

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2024 年 6 月 27 日 (27.06.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/131012 A1

(51) 国际专利分类号:
G01N 21/64 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/103529

(22) 国际申请日: 2023 年 6 月 29 日 (29.06.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202211643061.0 2022 年 12 月 20 日 (20.12.2022) CN

(71) 申请人: 浙江大学 (ZHEJIANG UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路 866 号, Zhejiang 310058 (CN)。

(72) 发明人: 王伟 (WANG, Wei); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路 866 号, Zhejiang 310058 (CN)。胡继荣 (HU, Jirong); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路

866 号, Zhejiang 310058 (CN)。鲍茜 (BAO, Qian); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路 866 号, Zhejiang 310058 (CN)。叶飞扬 (YE, Feiyang); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路 866 号, Zhejiang 310058 (CN)。叶庆富 (YE, Qingfu); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路 866 号, Zhejiang 310058 (CN)。

(74) 代理人: 杭州求是专利事务所有限公司 (HANGZHOU QIUSHI PATENT OFFICE CO., LTD.); 中国浙江省杭州市西湖区古墩路 701 号紫金广场 C 座 1505 室, Zhejiang 310030 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ,

(54) Title: METHOD FOR ANALYZING CONTENT AND DISTRIBUTION OF MICROPLASTICS IN MARINE CNIDARIAN

(54) 发明名称: 一种分析海洋刺胞生物中微塑料含量与分布的方法

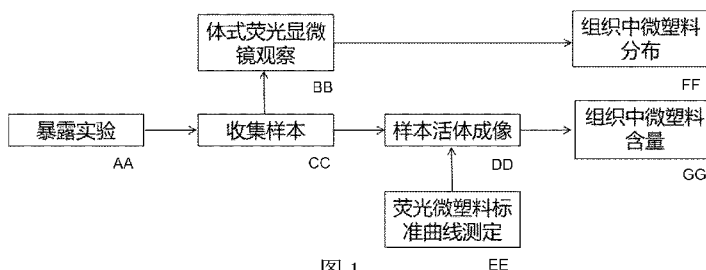


图 1

- AA Exposure experiment
BB Observation based on a stereo fluorescence microscope
CC Sample collection
DD Sample in vivo imaging
EE Fluorescent microplastic standard curve determination
FF Distribution of microplastics in a tissue
GG Content of the microplastics in the tissue

(57) Abstract: A method for analyzing the content and distribution of microplastics in a marine cnidarian, comprising: a marine cnidarian exposure experiment; observation based on a stereo fluorescence microscope; fluorescent microplastic standard curve drawing; and sample fluorescence imaging and microplastic content calculation, etc. The method can accurately locate the distribution of microplastics in a living marine cnidarian and effectively and effectively and accurately quantify the content of microplastics in an organism and a local tissue, and thus has important significance in the monitoring and treatment of novel environmental pollutants.

(57) 摘要: 一种分析海洋刺胞生物中微塑料含量与分布的方法, 包括: 海洋刺胞生物暴露实验; 体式荧光显微镜观察; 荧光微塑料标准曲线绘制; 样本荧光成像与微塑料含量计算等; 本方法能准确定位微塑料在活体海洋刺胞生物体内的分布, 并有效对生物体内和局部组织中的微塑料含量进行准确定量, 对新型环境污染物的监测与治理具有重要意义。

LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN,
MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA,
PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

- (84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚
(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR,
HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO,
PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN,
TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

一种分析海洋刺胞生物中微塑料含量与分布的方法

技术领域

本发明属于环境污染物检测领域，涉及了一种分析海洋刺胞生物尤其是水母活体中微塑料含量（富集）与分布的方法，是一种基于荧光示踪技术的微塑料颗粒定位定量检测方法。

背景技术

由于塑料制品的广泛使用，在物理、化学、生物等因素作用下，塑料制品可以分解成直径小于 5 mm 的微塑料颗粒。这些微塑料颗粒在河流、海洋等水体中广泛存在，被生物体摄入后，表现出多种生物学毒性，对水生生物构成了潜在的威胁。

