

除草劑 藥害輕減物質 探索과 作用機構 糾明

I. Metolachlor 吸收 및 代謝에 대한 N-(4-chlorophenyl)maleimide의 効果

全載哲 · 馬祥墾

Investigation of Herbicide Safeners and its Mode of Safening Action

I. Effect of N-(4-chlorophenyl)maleimide on Metolachlor Absorption and Metabolism

Jae-Chul Chun and Sang-Yong Ma

Abstract

Mode of safening action of N-(4-chlorophenyl)maleimide (CPMI) on metolachlor [2-chloro-N-(2-ethyl-6-methylphenyl)-N-(2-methoxy-1-methylethyl) acetamide] was investigated in sorghum (*Sorghum bicolor* L.). CPMI was synthesized by dehydration of N-(4-chlorophenyl)maleamic acid (CPMA) which was obtained from amination with maleic anhydride and 4-chloroaniline. Melting points of CPMA and CPMI (>95% purity) were 200–202°C and 116–118°C, respectively. Growth response study indicated that seed treatment of CPMI increased tolerance of sorghum shoot to metolachlor approximately threefold. Sorghum shoot was more sensitive to injury caused by metolachlor and CPMI activity than the root. Metolachlor was initially absorbed by sorghum shoot and metabolized to the metolachlor-glutathione conjugate in CPMI-untreated and treated shoots. However, CPMI treatment significantly accelerated metabolism of [¹⁴C]metolachlor in sorghum shoot, resulting in decrease in metolachlor content and increase in formation of the glutathione conjugate. It was concluded that the protection against metolachlor injury conferred by CPMI appeared to be correlated to detoxification of metolachlor in sorghum shoot tissue.

Key words: Herbicide safener, Sorghum, N-(4-chlorophenyl)maleimide

序 言

우리나라의 밭 작물栽培地域에서 널리 사용되고 있는 chloroacetanilide계 除草劑는 피, 바랭이 등의 一年生 禾本科 雜草와 일부 廣葉雜草에 대하여 매우 우수한 防除效果를 나타낸다. 作物 播種 直後 土壤에 처리된 除草劑는 雜草의 發芽 또는 이미 發芽된 雜草들의 初期 生育을 沮害함으로 防除效果를 나타낸다¹⁾. 일차적으로 chloroacetanilide계 除草劑의 植物體에 대한 生育沮害 現象은 草種, 處理部位, 除草劑의 種類, 濃度, 藥效持續期間 및 環境條件 등에 따라서 다르게 나타나는데²⁾, 環境條件 등과 같이 끊임없이 변화하는 條件 下에서 作物에 대한 藥害誘發의 우려는 常存하고 있다. 특히 低溫, 多濕의 環境條件에서 chloroacetanilide계 除草劑의 禾本科 作物에 대한 藥害 發現의 實例는 많이 報告되고 있다^{3,4)}. Chloroacetanilide계 除草劑로 인한 藥害로부터 作物을 保護하고, 除草劑의 安全使用을 도모하기 위하여 藥害輕減劑(herbicide safener)⁵⁾로 일컬어지는 特定化合物을 使用하고자 하는 背景은 作物에 대하여 보편적인 安定성이 인정되는 새로운 除草劑의 合成, 研究 등이 經濟的 側面에서 현실적으로 負擔을 加重시킴으로 이에 대한 代替方法으로써 herbicide safener가 實用化되어 있고, 우리나라에서도 除草劑에 herbicide safener를 混合시킨 藥劑가 商品化되어 利用되고 있다.

Herbicide safener는 植物體에서 除草劑의 吸收 및 移行 沮害, 作用點에 대한 除草劑와의 競爭 또는 除草劑 代謝의 增大를 통하여 除草劑의 活性沮害를 가져오는 것으로 알려져 있다²⁾. 여러 報告들에 의하면, herbicide safener가 처리된 植物體內에서는 chloroacetanilide계 除草劑의 不活性化가 增大되는데, 이와 함께 不活性化 反應에 관여하는 酵素의 活性 增大와 藥害輕減效果의 사이에 높은 相關도가 있음이 認定되었다⁷⁾. 이러한 除草劑 不活性化 酵素의 活性 增大는 chloroacetanilide계 除草劑에 特異的인 isozymes의 發現에 의한 것으로 報告되었다⁸⁾.

