

HPLC-DAD-ion trap-MS를 이용한 인동 생리활성 물질의 동시분석

유성광 · 원태형 · 강삼식 · 신중헌[#]

서울대학교 약학대학 천연물과학연구소

(Received October 21, 2009; Revised March 20, 2010; Accepted March 20, 2010)

Simultaneous Analysis of Bioactive Metabolites from Caulis *Lonicera japonica* by HPLC-DAD-ion trap-MS

Sungkwang Ryu, Tae Hyung Won, Sam Sik Kang and Jongheon Shin[#]

Natural Products Research Institute, College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract — A high-performance liquid chromatography (HPLC) with DAD detector and electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) was established for the simultaneous determination of coniferin (1), loganic acid (2), demethylsecologanol (3), sweroside (4) and loganin (5) from caulis *Lonicera japonica*. The optimal chromatographic conditions were obtained on an ODS column (5 μ m, 4.6 \times 150 mm) with the column temperature 35°C. The mobile phase was composed of (A) water with 0.1% formic acid and (B) methanol with 0.1% formic acid using a gradient elution, the flow rate was 0.3 ml/min. Detection wavelength was set at 254 nm. All calibration curves showed good linear regression ($r^2 > 0.998$) within test ranges. The developed method provided satisfactory precision and accuracy with overall intra-day and inter-day variations of 0.16~3.28% and 0.14~1.99%, respectively, and the overall recoveries of 99.39~105.89% for the five compounds analyzed. The verified method was successfully applied to quantitative determination of the two types (phenolic compounds and iridoids) of bioactive compounds in 24 commercial caulis *L. japonica* samples from different markets in Korea and China. The analytical results demonstrated that the contents of the five analytes vary significantly with sources.

Keywords □ HPLC-DAD-ion trap-MS, caulis *Lonicera japonica*, iridoids, phenolic compounds

한방생약의 오랜 활용 경험이 축적되어 있는 우리나라에서는 약품시장에서 생약이 양약에 버금가는 비중을 차지하고 있으며, 천연물신약 연구개발에 있어서도 전통 생약의 중요성이 지속적으로 증가하고 있다. 그러나 생약 특유의 생산 및 유통공정에 기인한 비 규격화와 질적 가치의 비 영속화, 산지별 함량 편차 및 생물학적 동질성의 미확인 등의 문제들은 한약재의 평가 및 신약개발에 있어 가장 큰 저해 요인으로 작용하고 있다. 그러므로 합리적인 생약 사용 기준과 나아가 현대적인 개념의 천연물 신약개발을 위해서 활성물질의 정성적, 정량적 분석에 기초를 둔 규격화가 시급히 요구된다.

인동은 인동과(Caprifoliaceae)에 속하는 인동덩굴(*Lonicerae*

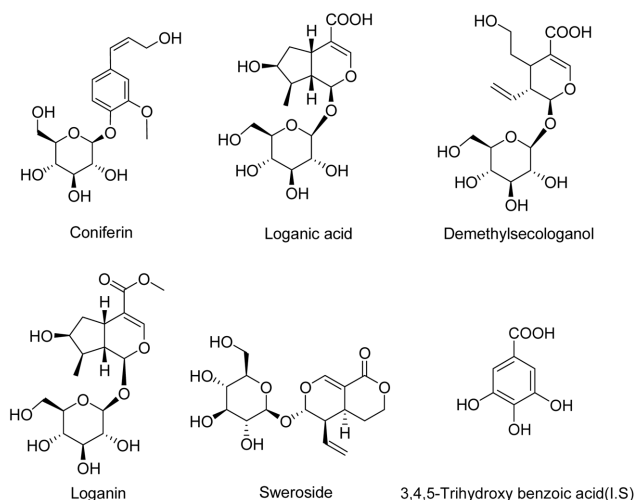


Fig. 1 – Chemical structures of five compounds in caulis *Lonicera japonica*.

