

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12Q 1/28

C12Q 1/26



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 98800040.7

[45] 授权公告日 2004 年 12 月 1 日

[11] 授权公告号 CN 1177937C

[22] 申请日 1998.1.20 [21] 申请号 98800040.7

[30] 优先权

[32] 1997.1.20 [33] JP [31] 7305/1997

[86] 国际申请 PCT/JP1998/000196 1998.1.20

[87] 国际公布 WO1998/031829 日 1998.7.23

[85] 进入国家阶段日期 1998.9.18

[71] 专利权人 协和梅迪克斯株式会社

地址 日本东京

[72] 发明人 藤代欣也 多贺克之 青山典仁

三池彰

审查员 周霞

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

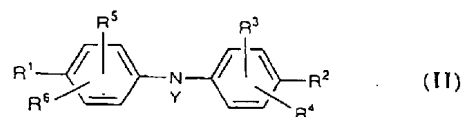
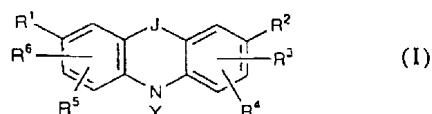
代理人 魏永良

权利要求书 5 页 说明书 21 页 附图 2 页

[54] 发明名称 抗坏血酸的定量方法及定量用试剂

[57] 摘要

抗坏血酸的定量方法、定量用试剂和定量用试剂盒，是在水溶性介质中，在同一反应体系中进行在抗坏血酸氧化酶存在下进行氧化还原型抗坏血酸生成氧化型抗坏血酸和过氧化氢的反应和在过氧化物酶存在下使生成的过氧化氢和如通式(I)或通式(II)(其中各取代基的定义见说明书)表示的色源体反应而生成色素的反应，通过定量生成的色素定量试样中的抗坏血酸。在此方法基础上可以进行总抗坏血酸的定量。本发明方法提供一种也可应用于临床检查的筛选，而且可同时测定多个检测体的简便的抗坏血酸的定量方法。通式(I) ∴ 通式(II) ∴



I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

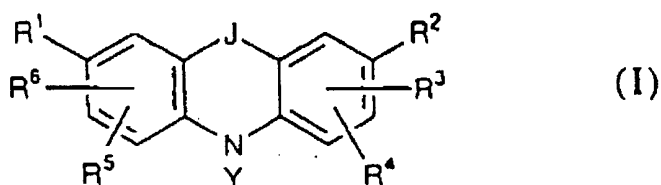
1、抗坏血酸的定量方法，该定量方法是利用对由还原型抗坏血酸和氧气生成氧化型抗坏血酸和过氧化氢的反应进行催化的抗坏血酸氧化酶——以下称为 ASOD——定量试样中的抗坏血酸，其特征在于包括以下步骤：

(1) 在水溶性介质中，ASOD 存在下，由还原型抗坏血酸和氧气生成氧化型抗坏血酸和过氧化氢的反应和在过氧化物酶存在下使生成的过氧化氢和下列通式 (I) 或通式 (II) 所表示的色源体反应而生成色素的反应在同一反应体系中进行的步骤

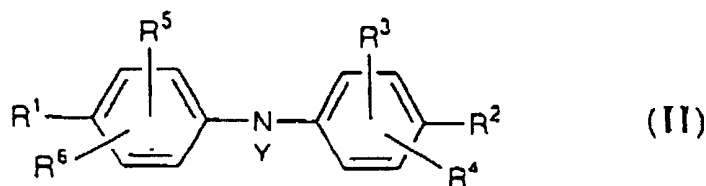
(2) 预先用已知量的还原型抗坏血酸做成校正曲线的步骤，

(3) 通过与该校正曲线进行比较，定量生成的色素的步骤，

通式(I)



通式 (II)

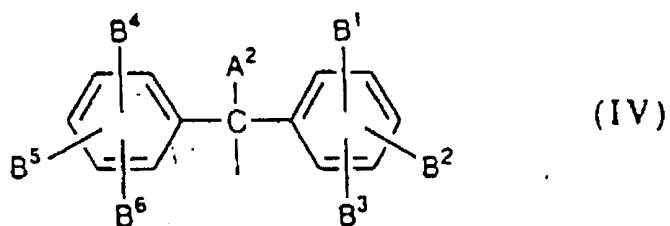


通式(I) 及通式 (II) 中，Y 表示氢原子或通式(III)基团：

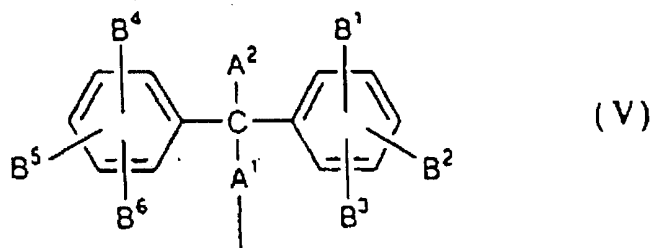


式中 Z 表示氧或硫、X 表示氢、烷基、链烯基、芳基、单取代氨基或非取代氨基；R¹ 表示羟基、单或二取代氨基或非取代氨基；R² 表示氢、羟基、烷基、烷氧基、芳基、链烯基、单或二取代氨基或非取代氨基；R³、R⁴、R⁵ 及 R⁶ 相同或不同，表示由氢、烷基、链烯基、烷酰基、芳酰

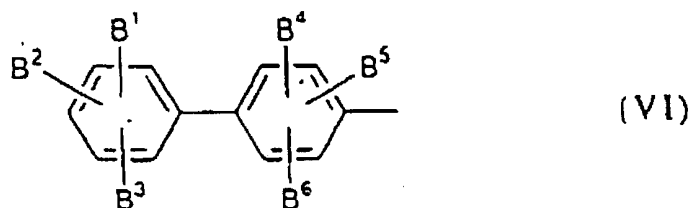
基、芳基、卤素、硝基、磺基、羧基、羟基、烷氧基、通式(IV)、



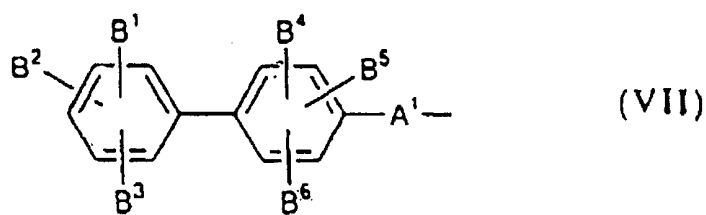
通式(V)、



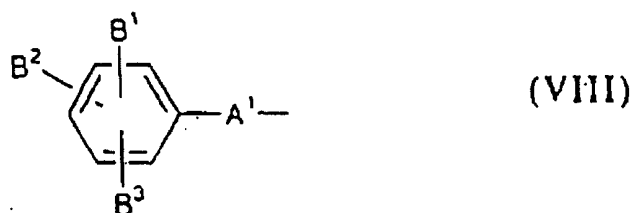
通式(VI)、



通式(VII)、



通式(VIII)、



表示的基团，通式(IV) ~ (VIII) 中，A¹表示亚烷基、A²表示氢、羟基、烷基、烷氧基、芳基、链烯基、脂环式烷基、单或二取代氨基或非取代

氨基, B^1 、 B^2 、 B^3 、 B^4 、 B^5 及 B^6 相同或不同, 表示氢、烷基、链烯基、烷酰基、芳酰基、芳基、卤素、硝基、磺基、羧基、羟基、烷氧基或羟基取代烷基;

或者, R^3 和 R^4 或 R^5 、 R^6 也可以一体形成亚烷基; J表示由氧、硫、



或通式(XI)表示的基团:



通式(IX)及通式(XI)中, R^7 及 R^8 相同或不同, 表示氢、烷基或链烷基。

2、如权利要求1所述的定量方法, 其特征在于: 在该水溶性介质中存在能够将氧化型抗坏血酸还原为还原型抗坏血酸的还原剂。

3、如权利要求1所述的定量方法, 其特征在于: 在利用能够将氧化型抗坏血酸还原为还原型抗坏血酸的还原剂还原该试样中的氧化型抗坏血酸之后, 使还原剂的还原能力丧失的化合物存在的情况下进行反应。

4、如权利要求1、2或3所述的定量方法, 其特征在于: 色素的定量通过测定由色素着色的反应液的吸光度进行。

5、如权利要求1所述的定量方法, 其特征在于: 色源体选自10-N-羧甲基氨甲酰基-3, 7-双(二甲氨基)-10 H-吩噻嗪—CCAP、10-N-甲基氨甲酰基-3, 7-双(二甲氨基)-10 H-吩噻嗪—MCDP、N-(羧基甲基氨基羧基)-4, 4'-双(二甲氨基)二苯基胺钠盐—DA-64、4, 4'-双(二甲基氨基)二苯基胺及双[3-双(4-氯苯基)甲基-4-二甲基氨基苯基]胺—BCMA。

6、如权利要求2或3所述的定量方法, 其特征在于: 还原剂为从含有SH基团的化合物、膦类、二膦类、亚硫酸盐、连二亚硫酸盐、二价铁盐及硼化氢盐中选择的一种。

7、如权利要求6所述的定量方法, 其特征在于: 还原剂为二硫苏糖

醇。

8、如权利要求3所述的定量方法，其特征在于：可使还原剂还原能力丧失的化合物为SH试剂。

9、如权利要求8所述的定量方法，其特征在于：SH试剂为N-乙基马来酰亚胺。

10、如权利要求3所述的定量方法，其特征在于：还原剂为二硫苏糖醇，可使还原剂还原能力丧失的化合物为N-乙基马来酰亚胺。

11、抗坏血酸定量用试剂，其特征在于：其中含有对由还原型抗坏血酸和氧气生成氧化型抗坏血酸和过氧化氢的反应进行催化的抗坏血酸氧化酶、权利要求1记载的通式(I)或通式(II)表示的色源体和过氧化物酶。

12、如权利要求11所述的抗坏血酸定量用试剂，其特征在于：其中还含有能够将氧化型抗坏血酸还原为还原型抗坏血酸的还原剂。

13、如权利要求12所述的抗坏血酸定量用试剂，其特征在于：其中还含有使该还原剂的还原能力丧失的化合物。

14、如权利要求11所述的抗坏血酸定量用试剂，其特征在于：色源体选自10-N-羧甲基基甲酰氨-3,7-双(二甲氨基)-10H-吩噻嗪—CCAP、10-N-甲基氨甲酰基-3,7-双(二甲氨基)-10H-吩噻嗪—MCDP、N-(羧基甲基氨基羧基)-4,4'-双(二甲氨基)二苯基胺钠盐—DA-64、4,4'-双(二甲基氨基)二苯基胺及双[3-双(4-氯苯基)甲基-4-二甲基氨基苯基]胺—BCMA。

15、如权利要求12或13所述的抗坏血酸定量用试剂，其特征在于：还原剂为二硫苏糖醇。

16、如权利要求13所述的抗坏血酸定量用试剂，其特征在于：还原剂为二硫苏糖醇，可使还原剂还原能力丧失的化合物为N-乙基马来酰亚胺。

17、还原型抗坏血酸定量用试剂盒，其特征在于：这种还原型抗坏血酸定量用试剂盒由ASOD及过氧化物酶组成的试剂和色源体组成的试剂构成。

18、抗坏血酸定量用试剂盒，其特征在于：由色源体与还原剂组成的试剂和 ASOD 及过氧化物酶组成的试剂构成。

19、抗坏血酸定量用试剂盒，其特征在于：由色源体与还原剂组成的试剂和 ASOD、过氧化物酶及能够使还原剂的还原能力丧失的化合物组成的试剂构成。

20、如权利要求 17、18 或 19 所述的抗坏血酸定量用试剂盒，其特征在于：色源体选自 10-N-羧甲基基甲酰氨-3,7-双(二甲氨基)-10 H-吩噻嗪—CCAP、10-N-甲基氨甲酰基-3,7-双(二甲氨基)-10 H-吩噻嗪—MCDP、N-(羧基甲基氨基羧基)-4,4'-双(二甲氨基)二苯基胺钠盐—DA-64、4,4'-双(二甲基氨基)二苯基胺及双[3-双(4-氯苯基)甲基-4-二甲基氨基苯基]胺—BCMA。

21、如权利要求 18 或 19 所述的抗坏血酸定量用试剂盒，其特征在于：还原剂为二硫苏糖醇。

22、如权利要求 19 所述的抗坏血酸定量用试剂盒，其特征在于：还原剂为二硫苏糖醇，可使还原剂还原能力丧失的化合物为 N-乙基马来酰亚胺。

抗坏血酸的定量方法及定量用试剂

本发明涉及一种抗坏血酸的定量方法、定量用试剂及定量用试剂盒。

抗坏血酸是一种重要的维生素，通常也被称为维生素C，当生物体内不足时会引起坏血症等。并且，近年来抗坏血酸和生物老化的关系受到了关注。因此抗坏血酸的定量非常重要。

目前作为定量抗坏血酸的方法，联氨法等化学测定方法、高效液相色谱法等仪器分析方法是众所周知的，但它们存在操作繁琐、定量时需要很长时间等问题。

近年发现了用于催化在氧气存在下氧化还原型抗坏血酸而生成氧化型抗坏血酸和过氧化氢的反应的抗坏血酸氧化酶（以下本酶称为ASOD）。已知，试样中的抗坏血酸能够通过测定由该酶反应消耗的氧气量或生成的过氧化氢量而定量。[JP-A-209770/94、JP-A-23971/96(EP-A-682116)]。

JP-A-209770/94作为过氧化氢的具体的定量法，公开了化学测定方法，而没有公开使用过氧化物酶的方法。JP-A-23971/96(EP-A-682116)作为过氧化氢的具体的测定方法，公开了在过氧化物酶存在下，使过氧化氢和苯酚等氢给予体或トリンダ-试剂及4-氨基安替比林等偶合物等形成的色源体反应而生成色素，测定由生成色素着色的反应液吸光度的方法。该方法是在过氧化氢生成反应结束，还原型抗坏血酸被完全地转换为氧化型抗坏血酸之后，对生成的过氧化氢进行定量的方法。

一般地说，在抗坏血酸或二硫苏糖醇等还原性物质存在下，使用过氧化物酶进行的色素生成反应难于发生，这是公知的。因此，在利用ASOD完全氧化试样中的还原型抗坏血酸、生成过氧化氢结束后，需要进行色素生成反应。在该方法中，虽然利用酶反应，但需要把化学性不稳定的过氧化氢储存在反应液中一次。

由于在生物体试样中存在着尿酸、过氧化物酶、胆红素、血红蛋白等

还原性物质，生成的过氧化氢被还原性物质消耗，所以通过存储过氧化氢的所述方法不能得到具有重现性的正确的数据，操作繁琐，需要长时间测定。

另外，在生物体内存在着还原型抗坏血酸，同时也存在着氧化型抗坏血酸，定量该还原型抗坏血酸和氧化型抗坏血酸总和的总抗坏血酸在临床上很重要。

氧化型抗坏血酸通过二硫苏糖醇等还原剂转化为还原型抗坏血酸后，利用 ASOD、还原型抗坏血酸能够定量总抗坏血酸。但是，在过氧化物酶存在下使生成的过氧化氢和色源体反应而定量生成色素的方法中，由于受色源体共存的还原剂的影响而难于生成色素。为了解决这个问题，需要在过氧化氢定量前从反应液中消除残留在反应液中的还原剂，操作变得复杂。