N-(4-chlorophenyl)maleimide(CPMI)는 chloroacetanilide계 除草劑인 alachlor에 대하여 藥害輕減效果가 期待되는 prosafener로서 紹介된 바 있으나⁹⁾, 그 외의 CPMI의 精確한 活性發現條件 및 作用機作 등은 전혀 研究되어져 있지 않다. 本 研究에서는 現在 우리나라의 밭 作物 栽培時에 널리 使用되고 있는 chloroacetanilide계 除草劑 metolachlor를 對象으로 하는 CPMI의 藥害輕減活性 發現與否와 그 藥害輕減 作用機構를 理解하고자 metolachlor의 吸收 및 代謝에 미치는 CPMI의 效果를 檢定하였다.

材料 및 方法

CPMI의 合成 CPMI는 Coleman 등¹⁰⁾, Roderick¹¹⁾ 및 Sauers¹²⁾에 의하여 報告되어진 合成法을 綜合, 變形하여 合成하였다. Maleic anhydride(0.25 mole)와 無水 toluene(60 ml)을 90°C로 維持되는 flask에서 混合하고, 이어서 toluene에 溶解시킨 4-chloroaniline(0.25 mole)을 funnel을 利用하여 매우 느린 速度로 添加하였다. 이 混合液을 90°C에서 1時間 以上 放置하고 室溫에서 冷却시킨 다음, 生成物을 funnel을 통하여 濾過하였다. Funnel上에서 生成物을 dichloromethane과 n-hexane으로 각각 洗淨, 乾燥하고 methanol을 利用하여 再結晶化하여 N-(4-chlorophenyl)maleamic acid(CPMA)를 合成하였다. 다시 CPMA(0.09 mole)를 80°C로 維持되는 flask에서 sodium acetate(0.05 mole) 및 acetic anhydride(0.3 mole)와 混合하고 flask를 80-100°C에 5分 동안 定置한 다음, sodium bicarbonate 飽和溶液을 매우 느린 速度로 添加하였다. 이어서 反應生成物을 濾過, 洗淨 및 乾燥시킨 다음, ethanol를 이용하여 再結晶化하여 CPMI를 합성하였다. 合成反應 段階別로 형성되는 物質의 녹는점과 nuclear magnetic resonance 檢定¹³⁾ 結果를 통하여 最終產物로서 CPMI의 存在를 確認하였다.

CPMI의 藥害輕減效果 수수 種子에 대하여

CPMI를 播種前 種子에 被覆處理 또는 播種時 播種 劑와 同時에 처리하였다. CPMI의 被覆處理는 여러 濃度水準의 CPMI(0.3-4.8g/kg)를 methanol에 溶解시키고 種子와 混合시킨 다음, 減壓濃縮(30°C)하여 신속히 methanol만을 除去하는 方法으로 實施하였으며, 被覆處理에 따르는 種子의 發芽抑制 여부를 調查하기 위하여 methanol만을 처리한 種子의 生育을 比較, 調查하였다. 또 다른 處理方法으로서 CPMI(5-100 μ M)를 播種 直後에 최초로 공급되는 물을 통하여 metolachlor(6.25-100 μ M)와 同時에 처리하였다. Plastic pot에 일정량의 無菌 vermiculite를 채우고 3cm의 심도로 被覆處理 및 無處理 또는 methanol만을 처리한 수수 種子를 播種한 다음, 下端部로 부터 충분한 水分을 供給하였다. 水分 維持 및 光 遮斷을 위하여 pot 上端部를 aluminum foil로 덮고 30°C와 相對濕度 80%의 暗 條件 栽培箱에 定置하였다. 播種 2, 3, 5, 7 및 10日 後 수수의 地上部와 根部에 대한 길이를 測定함으로써 藥害輕減效果를 檢定하였으며, 全 處理를 3 反復으로 實施하였다.