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-880-2484 (팩스) 02-762-8322
(E-mail) shinj@snu.ac.kr

japonica Thunb.)의 뿌리줄기로,¹⁾ 한방에서는 두통, 인두통, 급성 열병, 화농증, 전염병, 호흡기 감염, 종양의 치료제 및 해열, 이뇨, 해독 등의 목적으로 사용되어 왔으며,^{2,3)} 천연물 연구를 통하여 항미생물, 항산화, 항생, 항바이러스, 세포보호, 간 보호, 소염 등 다양한 생리활성이 규명되었다.^{4,7)}

현재까지 연구된 인동의 주요 활성 물질로 다양한 작용기를 가진 phenolic compounds, iridoids와 flavonoids가 알려져 있다.⁸⁻¹¹⁾ 천연물 함량에 대한 사전 탐색연구를 바탕으로 수행된 본 연구에서는 인동에 함유된 천연물 중에서 생리활성과 함량이 우수한 물질로 phenolic compounds 중에서 coniferin(1), iridoids로서 loganic acid(2), demethylsecologanol(3), sweroside(4), 그리고 loganin(5) 등 5종의 화합물을(Fig. 1) 표준물질로 선정하여 인동에 함유된 각 물질의 함량을 HPLC-DAD-ion trap-MS를 이용하여 동시 정량·정성 분석하는 최적의 분석법을 개발하였으며, 이를 활용하여 24종의 국내·외 지역에서 산출된 인동 활성 물질의 함량을 분석 비교하였다.

실험방법

시료 및 시약

표준시료로 사용한 coniferin(1), loganic acid(2), demethylsecologanol(3), sweroside(4) 그리고 loganin(5)는 본 연구팀에 의해 인동으로부터 추출, 분리, 정제하여 UV, IR, MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR 등을 통해 구조 동정되었으며 HPLC-DAD를 이용한 순도 실험 결과 95% 이상의 순수 물질임을 확인하였고 내부표준물질로 3,4,5-trihydroxy benzoic acid(Sigma-Aldrich, USA)를 사용하였다.

각 소재별 활성물질의 함량을 비교분석하기 위해 사용된 국내산, 중국산의 24종 중 16종의 인동시료는 서울 경동시장, 대구 약전거리, 대전 한약거리에서 각각 원산지별로 구입하였으며, 나머지 8종은 식약청에서 제공받았다. 각 시료는 자연 건조시킨 후 분말형태로 마쇄하여, 분석시료로 사용하였다.

Table II – Analytical parameters for ion trap-MS

<ESI source>	Method 1	Method 2	Method 3	Method 4	Method 5
Sheath gas flow rate (arb)	80.00	80.00	80.00	80.00	80.00
Aux gas flow rate (arb)	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00
Spray voltage (kV)	7.00	7.00	4.50	7.00	7.00
Capillary temp (°C)	250.00	250.00	250.00	250.00	250.00
Capillary voltage (V)	15.00	27.50	34.00	15.00	24.00
Tube lens offset (V)	-25.00	-17.00	-20.00	-25.00	6.00
<Ion optics>					
Compounds	I, S	1	2	3	4, 5
Octapole 1 offset (V)	-0.50	-0.50	-0.75	-0.50	-2.00
Lens voltage (V)	-84.00	-16.00	-16.00	-84.00	-34.00
Octapole 2 offset (V)	-4.50	-5.00	-4.50	-4.50	-4.50
Octapole RF amplitude (V p-p)	400.00	400.00	400.00	400.00	400.00

용매로서 메탄올(J. T. Baker, USA), 3차 증류수(J. T. Baker, USA)와 증류된 에탄올(Duksan, Korea)을 사용하였으며 이동상에 포름산(Wako, Japan)을 첨가하였다.

HPLC System 및 Condition

시료 분석을 위한 HPLC는 Agilent 1200 series로서 auto-sampler, column oven, binary pump, DAD detector(Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), degasser(Agilent Technologies, Tokyo, Japan)를 사용하였으며, software는 Agilent사의 Chemstation software(Agilent Technologies, Avondale, CA, USA)를 사용하였다. HPLC 조건으로 칼럼 오븐의 온도는 35°C, 분석파장은 254 nm, 유속은 HPLC와 ion trap-MS 기계를 사용하여 유속은 0.3 ml/min를 사용하였고, 칼럼은 Shiseido사의 Capcell Pak ODS UG120(5 µm, 4.6 mm×150 mm)를 사용하였다. 이동상은 A 용매로 100% 3차 증류수와 B 용매 100% 메탄올로 각각 0.1% 포름산을 첨가하여 사용하였으며 용매계는 용매기울기 용리로서 Table I에 나타내었다.

