

## 用离子色谱测定唾液葡萄糖含量方法的建立及评估

徐春<sup>1</sup> 窦倩<sup>2</sup> 汪诗文<sup>2</sup> 章子锋<sup>2</sup> 戴庆<sup>2</sup>

<sup>1</sup>解放军总医院第三医学中心内分泌科, 北京 100039; <sup>2</sup>国家纳米科学中心, 中国科学院卓越中心, 中国科学院纳米标准与表征重点实验室, 纳米光子学研究部, 北京 100190;

徐春和窦倩对本文有同等贡献

通信作者: 戴庆, Email: daiq@nanoctr.cn, 电话: 010-82545720

**【摘要】 目的** 建立用离子色谱测定唾液中葡萄糖浓度的方法。**方法** 利用热变性法去除唾液中的蛋白质, 以 CarboPac PA20 (3×30 mm) 作为保护柱, CarboPac PA20 (3×150 mm) 作为分析柱进行离子色谱分析。以超纯水 (A), 250 mmol/L NaOH 溶液 (B), 500 mmol/L NaAc (C) 为淋洗液进行梯度洗脱, 采用脉冲安培检测器检测。**结果** 本方法在 0.04~0.12 mg/L 范围内具有较好的线性关系, 线性相关系数  $R^2=0.9967$ 。葡萄糖的检出限是 2  $\mu\text{g/L}$ , 重复性测量相对标准偏差 (RSD) 的平均值为 0.75%, 加标回收率平均值为 103.07%。**结论** 本方法操作简便、灵敏度高、准确性好、结果稳定, 可用于唾液中葡萄糖含量的测定。

**【关键词】** 离子色谱; 唾液; 葡萄糖; 糖尿病; 无创检测

**基金项目:** 中国科学院科技服务网络计划 (STS 计划) (KFJ-STZ-ZDTP-063); 国家重点研发计划 (2016YFA0201600)

## Establishment, evaluation, and determination of saliva glucose concentration by ion chromatography

Xu Chun<sup>1</sup>, Dou Qian<sup>2</sup>, Wang Shiwen<sup>2</sup>, Zhang Zifeng<sup>2</sup>, Dai Qing<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Endocrinology, 3rd Medical Center, PLA General Hospital, Beijing 100039, China; <sup>2</sup>Division of Nanophotonics, CAS key laboratory of Standardization and Measurement for Nanotechnology, CAS Center for Excellence in Nanoscience, National Center for Nanoscience and Technology, Beijing 100190, China

Xu Chun and Dou Qian contribute equally to this article

Corresponding author: Dai Qing, Email: daiq@nanoctr.cn, Tel: 010-82545720

**【Abstract】 Objective** To establish an analytical method for measuring the concentration of glucose in saliva by ion chromatography. **Methods** The proteins in saliva were removed by thermal denaturation method, CarboPac PA20 (3×30 mm) was used as a protective column and CarboPac PA20 (3×150 mm) was used as an analytical column for ion chromatography analysis. Gradient elution was carried out with A—ultra-pure water, B—250 mmol/L NaOH solution and C—500 mmol/L NaAc solution. Pulsed ampere detector was used for detection. **Results** This method had a good linear relationship in the range of 0.04 to 0.12 mg/L, with a linear relation coefficient of 0.9967. The detection limit of glucose was 2 µg/L, the mean value of the relative standard deviation (RSD) of the repeatability measurement was 0.75%, and the average spike recovery was 103.07%. **Conclusion** This method is simple, sensitive, accurate and stable, and can be used for the determination of glucose concentration in saliva.

**【Key words】** Ion chromatography; Saliva; Glucose; Diabetes; Non-invasive detection

Fund program: Science and Technology Service Network Plan of Chinese Academy of Sciences (STS Plan) (KFJ-STZ-ZDTP-063); National Key Research and development Plan (2016YFA0201600)

唾液由唾液腺（腮腺、颌下腺、舌下腺、小涎腺）分泌，在口腔内起帮助消化、湿润和保护黏膜的作用。唾液又被称为过滤后的血液，有些成分与血液关系密切，且唾液具有采集安全方便、无创伤、可实时收集等优点，这使得唾液在研究疾病诊断方面有着独特的优势<sup>[1]</sup>。其中，唾液葡萄糖浓度指标吸引了研究者的广泛关注。

