

Benfuracarb 원제에 함유된 불순물들의 glutathione-S-transferase와 amidase 저해 특성

염창섭¹ · 김성문¹ · 유지숙² · 허장현^{1*}

¹강원대학교 생물환경학부, ²강원대학교 화학과

요약 : 본 논문의 목적은 benfuracarb 원제(90.2%)에 함유된 불순물의 glutathione-S-transferase와 amidase에 대한 저해 특성과 해당 불순물의 구조를 밝히는데 있다. Benfuracarb 원제, 유효성분 및 불순물은 glutathione-S-transferase(GST)를 효과적으로 저해하였으나, 그 저해력은 GST 효소 저해제인 ethacrynic acid의 저해력보다는 낮았다. 즉, GST에 대한 benfuracarb 원제, 유효성분 및 불순물의 I_{50} 은 각각 9.7×10^4 M, $>1.0 \times 10^3$ M, 1.8×10^4 M이었으나, ethacrynic acid의 I_{50} 은 1.7×10^5 M이었다. Benfuracarb 원제, 유효성분 및 불순물은 amidase를 저해하였는데, 이들의 효소저해력은 iprobenfos의 저해력(I_{50} , 8.2×10^7 M)보다는 낮은 6.0×10^5 M, 4.3×10^4 M, 7.6×10^5 M이었다. Benfuracarb 원제에는 4종의 불순물(IM 1~4)이 검출되었는데, 이들 중 IM 2와 3은 GST와 amidase의 활성을 저해하였던 반면, IM 4는 효소활성을 저해하지 않았다. 이들 불순물 중 효소활성 저해특성을 갖는 IM 2와 3을 IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, LC-MS를 이용하여 구조를 분석한 결과, IM 2는 ethyl-N-isopropylamino propionate로, 그리고 IM 3은 ethyl-N-isopropyl-N-(chlorosulphenyl) aminopropionate로 확인되었다. (2001년 7월16일 접수, 2002년 2월 28일 수리)

Key words : Amidase, benfuracarb, ethacrynic acid, impurity, iprobenfos, glutathione-S-transferase.

서론

살충제 benfuracarb[ethyl N - [2,3-dihydro-2,2-dimethyl-benzofuran - 7 - yl oxycarbonyl = (methyl) aminothio]-N-isopropyl--alaninate]는 곤충체내에서 carbofuran으로 활성화된 후 acetylcholinesterase를 저해하는 procarbamate계 약제로, 접촉 및 식독작용을 나타내어 잎벌레과(Chrysomelidae), 방아벌레과(Elateridae), 진딧물과(Aphididae), *Lisso rhoptus oryzophilus*, *Plutella xylostella*와 같은 해충을 치사시키는 것으로 알려져 있다(Tomlin, 1997).

Benfuracarb은 곤충, 식물, 포유류 체내에서 다양한 대사물로 전환된다. 즉, 곤충과 식물 체내에서 carbofuran, carbofuran phenol, 3-hydroxy carbofuran, 3-hydroxy phenol, N-hydroxymethyl carbofuran 및 3-keto carbofuran으로 대사되며, 포유류 체내에서는 carbofuran, carbofuran phenol, 3-hydroxycarbofuran, 3-hydroxyphenol과 3-ketophenol로 빠르게 대사되어 대부분 처리 7일 내에 체외로 방출된다(Edward와 Jepson, 1993).

일반적으로 농약은 생물체내에서 glutathione-S-transferase(GST), amidase, monooxygenase, esterases와 같은 효소에 의해 무독화되는 것으로 알려져 있다. 예를 들면 제초제인 propanil은 벼의 amidase에 의해 분해되어 불활성화되는데, amidase는 carbamate계 혹은 유기인계 살충제에 의해 저해되기 때문에 propanil의 경우 이들 살충제와 혼용이 금지되어 있는 실정이다.

