(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2013 년 8 월 22 일 (22.08.2013)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2013/122304 A1

(51) 국제특허분류:
A01N 37/18 (2006.01) *A01N 65/24* (2009.01)
A01N 37/20 (2006.01) *A01P 17/00* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2012/008991

(22) 국제출원일: 2012 년 10 월 30 일 (30.10.2012)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2012-0016232 2012 년 2 월 17 일 (17.02.2012) KR

(71) 출원인: **계명대학교 산학협력단 (INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION KEIMYUNG UNIVERSITY)** [KR/KR]; 704-701 대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 계명대학교 성서캠퍼스 대학원 300 호, Daegu (KR).

(72) 발명자: **이삼빈 (LEE, Sam Pin)**; 704-974 대구광역시 달서구 선원로 171, 성서무지개타운 102 동 306 호, Daegu (KR). **이인선 (LEE, In Seon)**; 706-934 대구광역시 수성구 청수로 261, 캐슬골드파크 1416 동 1803 호, Daegu (KR). **김배환 (KIM, Bae Hwan)**; 706-934 대구광역시 수성구 청수로 261, 캐슬골드파크 1116 동 503 호, Daegu (KR). **유미희 (YU, Mi Hee)**; 711-782 대구광역시 달성군 다사읍 죽곡 1 길 42, 대실역 e-편한세상아파트 103 동 1810 호, Daegu (KR). **박성진 (PARK, Sung Jin)**; 706-090 대구광역시 대구광역시 수성구 무학로 189, 녹원맨션 110 동 805 호, Daegu (KR). **이진호 (LEE, Jin Ho)**; 704-741 대구광역시 달서구 호산로 126, 삼성한국형아파트 118 동 1803 호, Daegu (KR). **박민주 (PARK, Min Ju)**; 706-220 대구광역시 수성구 달구벌대로 3081, 은세계맨션 101 동 1113 호, Daegu (KR). **김지은 (KIM, Ji Eun)**; 704-080 대구광역시 달서구 대명천로 12 안길 40, 대영하이츠 1 동 302 호, Daegu (KR). **이지훈 (LEE, Ji Hoon)**; 700-413 대구광역시 중구 동덕로 30 길 104-5, Daegu (KR).

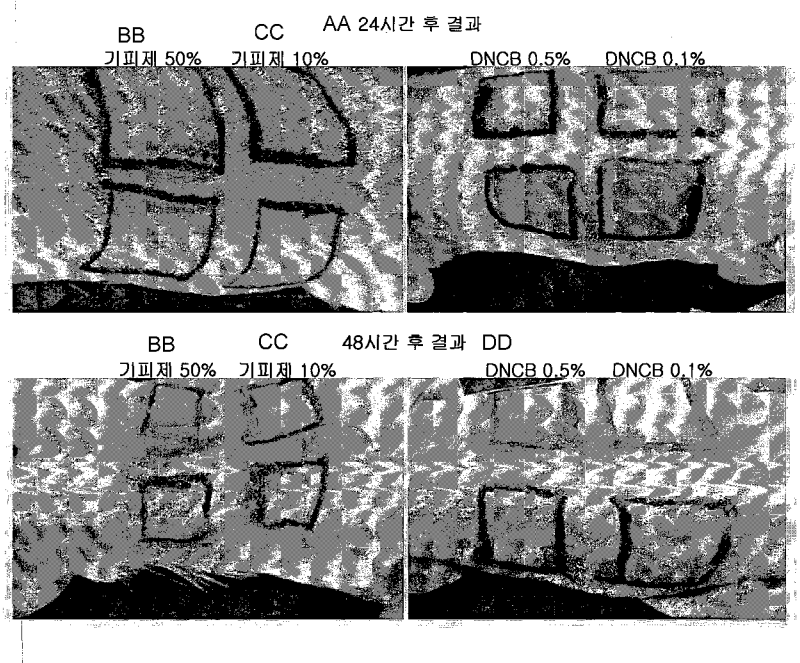
(74) 대리인: **양부현 (YANG, Boo-Hyun)**; 151-832 서울특별시 관악구 인헌동 1659-2 청동빌딩 301 호, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD,

[다음 쪽 계속]

(54) **Title**: COMPOSITION FOR REPELLING INSECTS COMPRISING IR 3535 DERIVATIVE AS ACTIVE INGREDIENT

(54) **발명의 명칭** : IR 3535 유도체를 유효성분으로 포함하는 곤충 기피용 조성물



AA ... Results after 24 hours
BB ... Repelling agent 50%
CC ... Repelling agent 10%
DD ... Results after 48 hours

(57) **Abstract**: The present invention relates to an insect-repelling composition comprising an IR 3535 derivative as an active ingredient. Also, the present invention provides an insect-repelling composition comprising an IR 3535 derivative and a cinnamon supercritical-based oil as active ingredients. The composition of the present invention exhibits a marked insect-repelling effect since the composition has outstanding aromatic properties and durability.

(57) **요약서**: 본 발명은 IR 3535 유도체를 유효성분으로 포함하는 곤충 기피 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 IR 3535 유도체 및 계피 초임계 오일을 유효성분으로 포함하는 곤충 기피 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물은 우수한 방향성 및 지속력을 갖고 있어 현저한 곤충 기피 효과를 나타낸다.

WO 2013/122304 A1

SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

【명세서】

【발명의 명칭】

IR 3535 유도체를 유효성분으로 포함하는 곤충 기피용 조성물

【기술분야】

본 발명은 IR 3535 유도체를 유효성분으로 포함하는 곤충 기피용, 특히 모기 기피용 조성물에 관한 것이다.

【배경기술】

모기는 지구상에 약 3,500종이 알려져 있고, 한국에서는 9속 55종이 기록되어 있다. 이러한 모기에 대한 피해는 1974년 아프리카 에티오피아에서 발견된 오스트랄로피테쿠스 유골의 사인이 말라리아라(malaria)라는 추론이 있다. 모기는 일반적으로 교미 후 암컷 성충의 난을 성숙시키기 위하여 동물에서 단백질을 얻기 위한 흡혈 활동을 하게 되며, 흡혈부위에 알레르기의 원인이 되는 타액(saliva)을 분비하게 된다. 이때 모기의 침샘 내 병원성 바이러스 균이 잠복된 경우 사람에게 질병을 매개하게 되는데, 그 대표적인 질병이 뎅기열(dengue hemorrhagic fever), 뇌염(encephalitis), 황열병(yellow fever) 등이다. 말라리아와 뎅기열에 의한 사망 인구는 매년 백만 명 이상으로 1일 기준 3,000명 이상의 사람들이 목숨을 잃고 있으며, 그 중 대부분이 어린 아동인 것으로 보고되고 있다. 오늘날에는 과학의 발달로 인한 환경오염과 지구 온난화로 모기의 출현 기간 및 발생빈도가 더욱 증가하고 있다.

이러한 모기를 생활공간으로부터 방제하기 위하여 이용된 방법 중 하나가 기피제이다. 모기 기피제는 야외에서의 사용이 제한되는 살충제대신 개인의 보호방법으로 이용된다. 주로 에어로졸이나, 액체, 로션의 제형으로 이용되고 있으며, 대표적인 기피성분은 합성 화합물(synthetic compounds)와 천연성분(natural compounds)으로 나눈다. 모기 기피제의 주요 성분으로는 유기인계 및 피레드로이드계 살충제를 사용하고 있으며 세계적으로 가장 널리 사용되는 성분 DEET(N, N-diethyl-m=toluamide)이다. 1964년 미국의 군용보급품으로 사용되어 전 세계적으로 보급되어 사용되고 있다. 하지만, 인체의 서로 다른 부위에

적용했을 때, 시간 경과에 따른 유효 잔존량이 다르고 사람의 피부를 통한 침투율이 높고, 경구독성 때문에 임산부나 어린아이 등에서 아직 안정성이 입증되지 않았다. 이러한 화학적 합성 모기 기피제에 대한 문제점을 보완하기 위해서 천연성분인 식물정유를 이용한 기피제의 연구가 진행되고 있지만 지속성이 짧고, 기피효과를 위해서 많은 양을 첨가해야 되는 문제점이 있다.

본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

【발명의 내용】

【해결하려는 과제】

본 발명자들은 인체에 무해하면서 곤충, 특히 모기에 대해 높은 기피활성을 갖는 곤충 기피제를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, IR 3535 유도체가 인체에 무해하면서도 우수한 곤충, 특히 모기 기피 효과를 가진다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서, 본 발명의 목적은 곤충 기피용 조성물을 제공하는데 있다.

본 발명의 다른 목적은 곤충 기피용 화장료 조성물을 제공하는데 있다.

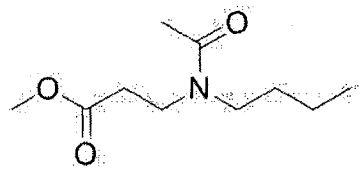
본 발명의 또 다른 목적은 곤충 기피 방법을 제공하는데 있다.

본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명 및 청구범위에 의해 보다 명확하게 된다.

【과제의 해결 수단】

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 포함하는 곤충 기피(insect repellent) 조성물을 제공한다:

[화학식 1]



본 발명자들은 인체에 무해하면서 곤충, 특히 모기에 대해 높은 기피활성을 갖는 곤충 기피제를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, IR 3535 유도체인 상기 화학식 1의 화합물이 인체에 무해하면서도 우수한 곤충, 특히 모기 기피 효과를 가진다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 IR 3535 유도체로서의 상기 화학식 1의 화합물은 IR 3535로부터 화학적으로 합성할 수 있다.

IR 3535 유도체의 합성은 당업계에 공지된 다양한 화학적 합성 방법을 이용할 수 있다. 바람직하게는 선구 물질인 IR 3535에 염화아세트산 및 피리딘을 처리하여 반응시키고, 감압여과 한 후 크로마토그래피로 정제하여 수득한다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 상기 화학식 1의 화합물은 현저한 모기 기피 효과(표 3)를 나타내며, 피부에 적용하였을 때 피부 자극 또는 피부 감작을 유발시키지 않는다(표 19, 24).

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 곤충 기피 조성물의 총 중량에 대하여 상기 화학식 1의 화합물의 함량은 0.1-30 중량%이며, 바람직하게는 0.1-25 중량%이고, 보다 바람직하게는 1-20 중량%이며, 보다 더 바람직하게는 1-15 중량%이고, 가장 바람직하게는 1-10 중량%이다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 곤충은 모기, 파리, 개미, 벌, 귀뚜라미, 노린재, 부채벌레, 벼룩, 풍뎅이, 사마귀 또는 바퀴벌레이며, 바람직하게는 모기, 파리, 개미, 벌, 부채벌레 또는 벼룩이고, 보다 바람직하게는 모기, 파리, 개미 또는 벌이며, 가장 바람직하게는 모기이다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 계피 초임계 오일을 추가적으로 포함한다.