有研究表明，对于糖尿病患者，唾液葡萄糖浓度与血糖浓度呈正相关，故可将唾液中的葡萄糖浓度作为糖尿病检测的标志物<sup>[2-3]</sup>。但在不同的研究中，唾液葡萄糖浓度与血糖浓度的关系模型差异较大，甚至还有部分研究者得出了完全相反的结论<sup>[4-5]</sup>。造成这种现象的关键因素是唾液中的葡萄糖含量极低，且其成分复杂。目前唾液葡萄糖的测定方法主要是基于酶（如葡萄糖氧化酶、己糖激酶、

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶)和各种葡萄糖敏感材料(如环肽、纳米材料、硼酸及其衍生物),且这两种方法往往需结合其他测试方法,才能实现低浓度葡萄糖的检测<sup>[6-8]</sup>。酶对葡萄糖的特异性好,但因稳定性差、价格昂贵、操作复杂等缺点限制了其使用范围<sup>[9]</sup>;大部分葡萄糖敏感材料虽稳定性较好,但与葡萄糖结合的特异性较差,且易受唾液中其他物质的干扰,进而影响其检测的准确性<sup>[10]</sup>。

色谱法是利用混合物在固定相上的吸附能力/亲和力大小不同而实现分离检测的方法<sup>[11]</sup>。该方法具有分析速度快、准确度高、选择性高、准重现性好等优点。近年来,离子色谱因配备了高灵敏度和高选择性的脉冲安培检测器,已被广泛用于生物样品中的单糖、寡糖、多聚糖及氨基酸等有机物质的检测<sup>[12]</sup>。沿着这一思路,我们开发了一种基于离子色谱检测唾液中葡萄糖浓度的方法,以期为唾液葡萄糖浓度检测提供更加科学、可靠的技术支撑,并为基于唾液葡萄糖的无创血糖检测提供一种精度较高的检测方法。

## **1 材料与方法**

### **1.1 仪器与试剂**

仪器:离子色谱(Thermo Fisher ICS 5000+),唾液采集管(德国莎斯特),离心机(AXTD4)。

试剂:超纯水,50 % NaOH 溶液,NaAc,葡萄糖标准品。

### **1.2 标准溶液的配制**

标准储备液:准确称取葡萄糖标准品,用超纯水配制成浓度为 1000 mg/L 的标准储备液,置于 4 °C 冰箱中密封贮藏,有效期 1 个月。

葡萄糖标准液:分别移取各标准储备液于 100 mL 容量瓶中,超纯水定容,配制成不同浓度(0.04、0.06、0.06、0.08、0.10、0.12 mg/L)的标准工作溶液。

### **1.3 唾液样本的采集和处理**

**1.3.1 唾液采集** 采集唾液前,受试者用清水漱口 3 次。采集时将采集管中的棉棒放入口中咀嚼 3~5 min,待唾液浸润棉棒后,把棉棒放回唾液收集管,离心(4000 r/min, 10 min)取上清液。受试者采集完唾液后,用清水漱口。

**1.3.2 唾液处理** 唾液经热变性法去除蛋白质。将收集到唾液样本立即置于 95 °C 水溶液中 30 min 后取出,自然冷却到室温,经台式离心机(4000 r/min, 10 min),

取上清液。测试前，上清液用 0.22 μm 的 PVDF 滤膜过滤，取滤液并利用离子色谱进行检测。

本次项目制定的规范化操作流程，通过了中国人民解放军总医院第三医学中心（原中国人民武装警察部队总医院）医学伦理委员会审核（2017 伦审器临审第 036 号），所有研究对象均签署了知情同意书。

入组条件：年龄18~80周岁，在中国人民解放军总医院第三医学中心内分泌科就医的门诊或住院患者。

排除条件：肝、肾功能障碍；孕妇或哺乳期妇女；患精神疾病或存在认知功能障碍等。

1.4 离子色谱测试葡萄糖的色谱条件

保护柱 CarboPac PA20（3×30 mm）；分析柱 CarboPac PA20（3×150 mm）；流速 0.45 ml/min；检测模式：脉冲安培检测器，点位波形采用糖标准四电位波形；色谱柱温度：30℃；检测器温度：30℃；工作电极：Au；参比电极：Ag/AgCl；梯度洗脱程序（表 1），其中 A 代表超纯水，B 代表 250 mmol/L NaOH 溶液，C 代表 500 mmol/L NaAc 溶液。