HPLC-MS System 및 Condition

질량분석기는 HPLC(Agilent 1200 series)를 inlet으로 사용하였으며, *m/z*비 2000까지의 범위를 수용할 수 있는 Finnigan electrospray source가 결합된 Finnigan MAT LCQ Ion-trap mass spectrometer(San Jose, CA, USA)를 사용하여 분석하였

Table I – Solvent gradient conditions for HPLC-DAD

Final time (min)	Flow rate (ml/min)	A ^a	B ^b
0	0.3	80	20
15	0.3	65	35
25	0.3	35	65
30	0.3	35	65
35	0.3	80	20

^awater with 0.1% formic acid.

^bmethanol with 0.1% formic acid.

Table III – Comparison of effectiveness by extraction solvent ($\mu\text{g/g}$, $n=3$)

Compound	100% Methanol	70% Methanol	100% Ethanol	70% Ethanol
1	240.78 \pm 2.31	213.98 \pm 0.13	212.39 \pm 0.52	316.78 \pm 0.52
2	1024.92 \pm 8.14	1022.54 \pm 1.47	908.51 \pm 2.99	1297.39 \pm 6.89
3	720.71 \pm 6.76	736.42 \pm 1.91	584.77 \pm 1.06	1080.32 \pm 3.41
4	2552.69 \pm 11.82	2340.63 \pm 5.76	2369.82 \pm 3.51	3112.12 \pm 1.38
5	2684.19 \pm 12.40	2469.96 \pm 5.63	2432.32 \pm 5.05	3279.19 \pm 3.48

Table IV – Comparison of effectiveness by extraction time ($\mu\text{g/g}$, $n=3$)

Compound	10 min	20 min	30 min	60 min	90 min
1	234.64 \pm 0.41	238.13 \pm 0.51	242.26 \pm 0.10	229.54 \pm 0.09	258.17 \pm 0.60
2	1872.73 \pm 3.06	1927.52 \pm 4.31	1957.30 \pm 0.73	1706.46 \pm 1.79	1931.79 \pm 3.19
3	958.57 \pm 2.02	996.58 \pm 0.84	1001.08 \pm 2.96	859.73 \pm 0.68	979.36 \pm 1.04
4	2509.36 \pm 1.39	2547.55 \pm 3.93	2598.20 \pm 2.47	2276.60 \pm 5.35	2580.40 \pm 1.89
5	5063.54 \pm 4.63	5217.12 \pm 7.63	5224.61 \pm 4.69	4519.42 \pm 10.79	5097.76 \pm 4.91

고 software는 Xcalibur(Finnigan MAT)를 사용하였다. 질량분석의 조건은 각 표준물질의 최적의 감도를 고려해 물질별로 나누어 설정하였다(Table II).

시료의 준비

표준시료는 검량선을 작성하기 위해 각각 메탄올로 희석하여 화합물을 1, 2, 4, 8, 15, 20 $\mu\text{g/ml}$ 로 각 농도별 혼합 시료를 준비하였다.

인동 원시료는 자연건조 시켰다가 분말 형태로 마쇄한 후 사용하였다. 최적의 추출 방법을 확립하기 위해 70%, 100% 에탄올, 70%, 100% 메탄올을 사용하여 추출·분석함으로써 용매별 추출 효율을(Table III), 10, 20, 30, 60, 90분 각각 추출·분석함으로써 추출 시간별 추출 효율을(Table IV), sonication, reflux, vortex법으로 각 시료를 추출·분석함으로써 추출 방법별 추출 효율을 비교하였다(Table V). 용매로서 70% 에탄올과 30분의 추출시간은 다른 조건에 비해 추출효율이 높았다. 추출 방법으로는 reflux법이 우수하였으나 sonication법과 vortex법과 비교한 편차는 크지 않았다. 그리하여 본 실험은 운용이 상대적으로 간편한 sonication법으로 수행하였다. 마쇄한 시료 200 mg에 70% 에탄올 10 ml을 넣은 후 30분간 sonication하여 추출한 뒤 이를 0.2 μm membrane filter로 여과, 내부표준물질 10 μg 첨가한 후 HPLC 분석에 사용하였다.