본 발명의 조성물에 포함되는 계피 초임계 오일은 기본적으로 초임계유체 추출 과정에 따라 제조될 수 있다. 초임계 추출의 원재료인 계피(Cinnamomum verum)를 적합한 크기의 입자 분말 형태가 되도록 파쇄하여 사용한다. 본 발명의 방법에서 사용할 수 있는 초임계 추출용기는 온도와 압력이 조절될 수 있으며, 추출원료와 초임계 유체가 접촉하도록 구성된 용기이면 특별히 한정되지 않는다.

본 발명에서 이용되는 초임계유체는 당업계에서 통상적으로 이용되는 다양한 초임계유체를 포함하며, 바람직하게는 물 또는 이산화탄소를 사용한다.

상기 초임계유체와 함께 사용되는 보조용매는 당업계에서 통상적으로 이용되는 극성 용매를 포함하며, 바람직하게는 알코올, 물, 에틸렌글라이콜, 폴리에틸렌글라이콜, 프로필렌카보네이트, 포름산, 아세트산, 아세토니트릴, 클로로디프루오로메탄 또는 이의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택되며, 보다 바람직하게는 메탄올, 에탄올, 프로판올, 1-헥사놀, 2-메톡시에탄올 및 그의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 알코올이고, 보다 더 바람직하게는 메탄올 또는 에탄올이며, 가장 바람직하게는 에탄올이다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 초임계 추출에서의 압력은 100-500 bar, 보다 바람직하게는 200-400 bar, 가장 바람직하게는 300-400 bar이다.

본 발명의 다른 바람직한 구현 예에 따르면, 상기 초임계 추출에서의 온도는 10-100℃, 보다 바람직하게는 30℃-70℃, 보다 더 바람직하게는 30-50℃이고, 가장 바람직하게는 30-40℃이다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 계피 초임계 오일은 계피를 온도 30-40℃ 및 압력 200-400 bar에서 초임계 추출하여 수득한다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 곤충 기피용 조성물의 총 중량에 대하여 계피 초임계 오일의 함량은 0.1-25 중량%이며, 바람직하게는 0.1-20 중량%이고, 보다 바람직하게는 1-20 중량%이며, 보다 더 바람직하게는 1-15 중량%이고, 가장 바람직하게는 1-10 중량%이다.

-30-

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 곤충 기피용 조성물의

화장품학적 유효량; 및 화장품학적으로 허용되는 담체를 포함하는 곤충 기피용 화장료 조성물을 제공한다.

본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 성분은 유효 성분으로서 상기 모기 기피용 조성물 이외에 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함하며, 예컨대 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함한다.

본 발명의 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클린싱, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 유연 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이 크림, 클렌징 크림, 클렌징 포옴, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.

본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.

본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.

본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.

본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄

에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.

본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 본 발명의 곤충 기피용 화장료 조성물을 피부에 도포하는 단계를 포함하는 곤충 기피 방법을 제공한다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 본 발명의 곤충 기피 조성물 조성물을 방충 효과를 얻고자 하는 영역에 적용(applying) 하는 단계를 포함하는 곤충 기피 방법을 제공한다.

【발명의 효과】

본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

(i) 본 발명은 IR 3535 유도체로서의 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 포함하는 곤충 기피 조성물을 제공한다.

(ii) 본 발명은 화학식 1의 화합물 및 계피 초임계 오일을 유효성분으로 포함하는 곤충 기피 조성물을 제공한다.

(iii) 본 발명의 조성물은 우수한 방향성 및 지속력을 갖고 있어 현저한 모기곤충 기피 효과를 나타낸다.

(iv) 본 발명은 곤충 기피 화장료 조성물을 제공한다.

(v) 본 발명은 곤충 기피 화장료 조성물을 피부에 도포하는 단계를 포함하는 곤충 기피 방법을 제공한다.

(vi) 본 발명은 곤충 기피 조성물을 방충 효과를 얻고자 하는 영역에 적용(applying) 하는 단계를 포함하는 곤충 기피 방법을 제공한다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 시험물질의 모기 기피 효과를 확인하기 위해 제작한 사육장에 대한 모식도이다.

도 2는 본 발명의 본 발명의 화학식 1의 화합물인 IR 3535 유도체(LJH-1-58)의 화학 구조식을 나타낸 그림이다.

도 3은 시험물질에 대한 안점막자극시험에서 시험물질의 점안 및 세척 과정을 나타낸 그림이다.

도 4는 시험물질에 대한 안점막자극시험 결과를 나타낸 그림이다.

도 5는 시험물질에 대한 피부 일차자극시험 시 처치 과정을 나타낸 그림이다.

도 6은 시험물질에 대한 피부 일차자극시험 결과를 나타낸 그림이다.

도 7은 시험물질에 대한 피부 감작성 시험 시 처치 과정을 나타낸 그림이다.

도 8은 시험물질에 대한 피부 감작성 시험 결과를 나타낸 그림이다.

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예

재료 및 방법

시험곤충

본 실험에 사용된 모기는 흰줄숲모기(Aedes albopictus)와 빨간집모기(Cx. pipiens pallens)의 유충을 채집 및 분양 받아 누대 사육하였다. 온도 25-28℃, 습도는 75-95%, 광조건은 16:8(L:D)를 유지하면서 10% 설탕물을 공급하고 흡혈을 위해 SD 랫트(4 주령)를 공급하였고, 난괴는 10 X 10 X 10 cm 의 작은 상자에 모기종류 별로 구분하여 수거하였고, 매일 증류수를 공급하면서 성장 단계별로 유충을 구별하여 식이(fish diet)를 증가시키면서 공급하였고, 최종으로 성장한

번데기는 매일 건져서 성충 사육장(40 X 30 X 20)(도 1)에서 사육하였다. 성충은 성장주기에 따라 구분하여 교미시켜 흡혈력을 유지하였다.

생물 검정(Arm-in-cage test)

기피 실험은 가로 40, 세로 30, 높이 30 cm 규격의 상자에 천을 연결하여 손에서 팔 일부만을 노출 시키고 나머지 부분은 보호 할 수 있도록 제작하였다. 기피력 평가는 성충 주령 5 일 이상의 교미된 암컷 50 마리를 기피실험 상자에 방사하여 실험하였고, 실험 6-8 시간 전 10% 설탕물 공급을 중단하여 절식한 후, 실험 하였다. 흰줄숲모기의 경우는 24 시간 흡력이 가능한 종이지만 가장 활발한 시간을 관찰하여 오전 10 시, 오후 8 시에 각각 실험하였고, 야행성인 빨간집모기는 오후 7 시 30 분에서 10 시 30 분 사이 암 조건하에서 모기가 인식할 수 없는 파장인 빨간색 조명만을 사용하여 실험하였다. 실험 시 온도는 27±1℃, 상대습도 75±5%, 노출부위는 시료 별로 각각 5 분씩 노출하였으며, 노출 부위에 1 mL 의 시료를 고르게 도포하였다. 모기는 샘플에 따라 매번 바꾸었으며 3 회 반복하여 실험하였고, 대조구로는 24% DEET 를 사용하였다. 바이팅 횟수는 5초 이상 랜딩한 모기와 바이팅한 모기를 카운팅 하였다.

3-(뷰틸아미노)프로판산 메틸 에스터의 합성

아크릴산 메틸 에스터(2.40 g, 2.73 X 10^{-2} moL)를 아세토나이트릴 5 mL 에 녹인 후, n-뷰틸아민(1 g, 1.36 X 10^{-2} moL)을 넣고 120℃, 70 W 의 조건에서 마이크로파(microwave) 반응을 30 분 동안 시켰다. 감압증류로 용매를 제거하여 3-(뷰틸아미노)프로판산 메틸 에스터를 수율 96.4%(2.06g)로 얻었다.

3-(N-뷰틸아세트아미노) 프로판산 메틸 에스터의 합성(LJH-1-58)

3-(뷰틸아미노) 프로판산 메틸 에스터(2.06 g, 1.29 X 10^{-2} moL)를 디클로로메테인(DCM) 30 mL 에 녹인 후, 염화아세트산(1.83 mL, 2.58 X 10^{-2} moL), 피리딘 3.21 mL, 3.87 X 10^{-2} moL)을 넣고 상온에서 1 시간 교반시켰다. 반응물을 감압여과 하여 얻어진 여과액을 물과 5% 구연산 용액으로 씻어 준 후, DMC 층을 무수 황산나트륨으로 처리하여 물을 제거하였다. 용매를

감압증류로 제거한 다음 헥세인과 에틸 아세테이트(1:2)를 이용한 컬럼크로마토그래피로 정제하여 3-(N-뷰틸아세트아미노)프로판산 메틸 에스터(도 2)를 수율 72.3%(1.88 g)로 얻었다.

^{1}H NMR(CDCl3, 400MHz) : δ 3.70(m, 3H), 3.59(m, 2H), 3.28(m, 2H), 2.62(m, 2H), 2.09(m, 3H), 1.55(m, 2H), 0.95(m, 3H)

^{12}C NMR(CDCl3, 400MHz) : δ 176.68, δ 175.37, δ 49.29, δ 48.13, δ 46.27, δ 36.37, δ 34.86, δ 24.98, δ 23.83, δ 17.53

계피 초임계 오일의 제조

초임계 추출에는 초임계 추출 장치 Waters AD-RC 08(Waters CO., Milford, MA, USA)를 사용하였다. 시료를 추출 용기에 300 g 을 넣어 이산화탄소(CO_2)유속 : 보조용매유속 = 47.5 g/분 : 2.5 g/분으로 하여 총 유속(이산화탄소유속 + 보조용매유속)은 50 g/분의 속도로 흘려주었고, 보조용매로는 HPLC 급 에틸 알코올(JT Baker Co., Phillipsburg, NJ, USA)를 사용하였다. 추출 온도는 35℃, 추출 시간은 120 분으로 고정하였으며, 압력을 200, 300, 400 bar 로 하여 압력이 다른 3 가지 조건에서 추출하였다. 회수된 추출물을 40℃에서 회전진공농축기(EYELA Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 농축한 후 실험에 사용하였다.

실험결과

실시예 1 : 모기 기피 실험(Semi-field test)

모기 기피 실험

계피 초임계 추출물의 모기 실험 180 × 60 × 60 cm(가로×세로×높이)의 직사각형의 아크릴 상자를 제작하여 칸막이를 이용하여 동일한 크기의 상자 세 개를 각각 나누어 케이지 A, 케이지 B, 케이지 C 로 구분하였다(도 1). 케이지 B 에는 지름 20 cm 의 구멍을 양쪽으로 각각 만들어 케이지 A, 케이지 C 로 모기가 이동할 수 있도록 하였다. 케이지 A 에는 계피 초임계 추출물, IR 3535, IR 3535 유도체를 혼합하여 배치하고 케이지 C 에는 대조구(70% EtOH)를 두고 냄새가 고르게 퍼지도록 약 10 분 정도 방치한 다음 케이지 B 에 칸막이를 열어 30 분 후에 각각의 케이지의 모기의 마리 수를 측정하였다.