在试样中成分的分析中，利用将该成分作为底物的氧化酶而生成过氧化氢（下面称为过氧化氢生成反应）、由过氧化氢和色源体生成色素的反应（下面称为色素生成反应）在同一反应体系中进行的方法被公开于 JP-A-29297/82(USP4384042) 及 JP-A-218069/85 中。而关于在同一反应体系中对利用 ASOD 氧化还原型抗坏血酸，使生成的过氧化氢和色源体反应生成色素的反应进行定量的方法，在这些公报中没有任何公开。

正如所述，在色素生成反应中由于在抗坏血酸等还原性物质存在下难于生成色素，所以一般认为在同一反应体系中不可能进行过氧化氢生成反应和色素生成反应。但是令人惊奇的是，发现存在即使在还原性物质存在的情况下，在特定条件下也能不受影响而能够定量的色源体，并完成了本发明。

本发明的目的在于，提供一种也可应用于临床检查的筛选，而且可同时测定多个检测体的更简便的抗坏血酸的定量方法、抗坏血酸定量用试剂以及抗坏血酸定量用试剂盒。

根据本发明，在利用对由还原型抗坏血酸和氧气生成氧化型抗坏血酸和过氧化氢的反应进行催化的抗坏血酸氧化酶（以下将本酶称为 ASOD）、定量试样中的抗坏血酸的方法中，在水溶性介质中，ASOD

存在下,由还原型抗坏血酸和氧气生成氧化型抗坏血酸和过氧化氢的反应和在过氧化物酶存在下使生成的过氧化氢和色源体反应而生成色素的反应在同一反应体系中进行,通过定量生成的色素能够定量抗坏血酸(以下称为定量方法A)。

使能够将氧化型抗坏血酸还原为还原型抗坏血酸的还原剂存在于试样中而适用所述定量方法A,这样能够定量试样中的总抗坏血酸。另外在该方法中,由于通过酶反应而生成的氧化型抗坏血酸再被还原剂还原转化为还原型抗坏血酸,所以氧化和还原反复进行。因此能够容易地定量比较低的浓度的总抗坏血酸(以下称为定量方法B)。

对于利用还原剂还原试样中的氧化型抗坏血酸之后,使残留还原剂的还原能力丧失的试样,通过适用所述定量方法A,能够定量试样中的总抗坏血酸(以下称为定量方法C)。

根据本发明,提供一种ASOD、色源体及过氧化物酶成分组合而成的抗坏血酸定量用试剂(以下称为定量试剂A)。

提供一种向定量试剂A中添加能够将氧化型抗坏血酸还原为还原型抗坏血酸的还原剂的成分组合而成的抗坏血酸定量用试剂(以下称为定量试剂B)。

而且提供一种向定量试剂B中,添加了能够使还原剂的还原能力丧失的化合物的成分组合而成的抗坏血酸定量用试剂(以下称为定量试剂C)。

在本说明书中,所述定量试剂A、B或C也可以由构成这些试剂的任意2种成分或者2种以上成分构成组合物。

而且根据本发明,提供一种便于对抗坏血酸定量的抗坏血酸定量用试剂盒。

本发明的定量用试剂能够在所谓的同一试剂体系使用,根据试剂的保存稳定性、操作性、试剂的供给形态等能够做成由多试剂组成的试剂盒。试剂盒只要预备从由各单一的成分及任意的2个以上成分组合而构成的组合物中选择而构成必要成分的试剂盒就可以。组合物应该避免不理想的组合、例如能够使还原剂和还原能力丧失的化合物组合等。试剂盒例示如

下。

对定量试剂 A，可以做成成分由 ASOD 及过氧化物酶组成的试剂和由色源体组成的试剂构成的试剂盒（以下称为试剂盒 A）。

对定量试剂 B，可以做成由色源体及还原剂组成的试剂和 ASOD 及过氧化物酶组成的试剂构成的试剂盒（以下称为试剂盒 B）。

对定量试剂 C 的成分，可以做成由色源体及还原剂组成的试剂和能够使 ASOD、过氧化物酶及还原剂的还原能力丧失的化合物组成的试剂构成的试剂盒（以下称为试剂盒 C）。

构成定量用试剂及其试剂盒的各试剂也可以是干燥品，为了省去试剂的配制也能够预先做成添加有水性介质的液态试剂。

对于所述任意一个定量试剂或试剂盒中的试剂，也可以根据需要适当添加缓冲剂、酶活化剂、防腐剂、稳定剂及表面活性剂等。另外定量时能够使这些成分存在于反应液中。

下面对于本发明的还原型抗坏血酸的具体定量方法进行叙述。

在定量方法 A 中，把含有还原型抗坏血酸的试样、ASOD、色源体及过氧化物酶加入水性介质例如缓冲溶液中，在 20℃ ~ 50℃ 下、使混合物反应 1 ~ 15 分钟。根据生成的色素测定着色的反应液的吸光度的变化，能够从用含有预先已知浓度的还原型抗坏血酸溶液做成的校正曲线中求得抗坏血酸的量。

ASOD 以氧气为底物，而由于通常氧气存在于水性介质中，所以氧气不需要特别供给。但是在反应前，最好是振荡或搅拌含有还原型抗坏血酸、色源体、ASOD 及过氧化物酶等的反应液。

在定量方法 B 中，可向含有抗坏血酸的试样中加入能够将氧化型抗坏血酸还原成还原型抗坏血酸的还原剂。然后对反应混合物实行定量方法 A，这样能够定量试样中的还原型及氧化型抗坏血酸的总量。

更简便的是，在实施该方法时，向含有抗坏血酸的试样中加入定量试剂 B 或试剂盒 B，使混合物在水性介质中 20℃ ~ 50℃ 下、反应 3 ~ 30 分钟。测定由生成的色素着色的反应液的吸光度的变化，能够从预先做成

的校正曲线中更简便地求得抗坏血酸的量。

在定量方法 B 中, 反应中氧化型抗坏血酸被还原剂还原成还原型抗坏血酸, 然后通过酶反应转化为氧化型抗坏血酸。因此氧化反应和还原反应反复进行, 能够更高灵敏度地定量抗坏血酸。利用该方法, 能够定量低抗坏血酸含有量的试样中的总抗坏血酸的量。

定量方法 C, 在含有抗坏血酸的试样中加入能够将氧化型抗坏血酸还原成还原型抗坏血酸的还原剂, 使其在 20 ~ 50 ℃、反应 1 ~ 15 分钟, 将氧化型抗坏血酸还原成还原型抗坏血酸。然后加入能够使还原剂还原能力丧失的化合物, 在 20 ~ 50 ℃下、反应 1 ~ 15 分钟, 使残留的还原剂还原能力丧失之后, 通过实行定量方法 A, 能够定量试样中的还原型及氧化型抗坏血酸的总量。

在实行该定量方法时, 使还原剂还原能力丧失的反应能够和定量方法 A 的方法的还原型抗坏血酸的定量反应在同一反应体系中进行。也就是将试剂盒 C 的色源体及还原剂组成的试剂加入含有抗坏血酸的试样中, 将氧化型抗坏血酸还原成还原型抗坏血酸, 然后加入试剂盒 C 中其他的试剂使酶反应进行, 通过测定反应液的吸光度变化, 能够定量总抗坏血酸。

由显色反应产生的色素的定量通过利用市售分光光度计、在 400 ~ 750nm 的波长、优选在使用的色源体的极大吸光波长下将试剂空白作为对照测定吸光度的变化、通常测定吸光度的增加而进行。利用含有已知浓度的还原型抗坏血酸溶液, 使其进行和所述同样的反应, 测定吸光度的变化, 做成校正曲线。未知量的还原型抗坏血酸或还原型抗坏血酸和氧化型抗坏血酸的总量能够利用该校正曲线定量。

