

배추좀나방(*Plutella Xylostella Linnaeus*)에 대한 새로운 살충활성 분자의 설계

조윤기¹ · 최우영¹ · 성낙도^{1*}

Design of the New Insecticidal Active Molecule against Diamond-Back Moth (*Plutella Xylostella Linnaeus*)

Yun-Gi Cho¹ · Woo-Young Choi¹ · Nack-Do Sung^{1*}

ABSTRACT

The new insecticidal active molecules from the based on the holographic quantitative structure-activity relationships (HQSAR) between a series of 1-(R₁)-2-(n-octyl)-3-(R₂),3-(R₃)-pseudothiourea derivatives and their insecticidal activities against Diamond-back moth (*Plutella Xylostella Linnaeus*) were designed and discussed quantitatively. The most active molecule from the based graphical analyses of atomic contribution maps with the optimized HQSAR C-1 model ($q^2=0.764$ & $r^2_{ncv}=0.942$) was 1-(n-butyl)-2-(t-butyl)-3,3-diisopropylpseudothiourea (P1: pI₅₀=5.30, IC₅₀=1.397 ppm). Therefore, it is suggested that the new designed molecule would increased the activity as much as 23.5 times as compared to X=n-octyl substituent 17(pI₅₀=4.00, IC₅₀=32.86 ppm) which was the highest active molecule in training set compounds.

Key words : Molecular design, HQSAR, Insecticidal activity, 1-(R₁)-2-(n-octyl)-3-(R₂),3-(R₃)-pseudothioureas, Diamond-Back moth (*Plutella Xylostella Linnaeus*).

본 연구는 한국과학재단(KOSEF) 우수연구센터(ERC) 육성사업의 지원으로 수행되었음(No. R11-2002-100-03005).
¹ 충남대학교 농업생명과학대학 응용생물환경화학식품학부 생물환경화학전공, 유기합성 및 생물활성제어실험실
(Division of Applied Biology, Chemistry & Food Science, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea)

* 교신저자 : 성낙도(E-mail: ndsung15@hanmail.net, Tel: 042-821-6737)

I. 서 론

국제작물보호연맹(GCPE: Global Crop Protection Federation) 산하의 한 조직으로 제초제, 살균제 및 살충제에 관한 저항행동위원회(RAC: resistance action committee)는 생물활성의 작용점(site of action)을 기준으로 한 작용기작(mode of action)에 기초하여 사용 목적에 따라 농약들을 Group이나 Code로 각각 분류하였다. 현재, IRAC(Insecticide RAC)에 의하여 분류된 살충제는 작용기작이 알려지지 않은 것을 포함하여 31 Group과 69종의 유도체들로 구성되어 있으며(IRAC, 2007) 이 중에서 유기인계 화합물이 가장 많은 유효성분을 포함하고 있다.

특히, 살충제 중에서 Isothiourea 골격을 갖는 화합물들은 Buprofezine 등, 18종이 알려져 있다(Worthing, 1991). 이 Buprofezine을 주성분으로 하는 Applaud는 Pyrethroid와 비슷한 선택독성을 갖는다(Japan Pesticides, 1987). 그러나 Applaud는 pyrethroid와는 달리 Juvenile hormone 활성화에 의한 chitin 생합성 저해제인 동시에 곤충의 탈피 및 성장을 억제하여 살충효과를 나타내는 곤충생장 조절제(Insect Growth Regulator, IGR)로 알려져 있다(Uchida와 Sugimoto, 1985). IGR 계통의 약제는 키틴합성 저해제, 유약 호르몬 유사체, 유약 호르몬, 탈피 호르몬 유도체, 탈피 호르몬, 탈피 저해제, 조숙 행동제 및 기타 등, 크게 8가지로 분류되며 우리나라에 등록되어 있는 대표적인 키틴합성 저해제는 Novaluron(Kumar와 Jaglan, 2005), Diflubenzuron(Thavara 등, 2007), Chlorfluazuron(Retnakaran 등, 1989) 및 Flufenoxuron(Salokhe 등, 2006) 등이 있다.

