

## Acylthiocholine들의 합성

정대일\* · 이용균

동아대학교 화학과

## Synthesis of Acylthiocholines

Dai-Il JUNG\* and Yong-Gyun Lee

Department of Chemistry, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea

### Abstract

Choline esters that are used with substrate of BChE-catalyzed hydrolyses were synthesized by two methods. First, 2-chloroethyl thiohexanoate, 2-chloroethyl thioheptanoate, and 2-chloroethyl thiooctanoate were synthesized by the treatment of hexanoyl chloride with ethylene sulfide. Hexanoyl thiocholine and octanoyl thiocholine were synthesized by using 2-chloroethyl thiohexanoate and 2-chloroethyl thiooctanoate with trimethyl amine. Second, after reaction of ethylene sulfide and dimethyl amine, followed by acylation with acid anhydride and then heptanonyl thiocholine, decanoyl thiocholine were synthesized by treatment of methyl iodide.

**Key words** – Acyl thiocholine, Acetylcholine sterase (AChE), Alzheimers disease, Acelylcholine

### 서 론

Alzheimer's disease(AD)[1,9]는 치매의 한 종류로 현대에 가장 관심을 가지고 연구되는 질병의 하나이다. AD는 점진적으로 진행되는 신경퇴행성 질병으로 중추신경계(central nervous system; CNS)에 이상을 초래하여 기억력과 사고력 행동에 손상을 가져온다. AD 환자 중 약 10%가 유전성이고 약 90%는 비유전성 이라고 알려져 있으나 아직은 그 이유가 밝혀지지 않았으며 단지 이 병에 걸린 환자의 뇌에서 관찰되는 특징은 중추신경계의 해마(hippocampus)와 연합피질(association cortex)에 있는 뉴런과 시냅스의 손실과 신경전달 물질의 감소이다[5]. 또 다른 특징은 아밀

로이드 전구체 단백질(Amyloid precursor protein, APP)의 이상 대사에 의해 생성되는  $\beta$ -병풍( $\beta$ -pleated sheet)구조의 아밀로이드 단백질이 다량 침전되어 있는 것이 관찰된 것이다[7,8,10,15]. 이러한 아밀로이드가 축적된 부위의 뇌내 콜린성 신경계 말단에서도 acetyl choline(ACh)의 감소라는 병리 조직적 특징이 나타난다[4]. 현재 AD의 발생 원인과 그 치료법에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으나 아직 획기적인 발병 원인이나 치료법에 관한 보고는 알려져 있지 않다. 치료법의 진행은 Wurtman등의 연구 결과에 따라 뇌에서 전구체 콜린의 농도가 증가함으로써 ACh의 생성을 촉진시키고자 하는 많은 시도가 있어 왔다[6].

다른 방법으로서 ACh의 분해 효소인 acetylcholine sterase(AChE)를 억제하여 시냅스 틈(synaptic cleft)으로부터 ACh의 제거를 막아 ACh의 농도를 증가 시키는 방법이 있고 이러한 방법에서 AChX 억제제의 연구가 진행되었다[14].

\*To whom all correspondence should be addressed  
Tel : 82-51-200-7249, Fax : 82-51-200-7259  
E-mail : dijung@daunet.donga.ac.kr