Carbamate계 혹은 유기인계 살충제가 작용점인 acetylcholinesterase 이외에도 무독화효소를 저해한다는 사실은

많은 저자들에 의해 밝혀졌다. 김(1998)은 carbamate계 살충제인 benfuracarb(순도 90%)이 무독화효소인 GST와 amidase를 저해하는 것으로, 그리고 조(1998)는 유기인계 살충제인 profenophos(순도 96%)가 esterases와 amidase를 저해하는 것으로 각각 보고하여 기존의 사실을 뒷받침하였다. 김(1998)과 조(1998)가 실험에 사용한 농약 원제 중에는 불순물이 함유되어 있으며, 이 불순물들의 무독화효소에 대한 작용에 대해서는 연구된 바가 없기에 무독화효소에 대한 저해 작용이 원제에 의한 것인지 혹은 불순물에 의한 것인지가 밝혀져 있지 않다.

본 논문의 목적은 benfuracarb 원제(technical grade; 90.2%)에 의한 무독화효소 GST와 amidase의 저해가 원제 주성분에 의한 것인지 혹은 불순물에 의한 것인지를 밝히고, benfuracarb 원제에 함유된 불순물의 구조를 밝히는데 있다.

재료 및 방법

Benfuracarb 원제로부터 불순물 분리

본 실험에 사용된 benfuracarb(technical grade; 90.2%)은 농업과학기술원으로부터 분양받았다. n-Hexane에 녹인 benfuracarb을 silica gel(230~400 mesh)이 충전된 유리 컬럼(300 mm×30 mm)에 loading하고 전개용매(n-hexane : ethylacetate, 3 : 1)를 1분당 3 ml씩 흘려 15 ml 시험관에 받았다. 각각의 시험관에 있는 용출액을 모세관을 이용하여 박층크로마토그래피 판(silica gel 60 F254, Merck; 10 mm×50 mm)에 일정량 spotting한 다음, 전개용매(n-hexane : ethylacetate, 3:1)가 들어 있는 전개용기(100 mm×30 mm×30 mm)에 넣었다. 이때 benfuracarb과 불순

*연락처

물의 분리를 확인하기 위하여 용출액과 benfuracarb 원제를 함께 박층크로마토그래피 판에 spotting 하였다. 전개용매가 박층크로마토그래피 판의 45 mm까지 전개되었을 때, 박층크로마토그래피 판을 꺼내고 UV를 조사하여 benfuracarb과 불순물의 분리를 확인하였고, 불순물이 함유된 용출액을 모아 250 ml 등근바닥플라스크에 담았다.

불순물이 함유되어 있는 용출액을 감압농축기(N-2N, EYELA, Japan)를 이용하여 완전 농축한 후, 1 ml의 methanol로 녹였고, 이 중 일부를 preparative LC(Waters Delta Prep 4000 system, U.S.A. ; 컬럼, 25 100 mm, C18 ; 유속 : 3 ml min⁻¹ ; 이동상, methanol/water : 8 : 2 ; 파장, 254 nm)에 주입하여 각각의 피크(불순물)에 상응하는 용출액을 분주하였다.

각각의 불순물이 함유되어 있는 용출액을 모아 감압농축기를 이용하여 완전 농축하고, 1 ml의 methanol로 녹인 다음, 이를 HPLC(Shimadzu CC-10A system, Japan ; 컬럼, 250 mm, Versapack C₁₈ ; 유속 : 1 ml min⁻¹ ; 이동상, methanol/water : 8 : 2 ; 파장, 254 nm)에 주입하여 각각의 피크로부터 불순물의 순도를 결정하였다. 각각의 불순물이 들어 있는 methanol 농축액을 15 ml의 시험관에 옮긴 후, N₂ 가스로 농축하였다.

유효성분으로부터 분리된 불순물을 -74°C의 deep freezer에 냉동 보관하면서, 실험에 사용하였다.