Metolachlor의 吸收 및 代謝 暗所에서 3일간 生育시킨 수수의 地上部(上端部 2cm)만을 採取하여 10mM HEPES buffer(pH 7.5)에 0.5mM CaCl₂, 0.1 mM MgCl₂, 1 mM KCl 및 10 μ M [¹⁴C]metolachlor (Specific activity : 4.5mCi/mmol)가 包含되어 있는 培養液내에서 5, 30, 60, 90 및 120分 동안 培養하였다. 栽培箱의 條件은 앞서 藥害輕減效果 檢定實驗에서 서술한 바와 一致하며, 培養期間 동안 外部로부터 培養液에 공기를 注入하였다. 배양후 植物組織을 蒸溜水를 이용하여 채취 즉시 洗滌한 다음, 80% methanol 하에서 1분간 摩碎, 濾過하였다. 이때 methanol 抽出에 의한 放射能 回收率은 98% 이상 이었다. 抽出液을 30°C에서 減壓濃縮하고 5ml의 蒸溜水를 가한 다음, 10ml의 dichloromethane으로 2 回 걸쳐 分劃하였다. 이때 培養液중에서 처리된 [¹⁴C] metolachlor의 95% 이상이 dichloromethane 층으로 回收됨을 確認하였다. 물層과 dichloromethane層의

放射能을 Liquid scintillation spectrometry로 測定하였으며, metolachlor와 metolachlor-glutathione 結合體의 標準品을 기준으로 thin-layer chromatography(TLC)에 의하여 各 層에 존재하는 物質의 正體를 동정하였다. n-Butanol : acetic acid : H₂O(12 : 3 : 5, v/v/v)을 TLC 展開溶媒로서 사용하였으며, 전개된 TLC plate를 X-rayfilm과 密着시켜 7일간 放置하였다.

結果 및 考察

CPMI의 合成 Maleic anhydride와 4-chloroaniline의 amination 反應을 통하여 형성된 CPMA의 結晶體를 中間產物로서 回收하고, 다시 acetic anhydride 및 sodium acetate에 의한 CPMA의 dehydration 反應으로 부터 CPMI를 合成하였다(그림 1). CPMA 및 CPMI의 녹는점(CPMA 200-202°C, CPMI 116-118°C) 確認과 NMR 分析(資料 提示 省略)을 통하여 이들 化合物의 化學構造의 特性을 Rubin¹³⁾ 등의 結果와 比較한 결과 各 化合物의 純度는 95% 이상인 것으로 나타났다.

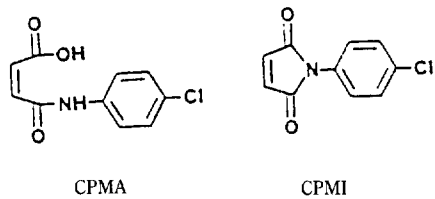


Fig. 1. Chemical structures of N-(4-chlorophenyl)maleamic acid(CPMA) and N-(4-chlorophenyl)maleimide(CPMI) synthesized.

CPMI의 藥害輕減效果 CPMI에 대한 最適 處理 方法을 설정하기 위하여 CPMI를 種子에 被覆處理한 경우와 播種후 최초로 供給되는 물을 통하여 처리한 境遇를 比較하였다(表 1). CPMI 單獨處理의 경우 種子被覆 처리에서는 0.6g까지, 또 水溶液으로

Table 1. Effect of CPMI treatments on sorghum shoot growth in the presence or absence of metolachlor.

Application Method ^a	Concentration (g/kg seed)	Shoot Length (% of control) ^b	
		CPMI alone	CPMI+25 μM metolachlor
Seed treatment	0	100a	27e
	0.3	97a	32e
	0.6	96a	62b
	1.2	90b	79a
	2.4	75c	58bc
	4.8	63d	47cd
Aqueous solution	0 (μM)	100a	33e
	5	98a	45d
	10	97a	49cd
	25	95a	52c
	50	95a	47cd
	100	90b	53c

^a CPMI was applied as seed coating or as aqueous solution at the initial watering. Mean shoot length of untreated seedlings was 8.3cm.

^b Means followed by the same letter within columns are not significantly different at 5% level according to the LSD.

처리한 경우에는 50 mM까지 수수 생육에 영향을 미치지 않았으며, 無處理 대비 90%의 생육을 보인水準은 前者의 경우 1.2g, 後者에 있어서는 100 mM로서 藥害輕減劑로의 利用은 이들 濃度水準에서 가능한 것으로 생각된다. 한편 metolachlor 處理에 따르는 수수 생육阻害에 대한 CPMI의 藥害輕減效果는 CPMI 處理 濃度の 增加와 함께 증가되어, CPMI를 수수 種子 1kg당 1.2g의水準으로 種子에 被覆處理한 境遇에 가장 높은 藥害輕減活性을 나타내었다. 그러나 水溶液으로 처리한 경우에는 全體 處理 濃度水準에서 바람직한 藥害輕減效果를 얻지