Table V – Comparison of effectiveness by extraction method ($\mu\text{g/g}$, $n=3$)

Compound	Sonication	Vortex	Reflux
1	209.27 \pm 0.28	192.18 \pm 0.49	263.08 \pm 0.55
2	1643.59 \pm 2.53	1541.74 \pm 4.12	2142.42 \pm 6.57
3	882.19 \pm 3.44	802.28 \pm 1.17	1130.16 \pm 4.40
4	2209.88 \pm 0.96	2070.94 \pm 3.35	2901.31 \pm 73.98
5	4426.22 \pm 3.19	4145.29 \pm 4.85	5684.27 \pm 14.28

실험결과 및 고찰

최적의 HPLC-DAD 분석조건에 대한 탐색

서로 다른 5 종류의 생리활성물질을 동시에 분리하기 위해 여러 용매조건들을 시도한 결과 Shiseido사의 Capcell Pak ODS UG120(5 μm , 4.6 mm \times 150 mm)를 사용 시 이동상은 A 용매 100% 3차 증류수, B 용매 100% 메탄올로 각각 0.1% 포름산을 첨가하여 사용하였고, 유속은 HPLC와 ion trap-MS를 동시에 사용하여 분석할 수 있는 효율적인 유속인 0.3 ml/min으로, 칼럼 오븐의 온도는 35°C로 분석 하였을 때 분석 시간 35분 이내에 모든 표준물질의 peak들이 분리 되었다. 또한 각 compound들이 적절한 흡광도를 갖는 분석 파장을 탐색한 결과 254 nm에서 모든 표준물질의 peak들이 분석하기에 적절한 감도를 갖는 것을 알 수 있었다. Fig. 2에 혼합한 표준물질들의 chromatogram과 인동 원시료에 대한 chromatogram을 제시하였다.

직선성, 범위, 검출한계와 정량한계

정량분석을 위한 검량선으로 각 표준물질을 단계별 농도로 희석한 혼합용액을 반복분석하여 Table VI과 같은 결과를 얻었다. 분석 파장인 254 nm에서 각 표준물질의 흡광도에 따라 1~20 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도 범위를 정하였다. 분석결과 각 표준물질은 상관계수 0.998에서 1.000의 값의 높은 직선성을 나타내었으며, 검출한계와 정량한계는 시그널 대 노이즈비 3:1과 10:1와, 검출 값의 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하여 각각 0.250~1.098($\mu\text{g/ml}$), 0.757~3.327($\mu\text{g/ml}$)의 높은 감도를 나타내었다.

정확성과 정밀성

인동 시료에 단계별 기지농도의 표준물질을 넣은 후 일간, 일 내 반복 실험하여 표준물질의 회수율과 실험의 정밀성을 측정하였을 때 회수율은 최소 99.39%에서 최대 105.89%로서 높은 정

