamaldehyde-A potential antidiabetic agent. Phytomedicine 14 , 15-22. http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2006.11.005.

(비특허문헌 0030) Todd JS, Zimmerman RC, Crews P and Alberte RS. 1993. The antifouling activity of natural and synthetic phenolic acid sulphate ester. Phytochem 34, 401-404.

(비특허문헌 0031) Voulvoulis N, Scrimshaw MD and Lester JN. 2000. Occurrence of four biocides utilised in antifouling paints, as alternatives to organotin compounds, in waters and sediments of a commercial estuary in the UK. Mar Poll Bull 40, 938-946.

(비특허문헌 0032) Wieczorek SK and Todd CD. 1998. Inhibition and facilitation of settlement of epifaunal marine invertebrate larvae by microbial biofilm cues. Biofouling 12, 81-118.

(비특허문헌 0033) Yamada H. 2007. Behaviour, occurrence, and aquatic toxicity of new antifouling biocides and preliminary assessment of risk to aquatic ecosystems. Bull Fish Res Agen 21, 31-45.

(비특허문헌 0034) Zang LY, Cosma G, Gardner H, Shi X, Castranova V and Than V. 2000. Effect of antioxidant protection by p-coumaric acid on low-density lipoprotein cholesterol oxidation. Am J Physiol Cell Physiol 279, 954-960.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 당해 분야에서 기존에 방오제로서 사용된 물질을 대체할 수 있는 새로운 방오제의 개발하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명은 상기한 목적을 달성하기 위해, 방오제 개발 대상 물질로서 주변에서 흔한 육상식물 추출물을 탐색하였다. 70여종의 식물 추출물을 파래 포자를 대상으로 방오효능을 탐색 한 결과, 계피 추출물에서 가장 좋은 효능을 확인하였다. 계피는 녹나무과(Lauraceae)의 식물로 250여 종이 보고되고 있으며 인도, 중국, 스리랑카, 베트남, 호주 등에 분포하는 것으로 알려져 있다(참조: Prasad et al. 2009). 계피로부터 쿠마린, 신남알데하이드, 신나몬 오일, 디테르페노이드(diterpenoids), 폴리페놀, 신남산 등의 물질이 분리되어 보고되었으며, 이들 물질과 이들의 유도체는 항균활성과 노화방지 효능 등의 다양한 생리활성을 가지는 것으로 보고되었다. 일례로, 신나몬 오일은 노화방지 효능을 보이며(참조: Gende et al. 2008; 및 Faix et al. 2009), 신나믹 알데하이드는 항균효과(참조: Kim et al. 2004), 신나몬 디테르펜은 알레르기 억제효과를 보인다(참조: Nohara et al. 1985). 또한 계피 추출물은, 경련억제, 항궤양, 담즙분비촉진, 진통효과, 항균, 해열, 지방분해효과 등의 효능이 있는 것으로 보고되어 있다(참조: Cralg 1999).

[0007] 계피에서 많은 물질이 분리되어 다양한 효능이 보고되고 있지만, 방오효능이 알려진 물질은 신남산 뿐으로 트랜스-신남산은 갈파래(*Ulva fasciata*)의 포자 부착을 저해하며(참조: Shin et al., 2001), p-(설포옥시)신남산은 해양 세균과 따개비의 부착을 저해하는 것으로 알려져 있다(참조: Todd et al., 1993). 본 발명에서는 다양한 생리활성이 보고된 계피의 추출물에서 방오효능을 나타내는 또 다른 물질을 분리하여 그 구조분석의 결과와 물질의 방오 효능을 밝혀내고자 한다.