못하여 CPMI 처리는 種子 被覆處理가 보다 효과적이었다. 또한 調査時期를 달리하여 藥害輕減 活性의 存在여부를 확인한 結果, 수수의 生育初期인 播種 3일후에 調査한 地上部의 生育에 있어서 가장 뚜렷한 藥害輕減效果가 認定되었다(資料 提示 省略). 한편 CPMI에 의하여 나타나는 藥害輕減效果를 地上部와 根部를 구분하여 調査하면, metolachlor 처리농도에 관계없이 근부에 비하여 지상부에서의 효과가 크게 나타났다(그림 2). 이것은 metolachlor는 土壤중에 있는 雜草種子の 發芽 또는 發芽된 種子の 中莖(mesocotyl)이나 葉초(coleoptile)로 주로 吸收되어 初期生育을 阻害하는 土壤處理劑²⁾로서 藥效 反應이 주로 地上部に 나타나는데, CPMI의 處理에 따라 metolachlor에 의한 地上部の 生育 抑制가 크게 輕減되었다는 사실은 CPMI의 藥害輕減劑로서의 利用 可能性과 함께 CPMI의 作用部位를 동시에 보여주는 結果로 생각된다.

Metolachlor 處理濃도에 대한 수수 地上部에서의 CPMI 藥害輕減效果는 種子 被覆處理에서 metola-

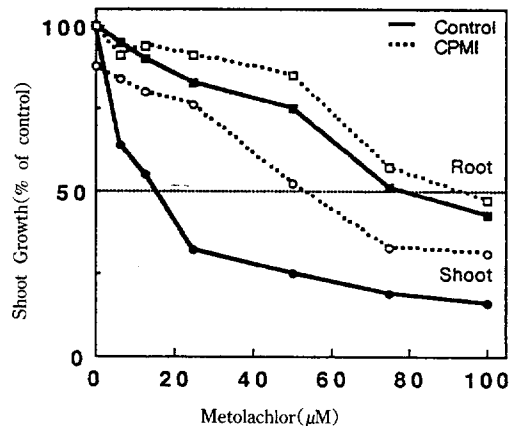


Fig. 2. Safening activity of CPMI on sorghum seedlings grown in vermiculite containing metolachlor for 3 days. CPMI was applied as seed treatment at 1.25g/kg of seed. Mean length of untreated shoots and roots was 7.9 and 8.2cm, respectively.

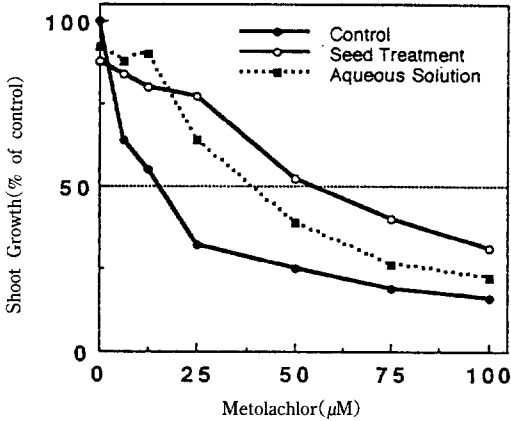


Fig. 3. Safening activity of CPMI on shoot length of sorghum seedlings grown in vermiculite containing metolachlor for 3 days. CPMI was applied as seed treatment at 1.25g/kg of seed or 25μM aqueous solution at the initial watering. Mean shoot length of untreated seedlings was 8.3cm.

chlor의 處理 濃度가 25 mM일 때 가장 큰 폭으로 나타났다가 metolachlor 濃度가 增加되면서 점차 그 폭이 減少되는 傾向을 나타내었으며, 水溶液 處理에서도 metolachlor 處理 濃度에 따라 비슷한 傾向을 나타내었지만 藥害輕減效果 폭은 被覆處理에 비하여 크게 떨어졌다(그림 3). 이러한 地上部の 生育 阻害는 CPMI 種子 被覆處理의 경우 metolachlor의 50% 生育抑制濃度(GR₅₀)가 53 μM이었으나, 無處理 種子에 대한 metolachlor의 GR₅₀는 15 μM로서 약 3.5배 정도 藥害輕減效果를 보였다(그림 2). 그러나 CPMI가 水溶液狀態에서 처리된 경우에는 無處理 種子에 비하여 약 2.5배 藥害輕減效果를 보이는데 그쳤다.