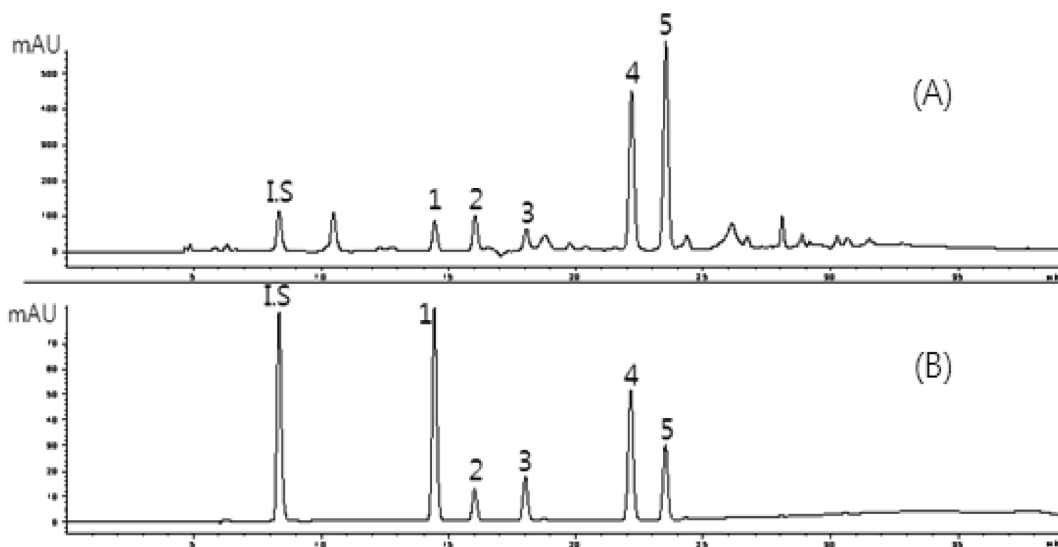


Fig. 2 – HPLC chromatograms of standard extract of caulis *Lonicera japonica* (A) and solution mixture (B).

Table VI – Calibration curves, LODs and LOQs of five standard compounds

Compound	Range ($\mu\text{g/ml}$)	Regression equation ^{a)}	r^2	LOD ^{b)} ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ ^{c)} ($\mu\text{g/ml}$)
1	1~20	$y=0.18180x+0.02239$	0.999	0.557	1.687
2	1~20	$y=0.02735x-0.00282$	1.000	0.327	0.990
3	1~20	$y=0.03862x+0.00776$	1.000	0.250	0.757
4	1~20	$y=0.09848x+0.00084$	0.998	0.657	1.990
5	1~20	$y=0.06499x-0.01462$	0.999	1.098	3.327

^{a)}y: peak area, x: concentration of the analyte ($\mu\text{g/ml}$).

^{b)}LOD, limit of detection.

^{c)}LOQ, limit of quantification.

Table VII – Precisions and accuracy of the five standard compounds

Compound	Spiked amount (μg)	Intra-day (n=5)		Inter-day (n=5)	
		Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)
1	2	101.19	0.45	100.62	0.45
	4	100.08	0.20	100.18	0.26
	8	99.90	0.23	100.72	0.27
2	2	105.89	3.15	102.50	1.99
	4	100.87	1.96	100.88	0.96
	8	100.00	0.56	100.10	0.58
3	2	103.61	3.28	100.86	1.65
	4	102.64	0.59	101.94	0.71
	8	99.89	0.31	100.25	0.38
4	2	100.55	0.57	101.14	0.86
	4	99.81	0.16	100.27	0.48
	8	99.39	0.16	99.61	0.14
5	2	100.02	0.69	100.76	0.65
	4	99.64	0.45	100.15	0.67
	8	101.64	1.74	100.13	0.78

확성을 나타냈으며 상대표준편차 (RSD)는 최소 0.14%에서 최대 3.28%로서 우수한 정밀성을 나타내었다(Table VII).

HPLC-DAD-ion trap-MS를 이용한 표준물질의 동정

인동에 함유된 표준물질의 동정에 있어 HPLC-DAD를 통해서 는 머무름 시간의 일치 를 통한 chromatogram상의 시각적인 정보만을 얻을 수 있다. 그래서 HPLC-DAD-ion trap-MS를 통해 인동 시료에 함유된 표준물질의 머무름 시간과 m/z 값 및 fragment 의 패턴을 확인함으로써 시료내의 표준물질을 동정하였다(Fig 3, 4). Table VIII에 각 peak에 대한 분석결과를 나타내었다.

산지별 생리활성 물질 함량 비교

국내에서 현재 유통되고 있는 인동은 대부분 중국산과 국내산 이며, 산지별 생리활성물질의 함량이 차이가 있음에도 불구하고 이를 비교분석할 만한 신뢰성 있는 자료가 부족하다. 그러므로 본 실험에서 확립한 최적의 분석법을 토대로 산지별 24종의 생 리활성 물질을 분석하였다(Table IX). 분석결과 24종의 인동에 함유된 생리활성 물질의 함량은 대체적으로 불규칙적이었으며, 대체적으로 coniferin(1), loganic acid(2)와 demethylsecologanol (3)은 낮은 함량을 가졌고 sweroside(4)와 loganin(5)은 높은 함 량을 가졌다.