본 연구에서는 앞서의 연구(Sung 등, 1995; Sung 등, 1997)에 기초하여 배추좀나방(*Plutella Xylostella*

Linnaeus)에 대하여 선택적인 살충활성을 나타내는 2-n-octylpseudothiourea 유도체(Fig. 1)들의 홀로그래피적인 정량적 구조와 활성관계(HQSAR: Holographic Quantitative Structure-Activity Relationship)를 검토하고(Akamatsu, 2002; Heritage와 Lowis, 1999) 새로운 살충성 분자를 설계하였다.

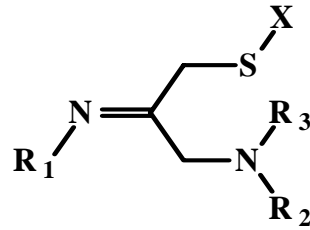


Fig. 1. General structure of 1-(R₁)-2-(n-octyl)-3-(R₂),3-(R₃)-pseudothiourea derivatives.

II. 재료 및 방법

1. 설명 인자들의 계산

분자 모델링과 PLS (partial least square) 분석은 Sybyl(Ver. 7.3) 프로그램(Tripos Inc.)를 사용하였다. 기질 분자로서 1-(R₁)-2-(n-octyl)-3-(R₂),3-(R₃)-pseudothiourea (이하 2-n-octyl pseudothiourea로 략함) 유도체들의 배추좀나방(*Plutella Xylostella Linnaeus*)에 대한 살충 활성 값(pI₅₀)은 저자의 문헌값을 이용하였다(Sung 등, 1995; Sung 등, 1997). 살충활성과 분자조각 크기 사이의 관계를 알아보기 위하여 분자 조각의 수를 2~10 bin 크기로 생성시키고 분자의 홀로그램 길이(53-257)를 넓게 선택하여 계산을 실행하

Table 1. Observed insecticidal activity ($Obs.pI_{50}$) of 1-(R_1)-2-(n-octyl)-3-(R_2),3-(R_3)-pseudothiourea derivatives against Diamond-Back moth and predicted insecticidal activity ($Pred.pI_{50}$) by the optimized HQSAR model for the training set

No.	Substituents			Insecticidal activity		
	R_1	R_2	R_3	Obs	$Pred^{a)}$	$Dev^{b)}$
1	Benzoyl	isopropyl	isopropyl	3.40	3.46	-0.06
3	4-fluorophenyl	isopropyl	isopropyl	2.94	2.92	0.02
4	4-chlorophenyl	isopropyl	isopropyl	3.09	3.03	0.06
5	4-nitrophenyl	isopropyl	isopropyl	2.97	3.01	-0.04
6	4-bromophenyl	isopropyl	isopropyl	2.83	2.83	0.00
7	4-methoxyphenyl	isopropyl	isopropyl	3.08	3.07	0.01
9	3-methoxyphenyl	isopropyl	isopropyl	3.33	3.33	0.00
10	3-cyanophenyl	isopropyl	isopropyl	3.17	3.19	-0.02
11	3-nitrophenyl	isopropyl	isopropyl	3.34	3.35	-0.01
13	Ethyl	isopropyl	isopropyl	3.30	3.58	-0.28
14	n-propyl	isopropyl	isopropyl	3.90	3.81	0.09
15	Allyl	isopropyl	isopropyl	3.72	3.60	0.12
16	2-methylpropyl	isopropyl	isopropyl	3.89	4.05	-0.16
17	n-Butyl	isopropyl	isopropyl	4.00	3.84	0.16
18	3-methylbutyl	isopropyl	isopropyl	3.80	3.88	-0.08
20	Ethoxypropyl	isopropyl	isopropyl	3.80	3.76	0.04
21	Cyclopentyl	isopropyl	isopropyl	3.78	4.00	-0.22
22	Cyclohexyl	isopropyl	isopropyl	3.75	3.63	0.12
23	Cyclohexylmethyl	isopropyl	isopropyl	3.30	3.39	-0.09
24	Cycloheptyl	isopropyl	isopropyl	3.32	3.05	0.27
27	n-propyl	H	methyl	2.63	2.77	-0.14
28	n-propyl	H	ethyl	2.83	2.83	0.00
29	n-propyl	H	ethenyl	2.86	2.83	0.03
30	n-propyl	H	isopropyl	3.00	2.82	0.18
31	n-propyl	H	cyclopropyl	2.85	2.83	0.02
32	n-propyl	H	1-methylpropyl	2.88	2.91	-0.03
33	n-propyl	H	1,1-dimethylpropyl	2.90	2.87	0.03
35	n-propyl	H	n-butyl	2.82	2.84	-0.02
36	n-propyl	H	t-butyl	2.88	2.79	0.09
38	n-propyl	H	isobutyl	2.90	2.88	0.02
39	n-propyl	H	pentyl	2.73	2.64	0.09
40	n-propyl	H	cyclopentyl	2.90	2.71	0.19
41	n-propyl	H	isoamyl	2.86	2.82	0.04
42	n-propyl	H	hexyl	2.44	2.43	0.01
44	n-propyl	H	heptyl	2.11	2.20	-0.09
45	n-propyl	H	n-octyl	1.62	1.96	-0.34
Ave. ^{c)} ($PRESS$) ^{d)}				0,081 (0,547)		