[0008]

발명의 효과

[0009] 본 발명의 발명자들은 계피 추출물로부터 방오 효능을 나타내는 4가지의 활성 물질을 NMR과 HR-MS로 분석한 결과, 이들 물질이 각각 쿠마린, 하이드록실쿠마린, 쿠마린산 및 신남알데하이드인 것을 확인하였으며, 이들 물질을 연성 부착생물인 구멍갈파래(*Ulva pertusa*)의 포자와 부착성 미세조류(*Navicula annexa*)를 대상으로 실험한 결과 우수한 부착 방지 효능을 나타냄을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 계피 추출물로부터 분리한 쿠마린 및 이의 유도체들 각각의 구조를 도시한 것이다. 도 1에서 물질 (1)은 쿠마린을 나타내고; 물질 (2)는 하이드록실쿠마린을 나타내며; 물질 (3)은 쿠마린산을 나타내고; 물질 (4)는

신남알데하이드를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] **재료 및 방법**

[0012] **추출 및 분리**

[0013] 계피는 베트남산의 *신나모뭄 로우레이로이*(*Cinnamomum loureiroi*)(Saigon cinnamon, Vietnamese cassia. 또는 Vietnamese cinnamon)를 구입하여 파쇄하고 문헌[참조: Jin et al. (1997)]에 기술된 방법으로 80% 메탄올을 이용하여 추출하였다. 추출은 3회 반복하였고 진공농축기를 사용하여 메탄올을 증발시킨 후 40 mg/mL의 농도로 조제하였다. 추출물은 셀라이트(celite)에 흡착시켜 실리카겔(500 g; 70-230 메쉬(mesh)) 크로마토그래피를 통하여 1차 분리하였고, 전개 용매는 헥산, 에틸 아세테이트 및 메탄올을 비극성에서 극성으로 20% 간격의 비율로 혼합하여 단계별 구배(step-gradient)로 사용하였다. 분획구 중 방오활성을 나타내는 에틸아세테이트 : 메탄올(4:1, v/v)의 분획을 HPLC[아질런트(Agilent) 1200 시리즈; 제조원: 미국 캘리포니아주 산타 클라라에 소재하는 아질런트 테크놀로지스(Agilent Technologies)]를 이용하여 2차 분리를 실시하였다. 컬럼은 유본다팩(uBondapak) C8 역상 컬럼[10 × 250 mm, 10 μm; 제조원: 미국 캘리포니아주 토란스에 소재하는 페노메넥스(Phenomenex)]을 사용하였고, 아세토니트릴과 물(HPLC 등급)을 이동상으로 하여 등용매(isocratic)(30% 아세토니트릴)의 조건으로 분리하였다. 유속을 2 mL/분으로 하여 100분 동안 분리하였고, 물질의 검출은 UV 검출기(제조원: 미국 캘리포니아주 산타 클라라에 소재하는 아질런트 테크놀로지스))를 이용하여 220 nm에서 실시하였다.

[0014] **구조분석**

[0015] 분리된 물질은 고 해상 빠른 원자 충격 질량 분석법(high resolution fast atom bombardment mass spectrometer)[HR-FABMS, JMS HX 110; 제조원: 일본 소재의 제올(JEOL)]를 이용하여 질량분석을 실시하였다. 핵자기공명분석(nuclear magnetic resonance: NMR)은 JNM-ECP 600 NMR 분광법(JEOL)을 이용하였으며 용매는 메탄올-*d*(CD_3OD)를 이용하여 ^{1}H, ^{13}C, 상관분석법(correlation spectroscopy: COSY), 이종핵 다중 결합 상관관계(heteronuclear multiple bond correlation: HMBC), 이종핵 다중 양자 결합력(heteronuclear multiple quantum coherence: HMQC)등을 측정하였다.