表 1 离子色谱测试葡萄糖的流动相梯度淋洗程序

保留时间（min）	A（%）	B（%）	C（%）
0.00	80.0	20.0	0.0
15.00	80.0	20.0	0.0
15.5	0.0	0.0	100.0
20.0	0.0	0.0	100.0
20.5	0.0	100.0	0.0
25.00	0.0	100.0	0.0
25.1	80.0	20.0	0.0
30.00	80.0	20.0	0.0

1.5 观测指标

1.5.1 离子色谱测试葡萄糖的线性范围

用离子色谱仪依次测试葡萄糖浓度为 0.04、0.06、0.08、0.1、0.12 mg/L 标液。以葡萄糖浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标，仪器自动拟合出二者的相关性。

1.5.2 离子色谱测试葡萄糖的相对标准偏差

按照 1.3 采集和处理唾液样本共计 4 例，每个唾液样本重复测试 3 次，按照公式 1 和 2 计算相对标准偏差（RSD）。

$$RSD = \frac{SD}{x} \quad (1)$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - x)^2}{n - 1}} \quad (2)$$

公式中， $SD$  指标准偏差， $x$  指测试的算术平均值， $n$  指测量次数， $x_i$  指是各次测量值。

### 1.5.3 离子色谱测试葡萄糖的加标回收率

首先测试加标前唾液样本中的葡萄糖浓度，然后分别向样本中添加不同浓度的葡萄糖标液进行测试，按照公式 3 计算加标回收率。

$$\text{加标回收率} = \frac{\text{加标后的测试值} - \text{原含量}}{\text{加标量}} \quad (3)$$

### 1.5.4 葡萄糖测试方法比较

检索目前关于测试葡萄糖的文献，考察葡萄糖的检测范围和检出限，并与本工作结果进行对比。

## 2 离子色谱测试结果

### 2.1 离子色谱测试葡萄糖的线性范围

利用离子色谱依次检测其葡萄糖浓度与峰面积的关系，仪器自动拟合出二者的相关性。离子色谱测试葡萄糖的线性范围是 0.04~0.12 mg/L（图 1），标准曲线  $Y = (6.64 \pm 0.3076) \times X + (-0.0212 \pm 0.026)$ ，其中， $X$  指葡萄糖浓度， $Y$  指峰面积，拟合度为 0.9967。检出限是指离子色谱可以定性地从样本中检出葡萄糖的最低浓度。将低浓度葡萄糖标准工作溶液逐级稀释后测定，以信噪比（S/N）为 3 对应的浓度为检出限，得到本方法的检出限为 2  $\mu\text{g/L}$ 。

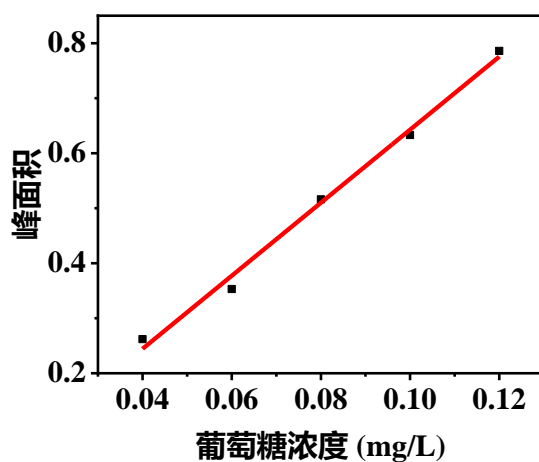


图 1 不同葡萄糖浓度的峰面积标准曲线

## 2.2 离子色谱测试葡萄糖的相对标准偏差

每个唾液样本重复测试 3 次，共计测试 4 个不同的唾液样本，相对标准偏差 RSD 的平均值为 0.75%，说明该测试方法具有优异的稳定性（表 2）。

表 2 离子色谱测试葡萄糖的重复性测试

样本编号	第一次测试浓度 (mg/L)	第二次测试浓度 (mg/L)	第三次测试浓度 (mg/L)	RSD (%)
1	12.88	12.74	12.80	0.55
2	18.08	17.92	17.96	0.46
3	41.36	40.28	40.76	1.33
4	35.70	35.25	35.50	0.63

## 2.3 离子色谱测试葡萄糖的加标回收率

表 3 反映了离子色谱的加标回收率。经测试原唾液样本中的葡萄糖含量均值为 8.58 mg/L，然后分别向样本中添加 3、14、20 mg/L 的葡萄糖标液测试。经计算，平均加标回收率为 103.07%。