치매환자 뇌내 ACh의 농도는 정상인에 비해 50%정도의 손실을 보인다. 대뇌의 ACh는 콜린과 아세틸 조효소A에서 합성되며 이때 choline acetyltransferase (ChAT)라고 하는 효소가 관계된다. 콜린의 흡수가 낮아지면 ACh 합성시 신경세포 구성 물질 중의 하나인 phosphatidyl choline (PC)을 콜린으로 사용하게 된다[12,13]. 이 경우 콜린성 뉴런이 파괴되어 치매와 같은 퇴행성 질병을 일으키게 된다. 따라서 ACh를 분해시키는 효소인 AChE를 억제시켜 ACh 농도를 증가시키는 치료법 개발을 시도하게 되었다. 실제로 physostigmine(1)과 edrophonium(2)등의 AChE억제제들이 임상 실험에 사용되었으며, tetrahydroamino-acridine (THA, tacrine)(3)가 FDA에서 치매 치료제로 허가되어 시판되고 있다. THA는 강력한 AChE 억제제이나 간 독성의 문제점을 가지고 있다. 그 외에도 여러 가지 억제제들이 여러 임상 단계를 걸쳐 연구 중이며 그 중 석송에서 추출한 huperzine A(4)라고 하는 AChE억제제가 현재 주목되고 있다. 이와 같이 최근에 이르러 AChE 촉매작용의 경제적, 의학적 그리고 국가적 안전에 대한 상당한 관심을 표명하고 있다.

AChE 활성자리는 음이온영역(anionic locus), 에스테르 영역, 그리고 수소성영역(hydrophobic region)의 주된 세 영역과 주변 음이온영역으로 이루어져 복합 반응 역학과 활성화 자리 형태역학을 도출하기 위해 서로 협력한다. 지금까지 기질 억제제가 peripheral site(주변 자리)를 통해 간접적으로 일어나는 것으로 알려져 있었으나 최근[2,3]에는 활성중심에서 직접적으로 일어날 가능성도 배제 할 수 없어 기질 억제의 차이를 활성 중심 주위의 분자 환경에서 설명하고자 하였다. Daniel M. Quinn은 콜린 에스테르에 대해 촉매화된 AChE 가수분해에 대한 kinetic parameter를 비교하여 보고하였는데 butanoyl thiocholine (BuTCh)의 큰  $K_m$ 값은 AChE 활성자리와 BuTCh와의 반응 결합이 약하다는 것을 제시하며 또한 기질이 변함에 따라 세 가지 중요한 영역 중 에스테르 영역에 지대한 영향이 있다고 보고하였다.

한편, Cho 등은 기질로서 콜린 에스테르( $C_2-C_{10}$ )가 효소인 AS-AChE(aqueous soluble AChE)와 DS-AChE(detergent soluble AChE)에 대해 어떠한 억제력이 존재하는지를 연구하여 AChE에 새로운 소수성 아실 영역(hydrophobic acyl region)이 존재할 것으로 보고하였다. 본 연구에서

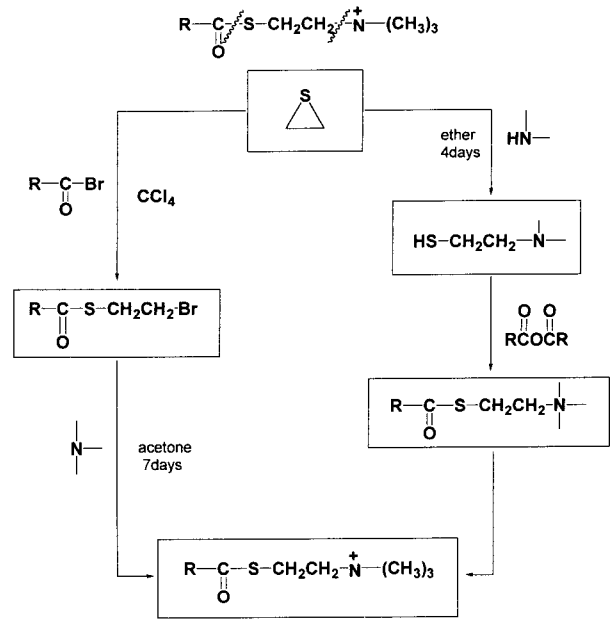


Fig. 1. Synthetic Methods of acylthiocholine.