LJH-1-58 의 모기 기피효과

5, 10% 농도의 LJH-1-58 과 24%의 DEET 의 빨간집모기에 대한 기피력을 관찰한 결과는 표 1 에 나타내었다. 1-2 분 경과 후 10%의 LJH-1-58 에서 높은 기피력을 보였으며, 4-5 분 경과 후까지도 기피력이 지속됨을 확인하였다. 10%의 LJH-1-58 과 24% DEET 의 기피력이 유사하게 나타난 것으로 보아 LJH-1-58 은 DEET 를 대체할 수 있는 IR 3535 의 새로운 합성물질로 사용가능 할 것이다. 또한 흰줄숲모기에서도 약 90%의 기피력을 보여(표 2) 두 종의 모기 모두에 LJH-1-58 의 적용이 가능하다.

【표 1】

IR 3535 유도체(LJH-1-58)의 빨간집모기 기피 효과

농도(%)	대조군에서 랜딩한 모기 수 (Mean ± S.D)	노출 기간(% Mean±S.D)[1]				
		0-1 분	1-2 분	2-3 분	3-4 분	4-5 분
5.0	11.32 ± 3.3	22.2 ± 23.4	59.0 ± 52.4	0.0 ± 0.0	8.3 ± 14.4	37.8 ± 40.2
10.0	8.2 ± 4.7	50.0 ± 70.7	100.0 ± 0.0	93.3 ± 11.5	94.8 ± 9.0	100.0 ± 0.0
DEET[2]	16.04 ± 8.4	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	95.2 ± 8.3

[1]% 기피 효과 = 100 x (대조군에서 바이팅한 모기 수 - 처리군에서 바이팅한 모기 수) / 대조군에서 바이팅한 모기 수

[2]24% 디에틸톨루아마이드(DEET)

【표 2】

IR 3535 유도체(LJH-1-58)의 흰줄숲모기 기피 효과

농도(%)	대조군에서 랜딩한 모기 수 (Mean ± S.D)	노출 기간(% Mean±S.D)				
		0-1 분	1-2 분	2-3 분	3-4 분	4-5 분
5.0	6.6±4.22	59.6±4.61	9.1±2.64	39.4±1	14.1±2.51	14.1±4.93

10.0	7.3±2.87	95.5±0.58	81.8±0.58	77.1±0.58	90.8±0.58	88±0.58
DEET	16.04 ± 8.4	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	95.2 ± 8.3

LJH-1-58 및 계피 초임계 오일의 모기 기피효과

1, 5, 10% 계피 초임계 오일 및 1% 계피 초임계 오일과 10% IR 3535 혼합물, 1% 계피 초임계 오일과 10% LJH-1-58 혼합물의 방향 기피 실험의 결과는 표 3 과 같이 나타났다. 모기를 방사한 후 30 분 동안 케이지 B 에서 계피 초임계 오일이 있었던 케이지 A 로 이동한 모기는 오일의 농도가 증가할수록 20%, 18.75%, 8.57%로 총 마릿수가 감소하였다. 또한 1%의 계피 초임계 오일과 10%의 IR 3535 및 LJH-1-58 각각의 혼합물에 대해 기피활성을 관찰한 결과, 케이지 A 로 이동한 모기의 총 마릿수는 IR 3535 혼합물에서 12.9%, LJH-1-58 혼합물에서 7.4%의 수준으로 나타나 계피 초임계 오일과 LJH-1-58 의 혼합물이 방향성 및 모기 기피효과에서 아주 우수한 활성을 가짐을 확인하였다.

【표 3】

계피 초임계 오일과 IR 3535 또는 LJH-1-58 의 혼합물의 노출 후에 모기 숫자의 변화

샘플	각 케이지에서 모기 숫자의 상대적 비율		
	케이지 A(%)	케이지 B(%)	케이지 C(%)
1%[1)]	20	60	20
5%	18.75	46.63	40.63
10%	8.57	54.14	34.29
1%+IR 3535[2)]	12.9	38.71	25
1%+LJH-1-58[3)]	7.4	55.55	37

[1)] 계피 초임계 오일(400 bar, 35 ℃).

[2)] 계피 초임계 오일(400 bar, 35 ℃) 1% + 10% IR 3535.

[3)] 계피 초임계 오일(400 bar, 35 ℃) 1% + 10% LJH-1-58.

실시예 2: 피부 안정성 평가(단회경구투여독성 시험)

개요

본 시험에서는 기피제(LJH-1-58)를 피부에 적용할 경우 안전한가 여부를 평가하기 위해, 「의약품등의 독성시험기준」(식품의약품안전청 고시 제 2009-116 호), 「기능성화장품등의 심사에 관한 규정」(식품의약품안전청 고시 제 2009-166 호) 및 「비임상시험관리기준」에 준하여 단회투여독성, 피부일차자극, 안점막자극, 피부감작성 유발여부에 대해 실험을 실시하였다.

시험계

6 주령 ICR 마우스를 입수(효창 사이언스, 한국)하여 7 주령에 물질을 투여하였다. 실험에 이용한 동물은 총 18 마리(웅성: 9 마리, 자성: 9 마리)였으며, 일주일간 검역 및 적응기간을 가지며 이 기간 동안 매일 관찰을 실시하여 건강한 동물만을 시험에 사용하였다.

시험방법

동물을 검역, 적응기간 중의 체중을 기초로 하여 선별한 후 군분리 당일의 체중을 기초로 하여 무작위법으로 각 군의 평균체중이 가능한 한 균등하도록 군을 구성하였다. 군당 마릿수는 암수 각 3 마리씩으로 할당하여 실험을 실시하였다. 개체식별은 꼬리 표식법으로 하였으며, 케이지당 3 마리씩 수용하였다. 투여전일 절식(14-16 시간 정도)한 후, 존데를 이용하여 시험물질을 경구투여하였다.

【표 4】

시험군의 구성

시험물질	투여량	성별	시험 동물 수	투여경로
용매(PEG-400)	10 ml/kg	웅성	3	경구
		자성	3	경구
기피제(LJH-1-58) 50%	10 ml/kg	웅성	3	경구
		자성	3	경구

기피제(LJH-1-58) 100%	10 ml/kg	웅성	3	경구
		자성	3	경구

관찰 및 검사항목

투여당일은 투여 후 30 분, 1 시간, 2 시간, 3 시간, 4 시간, 5 시간, 6 시간 까지는 매시간 마다 관찰하고, 투여 다음날부터 하루에 1 회씩 매일 14 일간 관찰함을 원칙으로 하였다. 약물에 의한 일반상태의 변화, 중독증상 및 폐사여부를 관찰하였다. 체중은 투여 직전, 투여 후 1 일, 3 일, 7 일 및 부검당일 부검 직전(14 일)에 측정하였다.

시험결과

기피제 100%를 투여한 군은 투여당일에는 별다른 이상을 보이지 않았지만, 투여 후 1 일 경과 후 모두 폐사하였다. 기피제 50% 투여군과 용매투여군은 실험기간 중 특이한 임상증상을 보이거나 사망한 동물이 없었다(표 5-10).

본 시험조건에서 기피제는 단회투여경구독성 시험결과 100% 원액을 10 ml/kg 으로 투여할 경우 모두 폐사하였으며, 50% 희석액 10 ml/kg 를 투여 한 경우는 모두 생존하였으므로, 본 시험물질의 LD_{50} 치는 100% 원액 기준으로 5-10 ml/kg 정도로 추정된다.

【표 5】

시험 결과

재료	투여량	성별	치사율	LD_{50}
용매(PEG-400)	10 ml/Kg	웅성	0/3	기피제 LD_{50} 치는 5-10 ml/kg 정도로 추정됨
		자성	0/3	
기피제 (LJH-1-58) 50%	10 ml/Kg	웅성	0/3	
		자성	0/3	
기피제 (LJH-1-58) 100%	10 ml/Kg	웅성	3/3	
		자성	3/3	

【표 6】

시험 물질을 경구 투여한 ICR 마우스의 치사율

재료	성별	투여량	시간			투여 후 일수											치사율
			2	4	6	1	2	3	4	5	6	7	…	…	13	14	
용매(PEG-400)	남	10 ml/kg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/3
	여	10 ml/kg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/3
기피제(LJH-1-58) 50%	남	10 ml/kg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/3
	여	10 ml/kg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/3
기피제(LJH-1-58) 100%	남	10 ml/kg	0	0	0	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3/3
	여	10 ml/kg	0	0	0	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3/3

【표 7】

시험 물질을 경구 투여한 ICR 마우스의 체중 변화

재료	성별	투여량	투여 후 일수				
			0	1	3	7	14
용매(PEG-400)	남	10 ml/kg	*20.04 ±0.69	21.15 ±0.87	24.53 ±1.24	26.85 ±1.58	30.43 ±1.99
	여	10 ml/kg	19.01 ±0.65	20.45 ±0.74	23.21 ±1.01	25.52 ±1.54	27.25 ±1.85
기피제(LJH-1-58) 50%	남	10 ml/kg	21.07 ±0.61	21.98 ±0.98	25.82 ±1.53	28.01 ±1.16	31.13 ±1.58
	여	10 ml/kg	20.05 ±0.56	20.91 ±0.75	23.95 ±1.45	26. 54 ±1.54	28.85 ±2.00
기피제(LJH-1-58) 100%	남	10 ml/kg	21.47 ±0.66	-	-	-	-
	여	10 ml/kg	20.02 ±0.59	-	-	-	-

* 모든 값들은 표준편차(± S.D.)로 나타냄.

각 그룹당 동물 수는 3 마리였음.

【표 8】

PEG-400 을 경구 투여한 ICR 마우스(웅성)의 임상적 소견

임상적 소견	시간			투여 후 일수													
	2	4	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
동물 개체 수	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
징후 없음	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
호흡곤란	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
활동성 감소	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
후궁반장	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
통각상실증	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
반사신경	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
타액분비	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
안구 징후	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
심혈관계 징후	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
마비	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
털이 곤두섬	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
체인-스톡스 호흡	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
사망	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

【표 9】

기피제(LJH-1-58) 50%를 경구 투여한 ICR 마우스(자성)의 임상적 소견

임상적 소견	시간			투여 후 일수													
	2	4	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
동물 개체 수	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
징후 없음	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
호흡곤란	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
활동성 감소	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
후궁반장	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
통각상실증	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
반사신경	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

타액분비	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
안구 징후	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
심혈관계 징후	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
마비	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
털이 곤두섬	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
체인-스톡스 호흡	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
사망	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

【표 10】

기피제(LJH-1-58) 100%를 경구 투여한 ICR 마우스(웅성)의 임상적 소견

임상적 소견	시간			투여 후 일수													
	2	4	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
동물 개체 수	3	3	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
징후 없음	3	3	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
호흡곤란	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
활동성 감소	0	0	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
후궁반장	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
통각상실증	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
반사신경	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
타액분비	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
안구 징후	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
심혈관계 징후	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
마비	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
털이 곤두섬	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
체인-스톡스 호흡	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
사망	0	0	0	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

실시예 3: 피부 안정성 평가(안점막자극시험)

시험계

3 개월령 NZ 흰색 토끼(샘타코 코리아)를 구입하고, 일주일간 검역 및 적응기간을 가지며 이 기간 동안 매일 관찰을 실시하여 건강한 동물만을 시험에 사용하였다.