表 3 离子色谱测试葡萄糖的加标回收率

加标量 (mg/L)	第一次测试 (mg/L)	第二次测试 (mg/L)	第三次测试 (mg/L)	平均值 (mg/L)	加标回收率 (%)
3	11.72	11.52	11.88	11.71	104.33
14	22.64	22.64	22.64	22.64	100.43

20	29.70	29.35	29.35	29.47	104.45
----	-------	-------	-------	-------	--------

## 2.4 葡萄糖测试方法比较

通过与其他葡萄糖检测方法的数据对比发现,本研究所建立的离子色谱法在测试唾液葡萄糖浓度方面具有灵敏高、检测精度高、检出限低等优势,且在实际测量过程中不易受到个体化差异等干扰因素的影响(表4)。

表4 离子色谱法与其他测定唾液葡萄糖方法的比较

方法	线性范围	拟合度	检出限	文献
葡萄糖氧化酶	0.1~6.0 mM (18.02~1080.96 mg/L)	0.9968	9.01 μM (1.64 mg/L)	6
葡萄糖氧化酶	50~540 mg/dL (500~5400 mg/L)	—	24.6 mg/dL 246 mg/L	7
葡萄糖氧化酶	10.8~693.0 μmol/L (1.95~124.85 mg/L)	0.97	4.2 μmol/L (0.76 mg/L)	9
环肽	10 nmol/L~20 mmol/L (0.18~3603.20mg/L)	0.9679	—	10
纳米材料 CuO	5μM~0.225 mM (0.9~40.5 mg)	0.998	~0.41 μM (0.074 mg/L)	16
苯硼酸	0~36 mg/L	0.99	1 mg/L	18
离子交换高效液相色谱 法	$0.5 \times 10^{-3}$ ~1.67 mmol/L (0.09~300.87 mg/L)	—	0.1 μmol/l (0.18 mg/L)	11
离子色谱法	0.04~0.12 mg/L	0.9967	0.002 mg/L	本工作

## 3 讨论

唾液葡萄糖检测的主要难点在于以下两个方面:①唾液中葡萄糖的含量低,约为血糖的 1/50~1/100<sup>[13]</sup>;②唾液成分复杂,包括蛋白质(粘蛋白、溶菌酶等)、激素(皮质醇、睾丸激素等)、有机分子(胆红素、胆固醇、乳酸等)、无机化合物(Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、磷酸盐)等,这些物质极易影响唾液葡萄糖检测的准确性<sup>[14]</sup>。要实现高灵敏度唾液葡萄糖检测的关键问题在于,如何同时克服上述两个难点,进而找到一种可兼顾检测的灵敏性、特异性与普适性的唾液葡萄糖测定方

法。

已有研究中唾液葡萄糖检测的方法多是基于酶法（葡萄糖氧化酶、己糖激酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶），再联合包括电化学方法、比色法、紫外分光光度法、远红外/拉曼光谱等检测手段<sup>[6-8]</sup>。例如，罗曼等<sup>[15]</sup>利用葡萄糖氧化酶结合酶标仪测定了波长在 510 nm 处葡萄糖反应产物的吸光度。葡萄糖的检测范围是 0.006~0.389 mmol/L（1.08~70.08 mg/L），线性关系  $R^2=0.9979$ ，检出限 0.006 mmol/L（1.08 mg/L）。这种方法虽也能测试唾液中的葡萄糖浓度，但其灵敏度、稳定性和精度较差，且该方法易受唾液中维生素 C、尿酸、谷胱甘肽等物质的干扰，影响检测结果<sup>[9]</sup>。此外还有利用一些葡萄糖敏感材料，比如环肽<sup>[10]</sup>、纳米材料<sup>[16]</sup>、硼酸及其衍生物<sup>[17]</sup>等实现对葡萄糖的吸附检测。与酶法相比，这些材料的稳定性较好。比如，我们前期致力于研究基于苯硼酸衍生物的石英晶体微天平（QCM）方法测试唾液中葡萄糖，通过表面引发的方法将氧化石墨烯参杂的苯硼酸水凝胶涂覆在石英晶片上；葡萄糖的检测范围是 0~36 mg/L，线性关系  $R^2=0.99$ ，检出限 1 mg/L。虽然该方法也可实现生理条件下葡萄糖的快速检测，但将其应用于真实唾液测试时，唾液中的蛋白质和有机分子等对测试产生极大的干扰<sup>[10, 18]</sup>。