反应液中的各成分按如下所示的浓度使用。

色源体配制成和反应液中的还原型抗坏血酸浓度等摩尔浓度以上的浓度, 优选是 1 ~ 10,000 倍浓度, 更优选配制成 10 ~ 1000 倍浓度。通常使用 0.01 ~ 100mM 的浓度, 优选在 0.1 ~ 10mM 的浓度下使用。

抗坏血酸氧化酶 (ASOD) 及过氧化物酶分别为 0.1 ~ 100U/ml、优选在 0.2 ~ 50U/ml 的浓度下使用。

还原剂使用和氧化型抗坏血酸浓度等摩尔浓度以上的浓度, 优选在

1 ~ 1,000 倍浓度, 更优选在 10 ~ 100 倍浓度下使用, 通常在 0.01 ~ 100mM, 优选在 0.1 ~ 10mM 的浓度下使用。

缓冲剂在 1 ~ 2000mM 优选在 5 ~ 1000mM 浓度下使用。缓冲溶液的 pH 由酶及各试剂的稳定性及反应条件等决定, pH 2 ~ 10, 优选 pH 3 ~ 9。

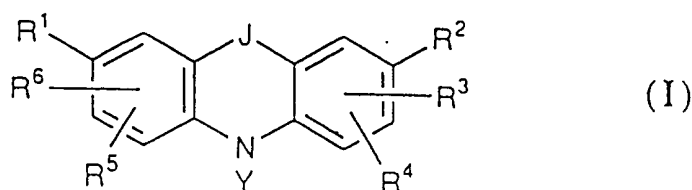
可使还原剂的还原能力丧失的化合物为用于还原氧化型抗坏血酸的还原剂的浓度的 1 ~ 10 倍、优选 2 ~ 5 倍的浓度下使用。

构成这些定量用试剂及这些试剂盒的各试剂中的各成分的含量或浓度能够根据各成分构成及使用方法进行变化, 为了由各成分配制反应液, 在向水性介质添加的时刻或其自身作为反应液配制的时刻按形成所述的优选浓度调节。

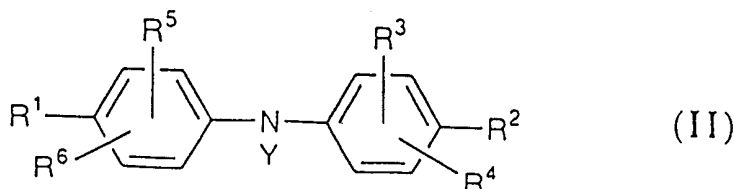
试样中的氧化型抗坏血酸量可从还原型及氧化型抗坏血酸总量中减去还原型抗坏血酸量求得。

在本发明中使用的色源体只要是在过氧化氢的定量反应中难于受还原物质影响的色源体, 都可以使用, 而作为期望的化合物可以例示如下述通式(I) 或通式 (II) 所示的化合物。

通式(I)



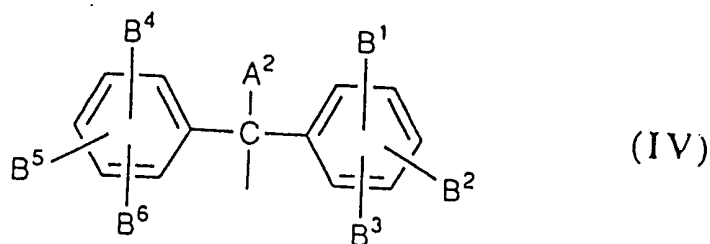
通式 (II)



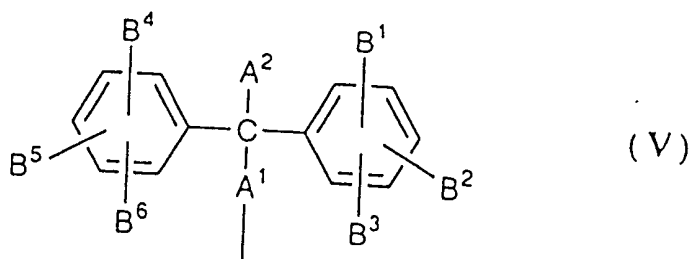
{通式(I) 及通式 (II) 中, Y 表示氢原子或通式(III)}



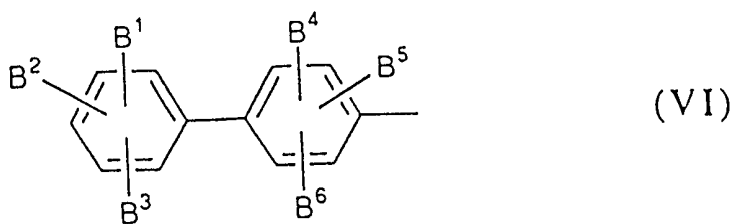
(式中Z表示氧或硫、X表示氢、烷基、链烯基、芳基、单取代氨基或非取代氨基。), R^1 表示羟基、单或二取代氨基或非取代氨基, R^2 表示氢、羟基、烷基、烷氧基、芳基、链烯基、单或二取代氨基或非取代氨基, R^3 、 R^4 、 R^5 及 R^6 相同或不同, 表示由氢、烷基、链烯基、烷酰基、芳酰基、芳基、卤素、硝基、磺基、羧基、羟基、烷氧基、通式(IV)、



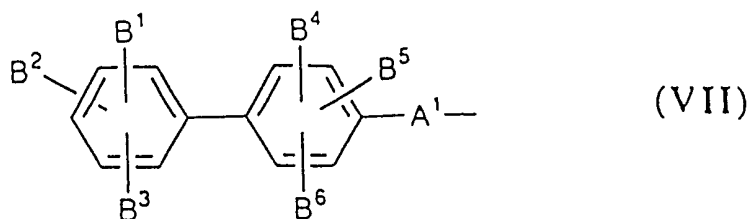
通式(V)、



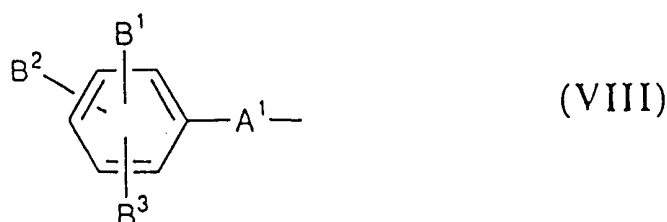
通式(VI)、



通式(VII)、



通式(VIII) 表示的基团



[通式(IV) ~ (VIII) 中, A^1 表示亚烷基, A^2 表示氢、羟基、烷基、烷氧基、芳基、链烯基、脂环式烷基、单或二取代氨基或非取代氨基, B^1 、 B^2 、 B^3 、 B^4 、 B^5 及 B^6 相同或不同, 表示氢、烷基、链烯基、烷酰基、芳酰基、芳基、卤素、硝基、磺基、羧基、羟基、烷氧基或羟基取代烷基], 或者, R^3 和 R^4 或 R^5 、 R^6 也可以一体形成亚链烯基, J 表示由氧、硫、通式(IX)



或通式(XI) 表示的基团



[通式(IX) 及通式(XI) 中, R^7 及 R^8 相同或不同, 表示氢、烷基或链烯基] }。

在上述各基团的定义中, 烷基及烷氧基、羟基取代的烷基上的烷基部分包括直链或支链 1 ~ 6 个碳的烷基、例如甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、2 - 戊基、3 - 戊基、异戊基、己基等。羟基取代烷基的羟基取代数表示 1 ~ 2 个。