시험방법

검역 및 적응기간 중의 체중을 기초로 하여, 안검사 후 각막 손상 등 안구에 이상이 없는 동물을 선별한 후, 임상 및 체중증가 등에 이상이 없으며 상태가 양호한 건강한 동물을 군 분리 당일의 체중과 주령을 기초하여 무작위법으로 각 군의 평균체중이 균등하도록 군을 구성하였다. 4 마리 중 2 마리는 오른쪽 눈에 시험물질을 점안하고, 왼쪽 눈은 무처치 대조안으로 두었으며, 나머지 2 마리는 오른쪽 눈은 시험물질 점안 후 세척군, 왼쪽 눈은 대조물질인 PEG-400 을 점안하였다(도 3).

【표 11】

시험군의 구성

시험물질	동물수	시험사이트 수 R / L	시험농도(%)	용매
기피제 (LJH-1-58)	2	비세안 (2)/ 무처치 (2)	10	PEG-400
	2	세안 (2) / PEG-400 (2)		

시험물질 농도 및 투여량

시험물질은 PEG-400 에 희석하여 10% 농도로 안구당 0.1 ml 씩 투여하였다. 세척군 안구는 시험물질 점안 30 초 후에 미온 생리식염수를 이용하여 충분히 세안하였다.

관찰 및 검사항목

시험기간 동안 매일 일반증상 및 사망여부를 관찰하였다. 적용부위의 관찰적용부위는 시험물질 점안 후 1 시간, 24 시간, 48 시간, 72 시간째 및 4 일, 7 일째에 관찰을 하였고 안점막 반응의 평가는 의약품등의독성시험 기준의 안구 병변의 등급에 따라 평점으로 평가하였다.

결과의 해석

반응 평가에 의한 결과의 판정은 일반적으로 많이 사용되는 Draize 안자극 구분표를 따랐다.

【표 12】

안자극 결과 판정표

평가	안정성 구분			판정
	급성안점막 자극지수 a)	평균안점막 자극지수 b)	7 일-개체별 안점막자극지수 c)	
무자극	0-1	0(48 시간 후)	-	사용가능
사실상 무자극	1-5	≤1(48 시간 후)	-	사용가능
최소 자극	5-15	≤5(48 시간 후)	-	사용농도조정
경자극	15-30	≤5(4 일 후)	-	사용농도조정
중자극	30-60	≤20(7 일 후)	≤30(실험한 모든 동물)	사용불가
강자극	60-80	≤40(7 일 후)	≤60(실험한 모든 동물)	사용불가
극심한 자극	80-110	-	-	사용불가

a) A.O.I. (Acute ocular irritation index): 평균안점막 자극지수 가운데 최대값

b) M.O.I. (Mean ocular irritation index): 총 스코어/실험 동물 수

c) 7 일 I.O.I. (Individual ocular irritation index): 7 일째 각 동물의 스코어

시험결과

실험기간 중 특이한 임상증상을 보이거나 사망한 동물은 없었다. 기피제(LJH-1-58) 10%의 비세안군 자극지수(A.O.I)는 2 로 '사실상 무자극' 을 나타내었으며, 세안군은 0 으로 '무자극' 을 나타내었다. 용매로 사용된 PEG-400 의 자극지수(A.O.I)는 3 으로 '사실상 무자극' 을 나타내었다. 기피제 10%의 비세안군 자극은 24 시간 이후 모두 없어졌으며, 용매인 PEG-400 의 발적은 일부 남아 있었으나 48 시간 이후에는 모두 회복되었다(도 4).

【표 13】

시험 결과

시험물질	시험농도(%)	자극결과: 평균안점막 자극지수(비세안/세안)				급성안점막 자극지수
		1 시간	24 시간	48 시간	72 시간	
기피제 (LJH-1-58)	10	2/0	0/0	0/0	0/0	2
PEG-400	-	3	2	0	0	3

본 시험 결과, 기피제 10%는 급성안점막 자극지수가 5 이하이므로 안점막 자극을 유발하지 않는 것으로 판단된다. 초기의 약한 자극은 용매로 사용된 PEG-400 의 영향일 것으로 추정된다.

【표 14】

기피제(LJH-1-58)의 눈 자극성 시험 결과

기피제(10%)		1 시간						24 시간					
		비세안군		세안군		PEG-400		비세안군		세안군		PEG-400	
반응 / 동물 수		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
각막	혼탁도(A)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	해당면적(B)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

	스코어: AXBX5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
홍채	자극(A)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	스코어: A X 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
결막	발적(A)	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0
	부종(B)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
	분비물(C)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Score: (A+B+C)X 2	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0
총 스코어		4		0		6		0		0		4	
평균 스코어		2		0		3		0		0		2	
한방추출물(1%)		48 시간						72 시간					
		비세안군		세안군		PEG-400		비세안군		세안군		PEG-400	
반응 / 동물 수		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
각막	혼탁도(A)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	해당면적(B)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	스코어: AXBX5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
홍채	자극(A)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	스코어: A X 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
결막	발적(A)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	부종(B)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	분비물(C)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	스코어: (A+B+C)X 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
총 스코어		0		0		0		0		0		0	
평균 스코어		0		0		0		0		0		0	

실시예 4: 피부 안정성 평가(피부 일차자극시험)

시험계

3 개월령 NZ 흰색 토끼(샘타코 코리아)를 구입하고, 일주일간 검역 및 적응기간을 가지며 이 기간 동안 매일 관찰을 실시하여 건강한 동물만을 시험에 사용하였다.

시험방법

검역 및 적응기간 중의 체중을 기초로 하여, 등 부위 제모 시 피부 상태가 양호한 동물을 시험에 무작위법으로 군을 구성하였다. 4 마리 중 2 마리는 기피제(LJH-1-58) 10%를, 2 마리는 기피제 50%를 도포하였다.

【표 15】

시험군의 구성

시험물질	동물수	시험 사이트 수	시험 농도(%)	용매
기피제 (LJH-1-58) 10%	2	8(비찰과 4, 찰과 4)	10%	PEG-400
기피제 (LJH-1-58) 50%	2	8(비찰과 4, 찰과 4)	50%	PEG-400

시험물질 처치

토끼 등 부위 털을 가로세로 약 10 cm 이상 되도록 제모한 후, 왼쪽은 시험물질 적용부위, 오른쪽은 대조물질 적용부위로 하고, 각 적용부위는 찰과 부위와 비찰과 부위를 두어 실험을 실시하였다. 시험물질은 적절한 농도로 조제하여 각 사이트 당 0.5 ml 씩 도포하여, 24 시간 폐쇄 첩포 하였다(도 5).

관찰 및 검사항목

일반상태 및 사망여부를 매일 관찰하였으며, 체중은 군분리 시와 72 시간째에 측정하였다. 시험물질 적용부위는 적용 24 시간째와 72 시간째에 관찰을 하며 피부 반응의 평가는

「의약품등의독성시험기준」(식품의약품안전청고시 제 1999-61 호)의 피부반응의 평가기준에 따라 평점으로 평가하였다.

【표 16】

피부반응의 평가기준

홍반과 가피 형성	평점
홍반이 없음	0
아주 경도의 홍반(육안으로 겨우 식별할 정도)	1
명료한 홍반	2
중등도에서 강한 홍반	3
심홍색의 강한 홍반과 가피 형성	4
부종	평점
부종 없음	0
매우 가벼운 부종(육안으로 겨우 식별한 정도)	1
명료한 부종(주위와 명료한 구분이 됨)	2
중등도의 부종(1 mm 정도 부어 올랐을 경우)	3
강한 부종(1 mm 이상 부어 오르고 노출 부위 밖에 까지 확장된 상태)	4

결과의 해석

피부일차자극지수(P.I.I.)는 시험물질 적용 후 24 시간째와 72 시간째의 홍반과 부종 평점에 의하여 산출하였다. 찰과 부위와 비찰과 부위 각각에 홍반 평점의 평균과 부종 평점의 평균을 구하며 24 시간째의 결과와 72 시간째의 결과의 평균값을 피부일차자극지수로하여 피부일차자극 결과 판정표에 의하여 결과를 판정하였다.

【표 17】

피부일차자극 결과 판정표

안전성 구분	피부일차자극 지수(P.I.I.)	판 정
0 - 0.5	무자극(Non irritant)	사용가능

0.6 - 2.0	경자극(Mildly irritant)	사용농도조정
2.1 - 5.0	중자극(Moderately irritant)	사용불가
5.1 이상	강자극(Severely irritant)	사용불가

시험결과

실험기간 중 특이한 임상증상을 보이거나 사망한 동물은 없었다. 기피제 10%의 P.I.I.는 0.13 으로 무자극 범위에 해당하므로 사용가능하다. 기피제 50%의 P.I.I.는 0.13 으로 무자극 범위에 해당하므로 사용가능하다(표 19-21). 시험물질 및 용매 처치부위 중 찰과 부위에서 24 시간째에 일부 약한 홍반이 관찰되었으나, 이는 물리적 자극에 의한 일시적인 자극으로 판단되며, 곧바로 정상으로 회복됨이 관찰되었다(도 6).

【표 18】

시험 결과

시험물질	시험 농도(%)	P.I.I.	판정	비고
기피제 (LJH-1-58)	10	0.13	무자극	사용가능
기피제 (LJH-1-58)	50	0.13	무자극	사용가능

이상의 결과, 본 시험조건에서, 실험기간 중 특이한 임상증상을 보이거나 사망한 동물은 없었으며, 기피제 10% 및 50%는 피부일차자극 측면에서 안전한 원료라 판단된다.