[0016] **방오효능 검증**

[0017] 물질의 부착방지 효능은 대표적인 연성 부착생물인 구멍갈파래(*Ulva pertusa*)의 포자와 부착성 미세조류(*Navicula annexa*)를 대상으로 실험하였다. 파래는 2010년 6월 내지 7월에 안면도 암반에서 채집하였고 포자방출은 문헌[참조: Cho et al. (2001)]의 방법을 따랐다. 방출된 포자는 PES 배지(참조: Provasoli, 1968)에 현탁시켜 부착방지 효능 검증에 사용하였고 부착 기질로는 슬라이드글라스를 사용하였다. 슬라이드글라스(1 × 2.5 cm)는 10% HCl에 12 시간 동안 넣어둔 후 증류수에 다시 12 시간 넣은 후 세척하여 사용하였다. 슬라이드글라스를 24 웰 플레이트의 각각의 웰에 3개를 세워서 넣고 파래 포자(1 × 10^5개 세포/mL)를 PES 배지에 현탁하여 2 mL 용량으로 접종하였다. 추출물 또는 분리 물질을 주입하고 암기로 20℃에서 배양하였고 6시간 후 결과를 확인하였다. 부착성 미세조류 *나비큘라 안넥사*(*Navicula annexa*)는 한국미세조류 은행에서 분양 받아 F/2 배지에서 배양하였다. 배양은 20℃에서 70 μmol/m^2/s(암 : 광 = 12:12)의 광 조건으로 진탕 배양기에서 50 rpm으로 실시하였다. 효능검증을 위한 실험은 파래를 대상으로 한 실험과 동일한 방법으로 실시하였고, 2.5 × 10^4개의 세포/mL의 농도로 접종하여 7일 배양 후 부착여부를 확인하였다(참조: Cho, 2012). 실험에 사용한 물질은 DMSO에 녹여 접종하였으며 음성대조군으로는 DMSO를 사용하였고, 양성대조군으로는 이르가롤을 사용하였다. 물질의 방오효능은 LC_{50} (반수치사농도)와 EC_{50} (반수영향농도)를 구하여 효능계수(therapeutic ratio)로 나타내었다(참조: Clare 1992). 효능계수는 독성에 대한 효능의 비율을 나타낸 것으로 값이 15 이상인 경우 친환경의 방오효능을 가진 것으로 판단한다(참조: Fusetani, 2011).

[0018] **결과 및 고찰**

[0019] **활성물질 분리 및 효능**

[0020] 부착방지 물질의 분리를 위해 계피(건중량 17.6 g)로부터 추출물 1.09 g을 얻었고 실리카 겔 크로마토그래피와 역상 HPLC를 이용하여 분리하였다. 먼저 실리카 겔 크로마토그래피로 분리한 결과 9개의 분획구를 얻었고 그 중 파래 포자를 대상으로 한 실험에서 부착억제 효능을 나타내는 2개의 분획구를 확인하였다. 분획구 6은 에틸 아세테이트 : 메탄올(4 : 1)을 전개용매로 하였고, 포자 부착억제에 대한 4.6 μg/mL의 EC_{50} 값을 나타내었다. 이 분획구는 다른 분획구에 비해 가장 높은 활성이 보였으며 91 mg을 얻었다. 분획구 7(126 mg)은 에틸 아세테이트 : 메탄올(1 : 1)를 전개용매로 하였고 포자 부착억제에 대한 5.3 μg/mL의 EC_{50} 값을 나타내었다. 분획구 6은 HPLC를 통해 2차 분리를 실시하였고 30% 아세토니트릴을 이용한 등용매 조건에서 4개의 활성물질의 피크를 확인하였다. 각 물질의 피크는 29, 35, 45, 75 분에서 나타났으며, 물질의 양은 각각 18.4 mg, 6.3 mg, 9.8 mg 및 14.7 mg 이었다.

[0021] 본 실험에서 계피에서 추출한 각 활성물질의 방오효능을 측정한 결과, 파래 포자의 부착방지 효능에서 EC_{50} 값은 0.13 내지 0.25 μg/mL로 나타났으며 LC_{50} 값은 12 내지 29 μg/mL였다. 그 중 물질 (2)는 가장 낮은 EC_{50} 값을 보였고 효능계수는 92.3이었다(표 1).

표 1

[0022] 쿠마린 및 이의 유도체에 의한 *울바 페르투사(Ulva pertusa)*의 정포자들(zoospores) 부착의 억제

화합물(μg/mL)	LC_{50}	EC_{50}	LC_{50}/EC_{50}
화합물 (1)	13	0.18	72.2
화합물 (2)	12	0.13	92.3
화합물 (3)	20	0.25	166.7
화합물 (4)	29	0.24	120.8

[0023] 또한 미세조류 부착방지 효능에서 EC_{50} 값은 0.21 내지 0.81 μg/mL로 나타났으며 LC_{50} 값은 15 내지 48 μg/mL였다. 그 중 물질 (2)가 가장 낮은 EC_{50} 값을 보였고 효능계수는 71.4로 가장 우수하였다(표 2).