目前对微塑料在水生生物体内的富集、分布有一定的研究进展，主要集中在使用显微镜对微塑料颗粒计数，从而大致判断微塑料在生物体不同器官和组织分布情况。但是由于微塑料颗粒与其他类似环境颗粒在视野下难以分辨，需要借助傅里叶红外变换光谱仪、拉曼表征等对颗粒进行定性表征，因此增大了微塑料在生物体内定位与定量的工作量与复杂度。且通过计数方式得到的数据存在主观性与取样的误差，无法对微塑料的含量进行准确的定量。此外，现有的其他定量技术需要复杂的预处理过程（如消解生物组织），进而提取出组织内的微塑料颗粒，增大了检测的工作量，因此开发一种无需复杂预处理、基于荧光活体成像的方法，用于研究微塑料在活体内的分布、定量具有重要的环境意义。

发明内容

针对现有技术预处理过程复杂、且无法对水生生物活体内的微塑料分布与

含量进行分析的局限，本发明提供了一种分析海洋刺胞生物中微塑料含量与分布的方法，包括：

暴露实验：选择特定直径的荧光微塑料颗粒加入到人工海水中配置成暴露溶液体系，选择海洋刺胞生物作为受试对象开展暴露实验。

体式荧光显微镜观察：将暴露后的受试对象活体或局部组织转移至体式荧光显微镜下，利用体式荧光显微镜观察微塑料在整只受试对象或局部组织中的分布。

样本荧光成像与微塑料含量计算：将暴露后的受试对象活体或局部组织置于小动物活体成像仪检测室中，采用小动物活体成像仪测定受试对象活体或局部组织中的荧光强度，并根据标准曲线计算相应含量；其中，所述荧光微塑料标准曲线通过如下方法绘制获得：

将盛有不同含量荧光微塑料的溶液滴加到培养皿中，放置于小动物活体成像仪检测室中，设置特定激发波长和发射波长后测定各溶液的荧光强度，以微塑料含量与对应的荧光强度绘制出荧光微塑料标准曲线。

进一步地，受试对象是海洋刺胞生物，为水母或海葵等。

进一步地，所述暴露溶液体系中，人工海水盐度为 20‰-30‰；暴露溶液温度为 18-25℃；微塑料直径为 100-1000 nm。

进一步地，利用培养皿作为容器将暴露后的受试对象活体或局部组织转移至体式荧光显微镜下和小动物活体成像仪检测室中。

优选地，荧光显微镜滤光片为 GFP-B；

进一步地，所述暴露实验具体为：将受试对象置于暴露溶液体系中培养一段时间后，捞出，用人工海水清洗后待检测。

进一步地，所述暴露实验还包括设置空白对照组，用于样本荧光成像与微

塑料含量计算中扣除受试对象本底荧光值，所述空白对照组的海洋刺胞生物在人工海水中培养。

进一步地，使用小动物活体成像仪对受试对象活体进行荧光成像。

进一步地，还包括：将检测后的受试对象冷冻干燥并称量样品干重，结合样品荧光成像得到的微塑料含量计算得到单位质量组织中微塑料的含量。

进一步地，冷冻干燥时间为 48 小时。

本发明具有如下优点：本发明方法直接采用体式荧光显微镜、小动物活体成像仪对海洋刺胞生物进行微塑料检测，无需消解生物组织等处理过程，不仅能准确定位微塑料在活体海洋刺胞生物体内的分布，而且极大地简化了检测过程，并有效对海洋刺胞生物体内的微塑料含量进行准确定量，对新型环境污染物的监测与治理具有重要意义，为研究微塑料在海洋刺胞生物体内的富集能力提供了方法。