烷酰基包括 1 ~ 6 个碳的烷酰基、例如甲酰基、乙酰基、丙酰基、丁酰基、异丁酰基、戊酰基、异戊酰基、三甲基乙酰基等。

脂环式烷基包括 3 ~ 8 个碳的脂环式烷基、例如环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基等。链烯基包括直链或支链状 2 ~ 6 个碳

的链烯基、例如乙烯基、丙烯基、丁烯基、戊烯基、己烯基等。芳基及芳酰基上的芳基部分的例子包括苯基、萘基等。

卤素表示氟、氯、溴、碘等各原子。

亚烷基包含 1 ~ 6 个碳的亚烷基、例如亚甲基、亚乙基、甲基亚甲基、亚丙基、甲基亚乙基、乙基亚甲基、亚丁基、1 - 甲基亚丙基、2 - 甲基亚丙基、乙基亚乙基、丙基亚甲基、亚戊基、甲基亚丁基、乙基亚丁基、丁基亚甲基、亚己基等。

亚链烯基包括 3 ~ 4 个碳的亚链烯基、例如 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$ 等。

R^1 、 R^2 及 A^2 定义中的单或二取代氨基的取代基的例子包含取代或非取代烷基、芳基、脂环式烷基、烷酰基、芳酰基、链烯基、烷氧基羰基、烷氧基、烷氧基磺酰基、氨基甲酰基等。

烷基、烷酰基、烷氧基、芳基、芳酰基、脂环式烷基及链烯基与前述定义相同。烷氧基羰基及烷氧基磺酰基的烷基部分与前述的烷基定义相同。

取代烷基具有相同或不同的 1 ~ 3 个取代基，该取代基的例子包含羟基、磺基、芳基、烷酰基、芳酰基等。

芳基、烷酰、芳酰基与前述定义相同。

X 定义中的单取代氨基的取代基的例子包含脂环式烷基、取代或非取代烷基、取代或非取代芳基等。脂环式烷基、烷基、芳基与前述定义相同。

取代烷基具有相同或不同的 1 ~ 2 个取代基，该取代基的例子包含烷氧基羰基、烷氧基羰基氨基、烷氧基羰基氨基苯基、烷氧基羰基氨基烷基苯基等。该取代基上的烷氧基的烷基部分与前述定义相同，烷氧基羰基氨基烷基苯基的烷基部分和所述的亚烷基定义相同。

取代芳基具有相同或不同的 1 ~ 2 个取代基，该取代基的例子包含卤素、氨基、磺基、烷基、烷氧基、烷酰基、烷氧基羰基、烷氧基羰基氨基、烷氧基羰基氨基烷基等。烷基、烷氧基、烷酰基、烷氧基羰基、烷氧基羰基氨基、烷氧基羰基氨基烷基及卤素与前述定义相同。

通式 (I) 及通式 (II) 表示的化合物的具体例包含在例如 JP-

A-29297/82 (USP4384042)、JP-A-218069/85 及 JP-A-128799/89、JP-A-145352/81(USP4851353)、JP-A-182361/84(USP4916058) 中记载的化合物。

通式(I)及通式(II)表示的化合物中特别优选的化合物通式(I)所含的化合物、例如10-N-羧基甲基氨基甲酰-3,7-双(二甲氨基)-10H-吩噻嗪(下面简称CCAP)、10-N-甲基氨基甲酰-3,7-双(二甲氨基)-10H-吩噻嗪(下面简称MCDP)等、通式(II)所含的化合物例如N-(羧基甲基氨基羧基)-4,4'-双(二甲氨基)二苯基胺钠盐(下面简称DA-64)、4,4'-双(二甲氨基)二苯基胺、双[3-双(4-氯苯基)甲基-4-二甲基氨基苯基]胺(下面简称BCMA)等。这些色源体可通过JP-A-57-29297(USP4384042)记载的方法合成。

ASOD 可以使用例如正青霉(*Eupenicillium*)属(JP-A-23971/96号公告)、木霉(*Trichoderma*)属或被孢霉(*Mortierella*)属(JP-A-209770/94号公告)、侧耳(*Pleurotus*)属[生物化学杂志(J.Biol.Chem.), 271,3105(1996)]等微生物而来的抗坏血酸氧化酶、植物而来或基因重组菌而来的酶。另外可得到市售品(例如天野制药)(株)制]。

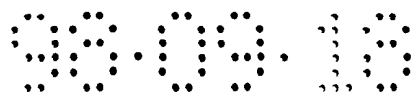
过氧化物酶能够从微生物、动物、植物中提取而使用,也能够利用市售品。

可将氧化型抗坏血酸还原成还原型抗坏血酸的还原剂包括带SH基团的化合物、膦类、二膦类、亚硫酸盐、连二亚硫酸盐、二价铁盐、硼氢盐等。

含有SH基团的化合物包含例如N-乙酰半胱氨酸、还原型半胱氨酸、还原型谷胱甘肽等氨基酸或肽类、二硫苏糖醇(DTT)、二硫赤藓糖醇、巯基乙醇、硫甘油等醇类、巯基乙酸等羧酸类、硫葡萄糖等糖类、溴化-2-氨基乙基异硫代糖醛酸等硫代糖醛酸(thiouronium)鎓盐。

膦类包含取代或非取代的膦。非取代的膦指 PH_3 (磷化氢)。

取代的膦具有相同或不同的1-3个取代基,该取代基的例子包含取



21

代或非取代烷基、取代或非取代芳基、取代或非取代芳香族杂环基、取代或非取代氨基、取代或非取代氨基甲酰基、取代或非取代烷氧基、取代或非取代烷酰基、取代或非取代芳酰基、取代或非取代磺基等。

将 1 取代的物质称为伯膦类、2 取代的物质称为仲膦类、3 取代的物质称为叔膦类。

二膦类的例子包含取代或非取代二膦，非取代二膦指 P_2H_4 (二膦)。

取代二膦具有相同或不同的 1 - 4 个取代基，该取代基的例子包含取代或非取代烷基、取代或非取代芳基、取代或非取代芳香族杂环基、取代或非取代氨基、取代或非取代氨基甲酰基、取代或非取代烷氧基、取代或非取代烷酰基、取代或非取代芳酰基、取代或非取代磺基等。

作为膦类及二膦取代基的取代基的取代或非取代烷基及取代或非取代烷氧基以及取代或非取代烷酰基的烷基部分以及取代或非取代芳基及芳酰基的芳基部分和前述烷基及芳基意义相同。

作为膦类及二膦类取代基的取代或非取代芳香族杂环基的芳香族杂环基的例子包含吡啶基、嘧啶基、1,5-二氮杂萘基、呋喃基、噻吩基、吡唑基、咪唑基、苯并呋喃基、二苯并呋喃基等。

取代烷基具有相同或不同的 1 - 3 个取代基，该取代基的例子包含芳基、芳香族杂环基、烷氧基、烷酰基、芳酰基、氨基、羟基、羧基、磺基、二氧磷基、氰基、卤素等。芳基、芳香族杂环基、烷氧基、烷酰基、芳酰基及卤素分别表示和前述相同的意义。

取代芳基具有相同或不同的 1 - 5 个取代基，该取代基的例子包含烷基、烷氧基、烷酰基、芳酰基、羧基、烷氧基羰基、氰基、氨基、磺基、二氧磷基、卤素等。烷基、烷氧基、烷酰基、芳酰基、烷氧基羰基及卤素分别表示和所述相同的意义。取代芳香族杂环基具有相同或不同的 1 - 3 个取代基，该取代基包含和所述的取代芳基相同的取代基。

取代氨基或取代氨基甲酰基具有相同或不同的 1 - 2 个取代基，该取代基的例子包含和所述相同的取代或非取代烷基、取代或非取代芳基及取代或非取代芳香族杂环基、烷酰氨基、芳酰基、烷氧基羰基等。