는 아실기의 탄소수가 6-10개인 acetyl thiocholine을 합성하여 합성되어진 thiocholine( $C_2-C_{10}$ )을 기질로써 효소인 AChE와의 반응성을 통해 효소-기질 결합자리의 분자환경을 정확히 해석하고자 한다. 아실기 탄소의 수가 6-10개인 acylthiocholine을 합성하기 위한 두 가지 방법(Method I, Method II)을 이용하여 합성 하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 재료

본 연구에서 사용한 시약은 모두 특급시약을 사용하였고 각 용매와 반응 물질은 반드시 문헌에 따라 정제하여 사용하였다. 모든 반응은 KOH,  $CaCl_2$ , 분자체(molecular sieves 3Å) 그리고 silica gel blue를 통과하여 얻은 건조 질소에서 수행하였다. 녹는점 측정기는 Buchi 510 녹는점 측정기를 사용하였으며,  $H^1$  NMR과  $^{13}C$  NMR spectra는  $(CH_3)_4Si(TMS)$ 를 내부 표준 물질로 사용하고  $CDCl_3$  또는 acetone  $d_6$ 를 용매로 사용하였으며 200 MHz FT-NMR spectrometer를 사용하여 ppm 단위로 측정하였다. 질량분석 spectra는 HP(Hewlett Packard) 5890 II GC-Mass [Column; HP ultra 2(SE-54, 5% phenylmethylsilicon, 50m×0.2mm×0.3μm) 70eV, EI]를 사용하여 얻었다. TLC는 Merck사

(60F-254)를 사용하였고 전개된 반점은 uv lamp와 visualizing agent로 발색시켜 확인하였고, column chromatography는 silica gel 9385(230-410mesh, Merck)를 사용하였다.

#### 방법

##### (1) 2-Chloroethyl thiohexanoate의 합성

잘 건조된 50mL two necked round bottom flask에 carbon tetrachloride 3mL와 ethylene sulfide 0.61g(0.01mol)을 넣고 실온에서 교반시켰다. dropping funnel을 사용하여 hexanoyl chloride 1.45g(0.011mol)을 10 분간에 걸쳐 적가 시킨 후 감압 증류(50torr, 80°C)하여 얻은 잔사를 flash column chromatography(eluent; *n*-hexane)로 정제시켜 독특한 냄새가 나는 무색 액체인 2-chloroethyl thiohexanoate 0.82g을 얻었다.

Yield; 67%

R<sub>f</sub>: 0.75 (TLC eluent; *n*-Hexane; EtOAc= 10:1, v/v)

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200MHz): δ 0.86-0.93(m, 3H), 1.27-1.35(m, 4H), 1.60-1.71(m, 2H), 2.53-2.60(t, 2H), 3.19-3.26(t, 2H), 3.56-3.64(t, 2H).

Mass, m/z(ref. int, %): 195, 165, 151, 138, 131(6), 115, 99(100), 71(30), 55(16), 51.

##### (2) Hexanoyl thiocholine의 합성

잘 건조된 50mL two necked round bottom flask에 아세톤 10mL와 2-chloroethyl thiohexanoate 1.95g(0.01mol)을 넣고 dry ice bath(-20°C)에서 trimethyl amine 0.59(0.01 mol)을 가 한 후 다시 실온에서 7일간 교반시켰다. 반응의 진행정도는 TLC로 추적하여 확인하였다. 반응을 끝낸 후 감압 건조시켜 매우 hygroscopic한 흰색 고체인 hexanoyl thiocholine(HexTCh) 2.54g을 얻었다.

Yield; 98%

<sup>1</sup>H NMR(Acetone-d<sub>6</sub>, 200MHz): δ 0.84-0.95(m, 3H), 1.30-1.36(m, 4H), 1.60-1.76(m, 2H), 2.62-2.69(t, 2H), 3.45-3.52(t, 2H), 3.56(s, 9H), 3.79-3.90(t, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200MHz): δ 13.8(C-6'), 22.1, 22.2(-S-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 25.0(C-5'), 31.0(C-4'), 43.9(C-3'), 53.4, 53.5, 53.6 (-N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 65.2(C-2'), 199.0(C=O).