附图说明

图 1 为本发明方法的流程图。

图 2 荧光微塑料在水母全身的分布图。

图 3 荧光微塑料在水母口腕和伞体中的分布图。

图 4 荧光微塑料的荧光强度随含量变化的标准曲线图。

图 5 在不同浓度荧光微塑料的海水暴露下水母荧光活体成像图。

图 6 荧光微塑料在水母体内的含量。

具体实施方式

本发明公开了一种分析海洋刺胞生物中微塑料含量与分布的方法，为微塑料健康风险评估奠定基础。该方法的流程如图 1 所示，包括以下步骤：

(1) 海洋刺胞生物暴露实验：选择特定直径的荧光微塑料颗粒加入到人工海水中配置成暴露溶液体系，选择海洋刺胞生物作为受试对象开展暴露实验；

(2) 体式荧光显微镜观察：将暴露后的受试对象转移到培养皿上，再将培养皿置于体式荧光显微镜下，利用体式荧光显微镜观察微塑料在整只海洋刺胞生物活体中的分布。也可以用解剖工具将受试对象分成各组织部位后，依次观察，定位微塑料具体位置；

(3) 样本荧光成像与微塑料含量计算：将暴露后的受试对象转移到培养皿上，将培养皿置于小动物活体成像仪检测室中，采用小动物活体成像仪测定整只海洋刺胞生物活体中荧光强度，并根据荧光微塑料标准曲线计算相应的微塑料含量；同样地，该步骤中，也可以用解剖工具将海洋刺胞生物分成各组织部位后转移到培养皿上，将培养皿置于小动物活体成像仪检测室中，采用小动物活体成像仪测定各组织中的荧光强度，进而根据荧光微塑料标准曲线计算相应的微塑料含量；

其中，荧光微塑料标准曲线绘制方法为：将盛有不同含量荧光微塑料的溶液滴加到培养皿中，放置于小动物活体成像仪检测室中，设置特定激发波长和发射波长（依据选择的荧光标记物设置）后测定各溶液的荧光强度，以微塑料含量与对应的荧光强度绘制出标准曲线；

(4) 样本冻干与微塑料浓度计算：将检测后的样品置于冷冻干燥仪中干燥并称量样品干重，结合步骤（3）的微塑料含量换算得到单位质量组织中微塑料的含量。

在上述步骤中优选地是，所述步骤（1）使用的是荧光标记的微塑料颗粒，直径在 20-1000 nm；

在上述方案中优选的是，所述步骤（1）使用的受试对象是水母，如海月水

母、海蜇等；

以下以海蜇幼体为例对本发明进行详细说明。实施实例只用于对本发明进一步说明，不代表本发明的保护范围，其他人根据本发明做出的非本质的修改和调整，依然属于本发明的保护范围。

实施例

一种分析海洋刺胞生物中微塑料含量与分布的方法，如图 1 所示，包括以下步骤：

(1) 水母暴露实验：以 NBD-CL（激发波长 488 nm，发射波长 518 nm）荧光染料标记的聚苯乙烯微球（PS-MP，直径 1 μm ）作为受试物，加入到人工海水中，配置成暴露溶液。受试动物为健康的海蜇幼体（伞径 2.5 ± 0.5 cm），随机分为暴露组和对照组。暴露组包括 3 个聚苯乙烯微球浓度水平（0.1, 1, 10 mg L^{-1} ），暴露周期为 5 d。其他实验条件如下：温度： $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ，盐度： $25 \pm 1\%$ ，光照周期：12 h 光照，12 h 黑暗交替，每天喂食丰年虾无节幼体。将暴露组活体水母置于盛有暴露溶液的容器，对照组活体水母置于人工海水中培养一段时间后，用不锈钢药匙将水母从玻璃瓶中捞出，用干净的海水清洗水母表面的微塑料，再转移到干净的海水中，以上步骤重复三次。

(2) 体式荧光显微镜观察：水母经荧光微塑料暴露 5 d 后（暴露浓度：10 mg L^{-1} ），使用体式荧光显微镜（Nikon SMZ18，日本）定位微塑料在整只活体水母中的分布。体式荧光显微镜的滤光片为 GFP-B（参数：EX 480/40、DM 505、BA 535/50）。如图 2 所示，可以清晰观察到整只水母活体中荧光微塑料的分布情况，不同组织部位，微塑料富集的分布不同。之后，为了更好地确定微塑料在水母体内的组织分布，用解剖工具将水母分为伞体和口腕，再用体式荧光显微镜观察，结果如图 3 所示。