Metolachlor의 吸收 및 代謝 CPMI의 藥害輕減 作用이 除草劑의 吸收를 阻害함으로써 나타나는지의 與否를 [¹⁴C]metolachlor를 대상으로 CPMI를 被覆處理 또는 無處理한 수수에서 吸收樣狀을 比較,

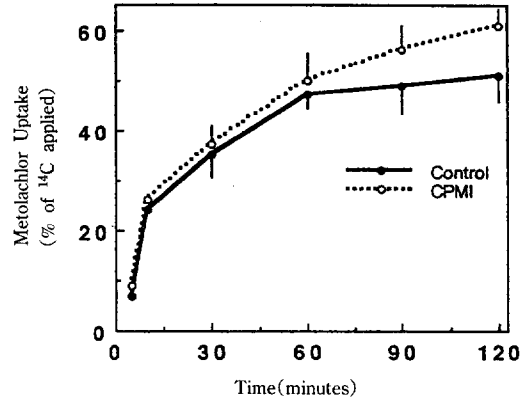


Fig. 4. Absorption of [¹⁴C]metolachlor by excised shoots from 3-day-old etiolated sorghum seedlings. CPMI was applied as seed treatment at 1.25g/kg seed. The concentration of [¹⁴C]metolachlor applied in incubation medium was 10 μM.

檢討하였다. 3일간 暗所에서 生育시킨 수수의 地上 上部를 採取하여 [¹⁴C]metolachlor가 포함되어 있는 培養液내에 放置하였다가 培養 時間別로 吸收 差異를 比較한 結果, CPMI의 處理에 關係없이 [¹⁴C]metolachlor의 吸收는 處理 後 60분 동안에는 差異가 없었고, 그 이후에는 약간의 差異를 보였다(그림 4). CPMI 무처리 수수에서의 [¹⁴C]metolachlor 吸收는 처음 10분 동안에 급격히 이루어지고 그 후 60분까지 꾸준히 增加되었다가 60분 이후부터는 완만한 增加를 보였던 반면에, CPMI 처리 수수에 있어서는 60분 이후에도 吸收가 계속 이루어지고 있었다. 이상의 結果는 CPMI가 나타내는 藥害輕減 活性의 發現은 metolachlor의 吸收를 阻害함으로써가 아닌 다른 藥害輕減機作에 依存하는 것으로 생각된다.

CPMI가 metolachlor의 代謝에 미치는 影響은 [¹⁴C]metolachlor가 포함되어 있는 培養液에서 일정 시간 동안 培養한 수수로부터 얻은 抽出液을 水層과 dichloromethane 層으로 分割하여 각 層에 포

함되어 있는 放射能을 측정함과 동시에 이들을 TLC 상에서 전개하여 抽出液의 正體를 同定하여 調査하였다. 그 결과 수수 抽出液의 dichloromethane 層에서는 metolachlor가 본래의 形態로 存在하는 반면에(그림 5의 A), 水層에서는 metolachlor가 glutathione과 결합된 形態로 存在하였다(그림 5의 D). 이것은 metolachlor와 metolachlor-glutathione conjugate의 溶解度 差異에 따른 特性으로 전자는 親油性인 반면에, 후자는 親水性을 나타내므로 溶媒의

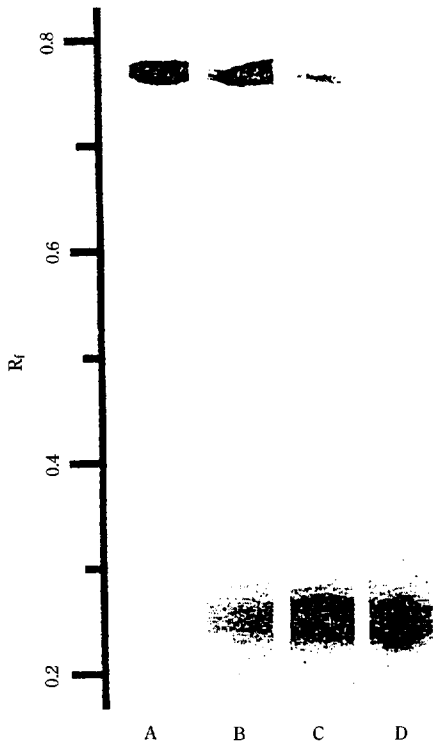


Fig. 5. Autoradiogram of a thin-layer chromatogram of radiolabel in shoots of 3-day-old sorghum seedlings. The identity of the metabolite present in untreated(B) and CPMI-treated(C) sorghum shoots was determined comparing Rf values of [¹⁴C]metolachlor(A) and metolachlor-glutathione conjugate (D) used as standard materials.