【표 19】

기피제(LJH-1-58) 10%의 일차 자극 시험 결과

실험군	기피제 (10%)								용매(PEG-400)							
피부반응	홍반, 가피				부종				홍반, 가피				부종			
적용부위	비찰과		찰과		비찰과		찰과		비찰과		찰과		비찰과		찰과	
관찰시간	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72

1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
계	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
평균	0	0	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0	0	0	0	0
평균의 합계	0.5								0.5							
P.I.I	0.13								0.13							

【표 20】

기피제(LJH-1-58) 50%의 일차 자극 시험 결과

실험군	기피제 (50%)								용매(PEG-400)							
피부반응	홍반, 가피				부종				홍반, 가피				부종			
적용부위	비찰과		찰과		비찰과		찰과		비찰과		찰과		비찰과		찰과	
관찰시간	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72
1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
계	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
평균	0	0	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0	0	0	0	0
평균의 합계	0.5								0.5							
P.I.I	0.13								0.13							

실시예 5: 기니 피그를 이용한 피부 감작성 시험(GPMT)

시험계

체중 250-300 g 의 Hartley albino 기니 피그를 구입(샘타코 코리아)하였다. 일주일간 검역 및 적응기간을 갖고, 이 기간 동안 체중증가 및 일반증상에 이상이 없는 건강한 동물 중 등부분을 제모하였을 때 상태가 양호한 것을 시험에 사용하였다. 검역 및 적응 기간 중 이상이 없는 동물 중 등 부분을 제모하여 피부 상태가 양호한 건강한 동물을 선별한 후, 군

분리 당일의 체중을 기초로 하여 평균 체중이 가능한 균등하도록 군을 구성하였다.

시험방법

인덕션은 시험 실시 4 시간 전 등 윗 부위(견갑 상부)를 털을 3 X 3 cm 크기로 제모하여 사용하였고, 챌린지는 시험 실시 24 시간 전에 인덕션 부위 아래의 등 부위(dorso-thoracic, lumbar region)의 털을 4 X 6 cm 크기로 제모한 후 시험 당일 전기 면도기로 나머지 털을 제거한 후 사용하였다. 1 차 인덕션은 각각의 시험군의 기니픽 견갑간부에 시료, FCA, 시료 + FCA 를 2 열로 0.1 ml 씩 피내 주사하였다. 2 차 인덕션은 일주일 후 FCA 주사 동일 부위를 제모한 뒤 10% SLS(용매: 페트로라텀)를 주사부위에 도포하고, 24 시간 후 동일부위에 시험 물질 0.1 ml 을 투여한 지름 1.5 X 1.5 cm 의 패치 4 개에 0.1 ml 를 도포하여 48 시간 폐쇄 첩포하였다. 챌린지는 마지막 인덕션 10 일 이후, 피부 일차자극이 없는 농도로 마리당 좌우 각 2 사이트씩 24 시간 폐쇄 첩포하여 피부 홍반, 부종을 관찰하였다(도 7).

시험군 구성

【표 21】

시험군의 구성

재료	동물 수 (웅성/자성)	농도 (%)				
		인덕션				챌린지
		피부 내		국소 부위		1st
		용매	농도	10% SLS	농도	
기피제 (LJH-1-58)	2/2	PEG-400	50	+	50	50%, 10%
DNCB	2/2	아세톤:올리브 오일 = 8:2	0.5	+	1	0.5%, 0.1%

용매 (PEG-400)	2/2	-	-	+	-	기피제 50%, DNCB 0.5%

관찰 및 검사항목

시험 기간 동안 임상증상과 사망여부를 관찰하였다. 시험물질에 대한 챌린지를 실시한 다음, 시험물질 첩포 제거 후 24, 48 시간째에 홍반 및 부종 반응 등의 자극성을 유무를 판단하였다. 필요할 경우에는 전기면도기를 이용하여 제모 한 후 검사하였으며, 제모 했을 경우에는 약 1 시간 정도 시간이 지난 다음(2 시간 이내) 검사를 실시하였다.

각 구획에서의 반응 평가는 의약품등의독성시험기준(식품의약품안전청 고시 제 2005-60 호)을 이용하여 판정하였다(표 23). 또한 피부감작성 유발 가능성에 대한 판정은 Kligman 의 등급을 따랐다(표 24). 피부감작성 판정 기준표의 등급 I, II 는 사용 가능 범위로 하며 등급 III 이상은 사용불가 범위로 하였다.

【표 22】

피부 반응의 평가 기준 의약품등의독성시험기준

스코어	반응
0	무반응
1	홍반이 적용부에 흩어져 나타남
2	중등도의 홍반
3	강한 홍반 및 부종이 나타남

【표 23】

감작성 판정 기준표

감작율(%)	등급	판정	사용 유무
0 - 8	I	약한 민감제	사용가능
9 - 28	II	순한 민감제	사용가능
29 - 64	III	보통 민감제	사용불가
65 - 80	IV	강한 민감제	사용불가

81 - 100	V	극심한 민감제	사용불가

시험결과

시험기간 동안 임상증상 및 체중변화에서 특이한 사항은 관찰되지 않았다. 기피제의 감작성 결과, 10% 및 50% 농도로 야기했을 때 감작성이 0%로 관찰되어 시험물질 사용가능 범위인 "등급 I" 에 해당하였다. DNCB 군의 0,5% 농도에서 24 시간과 48 시간에 모두 100%로 Kligman 의 감작성 기준표 상의 시험물질 사용불가 범위인 "등급 V" 에 해당하였으며, 0.1% 농도에서는 24 시간과 48 시간에 각각 100%, 75%로 Kligman 의 감작성 기준표 상의 시험물질 사용불가 범위인 "등급 V" 에 해당하였다. 음성대조군의 경우 용매로 감작시킨 후, 기피제 50% 및 DNCB 0.5%로 야기시켰을 경우, 모두 자극이 관찰되지 않았다(도 8).

【표 24】

챌린지 결과

재료	농도 (%)	양성반응 (%)		등급	비고
		24 시간	48 시간		
기피제 (LJH-1-58)	50	0 (0/8)	0 (0/8)	I	물질군
	10	0 (0/8)	0 (0/8)	I	
DNCB	0.5	100 (8/8)	100 (8/8)	V	양성대조군
	0.1	100 (8/8)	75 (6/8)	V	
용매 (염류용액)	기피제 50% DNCB 0.5%	0 (0/8)	0 (0/8) 0 (0/8)	-	음성대조군

시험기간 중 임상증상 및 체중증가 등에 이상 동물은 관찰되지 않았다. 기피제 50 및 10%는 챌린지 결과 양성율이 사용가능 범주로 평가되었다. 양성대조 물질로 사용한 DNCB 0.5 및 0.1%는 높은 감작성을 보였다.

【표 25】

챌린지 후 치사율

재료	성별 (동물 수)	처치 후 일수											치사율 (%)
		1	2	3	--	21	22	23	--	37	38	39	
기피제 (LJH-1-58)	웅성(2)	0	0	0	--	0	0	0	--	0	0	0	0 (0/2)
	자성(2)	0	0	0	--	0	0	0	--	0	0	0	0 (0/2)
DNCB	웅성(2)	0	0	0	--	0	0	0	--	0	0	0	0 (0/2)
	자성(2)	0	0	0	--	0	0	0	--	0	0	0	0 (0/2)
용매 대조군	웅성(2)	0	0	0	--	0	0	0	--	0	0	0	0 (0/2)
	자성(2)	0	0	0	--	0	0	0	--	0	0	0	0 (0/2)

【표 26】

챌린지 결과(그룹 데이터)

재료 & 농도 (%)		24 시간(M/F)				48 시간(M/F)			
인덕션	챌린지 농도(M/F)	0	1	2	3	0	1	2	3
기피제 (LJH-1-58)	기피제 10%	4/4	-	-	-	4/4	-	-	-
	기피제 50%	4/4	-	-	-	4/4	-	-	-
DNCB (0.5% + 1%)	DNCB 0.5%	-	2/2	2/2	-	-	4/4	-	-
	DNCB 0.1%	-	2/2	2/2	-	1/1	3/3	-	-
용매 대조군	기피제 10%	4/4	-	-	-	4/4	-	-	-
	DNCB 0.5%	4/4	-	-	-	4/4	-	-	-

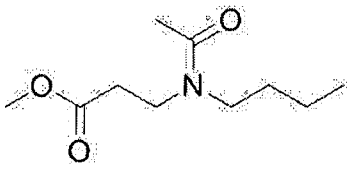
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

다음 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 포함하는 곤충 기피(insect repellent) 조성물:

[화학식 1]



【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 화학식 1의 화합물은 전체 조성물에 대하여 0.1 내지 25 중량%로 포함되는 것을 특징으로 하는 곤충 기피 조성물.

【청구항 3】

제 1 항에 있어서, 상기 곤충은 모기, 파리, 개미, 벌, 귀뚜라미, 노린재, 부채벌레, 벼룩, 풍뎅이, 사마귀 또는 바퀴벌레인 것을 특징으로 하는 곤충 기피 조성물.

【청구항 4】

제 3 항에 있어서, 상기 곤충은 모기인 것을 특징으로 하는 곤충 기피 조성물.

【청구항 5】

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 계피 초임계 오일을 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 곤충 기피 조성물

【청구항 6】

제 5 항에 있어서, 상기 계피 초임계 오일은 계피를 온도 30-40℃, 압력 200-400 bar에서 초임계 추출하여 수득한 것을 특징으로 하는 곤충 기피 조성물.

【청구항 7】

제 5 항에 있어서, 상기 계피 초임계 오일은 전체 조성물에 대하여 0.1 내지 20 중량%로 포함되는 것을 특징으로 하는 곤충 기피 조성물.

【청구항 8】

(a) 상기 제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항의 조성물의 화장품학적 유효량; 및 (b) 화장품학적으로 허용되는 담체를 포함하는 곤충 기피용 화장료 조성물.

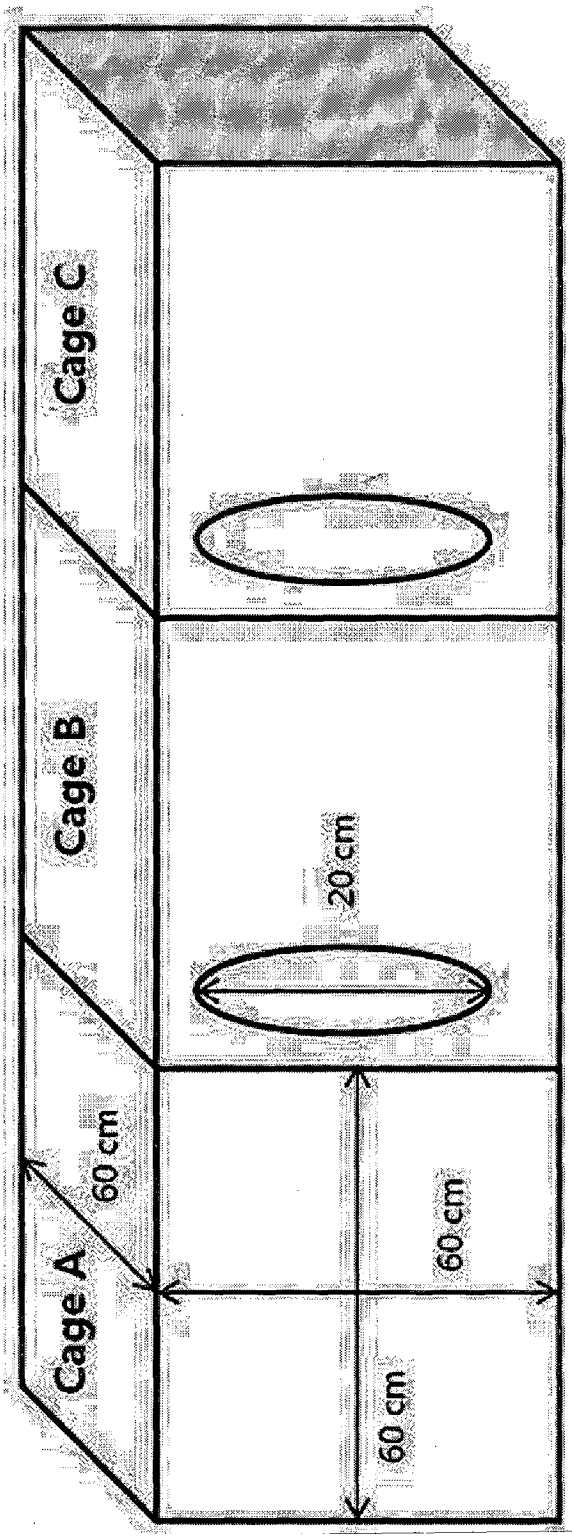
【청구항 9】

상기 제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항의 조성물을 피부에 도포하는 단계를 포함하는 곤충 기피(insect repelling) 방법.