(3) 荧光微塑料标准曲线绘制：配制不同微塑料含量的梯度荧光微塑料溶液，吸取 1 mL 标准溶液滴到培养皿中，放置在小动物活体成像仪 (IVIS Spectrum 公司，美国) 检测室中，设置特定激发波长和发射波长后测定各溶液的荧光强度，绘制荧光强度随微塑料含量变化的标准曲线；本实施例中荧光微塑料的标准曲线设置微塑料含量为 0, 5, 20, 50, 100, 200 μg ，标准曲线如图 4 所示。

(4) 样本荧光成像与微塑料含量计算：将活体水母转移到培养皿上，在步骤 (3) 的激发和发射波长下，采用小动物活体成像仪测定水母组织中荧光强度，并根据标准曲线计算相应含量；其中暴露组样品的结果要扣除空白对照组的背景值，得到最终结果；图 5 所示为不同浓度荧光微塑料海水暴露下水母的荧光活体成像图。

(5) 样本冻干与微塑料浓度计算：将检测后的样品置于冷冻干燥仪中干燥 48 h 后称重，得到水母组织干重，结合步骤 (4) 的微塑料含量换算得到单位质量组织中荧光微塑料的含量，如图 6 所示。

本发明方法直接采用体式荧光显微镜、小动物活体成像仪对海洋刺胞生物进行微塑料检测，无需消解生物组织等处理过程，不仅能准确定位微塑料在活体海洋刺胞生物体内的分布，而且极大地简化了检测过程，并有效对海洋刺胞生物内的微塑料含量进行准确定量，对新型环境污染物的监测与治理具有重要意义。

权利要求书

1. 一种分析海洋刺胞生物中微塑料含量与分布的方法，其特征在于，所述方法包括：

选择特定直径的荧光微塑料颗粒加入到人工海水中配置成暴露溶液体系，将海洋刺胞生物作为受试对象开展暴露实验；

将暴露后的受试对象活体或局部组织转移至体式荧光显微镜下，利用体式荧光显微镜观察微塑料在整只受试对象或局部组织中的分布；将暴露后的受试对象活体或局部组织置于小动物活体成像仪检测室中，采用小动物活体成像仪测定受试对象活体或局部组织中的荧光强度，并根据荧光微塑料标准曲线计算微塑料含量；

其中，所述荧光微塑料标准曲线通过如下方法绘制获得：

将盛有不同含量荧光微塑料的溶液滴加到培养皿中，放置于小动物活体成像仪检测室中，设置特定激发波长和发射波长后测定各溶液的荧光强度，以微塑料含量与对应的荧光强度绘制出荧光微塑料标准曲线。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述海洋刺胞生物为水母或海葵。

3. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述暴露溶液体系中，人工海水盐度为 20‰-30‰；暴露溶液温度为 18-25℃；微塑料直径为 100-1000 nm。

4. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述暴露实验具体为：将受试对象置于暴露溶液体系中培养一段时间后，捞出，用人工海水清洗后待检测。

5. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述体式荧光显微镜的滤光片为 GFP-B。

6. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，还包括：将检测后的受试对象冷冻干燥并称量样品干重，结合样品荧光成像得到的微塑料含量计算得到单位质量