대부분의 한약재와 마찬가지로 인동 또한 함량이 높은 활성물

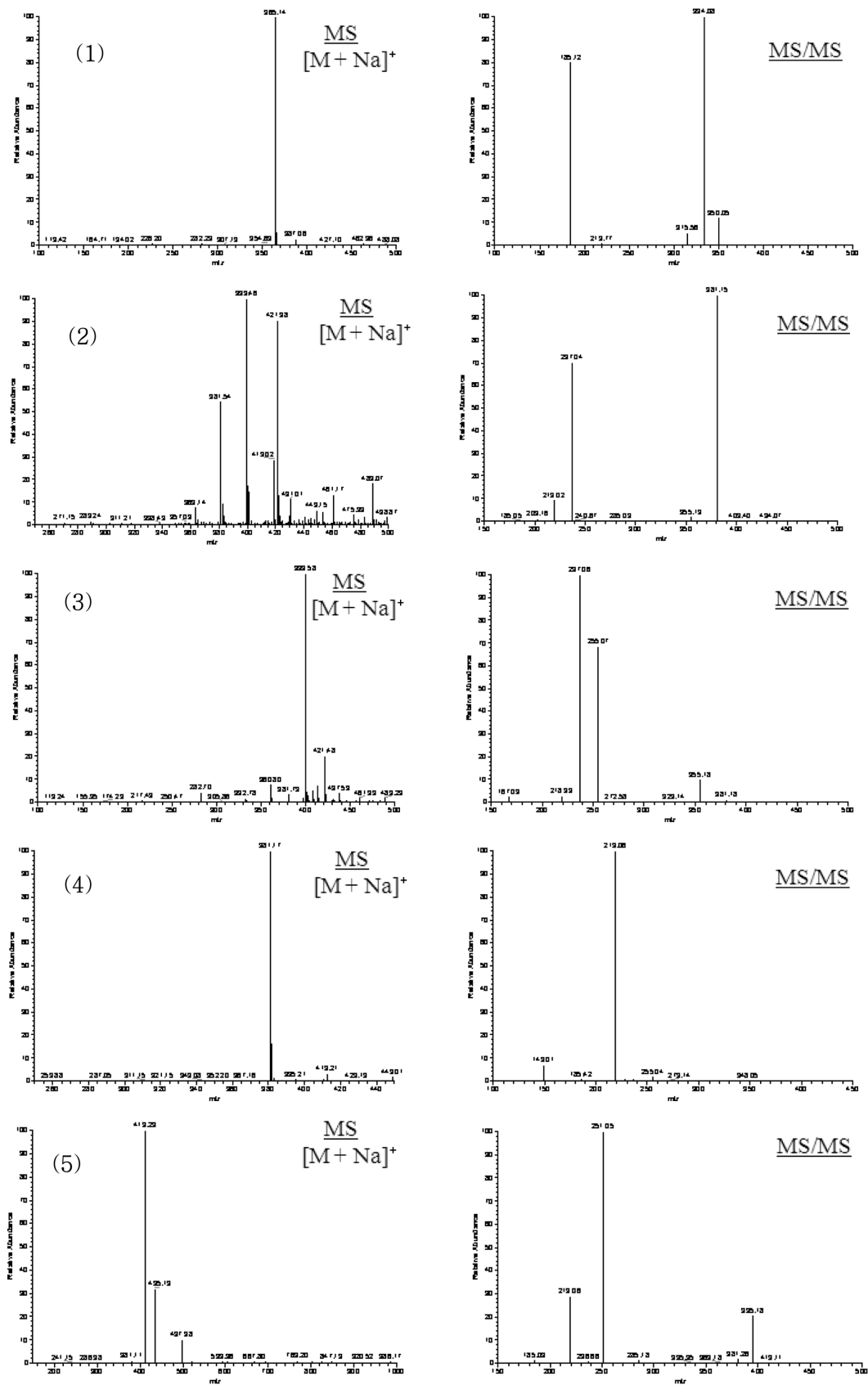


Fig. 3 – ESI mass spectra of five bioactive compounds in caulis *Lonicera japonica*.