표 2

[0024] 쿠마린 및 이의 유도체에 의한 *나비큘라 안넥사(Navicula annexa)*의 규조토 부착(diatom settlement)의 억제

화합물 (μg/mL)	LC_{50}	EC_{50}	LC_{50}/EC_{50}
화합물 (1)	20	0.35	57.1
화합물 (2)	15	0.21	71.4
화합물 (3)	40	0.64	109.3
화합물 (4)	48	0.81	59.3

[0025] **구조분석**

[0026] 계피추출물의 분획구 6에서 분리한 4개의 활성물질은 NMR과 HR-MS로 분석한 결과, 물질은 각각 쿠마린(1), 하이드록실쿠마린(2), 쿠마린산(3), 신남알데하이드(4)로 확인되었고 분석결과는 하기 표 3 및 4에 각각 나타내었다.

표 3

[0027] 쿠마린 및 이의 유도체에 대한 ^{13}C-NMR 스펙트럼 데이타

	화합물(1)	**화합물(2)**	**화합물(3)**	**화합물(4)**
위치	δC	δC	δC	δC

1			171.6	191.2
2	162.7	162.7	121.3	134.6
3	117.3	95.6	146.5	141.8
4	145.6	164.8		9.7
5	129.4	129.5		
6	125.8	125.8		
7	133.1	133.1		
8	117.6	117.6		
9	155.4	155.5		
10	120.3	119.5		
1a			123.4	142.6
2a			161.0	131.2
3a			121.8	136.4
4a			132.4	132.4
5a			124.3	136.4
6a			129.8	131.3

표 4

[0028] 쿠마린 및 이의 유도체에 대한 ^{1}H - NMR 스펙트럼 데이타

	화합물(1)	화합물(2)	화합물(3)	화합물(4)
위치	δH	δH	δH	δH
1				8.91
2			6.56	
3	6.43 d	6.45 d	6.95	6.98
4	7.95 d			1.91
5	7.57	7.56		
6	7.34	7.34		
7	7.49	7.48		
8	7.32	7.32		
9				
10				
1a				
2a				7.42
3a			7.12	7.35
4a			7.21	7.28
5a			7.19	7.31
6a			7.46	7.53

[0029] 물질 (1)은 HR-FABMS 질량분석 결과, 146.1024($[M+H]^+$)로 분자량은 145로 나타났으며, ^{1}H-NMR과 ^{13}C-NMR을 통해 분자식은 $C_9H_6O_2$인 것으로 확인되었다. ^{1}H-NMR에서는 6개의 시그날을 확인하였고 그것은 각 δ 6.43 (H-3: 1H, d), 7.95 (H-4: 1H, d), 7.57 (H-5: 1H), 7.34 (H-6, 1H), 7.49 (H-7: 1H), 7.32 (H-8: 1H)이었다. ^{13}C-NMR에서는 9개의 시그날을 확인하였고 δ 162.7 (C-2), δ 117.3 (C-3), 145.6 (C-4), 129.4 (C-5), 125.8 (C-6), 133.1 (C-7), 117.6 (C-8), 155.4 (C-9), 120.3 (C-10)이었다. NMR 분석 결과와 문헌[Gunther et al. (1975)]에 보고된 자료를 비교한 결과, 물질(1)은 쿠마린으로 확인되었다[도 1의 (1)].