组织中微塑料的含量。

7. 如权利要求 6 所述的方法，其特征在于，冷冻干燥的时间为 48 小时。

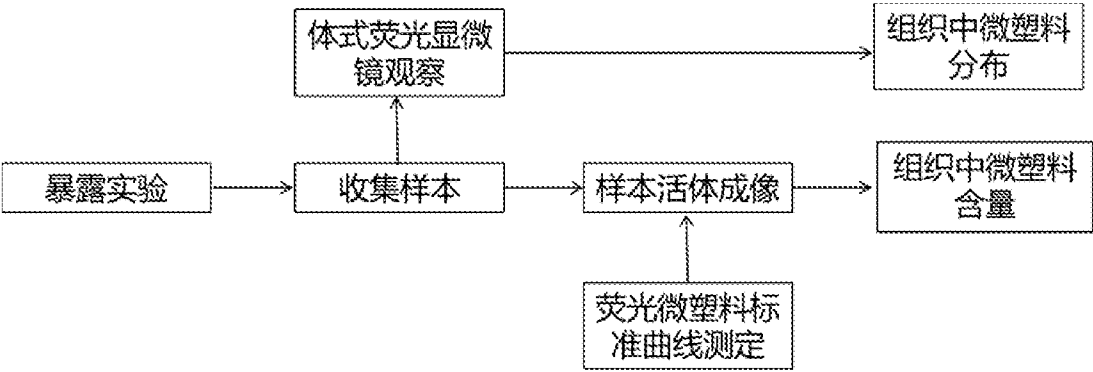


图 1

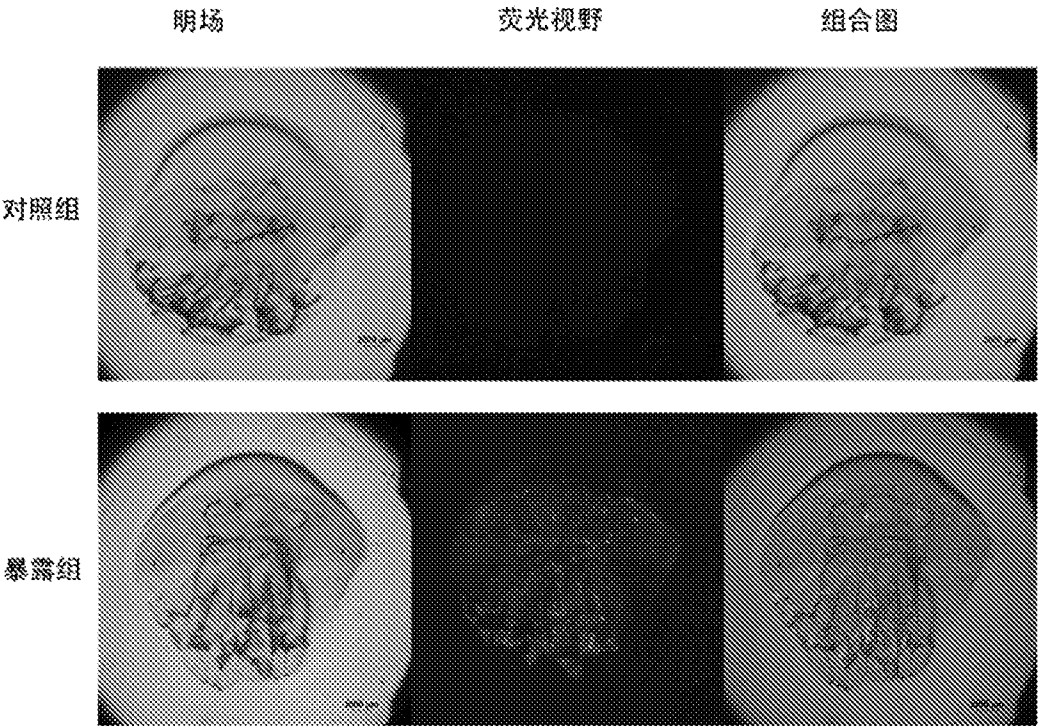


图 2

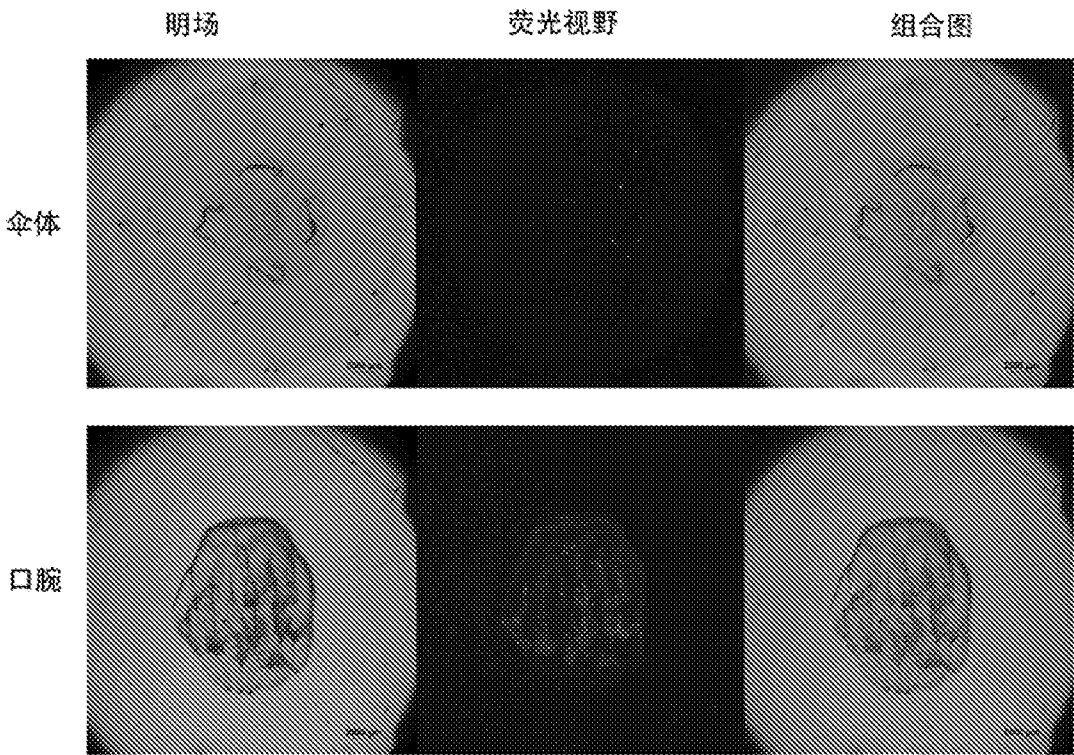


图 3

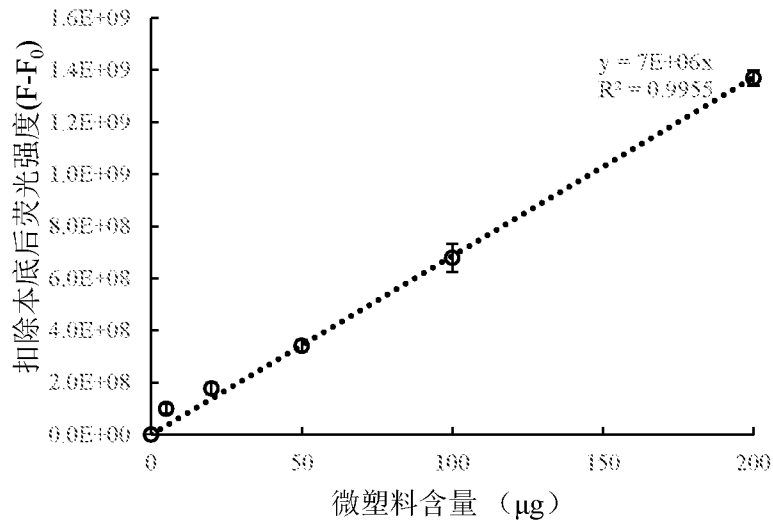


图 4