Mass, m/z(ref. int, %): 203, 159, 143, 114, 99(100), 87,

71(7), 58(100), 51.

##### (3) 2-Chloroethyl thioheptanoate의 합성

잘 건조된 50mL two necked round bottom flask에 carbon tetrachloride 3mL와 ethylene sulfide 0.61g(0.01mol)을 넣고 실온에서 교반시켰다. dropping funnel을 사용하여 heptanoyl chloride 1.60g(0.011mol)을 10 분간에 걸쳐 적가 시킨 후 감압 증류(50torr, 80°C)하여 얻은 잔사를 flash column chromatography(eluent; *n*-hexane)로 정제시켜 독특한 냄새가 나는 무색 액체인 2-chloroethyl thioheptanoate 0.82g을 얻었다.

Yield; 12%

R<sub>f</sub>: 0.76 (TLC eluent; *n*-Hexane; EtOAc= 10:1, v/v)

<sup>1</sup>H NMR(Acetone-d<sub>6</sub>, 200MHz): δ 0.85-0.92(m, 3H), 1.24-1.41(m, 6H), 1.61-1.68(m, 2H), 2.58-2.66(t, 2H), 3.21-3.29(t, 2H), 3.63-3.70(t, 2H).

Mass, m/z(ref. int, %): 209, 172, 165, 145(5), 138(1), 123, 113(100), 95(6), 85(18), 69(4), 57(12), 53(3).

##### (4) Heptanoyl thiocholine의 합성

잘 건조된 50mL two necked round bottom flask에 diethyl ether 2mL와 ethylene sulfide 0.60g을 넣고 dry ice bath(-20°C)에서 dimethyl amine 0.45(0.01mol)을 가 한 후 다시 실온에서 4일간 교반시켰다. 반응의 진행정도는 TLC로 추적하여 확인한 다음 methyl iodide 1.42g을 천천히 적가 시킨 다음 감압 농축 후 남은 잔사를 chloroform에 녹이고 과량의 hexane을 가하여 흰색 고체를 생성 시켰다. 이 고체를 chloroform에 녹여 몰로 추출하고, 감압 건조시켜 흰색 고체인 heptanoyl thiocholine(HepTCh) 1.33g을 얻었다.

Yield; 76%

mp: 134°C

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200MHz): δ 0.85-0.92(m, 3H), 1.27-1.31(m, 6H), 1.60-1.71(m, 2H), 2.57-2.64(t, 2H), 3.27-3.35(m, 2H), 3.54(s, 9H), 3.72-3.94(m, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200MHz): δ 13.0(C-7'), 18.9, 19.0(-S-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 22.0(C-6'), 25.5(C-5'), 28.4(C-4'), 42.0(C-3'), 52.5, 52.6, 52.7(-N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 64.7(C-2'), 206.1(C=O).

Acylthiocholine들의 합성

Mass, m/z(ref. int, %): 217, 173, 157, 143, 129, 104,85, 71, 58(100), 51.

(5) 2-Chloroethyl thiooctanoate 의 합성

잘 건조된 50mL two necked round bottom flask에 carbon tetrachloride 3mL와 ethylene sulfide 0.61g(0.01 mol)을 넣고 실온에서 교반시켰다. dropping funnel을 사용하여 octanoyl chloride 1.75g(0.011mol)을 10 분간에 걸쳐 적가 시킨 후 감압 증류(50torr, 80°C)하여 얻은 잔사를 flash column chromatography(eluent; n-hexane)로 정제시켜 독특한 냄새가 나는 무색 액체인 2-chloroethyl thiooctanoate 0.85g을 얻었다.

Yield; 38%

R<sub>f</sub>: 0.75 (TLC eluent; n-Hexane; EtOAc= 10:1, v/v)

Mass, m/z(ref. int, %): 223, 186, 159(5), 151, 138, 127 (100), 100(8), 97, 83, 67(6), 57(100).