[0030] 물질 (2)는 질량분석 결과, 162.0974 ($[M+H]^+$)로 분자량은 165였으며 ^{1}H-NMR과 ^{13}C-NMR을 통한 분자식은 $C_9H_6O_3$이었다. ^{1}H-NMR에서는 δ 6.45 (H-3: 1H, d), 7.56 (H-5: 1H), 7.34 (H-6, 1H), 7.48 (H-7: 1H), 7.32 (H-8: 1H) 등의 5개의 시그날을 나타내었고, ^{13}C-NMR에서는 δ 162.7 (C-2), 95.6 (C-3), 164.8 (C-4), 129.5 (C-5), 125.8 (C-6), 133.1 (C-7), 117.6 (C-8), 155.5 (C-9), 119.5 (C-10)의 9개의 시그날을 나타내었다. NMR의 분

석 결과와 문헌[참조: Gunther et al. (1975)]이 보고한 문헌의 자료를 비교한 결과 물질(2)는 하이드록실쿠마린으로 확인되었다[도 1의 (2)].

[0031] 물질 (3)은 질량분석 결과, 164.1187 ($[M+H]^+$)이며 분자량은 163이었으며, ^{1}H-NMR과 ^{13}C-NMR을 통해 분자식은 $C_9H_8O_3$로 나타났다. ^{1}H-NMR에서는 6개의 시그날을 확인하였고 그것은 각각 δ 6.56 (H-2: 1H), 6.95 (H-3: 1H), 7.12 (H-3a, 1H), 7.21 (H-4a: 1H), 7.19 (H-5a: 1H), 7.46 (H-6a: 1H)이었다. ^{13}C-NMR에서는 δ 171.6 (C-1), 121.3 (C-2), 146.5 (C-3), 123.4 (C-1a), 161.0 (C-2a), 121.8 (C-3a), 132.4 (C-4a), 124.3 (C-5a), 129.8 (C-6a)의 9개의 시그날을 확인하였다. 문헌[참조: Hoff et al. (1994)]에 보고된 자료와 비교한 결과, 물질(3)은 쿠마린 산으로 확인되었다[도 1의 (3)].

[0032] 물질(4)는 질량분석 결과, 146.1346 ($[M+H]^+$)으로 분자량은 145이며 분자식은 $C_{10}H_{10}O$인 것으로 확인되었다. ^{1}H-NMR에서는 δ 8.91 (H-1: OH), 6.98 (H-3: 1H), 1.91 (H-4, 3H), 7.42 (H-2a: 1H), 7.35 (H-3a: 1H), 7.28 (H-4a: 1H), 7.31 (H-5a: 1H), 7.53 (H-6a: 1H) 등의 8개의 시그날을 확인하였고, ^{13}C-NMR에서는 δ 191.2 (C-1), 134.6 (C-2), 141.8 (C-3), 9.7 (C-4), 142.6 (C-1a), 131.2 (C-2a), 136.4 (C-3a), 132.4 (C-4a), 136.4 (C-5a), 131.3 (C-6a)로 10개의 시그날을 확인하였다. 문헌[참조: Subash Babu et al. (2007)]에 보고된 자료와 비교한 결과, 물질(4)는 신남알데하이드로 확인되었다[도 1의 (4)].

[0033] 쿠마린은 벤조피론 그룹의 물질로 벤젠 고리와 피론 고리로 구성되며 많은 식물에서 분리가 보고되고 있다. 이것은 에센셜 오일(essential oil), 계피 껍질 오일(cinnamon bark oil), 계수나무 잎 오일(cassia leaf oil), 라벤더 오일(lavender oil) 등에서 많이 발견되고(참조: Lacy and O'Kennedy 2004), 그 유도체들은 *스트렙토마이세스*(*Streptomyces*), *아스퍼길러스*(*Aspergillus*)와 같은 미생물에서도 분리가 보고 되었다(참조: El-Gendy et al. 2008; 및 Aguirre-Pranzoni et al. 2011). 쿠마린은 6개의 탄소 자리가 하이드록실화에 의해 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-하이드록시쿠마린들 또는 6,7-디하이드록시쿠마린으로 생합성 되어진다. 또한 펼쳐진 피론 환의 형태로 부터 o-하이드록시페닐아세트알데하이드, o-하이드록시페닐에탄올, o-하이드록시페닐아세트산, o-하이드록시페닐 락트산, o-하이드록시페닐프로피온산, o-쿠마르산 등이 생성된다(참조: Lake 1999). 쿠마린과 그 유도체들은 다양한 생리활성을 가진 것으로 보고되고 있다. 예를 들어, 푸라노쿠마린은 살충효과를 나타내며(참조: Hadacek et al. 1994), 스코폴레틴(scopoletin), 움벨리페론(umbelliferone), 크산토톡신(xanthotoxin), 헤르니아린(herniarin) 등은 항균효과를 나타낸다(참조: Ojala et al. 2000). 쿠마르산은 항산화효과가 보고되었고(참조: Zang et al. 2000), 신남알데하이드는 *헬리코박터 필로리*(*Helicobacter pylori*)에 대해 항균활성을 나타낸다(참조: Ali et al. 2005).