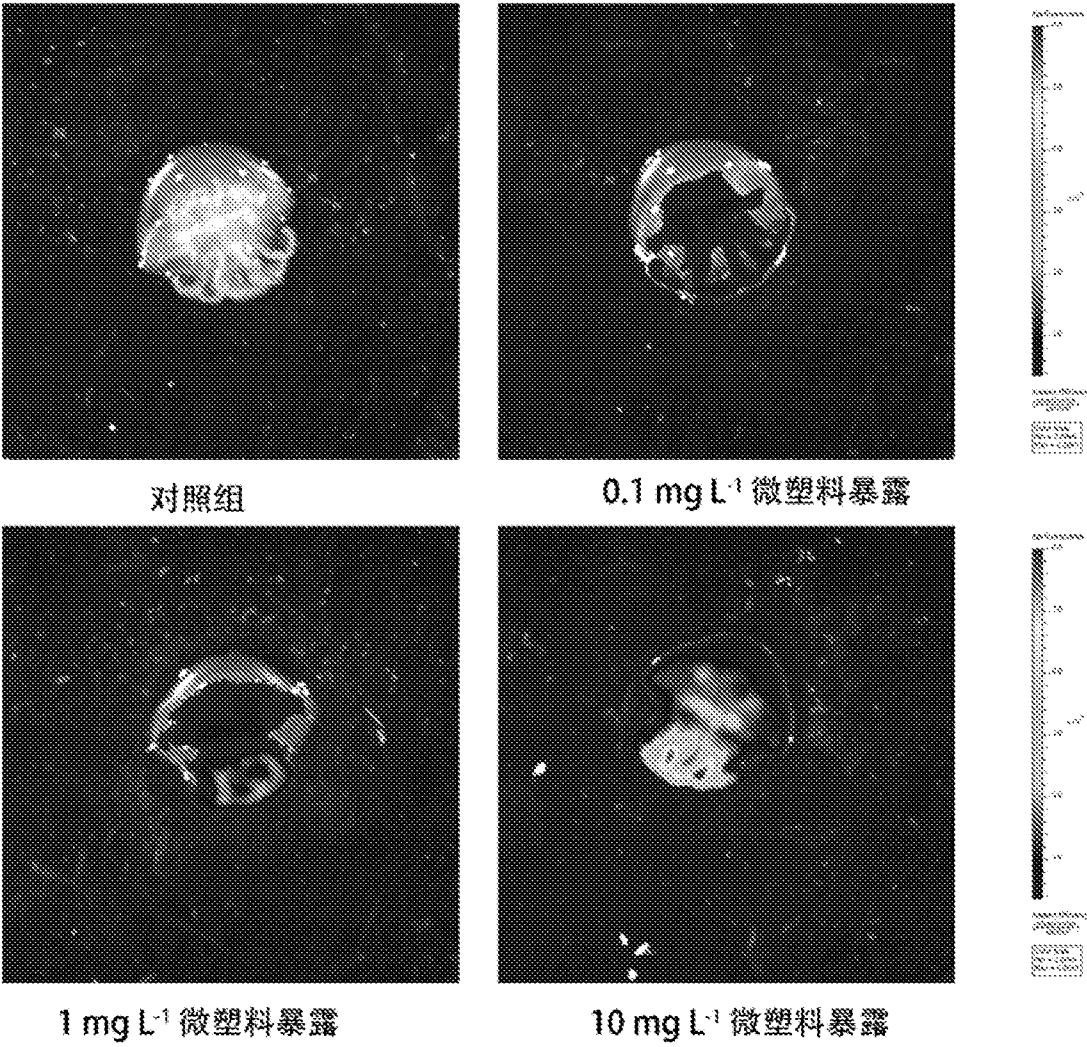


图 5

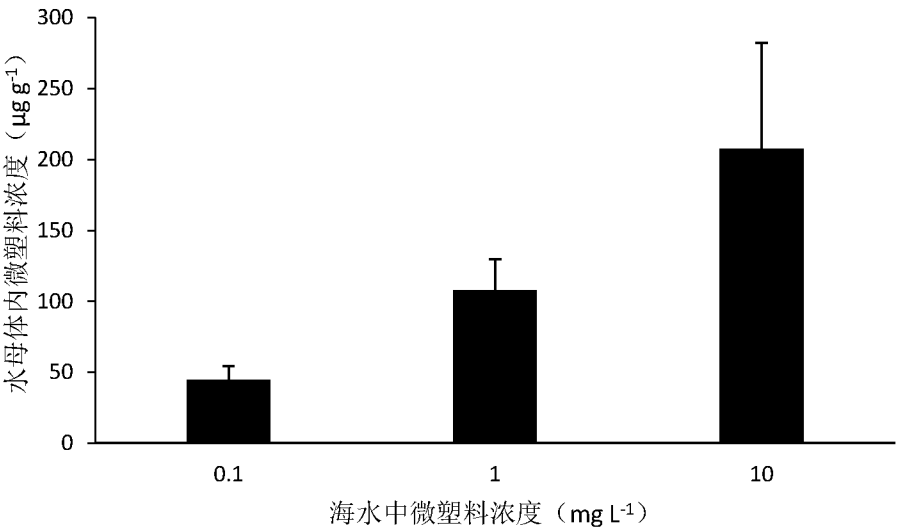


图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/103529

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N21/64(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC:G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNTXT, WPABSC, CJFD, CNKI: 海洋, 微塑料, 含量, 分布, 荧光, 强度, 颗粒, 曲线, 显微镜, marine, sea, microplastic?, content, distribution, fluorescence, intensity, particle?, curve, microscope