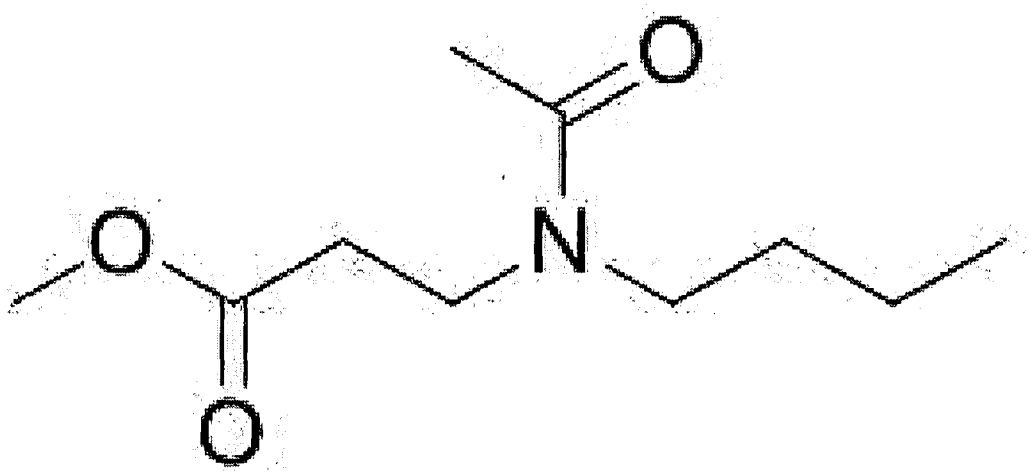
【청구항 10】

상기 제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항의 조성물을 방충 효과를 얻고자 하는 영역에 적용(applying) 하는 단계를 포함하는 곤충 기피 방법.