色谱法具有优异的选择性、准确性和稳定性，是检测唾液葡萄糖浓度的理想方法。比如，Gough 等<sup>[11]</sup>利用离子交换高效液相色谱法和脉冲光度法测定唾液葡萄糖浓度，该仪器检测葡萄糖的工作范围为 0.09~300.87 mg/L。在最高灵敏度条件（1000 nA）下检测到的低葡萄糖浓度（2.8  $\mu\text{mol/L}$ ）的 RSD 为 4.4%，而在 30000 nA 下检测到的高葡萄糖浓度（1.67 mmol/L）的 RSD 为 1.7%（未给出线性拟合度和回收率）。但并未系统研究、确立该方法应用于唾液葡萄糖的检测。

鉴于离子色谱法在测试糖类物质方面的优异性，本研究建立了离子色谱法测试唾液葡萄糖浓度的方法，并完成了以下两个方面改进和优化：（1）唾液的处理方法。唾液样本成分复杂，尤其是蛋白质含量较高，且具有较宽的动态范围（71~2232 mg/L<sup>[19]</sup>），极易影响唾液中微量葡萄糖的测试。去除蛋白质的方法可分为有机溶剂法、蛋白酶法、高盐法、透析法、热变性法等<sup>[20]</sup>。为了减少试剂引入对测试结果的干扰，且保证时效性，我们采用热变性法去除唾液中的蛋白质，即通过加热使蛋白变性沉淀，继而通过离心将其分离。（2）优化测试条件，包括色谱柱条件、流速、流动相种类及梯度洗脱程序等参数，使其对葡萄糖浓度具有更低



检测浓度的线性范围 (0.04~0.12 mg/L)。这种检测灵敏度的提高允许对唾液样本进行更高倍数的稀释 (减少干扰物含量), 显著提高了检测准确度。通过上述优化过程, 本方法对唾液中的葡萄糖具有更低的检出限 (2 µg/L) 及更优异的稳定性 (RSD 的平均值为 0.75%)。

综上, 本研究建立了离子色谱法测定唾液中葡萄糖浓度的方法, 为研究唾液葡萄糖浓度与血糖水平的相关性提供了一种可靠的技术手段, 与其他方法相比, 该方法具有灵敏度高、准确性好、稳定性佳等优点。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

1. Javaid MA, Ahmed AS, Durand R, et al. Saliva as a diagnostic tool for oral and systemic diseases[J]. J Oral Biol Craniofac Res,2016,6(1):66-75. DOI:10.1016/j.jobcr.2015.08.006.
2. Mohammadnejad P, Asl SS, Aminzadeh S, et al. A new sensitive spectrophotometric method for determination of saliva and blood glucose[J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc,2020,229:117897. DOI:10.1016/j.saa.2019.117897.
3. Tiongco REG, Arceo ES, Rivera NS, et al. Estimation of salivary glucose, amylase, calcium, and phosphorus among non-diabetics and diabetics: Potential identification of non-invasive diagnostic markers[J]. Diabetes Metab Syndr,2019,13(4):2601-2605. DOI:10.1016/j.dsx.2019.07.037.
4. Gupta A, Singh SK, Padmavathi BN, et al. Evaluation of correlation of blood glucose and saliva glucose level in known diabetic patients[J]. J Clin Diagn Res,2015,9(5): ZC106-ZC109. DOI:10.7860/JCDR/2015/12398.5994.
5. Soares MSM, Batista-Filho MMV, Pimentel MJ, et al. Determination of salivary glucose in healthy adults[J]. Med Oral Patol Oral Cir Bucal,2009,14(10):E510-E513. DOI:10.4317/medoral.14.e510.
6. Luo XJ, Shi WH, Liu YQ, et al. A smart tongue depressor-based biosensor for glucose[J]. Sensors,2019,19(18):3864. DOI:10.3390/s19183864.
7. Soni A, Jha SK. Smartphone based non-invasive salivary glucose

biosensor[J]. *Anal Chim Acta*,2017,996:54-63. DOI:10.1016/j.aca.2017.10.003.