^{a)}Predicted values by the optimized HQSAR C-1 model, ^{b)}different between observed value and predicted value, ^{c)}average residual of training set, ^{d)}predictive residual sum of squares of the training set.

였다. 이에 따른 분자 홀로그램 길이의 조건에서 다양한 분자조각 특징(atoms, bonds, connections, H-bond donor 및 acceptor)들의 조합에 따른 몇 가지 모델들을 유도하였다. 여기에서는 분자 조각의 크기가 4-7인 경우에 가장 양호한 통계값을 얻을 수 있었으며 그 조건에서 분자 조각의 특징들을 변화시켜 최종적으로 가장 좋은 통계값을 갖는 HQSAR 모델을 탐색하였다.

2. HQSAR-PLS의 계산

Training set ($n=36$) 화합물(Table 1)에 대한 PLS 계산으로부터(Mager, 1998) HQSAR 모델을 유도하였으며 무작위로 선택된 test set ($n=9$) 화합물에 대하여 HQSAR 모델의 예측성을 판단하였다. HQSAR 모델의 유도시 적정한 성분 수와 예측성(q^2)은 leave-one-out(LOO) cross-validation 과정에 의하여 결정된다. 그 다음에 적정한 주성분의 수를 사용하여 cross-validation 하지 않고 유도되는 모델에 대하여 최종 PLS 분석을 실행한다(Cho 등, 2006). 각 분자조각 중에 포함된 정보는 기본적으로 수소(H) 원자와 키랄성(chirality)이 제외된 채로 atoms, bonds 및 connections들이 홀로그램을 생성하는데 사용되었다. 적정모델(optimized model)의 척도는 예측성, q^2 값(r^2_{cv})=0.50 이상 그리고 상관성, r^2_{ncv} = 0.90 이상이어야 한다. 유도된 적정 HQSAR 모델에 관한 정보는 색깔로 암호화 된 기여도(atomic contribution map)로 나타내어 구조식 중, 살충활성의 기여 정도를 나타낸다. 뿐만 아니라, optimized QSAR tool을 사용하여 전보의 방법에 따라서(Sung과 Jang, 2007) 가장 높은 살충활성을 나타내는 새로운 분자를 설계하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 기질 유도체의 살충활성

HQSAR 방법으로 배추좀나방(*Plutella Xylostella Linnaeus*)에 대하여 살충활성을 나타내는 화합물의 구조적 특징을 탐색하기 위하여 기질 분자로서 45개의 2-n-octylpseudothiurea 유도체들의 살충 활성값(pI_{50})을 Table 1에 정리하였다. 가장 낮은 살충 활성값을 나타내는 화합물은 45번 분자($pI_{50}=1.62$)이었으며 가장 높은 살충 활성값을 나타내는 화합물은 17번 분자($pI_{50}=4.00$)이었다. 1-11번의 화합물에서는 치환기의 위치에 따라서 다소 상이하기는 하였으나 R_1 -치환기가 전자를 당기는 경우에는 살충 활성값이 낮아지는 경향을 나타내었다. 그리고 27-45번 화합물들은 R_3 -치환기 형태가 사슬형보다 곁가지이거나 고리형인 경우에 살충 활성값이 개선되는 경향을 보였다.