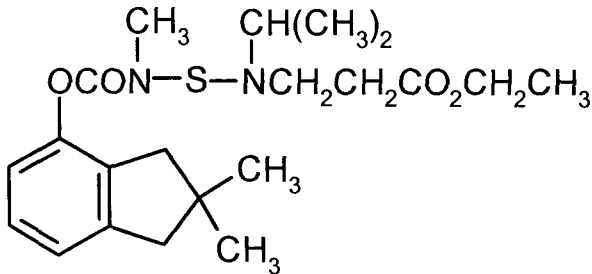


Fig. 1. Chemical structure of benfuracarb, a procarbamate insecticide.

Benfuracarb과 이에 함유된 불순물에 의한 GST와 amidases의 저해

Cytosolic과 microsomal 단백질의 분리

효소 실험에 사용된 cytosolic과 microsomal 단백질은 180~200 g의 생중량을 갖는 Sprague Dawley계 수컷 쥐를 대한실험동물센터(충북 음성군 삼성면 대야리 113)에서 구입하여 사용하였다. 쥐를 구입하여 2~3일간 순화시킨 다음, 경추를 절단시키고, 복부를 절개하여 간을 적출하였다. 적출한 간을 1.15% KCl을 이용하여 남아있는 혈액을 제거한 다음 세절하였고, 세절한 간을 homogenizer tube로 옮긴 후 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) 5 ml를 첨가하고 즉시 균질 마쇄한 다음, 10,000xg에서 15분간 원심분리 하였다. 원심분리한 시료의 상정액을 취하여 105,000xg에서 60분간 초원심분리한 다음 얻은 상정액을 cytosolic 단백질로 사용하였으며, 추출한 단백질들은 -74°C의 deep freezer에 보관하며 사용하였다.

단백질 정량

Bradford(1976)의 방법에 준하여 bovine serum albumin을 standard로 UV-Visible spectrophotometer를 이용하여 흡광도 595 nm에서 단백질을 정량하였다.

GST와 amidase 활성측정

Benfuracarb 원제에 함유된 불순물들의 GST 활성 저해력 측정은 Habig's method(1974)에 준하여 실시하였다. GST를 함유하는 cytosolic protein 10 μ l와 주성분 또는 불순물의 표준액 10 μ l를 37°C에서 5분간 incubation 시킨 후, 15 mM glutathione 30 μ l와 1-chloro-2,4-nitrobenzene(CDNB) 30 μ l를 첨가하였다. 반응 직후 1분간 340 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다.

Benfuracarb 원제와 이에 함유된 불순물들의 amidase 활성 저해력 측정은 Chen and Matsunaka's method(1990)에 준하여 실시하였다.

Amidase를 함유하는 cytosolic protein 60 μ l와 주성분 또는 불순물의 표준액 10 μ l를 37°C에서 5분간 incubation 시킨 후, 0.1M propanil 30 μ l를 첨가하여 동일 온도에서 30분간 incubation 시켰다. 반응액에 10% trichloroacetic acid 1 ml를 가하여 반응을 종결시킨 후 5,000 g에서 10분간 원심분리를 하였다. 상정액에 0.1% dimethyl amino cinnamaldehyde 1 ml를 첨가한 다음, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Benfuracarb에 함유된 불순물의 구조 동정

Benfuracarb 원제로부터 분리한 불순물들의 구조는 infra-red(IR) absorption spectrometer, ¹H-NMR과 ¹³C-NMR, 그리고 liquid chromatograph-mass spectrometer를 이용하여 동정하였다.

무독화효소의 활성을 저해한 불순물들의 작용기를 동정하기 위하여 불순물을 methanol에 녹여 KBr cell에 얇게 도포한 후, FT-IR(Bruker, IFS 48, Germany)을 이용하여 IR 스펙트럼을 얻었다. IR 스펙트럼의 각 피크로부터 불순물의 작용기를 확인하였다.

NMR을 이용하여 무독화효소의 활성을 저해한 불순물들의 구조 분석을 다음과 같이 행하였다. 정제된 불순물을 chloroform-d(TMS 0.03%포함)에 녹여 NMR 분석용 glass tube에 3.5 cm 높이로 채운 후, nuclear magnetic resonance spectrometer(Bruker, DPX 400, U.S.A.)를 이용하여 ¹H-NMR 스펙트럼과 ¹³C-NMR 스펙트럼을 얻었다. NMR 스펙트럼의 각각의 피크로부터 불순물의 구조를 동정하였다.