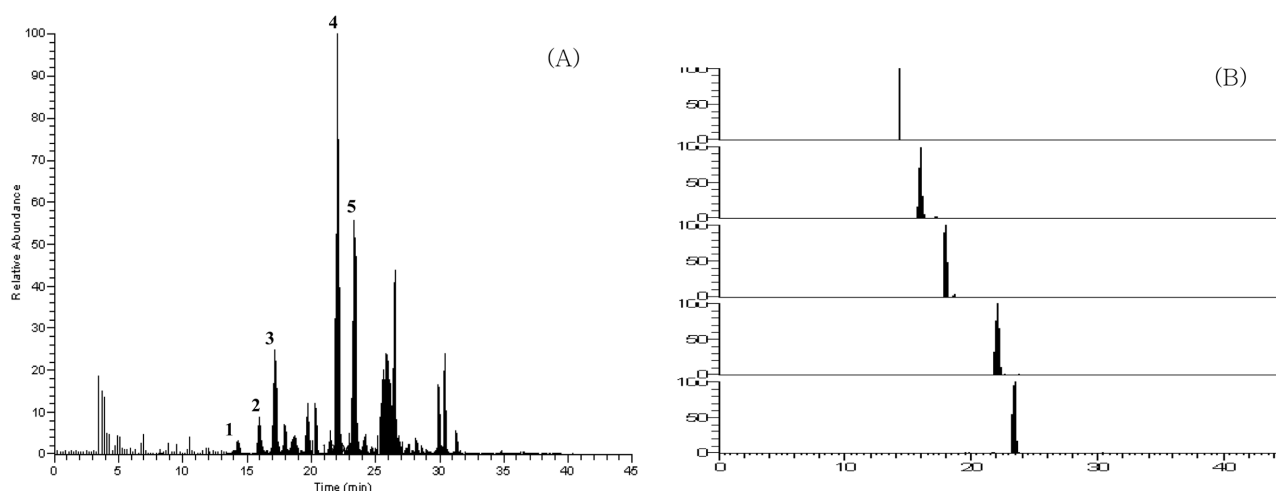


Fig. 4 – Total ion chromatograms of caulis *Lonicera japonica* in SIM mode (A) and SRM mode (B).

Table VIII – HPLC-DAD-ion trap-MS data of the five bioactive compounds in caulis *Lonicera japonica*

Peak no.	MW ^{a)}	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	C.E ^{b)}	Ion mode	Identification
1	342	365	185	32	Positive	Coniferin
2	376	399	381	26	Positive	Loganic acid
3	376	399	237	30	Positive	Demethylsecologanol
4	358	381	219	40	Positive	Sweroside
5	390	413	251	30	Positive	Loganin

^{a)}molecular weight.

^{b)}collision energy.

Table IX – Content of 5 compounds in samples of 24 commercial products from diverse sources ($\mu\text{g/g}$)

Samples	1	2	3	4	5
Uijeongbu	155.14	1168.64	365.49	7029.87	1291.37
Hongcheon	64.94	488.95	120.97	2842.11	1096.85
Gimpo	128.32	514.86	205.60	3360.85	687.41
Cheongsong	217.04	1044.87	347.81	6974.89	2062.74
Pocheon	208.56	853.62	687.23	8335.13	987.78
Wansan	159.25	839.28	155.19	3394.63	2291.35
Hwasan	155.31	1035.00	-	8412.94	1553.55
Yong-mun	-	961.77	-	4031.45	151.99
Sangju	-	599.77	178.90	6146.61	392.33
Andong	420.74	1631.54	95.24	4715.45	3241.19
Yuseong	-	1198.66	-	4158.96	866.46
Ganghwa	99.15	1466.63	214.41	2380.97	1542.08
Dong-gu	-	1651.58	-	3081.24	674.78
Gimcheo	-	705.29	-	3971.13	369.23
China	74.07	2410.59	41.95	1326.68	1974.00
Gangwon	46.93	1289.82	94.87	2382.44	702.51
Bonghwa	204.22	1092.22	205.40	3541.88	4213.94
Gyungju (stem)	15.78	-	-	374.55	55.05
Gyungju (leaf)	105.33	-	-	640.08	-
Seoul (stem)	81.69	1543.54	469.60	4600.27	7003.21
Seoul (leaf)	72.55	636.78	-	829.47	-
Sandong, China (stem)	43.83	416.89	36.04	862.61	723.63
Sandong, China (stem)	98.77	3019.19	57.21	1704.80	1305.29
Yeongcheon (stem)	215.83	822.55	266.35	4094.85	2792.49

1: coniferin, 2: loganic acid, 3: demethylsecologanol, 4: sweroside, 5: loganin.