2. HQSAR 모델의 유도

2-n-octylpseudothiurea 유도체의 구조변화에 따른 살충 활성값(pI_{50}) 값과의 관계를 알아보기 위하여 training set을 대상으로 HQSAR 분석을 실시하고(Heritage와 Lewis, 1999) PLS 분석 결과들은 Table 2에 정리하였다. 최적의 통계값을 자료를 얻기 위하여 분자조각의 크기를 2~5, 3~6, 4~7, 5~8, 6~9 및 7~10으로 변화시키며 계산하였다. 이중에서 저해활성이 우수한 분자조각의 크기는 4~7 범위로서 길이는 59 bin으로 분석되었다. Table 3에서는 최적의 양호한 통계값을 갖는 모델(C)을 바탕으로 분자조각의 특징을 변화시켜가며 최적의 통계값을 갖는 모델을 탐색하였다. 분자조각의 특징으로서 Atoms/bonds,

Table 2. HQSAR analyses for the influence of various *fragment sizes* on the key statistical parameters

Models	Best length		PLS analyses				
	Fragment size	Hologram	$r_{cv.}^2(q^2)$	SE _{cv.}	$r_{ncv.}^2$	SE _{ncv.}	NC
A	2~5	97	0.740	0.275	0.818	0.230	3
B	3~6	307	0.742	0.273	0.821	0.228	3
C	4~7 ^{a)}	59	0.773	0.265	0.918	0.159	5
D	5~8	307	0.718	0.286	0.795	0.244	3
E	6~9	353	0.703	0.294	0.777	0.255	3
F	7~10	199	0.681	0.304	0.759	0.265	3

^{a)}The best of fragment size., SE_{cv.}: cross-validated standard error., SE_{ncv.}: non-cross-validated standard error., NC: number of component.

Table 3. HQSAR analyses for various fragment distinction on the key statistical parameters using *fragment size* default (4~7)

Models	Best length		PLS analyses				
	Fragment distinctions	Hologram	$r_{cv.}^2(q^2)$	SE _{cv.}	$r_{ncv.}^2$	SE _{ncv.}	NC
C	Connections	59	0.773	0.265	0.918	0.159	5
C-1 ^{a)}	Atoms/bonds	53	0.764	0.275	0.942	0.137	6
C-2	Chirality	61	0.789	0.260	0.936	0.143	6

^{a)}The optimized HQSAR model, SE_{cv.}: cross-validated standard error., SE_{ncv.}: non-cross-validated standard error., NC: number of component.

Table 4. Observed activity (*Obs.PI₅₀*) against Diamond-Back moth and predicted activity (*Pred.PI₅₀*) by the optimized HQSAR model for the test set

No.	Substituents			Insecticidal activity		
	R ₁	R ₂	R ₃	Obs	Pred ^{a)}	Dev ^{b)}
2	4-chlorobenzyl	isopropyl	isopropyl	3.45	3.41	0.04
8	3-bromophenyl	isopropyl	isopropyl	3.23	2.73	0.50
12	Methyl	isopropyl	isopropyl	2.77	3.47	-0.70
19	n-Pentyl	isopropyl	isopropyl	3.83	3.70	0.13
25	n-hexyl	isopropyl	isopropyl	3.80	3.49	0.31
26	n-propyl	H	H	2.38	2.58	-0.20
34	n-propyl	H	1-ethylpropyl	2.89	2.96	-0.07
37	n-propyl	H	cyclobutyl	2.89	3.01	-0.12
43	n-propyl	H	cyclohexyl	2.90	2.34	0.56
Ave. ^{c)} (<i>PRESS</i>) ^{d)}				0.062 (1.228)		

^{a)}Predicted values by the optimized HQSAR C-1 model, ^{b)}different between observed value and predicted value, ^{c)}average residual of test set, ^{d)}predictive residual sum of squares of the test set.