무독화효소의 활성을 저해한 불순물들의 분자량을 결정하기 위하여 liquid chromatograph-mass spectrometry를 다음과 같이 행하였다.

정제된 불순물을 methanol에 녹여 100 ppm을 만든 후, liquid chromatograph-mass spectrometer(LC-MS, HP 1100 series, U.S.A.) 분석에 이용하였다. 분석에 사용된 컬럼은 Hypersil ODS, C₁₈(5 m, 125×4 mm)이었으며, mobile phase는 methanol-water 혼합액 (8:2, v/v)이었고, 용매속도는 0.5 ml min⁻¹이었다.

결과 및 고찰

Benfuracarb과 이에 함유된 불순물의 GST와 amidase에 대한 저해

Benfuracarb 원제를 column chromatography와 prep LC를 이용하여 유효성분과 불순물로 분리한 후 GST와 amidase에 대한 저해 실험을 수행한 결과는 다음과 같다. GST에 대한 선택적 저해제인 ethacrynic acid의 효소활성 50% 저해도(I_{50})는 1.7×10^{-5} M이었고, benfuracarb 원제, 유효성분 및 불순물의 GST에 대한 I_{50} 은 선택적 저해제에 의한 I_{50} 보다 높았는데 각각의 I_{50} 은 9.7×10^{-4} M, $>1.0 \times 10^{-3}$ M, 1.8×10^{-4} M이었다(표 1). 저자들이 검정한 benfuracarb 원제의 GST에 대한 I_{50} 은 동일한 원제를 가지고 GST에 대한 활성저해 실험을 수행한 김(1998)의 I_{50} (1.3×10^{-4} M)과 비슷하였다. Benfuracarb 유효성분의 GST에 대한 I_{50} 값이 매우 높았는데, 이는 유효성분의 GST에 대한 저해가 매우 약하다는 것을 나타내며, 원제에 의한 GST 활성저해가 유효성분에 의한 것이 아니라는 것을 시사하여 준다. GST에 대한 benfuracarb 원제와 불순물의 I_{50} 이 비슷하였는데, 이 결과는 원제에 의한 효소활성저해에 원제뿐만 아니라 불순물 역시 관여했다는 것을 나타내는 것이다.

Amidase에 대한 선택적 저해제인 IBP(iprobenfos)의 I_{50} 은 8.2×10^{-7} M이었다. Benfuracarb 원제, 유효성분 및 불순물은 모두 amidase의 활성을 저해하였고, 이들의 I_{50} 은 각각 6.0×10^{-5} M, 4.3×10^{-4} M과 7.6×10^{-5} M이었다(표 1). 이러한 결과를 바탕으로 benfuracarb 원제의 amidase 활성저해는 유효성분과 불순물에 의해 일어난 것이라 추론하였고, benfuracarb에 함유된 불순물 정제를 통해 불순물의 정체를 구명하고자 하였다.

Benfuracarb 원제를 column chromatography와 prep LC를 이용하여 유효성분과 불순물로 분리하여 분리한 후, 분리된 각 화합물 피크와 그 이외의 피크 비율을 비교한 결과 IM 1, IM 2, IM 3, IM 4의 순도는 각각 94.1%,

94.2%, 90.6%, 93.6%이었다. 각각의 분리된 불순물들이 GST와 amidase를 저해하는지를 확인하기 위하여 효소활성 저해 실험을 재차 수행하였다.