(6) Octanoyl thiocholine의 합성

잘 건조된 50mL two necked round bottom flask에 아세톤 10mL와 2-chloroethyl thiooctanoate 2.23g(0.01mol)을 넣고 dry ice bath(-20°C)에서 trimethyl amine 0.59(0.01 mol)을 가 한 후 다시 실온에서 7일간 교반시켰다. 반응의 진행정도는 TLC로 추적하여 확인하였다. 반응을 끝낸 후 감압 건조시켜 매우 hygroscopic한 흰색 고체인 octanoyl thiocholine(HexTCh) 0.42g을 얻었다.

Yield; 19%

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200MHz): δ 0.81-0.88(m, 3H), 1.14-1.39(m, 8H), 1.50-1.72(m, 2H), 2.51-2.59(t, 2H), 3.27-3.32 (m, 2H), 3.44(s, 9H), 3.53-3.61(m, 2H).

Mass, m/z(ref. int, %): 231, 187, 171, 142, 99, 71, 58 (100), 51

(7) Decanoyl thiocholine의 합성

잘 건조된 50mL two necked round bottom flask에 diethyl ether 2mL와 ethylene sulfide 0.60g을 넣고 dry ice bath(-20°C)에서 dimethyl amine 0.45g(0.01mol)을 가 한 후 다시 실온에서 4일간 교반시켰다. 반응의 진행정도는 TLC로 추적하여 확인한 다음 decanoic anhydride 3.26g (0.01mol)을 diethyl ether 3mL에 묽혀 적가 시키고 다시

methyl iodide 1.42g을 천천히 적가 시킨 반응물을 감압 농축하고 남은 잔여물을 물로 세척시킨 후 chloroform과 hexane로 재결정하여 흰색 고체인 decanoyl thiocholine (DecTCh) 0.95g을 얻었다.

Yield; 48%

<sup>1</sup>HNMR (CDCl<sub>3</sub>, 200MHz): δ 0.76-0.82(m, 3H), 1.08-1.18(m, 12H), 1.52-1.56(m, 2H), 2.48-2.56(t, 2H), 3.21-3.29 (m, 2H), 3.48(s, 9H), 3.58-3.66(m, 2H).

Mass, m/z(ref. int, %): 258, 230, 215, 199, 185, 170, 155, 142, 128, 104, 87, 72(7), 58(100), 55(4).

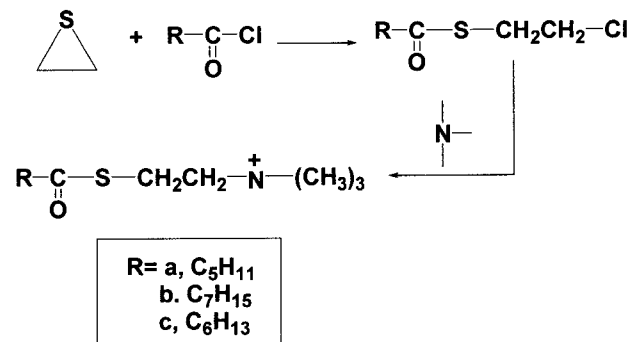


그림 A

결과 및 고찰

Acylthiocholine을 합성하기 위해 첫 번째 방법으로 ethylene sulfide에 acylation 시킨 후 trimethyl amine과 첨가반응을 시도하였다.

첫 단계로 ethylene sulfide에 hexanoyl chloride, heptanoyl chloride 그리고 octanoyl chloride를 천천히 적가 하여 2-chloroethyl thioalkanoate를 합성하였고 flash column chromatography로 분리하였다. 2-chloroethyl thiohexanoate와 2-chloroethyl thioheptanoate의 수율이 각각 67, 38%인데 비하여 2-chloroethyl thiohexanoate의 경우 수율이 12%로 매우 낮았다. 두 번째 단계는 2-chloroethyl thioalkanoate 유도체에 triethyl amine을 첨가시키는 것인데 trimethyl amine은 상온에서 기체(3.4°C)이므로 반응기를 냉각시켜 첨가하였고 반응 시간이 매우 길어 일주일이 걸렸