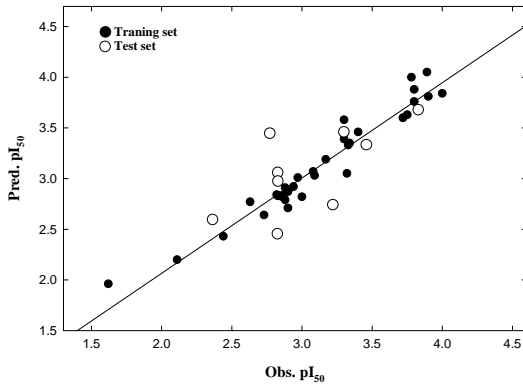


Fig. 2. Relationships between observed insecticidal activities ($Obs.pI_{50}$) and predicted insecticidal activities ($Pred.pI_{50}$) by optimized HQSAR C-1 model.

Connections, Chirality가 사용되었다. 특히, Atoms/bonds 조건을 갖는 최적모델(C-1)에서 $q^2=0.764$ 및 $r^2=0.942$ 를 얻을 수 있었으며 분자 홀로그램의 길이는 53 bin 그리고 주성분 수는 6이었다. 최적의 HQSAR 모델(C-1)로부터 예측된 활성값 ($Pred.pI_{50}$)과 관측값($Obs.pI_{50}$)과의 관계를 Fig. 2에 나타내었다. 비례관계식($Pred.pI_{50}=0.941Obs.pI_{50}+0.184$, $n=36$, $r^2=0.941$ 및 $q^2=0.935$)으로부터 두 활성값 사이에는 상관성과 예측성이 높음을 확인할 수 있었으며 test set 화합물들은 training set 화합물들에 비하여 직선에서 약간 벗어나는 경향을 나타내었다. 또한, test set 화합물들에 대하여 최적의 HQSAR 모델(C-1)로 예측된 살충 활성값은 Table 4에 정리하였다. Test set의 오차(Ave.= 0.081 및 $PRESS=0.547$)가 training set의 오차(Ave.=0.062 및 $PRESS=1.228$)보다 큰 경향을 나타내었으나 Ave.값이 관측값($Obs.pI_{50}$)의 10%이내 값을 나타내므로 HQSAR 모델(C-1)

의 예측성이 대체로 양호함을 시사하고 있다.

3. 기여도와 분자설계

배추좀나방(*Plutella Xylostella Linnaeus*)에 대한 2-n-octylpseudothiourea 유도체의 살충활성에 미치는 구조상 특성을 비교 분석하기 위하여 살충활성이 가장 작은 화합물(45)과 가장 큰 화합물(17)에 대한 기여도를 Fig. 3에 제시하였다. 기여도에서 활성에 기여하는 부분은 녹색 그리고 기여하지 않는 부분은 붉은색으로 나타내었다. 저해활성이 가장 낮은 45번 화합물($pI_{50}=1.62$)은 R_3 -치환기로서 n-octyl group이 도입되는 경우, octyl group의 C₆-C₇번 탄소원자 사이 그리고 S

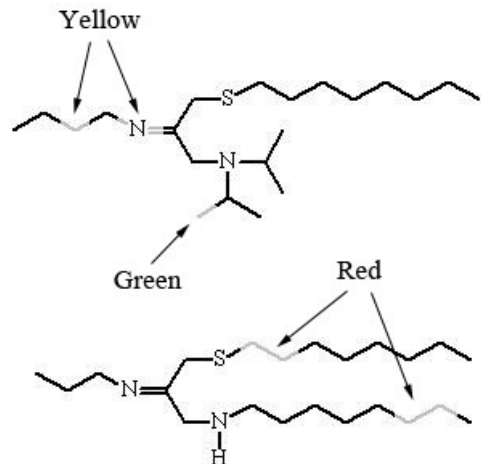


Fig. 3. Atomic contributions to the insecticidal activities ($Obs.pI_{50}$) of 1-(R_1)-2-(n-octyl)-3-(R_2),3-(R_3)-pseudothiourea derivatives (Up: 17: $Pred.pI_{50}=3.84$ & Down: 45: $Pred.pI_{50}=1.96$): Red color denotes the least contribution to the insecticidal activity while green color signifies greatest contribution and black color signifies average contribution.