IM 1은 효소저해와 구조동정을 위한 충분한 양을 확보하지 못하였기에, 본 연구에서는 IM 2-4에 대한 효소저해 및 이들의 구조를 동정하였다. 효소활성 저해실험 결과 IM 2와 3은 무독화효소인 GST와 amidase의 활성을 저해한 반면, IM 4는 저해하지 않았다. IM 2의 GST와 amidase에 대한 I_{50} 은 각각 4.9×10^{-4} M과 3.0×10^{-4} M이었고, IM 3의 GST와 amidase에 대한 I_{50} 은 각각 6.4×10^{-5} M과 5.3×10^{-5} M이었다. IM 2와 IM 3에 의한 GST와 amidase 저해정도는 benfuracarb에 함유되어 있는 불순물(표 2)에 의한 GST와 amidase 저해정도와 유사하였기에 불순물이 무독화효소인 GST와 amidase를 저해한다는 사실을 재확인하였다.

Benfuracarb에 함유된 불순물의 분리 및 구조 동정

Benfuracarb 원제에 의한 GST와 amidase 활성저해가 원제 중에 함유된 불순물에 의한 것이었기에, benfuracarb 원제에 함유되어 있는 불순물을 동정하는 실험을 수행하였다. Preparative LC를 사용하여 분리 정제하고 크로마토그램 상에서 확인된 benfuracarb 불순물은 총 4종이었으며, 이들은 머무름시간 순서대로 IM 1-4로 명명되었다. 각 IM들의 머무름시간은 10.2분, 13.9분, 18.0분과 25.3분이었으며, 함량은 IM 2 > IM 3 > IM 4 > IM 1의 순이었다(그림 2).

Benfuracarb에 함유되어 있는 4종의 불순물 중 IM 2와 IM 3이 GST와 amidase의 활성을 저해하였기에 이들의 구조를 분석하였다. IM 2의 구조를 IR을 이용하여 동정한 결과 피크 2900 cm^{-1} 에서 ester 기 피크, 1736 cm^{-1} 에서 C=O 신축 진동에 의한 피크, 1258 cm^{-1} 에서 amine기 피크를 확인하였다. 그리고 $^1\text{H-NMR}$ spectrum을 얻고 이의 결과를 해석한 바, ethoxy기의 2개의 수소가 4.2 ppm에서 quartet으로 3개의 수소가 1.4 ppm에서 triplet으로 나타났

Table 1. Inhibition of technical grade (90.2%), active ingredient and impurities of benfuracarb to detoxifying enzymes

Enzyme	Benfuracarb		
	Technical grade (90.2%)	Active ingredient (99.2%)	Impurities in technical grade
		I_{50} (M)	
Glutathion-S-transferase	9.7×10^{-4}	$> 1.0 \times 10^{-3}$	1.8×10^{-4}
Amidase	6.0×10^{-5}	4.3×10^{-4}	7.6×10^{-5}

Table 2. Inhibition of glutathion-S-transferase and amidase by impurities in technical grade (90.2%) benfuracarb

Enzyme	IM 2 (94.2%)	IM 3 (90.6%)	IM 4 (93.6%)
		I_{50} (M)	
Glutathion-S-transferase	4.9×10^{-4}	6.4×10^{-4}	- ^{a)}
Amidase	3.0×10^{-4}	5.3×10^{-4}	- ^{a)}

^{a)}no inhibition

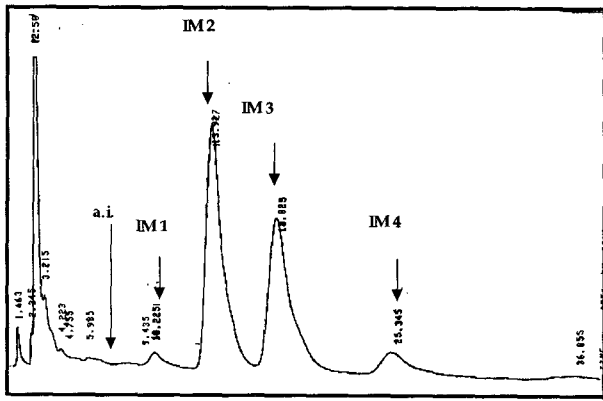


Fig. 2. A chromatogram of impurities in technical grade benfuracarb. Impurities were separated from technical grade (90.2%) benfuracarb by column chromatography and preparative liquid chromatography.