極性에 따라 효과적으로 代謝物質의 抽出이 가능하였기 때문이었다⁷⁾. 植物體內로 吸收된 除草劑의 代謝는 일반적으로 3段階에 걸쳐 일어나며, 이 過程을 거치면서 不活性化 또는 無毒化된다¹⁴⁾. Shimabukuro¹⁵⁾에 따르면 植物體內로 吸收되는 親油性의 除草劑는 phase I 反應에서 酸化, 還元 혹은 加水分解를 받으며, phase II에서 conjugation에 의하여 親水化되어 除草活性이 喪失되며, 이후 phase III에서 제2차 conjugation이 일어난다고 하였다. 이와같은 無毒化 過程에서 나타나는 conjugation은 CPMI의 處理에서 確認할 수 있었는데 抽出 分割層에서의 metolachlor와 metolachlor-glutathione conjugate는 CPMI의 處理에 따라 區分되어 CPMI 無處理에서의 수수 抽出液에서는 dichloromethane 층에서 metolachlor(그림 5의 B)가 存在하였던 반면에, CPMI 處理 수수의 水층 抽出에서는 metolachlor-glutathione conjugate(그림 5의 C)가 주로 存在하고 있었다. 따라서 CPMI에 의한 metolachlor의 藥害輕減作用에 있어서는 metolachlor-glutathione conjugation이 중요한 段階임을 시사하여 주었다.

Metolachlor의 代謝 즉 metolachlor-glutathione conjugation에 미치는 CPMI의 影響을 보면, CPMI 無處理 수수에 있어서의 代謝는 處理 直後부터 完만하고 꾸준한 增加가 서서히 일어났으나 CPMI를 種子에 被覆處理한 수수에서의 metolachlor의 代謝量은 處理時間의 經過와 함께 增加하여 處理後 처음 10분까지는 급격히 增加하고 그 이후에는 완만하게 增加되는 傾向을 나타내어 CPMI 無處理區에 비하여 無處理 5분에 14%, 10분에 28% 그리고 120분에 48%가 더 代謝되는 結果를 보여주었다(그림 6).

Metolachlor의 glutathione과의 結合에 의한 不活性化는 여러 safener들의 處理時에 많이 確認되었다⁷⁾. 이러한 alkylation 反應은 glutathione S-transferase에 의하여 觸媒되어 빠른 速度로 일어나므로 glutathione과 glutathione S-transferase는 metolachlor의 代謝에 기여하는 중요한 因子로서 報告되어 왔다^{8,14)}. CPMI에 있어서도 metolachlor의 gluta-

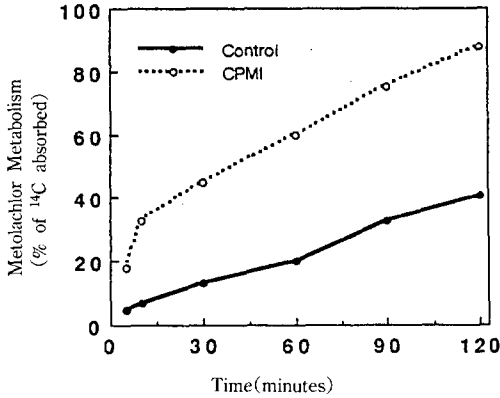


Fig. 6. Metabolism of [¹⁴C]metolachlor in excised shoots of 3-day-old sorghum seedlings. The concentration of [¹⁴C]metolachlor applied in incubation medium was 10 μ M. Sorghum shoots were extracted with 80% methanol and partitioned with dichloromethane. Metabolism was quantified by measuring the radioactivity of the aqueous layer.

thione과의 conjugation에 의한代謝量의 增加는 glutathione S-transferase의 活性 增大에 의한 것으로 認定되며, 이러한 代謝 過程이 CPMI의 주된 藥害輕減機作중의 하나로 생각된다.