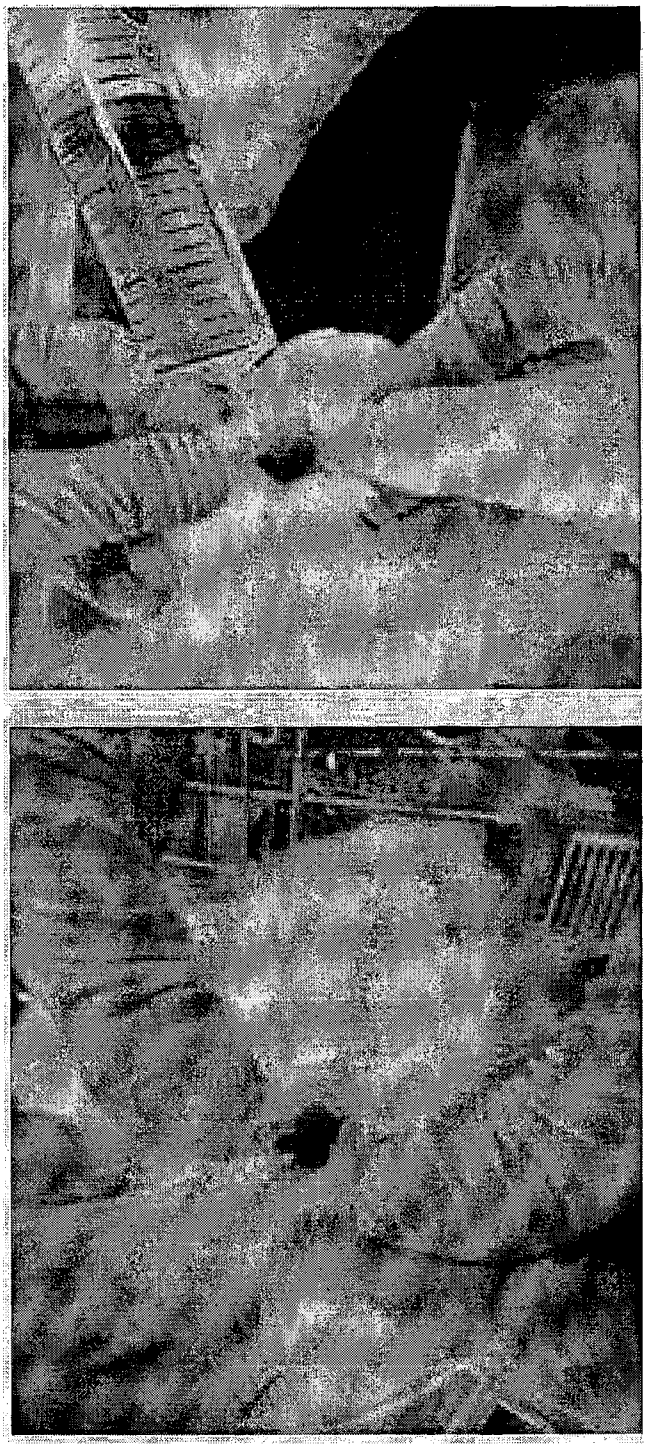
도 1



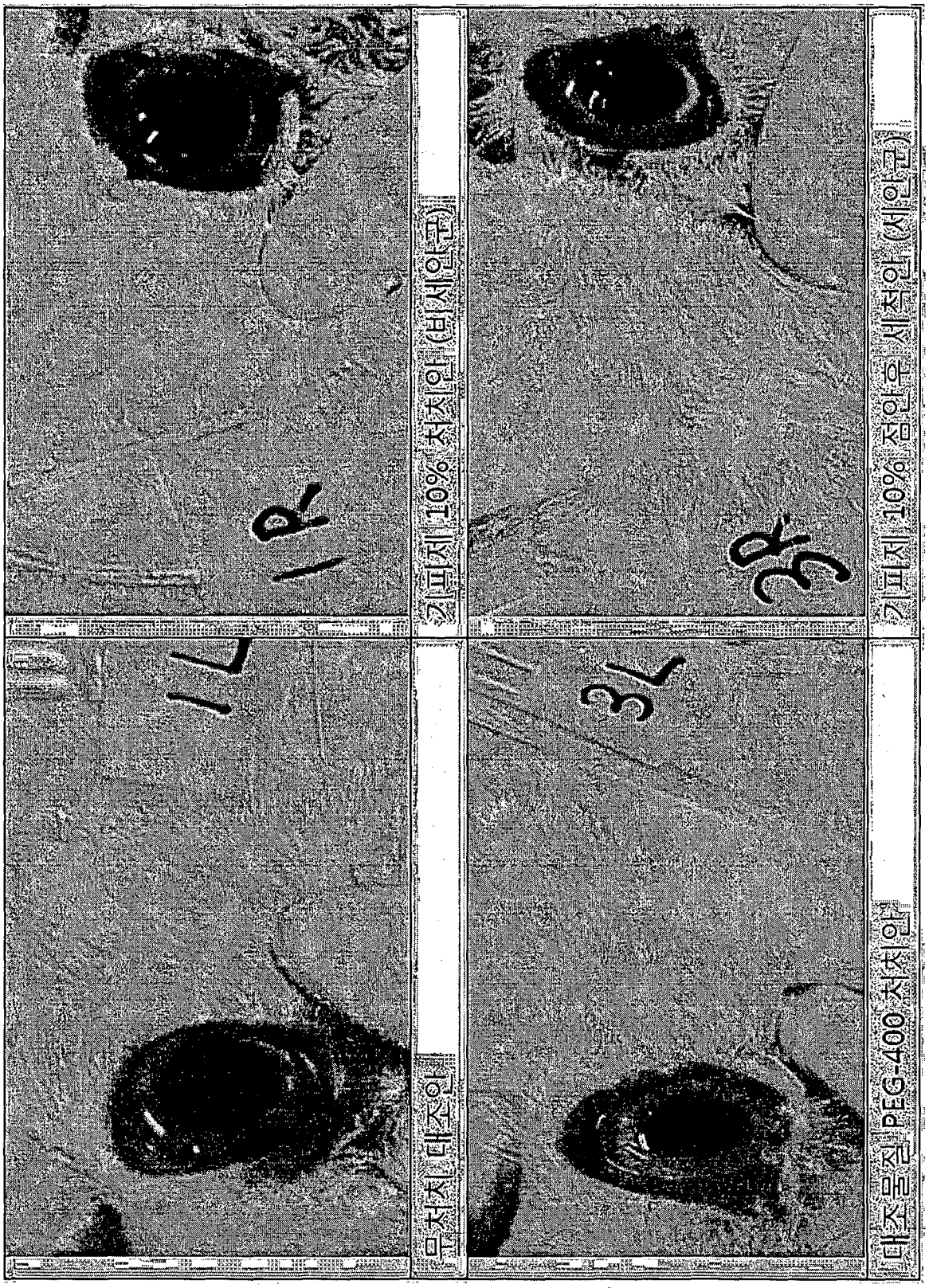
도 2



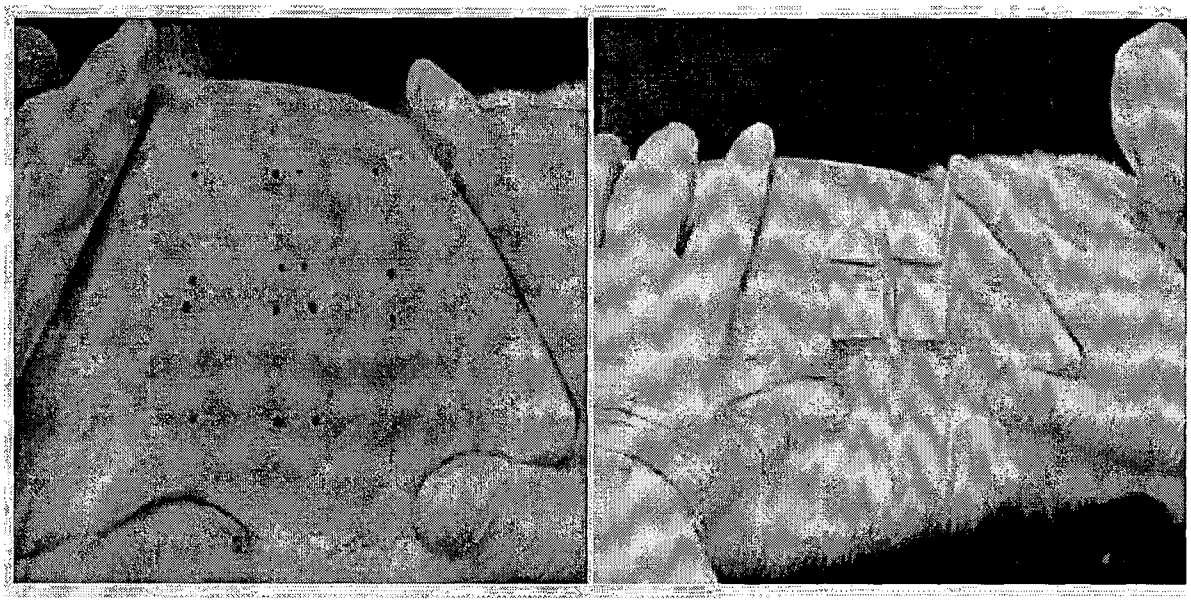
도 3



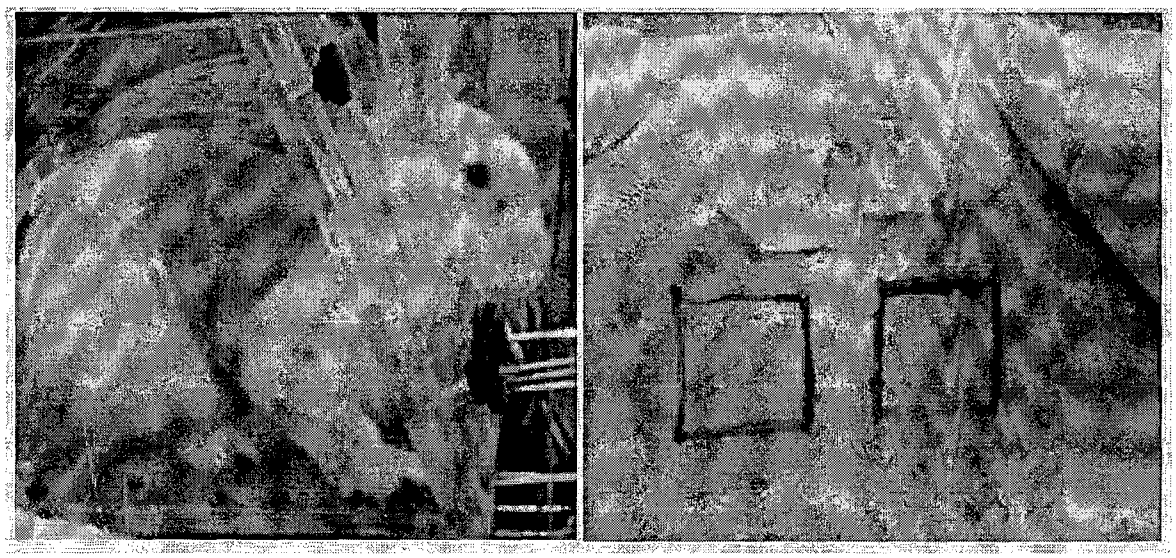
도 4



도 5

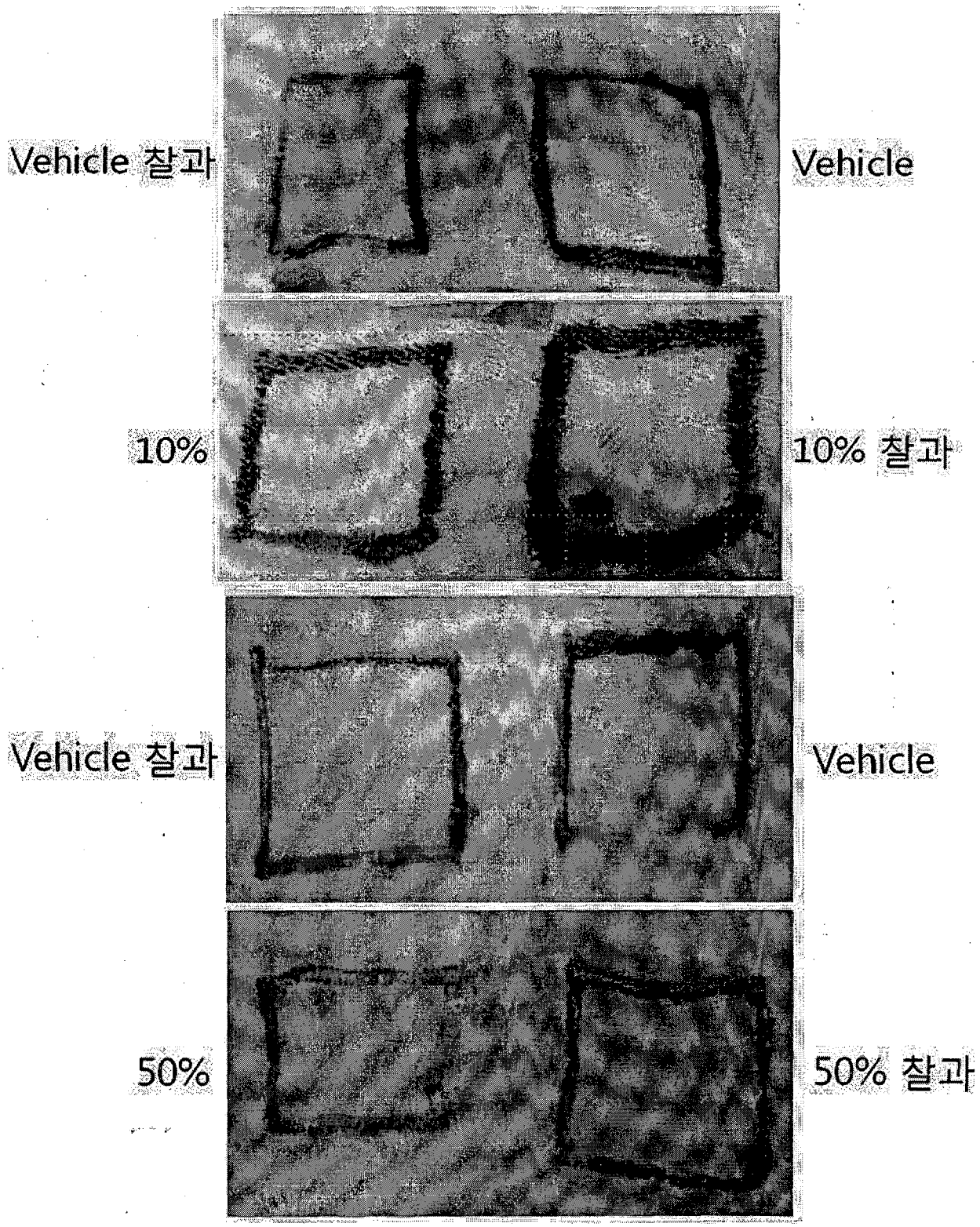


(제모) (물질도포)

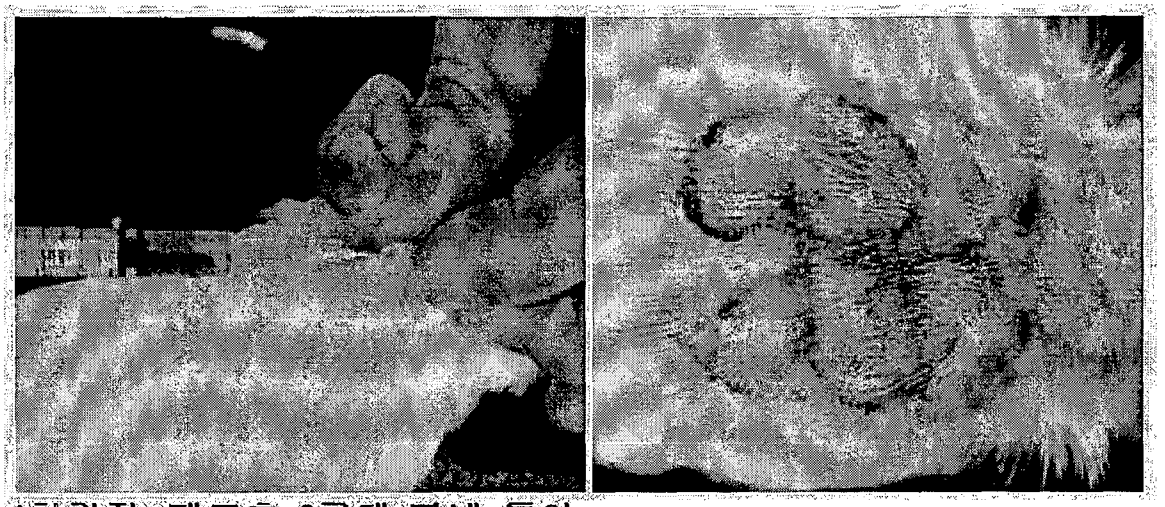


(보정) (적용부위 관찰)