8. Bell C, Nammari A, Uttamchandani P, et al. Flexible electronics-compatible non-enzymatic glucose sensing via transparent CuO nanowire networks on PET films[J]. *Nanotechnology*,2017,28(24):245502. DOI:10.1088/1361-6528/aa7164.

9. 张厚毅. 唾液葡萄糖的检测法改进及应用探讨 [J], 齐鲁医学检验,2005,16(3):17-19. DOI:10.3969/j.issn.1673-5013.2005.03.007.

Zhang HY, Detection improvement and implication discussion of saliva glucose[J]. *Qilu Med Exam*,2005,16(3):17-19. DOI:10.3969/j.issn.1673-5013.2005.03.007.

10. Li C, Chen X, Zhang FY, et al. Design of cyclic peptide based glucose receptors and their application in glucose sensing[J]. *Anal Chem*,2017,89(19):10431-10438. DOI:10.1021/acs.analchem.7b02430.

11. Gough H, Luke GA, Beeley JA, et al. Human salivary glucose analysis by high-performance ion-exchange chromatography and pulsed amperometric detection[J]. *Arch Oral Biol*,1996,41(2):141-145. DOI:10.1016/0003-9969(95)00121-2.

12. Lamb JD , Myers GS , Edge N. Ion chromatographic analysis of glucose, fructose, and sucrose concentrations in raw and processed vegetables[J]. *J Chromatogr Sci*,1993,31(9):353-357. DOI:10.1093/chromsci/31.9.353.

13. 黄辉, 乔羽, 魏明竞, 等. 唾液葡萄糖比色测定方法的建立及应用[J]. 现代口腔医学杂志,2005,19(6):621-623. DOI: 10.3969/j.issn.1003-7632.2005.06.019.

Huang H, Qiao Y, Wei MJ, et al. Establishment and application of colorimetric method for saliva glucose measurement[J]. *J Mod Somatol*,2005,19(6):621-623. DOI:10.3969/j.issn.1003-7632.2005.06.019.

14. Ngamchuea K, Chaisiwamongkhol K, Batchelor-McAuley C, et al. Chemical analysis in saliva and the search for salivary biomarkers—a tutorial review[J]. *Analyst*, 2018,143(1):81-99. DOI:10.1039/c7an01571b.

15. 罗曼, 宣文洋, 陈文西. 基于健康人群唾液葡萄糖检测体系的构建[J]. 检验医学,2012,27(6):486-490. DOI: 10.3969/j.issn.1673-8640.2012.06.015.

Luo M, Xuan WY, Chen WX. Establishment of saliva glucose detection system

for healthy subjects[J]. Lab Med,2012,27(6):486-490.  
DOI:10.3969/j.issn.1673-8640.2012.06.015.

16. Chakraborty P, Dhar S, Deka N, et al. Non-enzymatic salivary glucose detection using porous CuO nanostructures[J]. Sensor Actuat B-Chem,2020,302:127134. DOI:10.1016/j.snb.2019.127134.

17. 安媛媛, 徐祖顺, 吴水林. 苯硼酸类糖敏感材料的研究进展[J], 高分子通报,2012,3:98-106. DOI: 10.14028/j.cnki.1003-3726.2012.03.004.

An YY, Xu ZS, Wu SL. Research advances in phenylboronic acid-containing materials[J]. Chin Polym Bull,2012,(3):98-106.  
DOI: 10.14028/j.cnki.1003-3726.2012.03.004.

18. Zhang ZZ, Dou Q, Wang SW, et al. Hybrid hydrogel films with graphene oxide for continuous saliva-level monitoring[J]. J Mater Chem C,2020,8:9655-9662.  
DOI: 10.1039/D0TC00725K.

19. Ngamchuea K, Chaisiwamongkhon K, Batchelor-McAuley C, et al. Chemical analysis in saliva and the search for salivary biomarkers-a tutorial review[J]. Analyst, 2018,143:81-99. DOI: 10.1039/C7AN01571B.

20. 赵海运, 王庆奎, 邢克智, 等, 黄芪多糖除蛋白质方法与条件优化[J]. 天津农学院学报,2009,16(4):5-8. DOI: 10.3969/j.issn.1008-5394.2009.04.002.

Zhao HY, Wang QK, Xing KZ, et al. Protein removing method and condition optimization of polysaccharide extraction from astragalus[J]. J Tianjin Agr, 2009,16(4):5-8. DOI:10.3969/j.issn.1008-5394.2009.04.002.