다. 이것은 두 반응물이 각각 액상과 기상으로 존재하여 반응 충돌이 어렵기 때문인 것으로 생각되어진다. 같은 조건에서 HexTCh(hexanoyl thiocholine)은 98%의 높은 수득율로 합성되어 정제가 필요없었고, OctTCh(octanoyl thiocholine)은 12%로 수득율이 비교적 낮았으며 HepTCh(heptanoyl thiocholine)은 이 방법으로 합성 할 수 없었다.

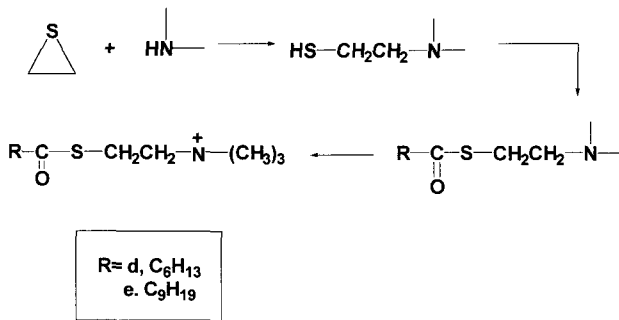


그림 B

Acylthiocholine을 합성하기 위한 두 번째 방법으로 먼저 ethylene sulfide에 dimethyl amine을 첨가반응시켰다. Dimethyl amine은 상온에서 기체(bp 7°C)이므로 반응기를 냉각시켜 첨가하였고 반응 시간은 4일 정도 필요했다. 이 반응 혼합물에 heptanoic anhydride와 decanoic anhydride를 넣어 acylation 시킨 후 methyl iodide를 첨가 반응시켰다. HepTCh(heptanoyl thiocholine)은 78%의 수득율로 합성되었는데 분자 구조상 긴 탄소 사슬을 가지면서 4차 암모늄 구조를 가지고 있어 극성 및 비극성 용매에 모두 용해되었다. 반응 혼합물을 chloroform에 녹여 증류수로 추출하면 HepTCh은 chloroform과 증류수에 대해 6:4의 비율로 분배되는데 수층에서 더욱 순수한 HepTCh을 얻을 수 있었고 이를 반복하여 HepTCh을 분리해 내었다. DecTCh(decanyl thiocholine)은 48%의 수득율로 합성되었는데 분자 구조상 4차 암모늄 구조를 가지지만 탄소 사슬이 길어짐에 따라 물에는 용해되지 않았다. 따라서 먼저 물로 세척하여 불순물을 제거한 후 alcohol, ether, methylene chloride등에 용해시켜 용해되지 않은 불순물을 제거하여 순수한 DecTCh(decanyl thiocholine)을 얻었다. 첫 번째 방법으로 합성한 acylthiocholine chloride(hexanoyl thiocholine, octanoyl thiocholine)는 흡수성이 매우 강하여 효소와의 반응에서 기질로 사용하기 위해 매우 조심스럽게

취급해야했다. 반면에 두 번째 방법으로 합성한 acylthiocholine iodide(heptanoyl-thiocholine, decanoyl-thiocholine)는 흡수성이 없었고 아실기 탄소수가 10개인DecTCh은 물에 용해되지 않았다. 첫 번째 방법으로 DecTCh chloride를 합성한다면 반응 속도론적 연구에 적합한 수용성 DecTCh을 합성 할 수 있을 것으로 기대된다.