질 하나로는 인동이 가지고 있는 전반적인 약효를 나타내지 못하며 여러 개의 활성물질이 같이 존재할 때 시너지 효과를 발휘한다고 알려져 있다.¹²⁾ 그러므로 단일 활성 성분만을 분석하여 생약재의 질을 판단하기 보다는 보다 체계적인 활성검색에 의하여 시너지 효과가 규명된 활성 물질에 대한 동시 분석법이 한약재 평가를 위한 적절한 접근방법으로 사료된다.

결 론

본 실험은 HPLC-DAD-ion trap-MS를 이용하여 인동에 함유된 2종류, 5종의 생리활성물질의 동시분석법을 개발하였으며, 최적의 조건에 대한 평가로서 직선성, 범위, 검출한계, 정량한계, 정밀성과 정확성 등 여러 validation parameter들을 제시하였다. 또한 각 표준물질들의 정확한 동정을 위하여 HPLC-DAD-ion trap-MS를 이용하여 이를 확인하였고 이와 같이 확립한 최적의 분석법을 통하여 국내에 유통되고 있는 인동 24종의 활성성분 함량을 비교분석하였다.

감사의 말씀

본 연구는 한국 식품의약품안전청(KFDA) 주관 아래 수행된 한약재 과학화사업(과제번호: 08182 한약재 252)으로서 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) Li, H. J., Zhang, Z. Y. and Li, P. : Comparative study on volatile oils in flower and stem of *Lonicera japonica*. *Journal of Chinese Medicinal Materials (Zhongyao)* **25**, 476 (2002).
- 2) 진재인 : 도설한방의학대사전(중국약학대전) I, 강담사, p. 160 (1982).
- 3) Chinese Pharmacopoeia Committee. the chinese pharmacopoeia

- 2005 edition, part . Chemical Industry Press: beijing, p. 130 (2005).
- 4) Mathad, V. T., Raj, K., Bhaduri, A. P., Sahai, R., Puri, A., Tripathi, L. M. and Srivastava, V. M. L. : Studies on the profile of immunostimulant activities of modified iridoid glycosides. *Bioorganic Medicine and Chemistry* **6**, 605 (1998).
- 5) Kumarasamy, Y., Nahar, L., Cox, P. J., Jaspars, M. and Sarker, S. D. : Bioactivity of secoiridoid glycosides from *Centaureum erythraea*. *Phytomedicine* **10**, 344 (2003).
- 6) Marinova, E. M. and Yanishlieva, N. V. : Antioxidant activity and mechanism of action of some phenolic acids at ambient and high temperatures. *Food Chemistry* **81**, 189 (2003).
- 7) Chang, C.-W., Lin, M.-T., Lee, S.-S., Liu, K. C. S. C., Hsu, E.-L. and Lin, J.-Y. : Differential inhibition of reverse transcriptase and cellular DNA polymerase- α activities by lignans isolated from Chinese herbs, *Phyllanthus myrtifolius* Moon, and tannins from *Lonicera japonica* Thunb and *Castanopsis hystrix*. *Antiviral Res.* **27**, 367 (1995).
- 8) Chen, J. and Ma, S. C. : Extraction, separation and identification of loganin and sweroside from *Caulis Lonicerae japonicae*. *Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy (Zhongguo Xiandaiyingyongyaoxue Zashi)* **23**, 199 (2006).
- 9) Wu, X. F., Li, Y. X., Hou, H. E. and Wei, W. : Determination of chlorogenic acid in the branch of *Lonicera japonica*. *Journal of Chinese Medicinal Materials (Zhongyao)*. **19**, 69 (1996).
- 10) Li, Y. X. : Determination of the chlorogenic acid and chemical compounds of flavones contents in the branch of *Lonicera japonica* Thunb. *HeNan Science (Henan Kexue)* **16**, 63 (1998).
- 11) Lin, R. Y. and He, P. X. : Determination of chlorogenic in the stem of *Lonicera japonica*. *Henan Science (Henan Kexue)* **24**, 38 (2006).
- 12) Chen, J. and Ma, S. C. : HPLC determination of sweroside and loganin in *Caulis Lonicerae*. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis (Yaowu Fenxi Zazhi)* **25**, 1451 (2005).