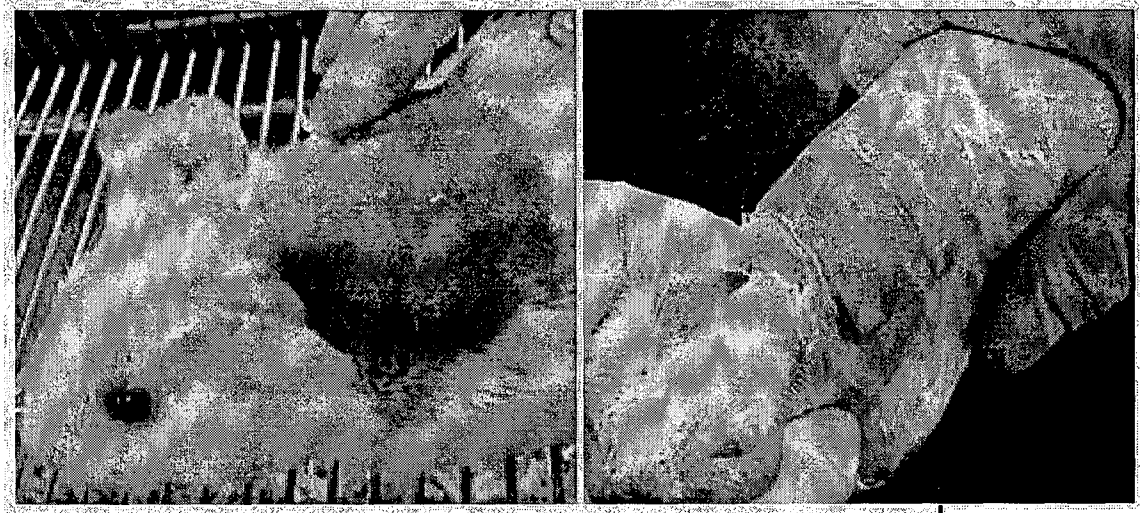
도 6



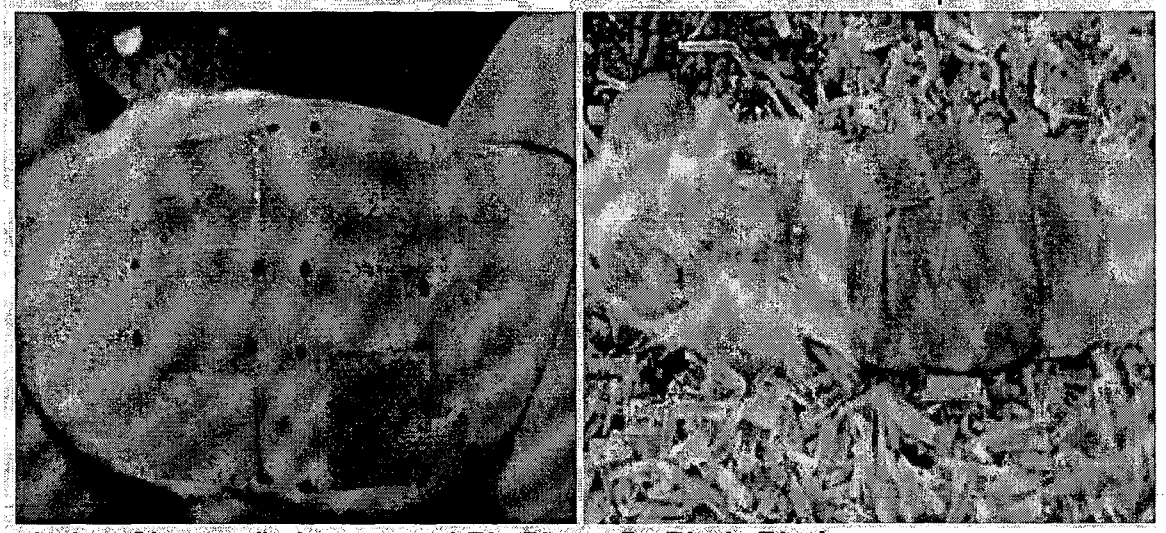
도 7



1차감작: 제모후 6군데 피내 투여

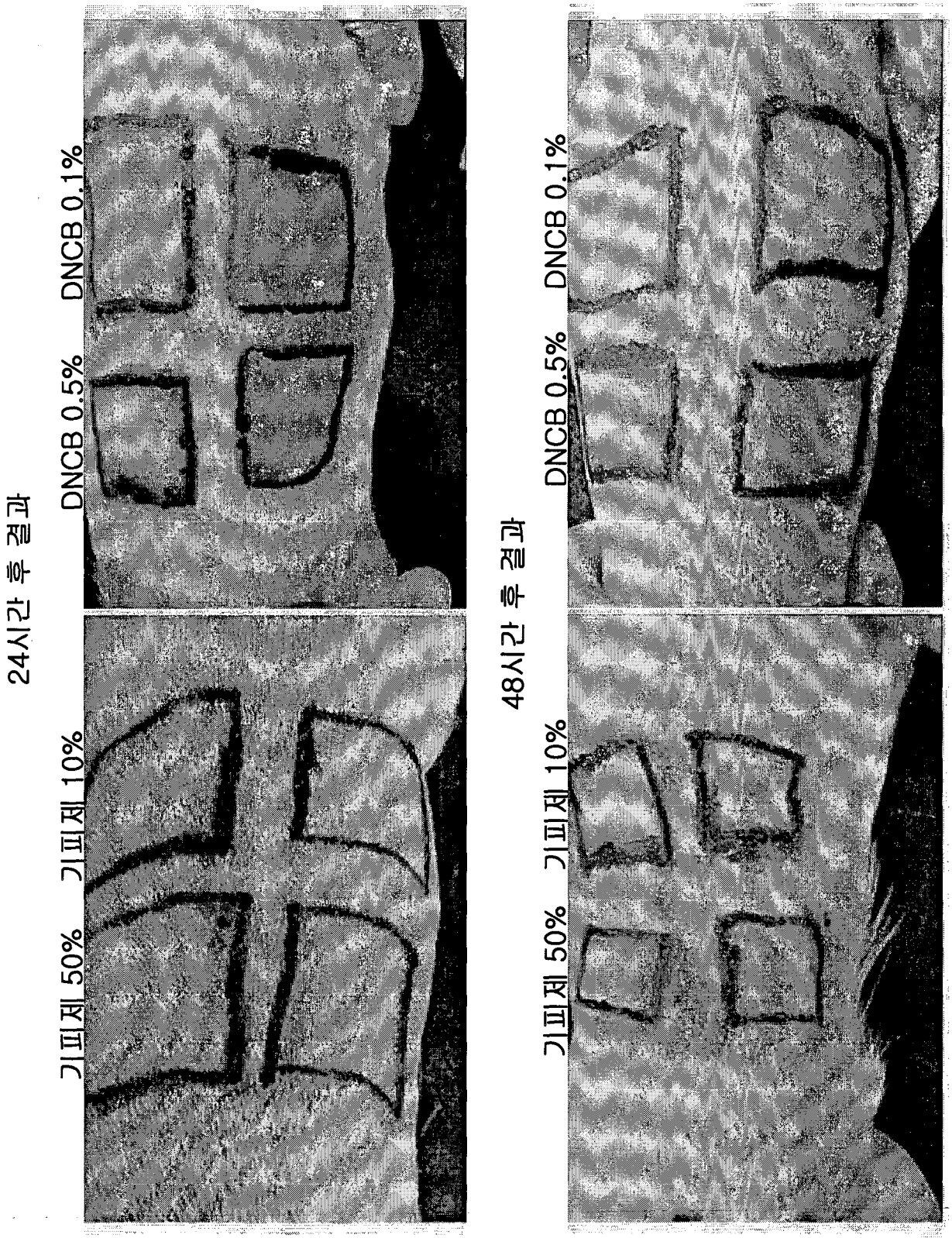


2차감작: 제모후 SLS 바른 후 시험물질을 48시간 첩포



아기: 2열로 2개 농도 24시간 첩포 후 결과 검사

도 8


24시간 후 결과
기피제 50%
기피제 10%
DNCB 0.5%
DNCB 0.1%
48시간 후 결과
기피제 50%
기피제 10%
DNCB 0.5%
DNCB 0.1%

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2012/008991

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01N 37/18(2006.01)i, A01N 37/20(2006.01)i, A01N 65/24(2009.01)i, A01P 17/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01N 37/18; A01P 17/00; A01N 25/04; A01N 65/24; A01N 43/40

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: insect repellent, propionic acid

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	US 6255253 B1 (FOERSTER, Thomas et al.) 03 July 2001 See column 2, lines 51-65.	1-4,8-10 5-10
Y A	KR 10-2003-0087445 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY FOUNDATION) 14 November 2003 See page 2.	5-10 1-4
A	US 2008-0319015 A1 (GRUENEWALD, Hans-Werner et al.) 25 December 2008 See pages 1-2.	1-10
A	CILEK, J. E. et al. "Comparative efficacy of IR3535 and DEET as repellents against adult Aedes Aegypti and Culex Quinquefasciatus". J. Am. Mosq. Control Assoc., 2004, vol. 20, no. 3, pages 299-304. See the entire document.	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
29 MARCH 2013 (29.03.2013)	**29 MARCH 2013 (29.03.2013)**

Name and mailing address of the ISA/KR
Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea
Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2012/008991

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 6255253 B1	03.07.2001	AT 231333 T	15.02.2003
		AU 1998-94348 B2	06.09.2001
		AU 9434898 A	08.03.1999
		CA 2300858 A1	25.02.1999
		DE 19735790 A1	25.02.1999
		EP 1005269 A1	07.06.2000
		EP 1005269 B1	22.01.2003
		ES 2190607 T3	01.08.2003
		WO 99-08517 A1	25.02.1999
KR 10-2003-0087445 A	14.11.2003	KR 10-0484887 B1	28.04.2005
US 2008-0319015 A1	25.12.2008	EP 1965639 A1	10.09.2008
		JP 2009-520707 A	28.05.2009
		JP 2009-520707 T	28.05.2009
		WO 2007-079822 A1	19.07.2007

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2012/008991

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A01N 37/18(2006.01)i, A01N 37/20(2006.01)i, A01N 65/24(2009.01)i, A01P 17/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
A01N 37/18; A01P 17/00; A01N 25/04; A01N 65/24; A01N 43/40

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: insect repellent, propionic acid

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X Y	US 6255253 B1 (FOERSTER, THOMAS 외 2명) 2001.07.03. 컬럼 2, 제51-65행 참조.	1-4,8-10 5-10
Y A	KR 10-2003-0087445 A (대한민국(서울대학교 총장)) 2003.11.14. 페이지 2 참조.	5-10 1-4
A	US 2008-0319015 A1 (GRUENEWALD HANS-WERNER 외 1명) 2008.12.25. 페이지 1-2 참조.	1-10
A	CILEK, J. E. et al. 'Comparative efficacy of IR3535 and DEET as repellents against adult Aedes Aegypti and Culex Quinquefasciatus'. J. Am. Mosq. Control Assoc., 2004, Vol. 20, No. 3, pages 299-304. 전문 참조.	1-10

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2013년 03월 29일 (29.03.2013)	**2013년 03월 29일 (29.03.2013)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 82-42-472-7140

심사관
유준석
전화번호 82-42-481-5782

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2012/008991

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 6255253 B1	2001.07.03	AT 231333 T	2003.02.15
		AU 1998-94348 B2	2001.09.06
		AU 9434898 A	1999.03.08
		CA 2300858 A1	1999.02.25
		DE 19735790 A1	1999.02.25
		EP 1005269 A1	2000.06.07
		EP 1005269 B1	2003.01.22
		ES 2190607 T3	2003.08.01
		WO 99-08517 A1	1999.02.25
KR 10-2003-0087445 A	2003.11.14	KR 10-0484887 B1	2005.04.28
US 2008-0319015 A1	2008.12.25	EP 1965639 A1	2008.09.10
		JP 2009-520707 A	2009.05.28
		JP 2009-520707 T	2009.05.28
		WO 2007-079822 A1	2007.07.19