## 요 약

축매화된 acetylcholine esterase 가수분해의 기질로 사용될 choline ester를 두 가지 방법으로 합성하였다. 먼저, ethylene sulfide를 출발물질로 하여 2-chloroethyl thiohexanoate, 2-chloroethyl thioheptanoate, 2-chloroethyl thiooctanoate를 각각 합성하였고 여기에 trimethyl amine을 첨가하여 hexanoyl thiocholine, octanoyl thiocholine을 합성하였다. 두 번째 방법으로 ethylene sulfide에 dimethyl amine을 첨가시켜 acid anhydride로 acylation 시킨 후 methyl iodide를 첨가하여 heptanoyl thiocholine, decanoyl thiocholine을 합성하였다. 합성된 hexanoyl thiocholine을 기질로 하여 butyrylcholine esterase와의 반응을 연구 하고자 한다. 또한 본 연구에서는 한국 과학 기술원 도핑컨트를 센터와 연계하여 acetylcholine esterase와 기질인 acylthiocholine과의 입체적으로 둘러싸인 acyl-binding site를 분자 조형하고자 노력 중에 있다.

## 감사의 글

본 연구는 1999년 농림수산부 기초 연구비와 2001년도 동아 대학교 기초 연구비 및 교비에 의해 수행된 결과이며 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1. Alzheimer A. 1907. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde., *Zentralbl. Nervenheilk* **30**, 177-179.
2. Kinesella K. G, 1992. Changes in life expectancy. *Am. J. Clin. Nutr.* **55**, 1196s.
3. Berman H. A., D. F. Olshefski, M. Gilbert and M. M. Decker. 1985. Fluorescent Phosphonate Labels for Serine Hydrolases. *J. Bio. Chem.* **260**, 3462.

3. Berman H. A. and M. M. Decker. 1986. Kinetic, Equilibrium, and Spectroscopic Studies on Dealkylation ("Aging") of Alkyl Organophosphonyl Acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* **261**, 10646.
4. Carson K. A., C. Geula and M. M. Mesulam. 1991. Electron microscopic localization of cholinesterase activity in Alzheimer brain tissue. *Brain Res.* **540**, 204-208.
5. Dekosky S. T. and S. D. Styren. 1994. Cholinergic changes and synaptic alterations in Alzheimer's disease In: *Alzheimer Disease Therapeutic Strategies*, pp.93-96. Ezio Giacobini, Robert Becker eds, Birkhauser, Boston.
6. Farber S. A., B. E. Slack and B. M. Cohen. 1994. Choline metabolism, membrane phospholipids, and Alzheimer disease. In: *Alzheimer Disease : Therapeutic strategies*. pp.247-252. E. Giacobini, R. Birkhauser. Boston.
7. Glenner G. 1983. Alzheimer disease: The commonest from amyloidosis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **107**, 281-282.
8. Goate A. M. and J. Hardy. 1991. Segregation of missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer disease, *Nature* **349**, 704-706.
9. Kinesella K. G, 1992. Changes in life expectancy. *Am. J. Clin. Nutr.* **55**, 1196s.
10. Nonaka G., M. Harada and I. Nixhioka. 1980. Eugenilin, a new allagitannin from cloves, *Chem. Pharm. Bull.* **28**, 685-687.
11. Perrin D. D. and W. L. F. Armarego. 1966. *Purification of Laboratory Chemicals*; Pergamon Press, London.
12. Perry E. K., R. H. Perry, G. Blessed and B. E. Yomlinson. 1977. Necropsy evidence of central cholinergic deficits in senile dementia. *Lancet*, 189.21~25. Yu. J., and H. Fang. 1981. Studies on the essential oils of clove buds and clove leaves. *Zhongcaoyao* **12**, 340-342.
13. Perry E. K., B. E. Tomlinson, G. Blessed and P. H. Gibson. 1978. Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scorers in senile dementia. *Br. Med. J.* 1457-1459.
14. Vander A. J., J. H. Sherman and D. S. Luciano. 1994. In: *Human physiology: the mechanisms of body function*. pp.207-208. 6th eds. Academic Press Inc., NY.
15. Yu. J. and H. Fang. 1981. Studies on the essential oils of clove buds and clove leaves. *Zhongcaoyao* **12**, 340-342, 339.

(Received December 7, 2001; Accepted January 24, 2002)