取代烷氧基具有相同或不同的 1 - 2 个取代基，该取代基的例子含有

氨基、羟基、磺基、二氧磷基、氟基、上述的卤素等。

取代磺基的取代基的例子包含和上述相同的取代或非取代烷基、取代或非取代芳基、取代或非取代芳香族杂环基。

伯磷类的例子含有甲基磷、乙基磷、丙基磷、异丁基磷、苯基磷、2-萘基磷、2-苯并呋喃基磷、2-磷乙基胺、4-(磷甲基)咪唑、1, 2, 4-丁烷三基三(磷)、(苯磺酰基)磷、氧甲酰基磷等。

仲磷类的例子包含二甲基磷、二乙基磷、二异丙基磷、二异戊基磷、二苯基磷、3, 3'-磷二基二丙酸、4, 4'-磷二基二苯甲酸等。

叔磷类的例子包含三甲基磷、三乙基磷、三正丁基磷、三正己基磷、三苯基磷、甲基二苯基磷、二甲基苯基磷、磷三基三二甲基胺、磷三基三二乙基胺、三(2-甲基苯基)磷、三(3-甲基苯基)磷、三(4-甲基苯基)磷、三(4-甲氧基苯基)磷、磷三基三醋酸、3, 3', 3''-磷三基三丙酸、4, 4', 4''-磷三基三苯甲酸、三(羟甲基)磷、2, 2', 2''-磷三基三丙腈、乙基(苯)丙基磷、乙酰二乙基磷等。

亚硫酸盐、连二亚硫酸盐的盐含有锂、钾、钠等碱金属盐、镁、钙等碱土金属盐等。

二价铁盐含有卤化铁、硫酸亚铁、硝酸亚铁等。卤素表示和前述相同的意义。

在这些还原剂中，优选含有SH基的化合物。

可使还原剂丧失还原能力的化合物，可使用SH试剂、氧化物等，可以由所用的还原剂的种类选择。作为还原剂使用含有SH基的化合物时，优选使用例如氧化剂、巯基形成剂、烷基化剂等的SH试剂，烷基化剂优选。

氧化剂的例子包含5, 5'-二巯基双(2-硝基苯甲酸)、2, 2'-二吡啶基二硫化物、连四硫酸、2, 6-二氯酚基酚、氧化型谷胱甘肽等，巯基形成剂的例子包含p-二价汞基苯甲酸、p-二价汞基苯磺酸等，烷基化试剂的例子包含碘代醋酸、碘乙酰胺。N-乙基马来酰亚胺等。氧化物的例子包含碘酸钾等碘酸盐。

缓冲剂的例子含有乳酸盐、柠檬酸盐、醋酸盐、琥珀酸盐、甘氨酸盐、3, 3'二甲基戊二酸盐、苯二甲酸盐、磷酸盐、三乙醇胺盐、二乙醇胺盐、硼酸盐、巴比土酸盐、三(羟甲基)氨基甲烷盐、咪唑醋酸盐、苹果酸盐、草酸盐、碳酸盐、正常(グッド)缓冲剂等。

酶活化剂的例子含有脱氢醋酸。防腐剂的例子包含叠氮化钠、硫酸链霉素。稳定剂的例子包含乙二胺四乙酸(下面简称为 EDTA)等金属螯合剂, 除此而外酶稳定剂的例子包含可溶性淀粉等多糖类及其衍生物、白蛋白、球蛋白等蛋白质、聚乙二醇等水溶性高分子化合物。表面活性剂的例子包含トリトン X - 100 等。

作为水性介质, 例如可包括缓冲溶液、生理食盐水、蒸馏水等含水的液体, 缓冲溶液优选。

上述所示的化合物或酶登载在例如东京化成(株)、(株)同仁化学研究所、大东化学(株)、和光纯药工业(株)、盛进(株)、ナカライ(株)、Aldrich、Pierre 等试剂目录上, 能够买到市售品。

下面叙述试验例。

试验例 1 (反应液发色受还原型抗坏血酸的影响)

作为トリンダ-型试剂, N-(2-羟基-3-磺基丙基-3, 5二甲氧基苯胺钠(下面简称 HSDA)和 4-氨基安替比林(下面简称 4-AA)及 N-乙基-N(3-甲基苯)-N'-琥珀酰乙二胺(下面简称 EMSE)和 4-AA 一并作为无色型色源体, 将 CCAP 及 BCMA 用于试验中。

使第 1 表所示浓度的还原型抗坏血酸、含有 6.25U/ml 过氧化物酶及 0.086mM 的上述各色源体的 10.0mM 哌嗪-N, N'-双(2-乙磺酸)(下面简称 PIPE)缓冲溶液(pH6.0)在 37℃ 温育 5 分钟后, 分别添加过氧化氢达到 25μM 使之开始反应。反应达到平衡后, 在各色源体的最大吸收波长测定反应液的吸光度。将反应前后的吸光度的变化示于第 1 表中。

表 1

色源体		还原抗坏血酸 (μM)				
		0	10	19	38	95
HSDA	4-AA	0.152	0.141	0.130	0.117	0.089

表 1 (续)

EMSE	4-AA	0.286	0.266	0.240	0.212	0.160
CCAP		0.804	0.755	0.691	0.624	0.473
BCMA		0.329	0.309	0.281	0.256	0.193

如第 1 表中所示, 利用トリンダ-试剂 EMSE 和 4-AA 及 HSDA 和 4-AA 以及无色型色源体 CCAP 及 BCMA 的任一种的显色反应都由于还原型抗坏血酸的存在而被阻碍。

试验例 2 (反应液发色受二硫苏糖醇的影响)

进行除了利用二硫苏糖醇取代试验例 1 中的还原型抗坏血酸之外, 和试验例 1 同样的试验。将反应前后的吸光度变化示于第 2 表中。

表 2

色源体		二硫苏糖醇浓度(mM)				
		0	1.1	2.2	4.4	8.8
HSDA	4-AA	0.152	0	0	0	0
EMSE	4-AA	0.286	0	0	0	0
CCAP		0.804	0.800	0.802	0.613	0.455
BCMA		0.329	0.343	0.326	0.251	0.186

如第 2 表中所示, 利用トリンダ-试剂 EMSE 和 4-AA 及 HSDA 和 4-AA 以及无色型色源体 CCAP 及 BCMA 任一种的显色反应都由于二硫苏糖醇的存在而被阻碍。

试验例 3

使含有 6.25U/ml 过氧化物酶及 0.086mM 第 3 表所示的各色源体的 10.0mM PIPES 缓冲溶液(pH6.0)在 37℃ 预温育 5 分钟后, 添加过氧化氢达到 15μM 使之开始反应 (反应体系 1)。

另一方面, 使含有 2.76U/ml ASOD(抗坏血酸氧化酶, 天野制药制, Type III)、6.25U/ml 过氧化物酶及 0.086mM 各色源体的 10.0mM PIPES 缓冲溶液(pH6.0)在 37℃ 温育 5 分钟后, 添加还原型抗坏血酸达到

15 μ M 使之开始反应（反应体系 2）

在各个反应体系中，反应开始时及反应达到平衡后，利用各色源体的最大吸收波长测定反应液的吸光度。各个反应体系反应前后的吸光度的变化示于第 3 表中。

表 3

色源体	反应体系	吸光度
H S D A 4 - A A	反应体系 1	0.091
H S D A 4 - A A	反应体系 2	0.0
E M S E 4 - A A	反应体系 1	0.171
E M S E 4 - A A	反应体系 2	0.0
C C A P	反应体系 1	0.487
C C A P	反应体系 2	0.488
B C M A	反应体系 1	0.319
B C M A	反应体系 2	0.315