Table 5. Predicted insecticidal activity ($Pred_{pI_{50}}$) of designed 1-(n-butyl)-2-(x)-3,3-diisopropyl pseudothiurea derivatives using the optimized HQSAR C-1 model

No.	X-Substituent ^{a)}	Pred(pI_{50})	IC ₅₀ (ppm)	Priority order
P1	t-Butyl ^{b)}	5.30	1,397	1
P2	Cyclopropyl	5.17	1,734	2
P3	2-Methylcyclopropyl	5.12	2,052	3
P4	2,3-Dimethylcyclopropyl	5.00	2,911	4
P5	1-Methylpropyl	5.00	2,788	5
P6	Isopropyl	4.94	2,968	6

^{a)}Groups on the S atom ($R_1=n$ -butyl & $R_2=R_3$ =isopropyl group), Patent pending Nov, 2007., ^{b)}The designed most highest active molecule.

원자와 결합한 X-치환기의 C₁-C₂번 탄소원자 사이에 붉은색이 나타나므로 이들 부분이 살충활성에 기여하지 않음을 알 수 있었다. 반면에 가장 높은 살충활성을 나타낸 17번 화합물($pI_{50}=4.00$)은 R₃-치환기로서 isopropyl group이 도입되는 경우, 말단 부위의 탄소원자에 녹색이 나타나는 부분이 살충활성 개선에 영향을 미치고 있다. R₁-치환기로서 n-butyl group이 결합하는 질소(N) 원자와 butyl group의 C₂번 탄소원자 부분에는 노란색을 나타나므로 이 부분이 살충활성에 약간 기여한다는 것을 알 수 있다.

이상과 같이, 적정 HQSAR 모델(C-1)의 살충활성에 관한 정보를 구조식에 나타낸 기여도 분석결과에 기초하여 고효성 분자를 탐색한 결과, R₁, R₂ 및 R₃-치환기보다는 S 원자에 결합된 X-치환기의 변화에 살충활성이 예민하게 대응한다는 사실을 알았다. 그러므로 다루어진 화합물 중에서 가장 높은 살충활성을 나타낸 화합물(17)의 R₁=n-butyl 및 R₂=R₃=isopropyl group을 고정하고 X-치환기를 수식하여 설계된 분자들의 예측된 살충 활성값들을 Table 5에 정리하였다.

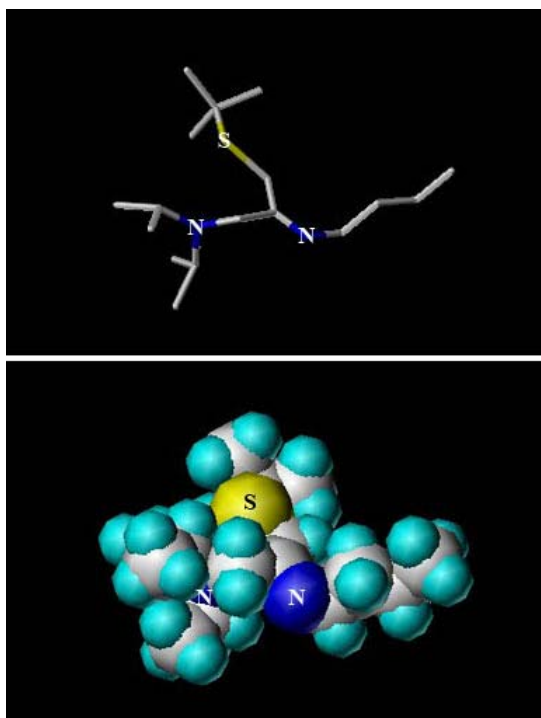


Fig. 4. Molecular structure of the most insecticidal active compound, designed 1-(n-butyl)-2-(t-butyl)-3,3-diisopropyl-pseudothiurea (P1: $red_{pI_{50}}=5.30$) up: Tube model & Down: CPK model.

그 결과, 예측된 살충활성이 가장 높은 분자는 X=t-butyl 치환체(**P1**: $pI_{50}=5.30$, $IC_{50}=1.397$ ppm)이었다. 따라서 분자설계된 새로운 X=t-butyl치환체는 X=n-octyl 치환체(**17**: $pI_{50}=4.00$, $IC_{50}=32.86$ ppm)보다 살충활성이 23.5배 향상된 결과를 나타내었으며 최적 HQSAR 모델(C-1)에 의하여 예측값이 일치 할 확률은 약 94.2%이다. 따라서 Fig. 4에는 배추좀나방에 대하여 살충활성이 가장 높을 것으로 예상되는 1-(n-butyl)-2-(t-butyl)-3,3-diisopropylpseudothiourea (**P1**) 분자의 3차원 구조식을 제시하였으며 분자내 원자간 반발력이 최소화 된 최적화 에너지는 8.839 Kcal/mol이었다.