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 115753723 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 07 March 2023 (2023-03-07) claims 1-7, and figures 1-6	1-7
Y	CN 115290615 A (HAINAN TROPICAL OCEAN UNIVERSITY) 04 November 2022 (2022-11-04) description, paragraphs [0038]-[0051], and figures 1-2	1-7
Y	CN 103411942 A (GUIZHOU UNIVERSITY) 27 November 2013 (2013-11-27) description, paragraphs [0009]-[0023]	1-7
A	CN 105651748 A (NANJING UNIVERSITY) 08 June 2016 (2016-06-08) entire document	1-7
A	CN 111487096 A (NANJING UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 04 August 2020 (2020-08-04) entire document	1-7
A	CN 115449004 A (MINNAN NORMAL UNIVERSITY) 09 December 2022 (2022-12-09) entire document	1-7



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“D” document cited by the applicant in the international application

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 August 2023

Date of mailing of the international search report

18 August 2023

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District,
Beijing 100088

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/103529

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP H03115958 A (HAMAMATSU PHOTONICS K.K.) 16 May 1991 (1991-05-16) entire document	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/103529

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	115753723	A	07 March 2023	None			
CN	115290615	A	04 November 2022	None			
CN	103411942	A	27 November 2013	None			
CN	105651748	A	08 June 2016	CN	105651748	B	28 August 2018
CN	111487096	A	04 August 2020	None			
CN	115449004	A	09 December 2022	None			
JP	H03115958	A	16 May 1991	JPH	0614921	B2	02 March 1994

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2023/103529

A. 主题的分类

G01N21/64 (2006.01) i

按照国际专利分类 (IPC) 或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献 (标明分类系统和分类号)

IPC: G01N

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库 (数据库的名称, 和使用的检索词 (如使用))

CNTXT, WPABSC, CJFD, CNKI: 海洋, 微塑料, 含量, 分布, 荧光, 强度, 颗粒, 曲线, 显微镜, marine, sea, microplastic?, content, distribution, fluorescence, intensity, particle?, curve, microscope

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 115753723 A (浙江大学) 2023年3月7日 (2023 - 03 - 07) 权利要求第1-7项, 图1-6	1-7
Y	CN 115290615 A (海南热带海洋学院) 2022年11月4日 (2022 - 11 - 04) 说明书第[0038]-[0051]段, 图1-2	1-7
Y	CN 103411942 A (贵州大学) 2013年11月27日 (2013 - 11 - 27) 说明书第[0009]-[0023]段	1-7
A	CN 105651748 A (南京大学) 2016年6月8日 (2016 - 06 - 08) 全文	1-7
A	CN 111487096 A (南京理工大学) 2020年8月4日 (2020 - 08 - 04) 全文	1-7
A	CN 115449004 A (闽南师范大学) 2022年12月9日 (2022 - 12 - 09) 全文	1-7
A	JP H03115958 A (HAMAMATSU PHOTONICS K.K.) 1991年5月16日 (1991 - 05 - 16) 全文	1-7

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“D” 申请人在国际申请中引证的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2023年8月14日

国际检索报告邮寄日期

2023年8月18日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

授权官员

李佳

电话号码 (+86) 010-53962600

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/103529

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	115753723	A	2023年3月7日	无	
CN	115290615	A	2022年11月4日	无	
CN	103411942	A	2013年11月27日	无	
CN	105651748	A	2016年6月8日	CN 105651748	B 2018年8月28日
CN	111487096	A	2020年8月4日	无	
CN	115449004	A	2022年12月9日	无	
JP	H03115958	A	1991年5月16日	JPH 0614921	B2 1994年3月2日