[0034] 본 발명에서 계피로부터 분리된 물질의 방오효능은 방오 효능계수로 나타내었으며, 상용되고 있는 이르가롤의 효능계수는 15 이하인 반면 쿠마린과 이의 유도체들은 최소 72.3 이상으로서, 이는 쿠마린과 이의 유도체가 친환경의 방오제로서 가능성이 있음을 보여주는 값이다. 방오효능의 결과, 쿠마린과 하이드록실쿠마린은 쿠마르산과 신남알데하이드 보다 더 효과가 뛰어나며, 이것은 폐환(close ring)이 개방환(open ring)보다 방오효능에서는 더 효과가 있는 것으로 보여진다.

[0035] 수중환경에서 생물 부착의 초기과정은 부착성 미세조류와 해조류 포자와 같은 연성생물이 주를 이루며, 이들은 중합체를 분비하여 생물막(biofilm)을 형성한다. 무척추동물의 유생은 이들의 중합체와 생물막을 인식하여 2차적인 부착이 일어나게 된다(참조: Wieczorek and Todd, 1998). 따라서 초기 연성 생물의 부착을 억제하는 것은 수중환경에서 생물의 부착을 막을 수 있는 가장 효과적인 방법이 될 것이다(참조: Cho, 2012).

산업상 이용가능성

[0036] 본 발명의 효능검증에서는 대표적인 연성 부착생물인 *유. 페르투사*(*U. pertusa*)와 *엔. 안넥사*(*N. annexa*)를 사용하였고, 이들의 억제를 통해 2차적인 무척추동물의 부착을 억제할 수 있을 것이다. 방오제의 개발은 해양환경의 보호를 위해 중요한 과제일 뿐만 아니라 친환경의 방오제의 개발은 방오도료 산업에도 필수적인 과제이다. 당해 기술분야에서 쿠마린과 이의 유도체들의 방오효능에 대한 발명은 본 발명에서 최초로 완성된 것이며 이러한 물질들을 혼합한 친환경 방오도료를 개발할 수 있을 것이다.

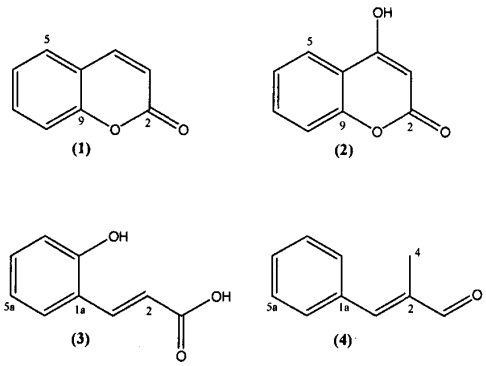
[0037] 이상, 본 발명은 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구체적인 양태들을 설명하였지만, 본 발명이 속하는 기술

분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 그 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 양태들은 모든 면에서 단지 예시적인 것이며 한정적인 것이 아니라는 것으로 이해하여야 한다.

도면

도면1

계피 추출물로부터 분리한 쿠마린 및 이의 유도체의 구조



(1): 쿠마린

(2): 하이드록시쿠마린

(3): 쿠마르산

(4): 신남알데하이드