참고문헌

1. Akamatsu, M. 2002. Current state and perspectives of 3D-QSAR, *Curr. Topics Med. Chem.* 2 : 1381-1394.
2. Cho, S. Y., J. Y. Baek, S. S. Han, S. K. Kang, J. D. Ha, J. H. Ahn, J. D. Lee, K. R. Kim, H. G. Cheon, S. D. Rhee, S. D. Yang, G. H. Yon, C. S. Pak, and J. K. Choi. 2006. PTP-1B inhibitors: Cyclopenta[d][1,2]-oxazine derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett* 16 : 499-502.
3. Heritage, T. W. and D. R. Lowis. 1999. Molecular hologram QSAR. Ch. 4., In *Rational drug design: Novel Methodology and Practical Applications* (ed. Parrill, A. L. and M. R. Reddy), ACS Symposium Series 719, ACS, Washington, DC.
4. IRAC Mode of Action Classification. Insecticides resistance action committee (IRAC). 2007. www.irac-online.org/.
5. Japan Pesticides, 1987, No. 11, Japan Pesticide Information, Tokyo.
6. Kumar, H. and R. S. Jaglan. 2005. Efficacy of novaluron against diamondback moth, *Plutella xylostella* L. *Haryana. J. Horticultural Sc.* 34(34) : 305-307.
7. Mager, P. P. 1998. *Multivariate Chemometrics in QSAR: A Dialogue*. Letchworth, Hertfordshire, England, Wiley.
8. Retnakaran, A., A. MacDonald, D. Nicholson, and J. Percy-Cunningham. 1989. Ultrastructural and autoradiographic investigations of the interference of chlorfluazuron with cuticle differentiation in the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. *Pesticide Biochem. Physiol.* 35(2) : 172-184.
9. Salokhe, S., A. Sarkar, A. Kulkarni, S. Mukherjee, and J. K. Pal. 2006. Flufenoxuron, an acylurea insect growth regulator, alters development of *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae) by modulating levels of chitin, soluble protein content, and HSP70 and p34cdc2 in the larval tissues. *Pesticide Biochem. Physiol.* 85(2) : 84-90.
10. Sung, N. D. and S. C. Jang. 2007. Molecular holographic QSAR analyses on the bonding affinity constants between nicotine acetylcholine receptors and new 3-benzylidenemyosine analogues and molecular design. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 50(2) : 127-131.
11. Sung, N. D., K. C. Jeoung, D. J. Jeon, and D. H. Kim. 1995. Influence of N-substituent Amino group on the Insecticidal Activity of 2-(n-Octyl)-3-(n-propyl)isothiourea Derivatives. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* 38(2) : 163-167.
12. Sung, N. D., S. J. Yu, D. J. Jun, D. H. Kim, and K. Y. Cho. 1997. Influence of 1-substituted imino group on the insecticidal activity of 1-sub.-2-(n-octyl)-3,3-di-iso-propylpseudothiourea derivatives. *Kor. J. Pesticide Sci.* 1(1) : 1-6.
13. Thavara, U., A. Tawatsin, C. Chansang, P. Asavadachanukorn, M. Zaim, and M. S. Mulla. 2007. Simulated field evaluation of the efficacy

- of two formulations of diflubenzuron, a chitin synthesis inhibitor against larvae of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) in water-storage containers. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health 38(2) : 269-275.
14. Uchida, M., T. Asi, and T. Sugimoto. 1985. Inhibition of cuticle decomposition and chitin biosynthesis by a new insect growth regulator, buprofezin, in *Nilapar vapalugens* seal. Agric. Biol. Chem. 49 : 1233-1237.
15. Worthing, C. R. Ed. 1991. The Pesticide Manual, 9th ed., Published by the British Crop Protection Council Unwin Brothers Limited, Old Woking Survey, UK.