要 約

Maleic anhydride와 4-chloroaniline에 의한 amination 反應을 통하여 CPMA를 回收하고, 다시 acetic anhydride 및 sodium acetate에 의한 CPMA의 dehydration 反應을 거쳐 CPMI를 合成하였다. 生成物의 녹는점(CPMA 200–202°C, CPMI 116–118°C) 比較와 NMR 分析을 통하여 化合物의 純度(95% 이상)를 決定하였다. 生育 初期段階의 수수에서 metolachlor에 의한 生育抑制는 根部에 비하여 地上部에서 더욱 크게 나타났으며, 이러한 地上部の 生育沮害는 種子에 CPMI를 被覆處理한 경우에 뚜렷

한 減少를 보였다. CPMI를 수수 種子 1kg당 1.2g의 水準으로 種子에 被覆處理한 경우에 가장 높은 藥害輕減 活性을 나타내었으며, 地上部の 50% 生育抑制를 나타내는 metolachlor의 濃度(GR₅₀值)로 표시한 藥害輕減指數는 無處理種子(15 μ M)에 비하여 被覆處理 種子 (53 μ M) 에서 약 3배 정도 增大되었다. CPMI의 處理 여부에 관계없이 [¹⁴C]metolachlor의 吸收에는 差異가 認定되지 않았다. CPMI를 被覆處理한 수수에서 metolachlor의 不活性化가 촉진되어 수수내의 吸收된 metolachlor의 대부분이 빠른 시간내에 glutathione과의 結合을 통하여 代謝 또는 解毒되었다.

參 考 文 獻

1. Fuerst, E. P. (1987). Understanding the mode of action of the chloroacetamide and thiocarbamate herbicides. *Weed Tech.* **1**: 270–277.
2. Lebaron, H. M., McFarland, J. E. and Simoneaux, B. J. (1988). Metolachlor. In: *Herbicides; chemistry, degradation, and mode of action* (P. C. Kearney and D. D. Kaufman, ed.): 355–381. Marcel Dekker.
3. Ketchersid, M. L., Norton, K., and Merkle, M. G. (1981). Influence of soil moisture on the safening effect of CGA-43089 in grain sorghum (*Sorghum bicolor* L.). *Weed Sci.* **29**: 281–287.
4. Vigor, P. R., Eberlein, C. V., and Fuerst, E. P. (1991). Influence of available soil water content, temperature, and CGA-154281 on metolachlor injury to corn. *Weed Sci.* **39**: 227–231.
5. Hatzios, K. K., and Hoagland, R. E. (1989). *Crop safeners for herbicides*. Academic Press. New York.
6. Hatzios, K. K. (1984). *Herbicide antidote*:

- Development, chemistry, and mode of action, *Adv. Agron.* **36**: 265–316.
7. Gronwald, J. W., Fuerst, E. P., Eberlein, C. V., and Egli, M. A. (1987). Effect of herbicide antidotes on glutathione content and glutathione-S-transferase activity of sorghum shoots. *Pestic. Biochem. Physiol.* **29**: 66–76.
 8. Dean, J. V., Gronwald, J. W., and Eberlein, C. V. (1990). Induction of glutathione-S-transferase isozymes in sorghum by herbicide antidotes. *Plant Physiol.* **92**: 467–473.
 9. Rubin, B., and Kirino, O. (1988). Herbicide safeners: chemistry, safening effect, and mode of action. In: *Crop safeners for herbicides* (K. K. Hatzios and R. E. Hoagland, ed.): 317–336. Academic Press.
 10. Coleman, L. E., Jr., Bork, J. F., and Dunn, H. Jr. (1959). Reaction of primary aliphatic amines with maleic anhydride. *J. Org. Chem.* **24**: 135–136.
 11. Roderick, W. R. (1957). The isomerism of N-substituted maleimides. *J. Am. Chem. Soc.* **79**: 1710–1712.
 12. Sauer, C. K. (1969). The hydration of N-arylmaleamic acids with acetic anhydride. *J. Org. Chem.* **34**: 2275–2279.
 13. Rubin, B., Kirino, O., and Casida, E. (1985). Chemistry and action of N-phenylmaleilic acids and their progenitors as selective herbicide antidotes. *J. Agric. Food Chem.* **34**: 2275–2279.
 14. Gronwald, J. W. (1989). Influence of herbicide safeners on herbicide metabolism. In: *Crop safeners for herbicides* (K. K. Hatzios and R. E. Hoagland, ed.): 103–128. Academic Press.
 15. Shimabukuro, R. H. (1985). Detoxication of herbicides. In: *Weed physiology*, Vol. II (S. O. Duke, ed.): 215–240. CRC Press.