如第 3 表中所示，将 EMSE 和 4 - AA 及 HSDA 和 4-AA 作为色源体时，几乎不能检测出由 ASOD 进行的酶反应生成的过氧化氢和该色源体的反应所产生的反应液的着色。另一方面，在使用无色型色源体 CCAP 及 BCMA 时，能够很好地观察到由酶反应产生的过氧化氢和该色源体的反应产生的色素的生成。显示由本反应体系可对还原型抗坏血酸定量。

试验例 4

使含有 2.76U/ml 的 ASOD(抗坏血酸氧化酶，天野制药制，Type III)、6.25U/ml 过氧化物酶及 0.086mM CCAP 的 10.0mM PIPES 缓冲溶液(pH6.0)在 37℃ 温育 5 分钟后，添加还原型抗坏血酸达到 7.5 μ M 使之开始反应（DTT 无添加区）。

另一方面，使含有 2.75U/ml ASOD、6.25U/ml 过氧化物酶、0.086mM CCAP 及 2.16mg/dl 二硫苏糖醇的 10.0mM PIPES 缓冲溶液(pH6.0)在 37℃ 温育 5 分钟后，添加抗坏血酸达到 7.5 μ M 使之开始反应（DTT 添加区）

在各个反应体系中，反应开始时及反应达到平衡后，在 660nm 测定

反应液的吸光度。各个反应体系反应前后的吸光度的变化示于第 4 表中。

表 4

抗坏血酸浓度(μM)	吸光度	
	DTT 未添加	DTT 添加
7.5	0.240	1.686

如第 4 表中所示, 由于添加二硫苏糖醇而使本反应的发色程度大幅提高, 所以显示出由本方法可高灵敏度地测定还原型抗坏血酸。

图 1 是显示利用试剂液 A-1 测定时还原型抗坏血酸浓度和吸光度关系的校正曲线。

图 2 是显示利用试剂液 A-2 测定时还原型抗坏血酸浓度和吸光度关系的校正曲线。

图 3 是显示利用试剂液 B-1 测定时还原型抗坏血酸浓度和吸光度关系的校正曲线。

下面通过实施例说明本发明的形态。在实施例中配制下述试剂液以备使用。

*还原型抗坏血酸定量用试剂液

试剂液 A-1

CCAP	0.089mM
磷酸钾缓冲溶液 (pH6.0)	97.4 mM
过氧化物酶	6.5U/ml
ASOD	3.1 U/ml

试剂液 A-2

BCMA	0.125 mM
磷酸钾缓冲溶液 (pH6.0)	97.4 mM
过氧化物酶	6.5U/ml
ASOD	3.1 U/ml

试剂液 A-3

MCDP	0.115mM
磷酸钾缓冲溶液 (pH6.0)	97.4 mM

过氧化物酶	6.5U/ml
-------	---------

ASOD	3.1 U/ml
------	----------

***总抗坏血酸定量用试剂液**

试剂液 B - 1

CCAP	0.089mM
------	---------

磷酸钾缓冲溶液 (pH6.0)	97.4 mM
-------------------	---------

过氧化物酶	6.5U/ml
-------	---------

ASOD	3.1 U/ml
------	----------

二硫苏糖醇	2.16 mM
-------	---------

试剂液 B - 2

BCMA	0.125 mM
------	----------

磷酸钾缓冲溶液 (pH6.0)	97.4 mM
-------------------	---------

过氧化物酶	6.5U/ml
-------	---------

ASOD	3.1 U/ml
------	----------

二硫苏糖醇	2.16 mM
-------	---------

***还原型抗坏血酸定量用试剂液的试剂盒**

试剂液 A-4a 试剂盒 A-4

磷酸钾缓冲溶液 (pH6.0)	9.5mM
-------------------	-------

CCAP	0.115mM
------	---------

试剂液 A-4b

磷酸钾缓冲溶液 (pH6.0)	86.7 mM
-------------------	---------

过氧化物酶	25.0 U/ml
-------	-----------

ASOD	12 U/ml
------	---------

***总抗坏血酸定量用试剂的试剂盒**

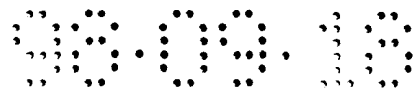
试剂盒 C-1

试剂液 C-1a

磷酸钾缓冲溶液 (pH6.0)	9.5 mM
-------------------	--------

二硫苏糖醇	0.58 mM
-------	---------

CCAP	0.115 mM
------	----------



试剂液 C-1b

磷酸钾缓冲溶液 (pH6.0)	86.7 mM
N- 乙基马来酰亚胺	4.27 mM
过氧化物酶	25.0 U/ml
ASOD	12.0 U/ml

实施例 1

作为标准液配成含有各种浓度的还原型抗坏血酸 10 mM 甘氨酸 - 盐酸缓冲溶液 (pH3.0) 。

使 2.9ml 的试剂液 A - 1 在 37 °C 温育 5 分钟后, 添加抗坏血酸标准液 0.1ml 使其在 37 °C 反应 5 分钟。反应结束后, 在 660nm 测定反应液的吸光度的增加。

图 1 上显示还原型抗坏血酸和吸光度值的关系。横轴上显示添加的还原型抗坏血酸溶液的浓度(mg/dl), 纵轴上显示 660nm 处的吸光度值。由本图可知, 利用被测液的还原型抗坏血酸的含量和吸光度的比例关系能够较好地测定被测液中的还原型抗坏血酸的量, 还原型抗坏血酸可足以测定到 0.2 mg/dl 的程度。

实施例 2

进行除利用试剂液 A - 2 代替试剂液 A - 1 之外其它和实施例 1 同样的反应, 在 755nm 测定反应液吸光度的增加。结果示于图 2 上。

由本图可知, 利用被测液的还原型抗坏血酸的含量和吸光度的比例关系能够较好地测定被测液中的还原型抗坏血酸的量。还原型抗坏血酸足以充分测定到 0.2 mg/dl 的程度。

实施例 3

根据实施例 1 利用试剂液 A - 1、A - 2、A - 3、测定新鲜血清试样 1 ~ 3 中的还原型抗坏血酸的浓度。反应液吸光度使用所用的色源体的极大吸收波长测定。

另外, 作为比较对象利用抗坏血酸定量用试剂盒 (ベーリンガーマン

ハイム社制、F - 试剂盒、L - 抗坏血酸 制品号 409677) 定量该血清试样, 结果示于第 5 表中。

表 5

所用试剂	抗坏血酸浓度(mg/dl)		
	血清试样 1	血清试样 2	血清试样 3
A - 1	0.6 2 0	1.1 1 4	0.2 2 4
A - 2	0.6 2 2	1.1 1 5	0.2 3 6
A - 3	0.6 2 0	1.0 9 1	0.2 2 0
F - 试剂盒	0.6 3 0	1.1 5 0	不能测定

如第 5 表中所示, 本发明定量方法的结果得到了和 F - 试剂盒几乎相同的值。对血清试样 3, 当利用 F - 试剂盒时, 由于吸光度低而不能测定, 但利用本发明的定量方法能够测定。

实施例 4

利用试剂盒 A - 4 及试剂盒 C - 1 定量测定还原型抗坏血酸和氧化型抗坏血酸的总量。

将还原型抗坏血酸和氧化型抗坏血酸如第 6 表中所示溶解于 10 mM 磷酸钾缓冲溶液 (pH6.0) 中, 使其总量为 2.5 mg/dl, 配成试剂液。

在 2.2ml 试剂液 A - 4 a 及试剂液 C - 1 a 中分别添加试剂液 50 μ l, 在 37 $^{\circ}$ C 温育 5 分钟后, 分别添加试剂液 A - 4 b 及试剂液 C - 1 b 0.75ml, 使其在 37 $^{\circ}$ C 反应 5 分钟。反应结束后, 在 660nm 测定反应液的吸光度的增加。结果示于第 6 表中。