으며(표 3), 3.4 ppm에서 isopropyl 기의 1개의 수소가 multiplet으로 6개의 수소가 1.2 ppm에서 doublet으로 나타났다. 그리고 amino기 옆 2개 탄소의 수소 2개는 각각 2.8 ppm, 3.2 ppm에서 triplet으로 나타났다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서는 C=O group에 의한 peak가 175 ppm에서, C-2, 3은 60 ppm에서 확인되었으며, C-4는 49 ppm에서, C-6은 34 ppm에서 확인되었다(표 3). 그리고 20 ppm에서 C-1이 coupling된 것과, 15 ppm에서 C-7이 관찰되

었다.

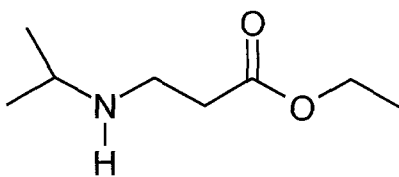
또한 LC-MS(표 3)를 이용한 분석 결과로부터 IM 2의 화학구조가 분자량 159의 $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{NO}_2$ 인 ethyl-*N*-isopropyl amino propionate(그림 3)로 동정되었다.

불순물 중의 IM 3의 구조를 동정하기 위하여 기기 분석을 수행한 결과, IR, $^{13}\text{C-NMR}$ 에서는 IM 2와 유사한 결과를 얻을 수 있었다(표 3). 그러나 $^1\text{H-NMR}$ 에서는 3.2 ppm의 multiplet이 약간 왼쪽으로 이동되어 있음을 관찰할 수 있었다. LC/MS로 분석한 결과 분자이온 m/z 는 227이었고, Cl의 동족체 피크존재비(3:1)로부터 Cl 원소가 1개라는 것을 알 수 있었으며, 분자의 fragment로서 분자이온 m/z 는 102와 125라는 것을 확인할 수 있었다(표 3). $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 H의 수가 17개이었고, $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서 C의 수가 8개이었으며, IR 스펙트럼에서는 IM 2에서 발견된 작용기가 모두 존재하였다. 이러한 결과를 바탕으로 benfuracarb의 불순물 IM 3은 질소원자에 H가 결합되어 양(+)으로 하전되어 염의 형태로 존재하는 것이라 추론하였다. 이러한 일련의 구조동정으로 통하여 밝힌 IM 4는 분자량 226의 $(\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}+\text{O}_2\text{S}) \cdot \text{X}$ (그림 3)로 동정하였고, 그 일반명은 ethyl-*N*-isopropyl-*N*-(chlorosulfonyl)amino propionate이었다. 본 실험을 통하여 구조가 동정된 IM 2와 3은 benfuracarb 합성 공정 중에 혼입되었거나 혹은 합성물로부터 분해되어 benfuracarb 원제에 존재하는 것으로 추정된다.

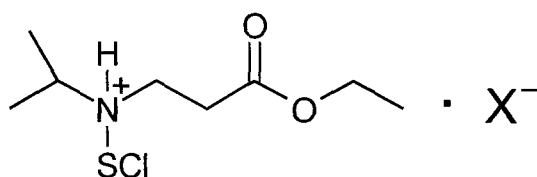
본 연구는 benfuracarb의 원제에 함유되어 있는 유효성분 혹은 불순물이 무독화과정에 관여하는 GST와 amidase

Table 3. $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, and LC-MS data of IM 2 and IM 3 purified from technical grade benfuracarb

Impurity	Chemical name	$^1\text{H-NMR}$ (δ , CDCl_3/TMS)	$^{13}\text{C-NMR}$ (δ , CDCl_3/TMS)	LC-MS (m/z)
IM 2	ethyl- <i>N</i> -isopropylamino propionate	1.25 (d,6H), 1.25 (t,4H), 2.75 (t,2H), 3.3 (t,2H), 3.5~3.4 (m,1H), 4.25 (q,2H)	12 (s,1C), 10.5 (d,2C), 32 (s,1C), 49 (s,1C), 60 (s,1C), 61 (s,1C), 172 (s,1C)	160 (M^+), 159, 144, 118, 102
IM 3	ethyl- <i>N</i> -isopropyl- <i>N</i> -(chlorosulfonyl)aminopropionate	1.15 (d,6H), 1.3 (t,4H), 2.7 (t,2H), 3.27 (t,2H), 3.4~3.3 (m,1H), 4.15 (q,2H)	12 (s,1C), 20.5 (d,2C), 32 (s,1C), 49.5 (s,1C), 60 (s,1C), 61 (s,1C), 172 (s,1C)	227 (M^+), 143, 102, 101, 100



IM 2



IM 3

Fig. 3. Chemical structures of impurities IM 2 and IM 3 in benfuracarb.

를 직접 공격하여 그 활성을 둔화 혹은 저해한다는 것을 보여 주고 있다. 무독화효소인 GST와 amidase를 공격하는 benfuracarb 혹은 불순물을 무독화효소에 의해 저해되는 농약과 혼합제로 개발할 경우, 농약의 약효 상승효과를 기대할 수 있을 것이다.

인용문헌

- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248~254.
- Burns, R. G. and J. A. Edwards (1980) Pesticide breakdown by soil enzymes. *Pestic. Sci.* 11:506~512.
- Chen, J. J. and S. Matsunaka (1990) The propanil hydrolyzing enzyme aryl acyl amidase in the wild

rices of genus *Oryza*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 38:26~38.

Edward, D. P. and P. C. Jepson (1993) Synergism between EBI fungicides and a pyrethroid insecticide in the honeybee (*Apis mellifera*). *Pestic. Sci.* 39:293~297.

Habig, W. H., M. J. Pabst, and W. B. Jakoby (1974) Glutathione-S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249:7130~7139.

김재훈 (1998) Glutathione-S-transferase, aryl-acyl amidase, monooxygenase의 저해특성을 이용한 혼합제 개발 연구. 강원대학교 대학원 석사학위 논문. p.51.

농약사용지침서 (2000) 농업공업협회. p.823.

조준모 (1998) 농약의 무독화 효소 저해 특성을 이용한 혼합제 개발. 강원대학교 대학원 석사학위 논문. p.46.

Inhibition of glutathione-S-transferase and amidase by impurities in technical grade benfuracarb

Chang-Sub Yum¹, Songmun Kim¹, Ji Sook Yu², Jang-Hyun Hur^{1*}(¹Division of Biological Environment, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea, ²Department of Chemistry, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea)

Abstract : Objectives of this study were to determine if impurities in technical grade benfuracarb inhibit glutathione-S-transferase and amidase and to identify structures of impurities in technical grade benfuracarb. Technical grade benfuracarb, active ingredient, and impurity inhibited glutathione-S-transferase, and their I_{50} were 9.7×10^{-4} M, $>1.0 \times 10^{-3}$ M, 1.8×10^{-4} M, respectively. Such inhibition, however, was not higher than that by ethacrynic acid, a selective inhibitor to GST. Technical grade benfuracarb, active ingredient, and impurity also inhibited amidase, and their I_{50} were 6.0×10^{-5} M, 4.3×10^{-4} M, 7.6×10^{-5} M, respectively. Our results show that the inhibition of both detoxifying enzymes by impurities in benfuracarb was 10-fold lower than that by active ingredient, suggesting that both active ingredient and impurities are involved in the inhibition of both detoxifying enzymes. Of four impurities (IM 1~4) that were separated from technical grade benfuracarb, IM 2 and IM 3 inhibited GST and amidase. Based on data from IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR and MS, it was determined that IM 2 is ethyl-N-isopropylamino propionate and IM 3 is ethyl-N-isopropyl-N-(chlorosulfonyl)aminopropionate.

*Corresponding author (Fax : +82-33-254-3835, E-mail : jhhur@cc.kangwon.ac.kr)