表 6

抗坏血酸浓度(mg/dl)		吸光度	
还原型	氧化型	试剂盒 A - 4	试剂盒 C - 1
0.0	2.5 0 0	0.0 0 6	0.2 8 5
0.6 2 5	1.8 7 5	0.0 3 2	0.2 8 4
1.2 5	1.2 5	0.0 5 8	0.2 9 0
1.8 7 5	0.6 2 5	0.0 9 4	0.2 8 6
2.5 0 0	0.0	0.2 2 0	0.2 8 3

如第 6 表中所示, 通过使用试剂盒 A - 4 的方法, 可得到与还原型抗坏血酸成比例的吸光度, 通过使用试剂盒 C - 1 的方法, 测定了对应于还原型抗坏血酸和氧化型抗坏血酸的总量的吸光度。

实施例 5

对实施例 3 的血清试样 1 在室温下放置 6 小时的及该血清试样 1 的试样各 50 μ l, 用试剂盒 C - 1, 用实施例 4 的方法定量。这时, 同样利用 F - 试剂盒对相同的试样分别进行测定。结果示于第 7 表中。

表 7

所用试剂	抗坏血酸浓度(mg/dl)	
	新鲜血液	保存血液
试剂盒 C - 1	0.6 5 2	0.6 0 2
F - 试剂盒	0.6 3 0	不能测定

对于保存血液, 因为利用定量还原型抗坏血酸的 F - 试剂盒不能测定吸光度, 可见还原型抗坏血酸被氧化型抗坏血酸氧化。

即使在由于长时间放置还原型抗坏血酸被氧化、变成氧化型抗坏血酸的试样的情况下, 也得到了和放置前还原型抗坏血酸和氧化型抗坏血酸的总量同样的值。另外, 保存血液试样中的还原型抗坏血酸和氧化型抗坏血酸的总量比新鲜时低被认为是由于在保存过程中还原型抗坏血酸向 2、3 - 二酮古洛糖酸的不可逆分解而致。另外与实施例 3 相比, 本方法得到的新鲜血液的值高是由于将血液中最初含有的氧化型抗坏血酸合并测定所致。

实施例 6

作为标准溶液配成含有各种浓度的还原型抗坏血酸 10mM 的甘氨酸 - 盐酸缓冲溶液 (pH3.0) 。

将 2.9ml 试剂液 B - 1 在 37 $^{\circ}$ C 温育 5 分钟后, 添加还原型抗坏血酸 0.1mM, 使其在 37 $^{\circ}$ C 反应 20 分钟。反应结束后, 在 660nm 测定反应液的吸光度的增加。

图 3 显示还原型抗坏血酸和吸光度值的关系。横轴显示添加的还原型抗坏血酸溶液的浓度(mg/dl), 纵轴显示 660nm 处的吸光度值。由本图可

知，使用还原型抗坏血酸的高灵敏度试剂液 B-1，利用被测液的还原型含量和吸光度的比例关系能够很好地测定被测液中微量的还原型抗坏血酸。还原型抗坏血酸可足以测定到 0.05 mg/dl 的程度。

根据本发明，能够提供在诊断剂领域有用的定量还原型抗坏血酸的方法、定量用试剂、定量用试剂盒。

说明书附图

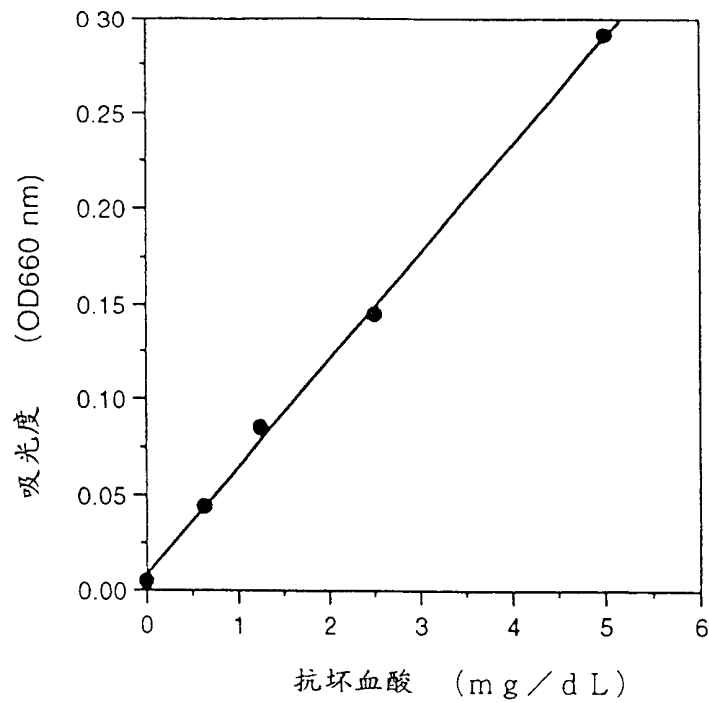


图 1

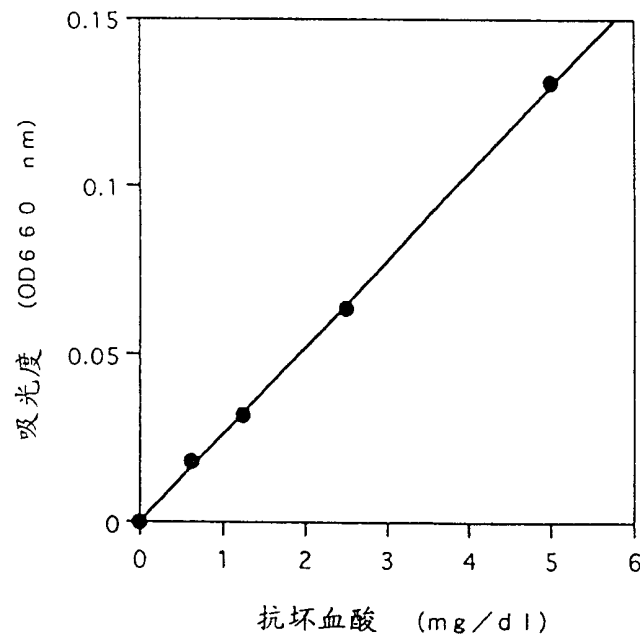


图 2

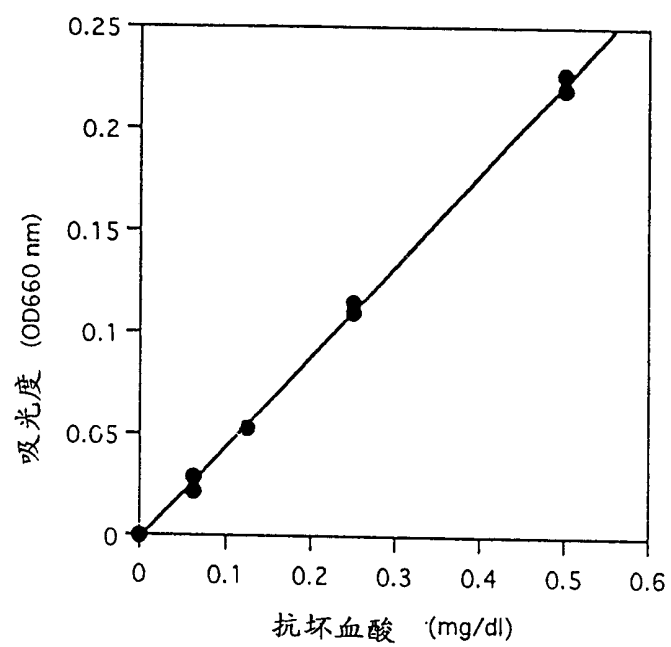


图 3