(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 103995103 A
(43)申请公布日 2014.08.20

(21)申请号 201410258017.7
(22)申请日 2014.06.11
(71)申请人 中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所
地址 100080 北京市海淀区中关村南大街12号
(72)发明人 王静 王淼 佘永新 李腾飞 刘广洋 杜欣蔚 于海龙 金芬 邵华 金茂俊 王珊珊
(74)专利代理机构 北京超凡志成知识产权代理事务所（普通合伙）11371
代理人 吴开磊
(51)Int.Cl.
G01N 33/53(2006.01)
G01N 27/48(2006.01)

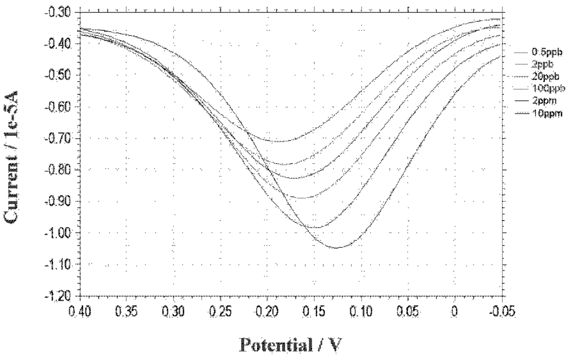
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

基于普鲁士蓝仿生标记检测小分子化合物的方法

(57)摘要

本发明涉及电化学免疫技术领域，是一种基于普鲁士蓝仿生标记检测小分子化合物的方法。包括以下步骤：以一种具有类过氧化氢酶催化活性的普鲁士蓝微粒子标记待测物的类似物作为标记抗原；将磁性四氧化三铁微粒固定抗体，并将其分散在反应液中；形成竞争性免疫反应、电化学检测体系中的氧化电流信号进而对待测物实现定量测量。该检测方法采用普鲁士蓝代替生物酶分子标记小分子抗原，并结合磁性微粒进行竞争性免疫反应，通过电化学检测标记抗原对于过氧化氢和对苯二酚的催化氧化反应产生的电信号，由于其电信号大小与待测小分子浓度呈线性相关，可实现对小分子化合物的高灵敏度定量检测。



CN 103995103 A

1. 基于普鲁士蓝仿生标记检测小分子化合物的方法，其特征在于，包括以下步骤：

a) 以一种具有类过氧化氢酶催化活性的普鲁士蓝微粒子标记待测物的类似物作为标记抗原；

b) 将磁性四氧化三铁微粒固定抗体，并将其分散在反应液中；

c) 在反应液中加入步骤 a 中制得的标记抗原和待测物后，标记抗原与待测物竞争抗体，形成竞争性免疫反应；

d) 通过磁铁分离，将磁性抗体及其吸附的抗原分离至试管底部，吸取上清，在其中加入含有对苯二酚和过氧化氢的溶液，通过差分脉冲伏安法，电化学检测体系中的氧化电流信号进而对待测物实现定量测量。

2. 如权利要求 1 所述的基于普鲁士蓝仿生标记检测小分子化合物的方法，其特征在于：

所述小分子化合物是指分子量在 1000 以下，且不能直接产生免疫原性的有机化合物分子。

3. 如权利要求 1 所述的基于普鲁士蓝仿生标记检测小分子化合物的方法，其特征在于：

所述四氧化三铁微粒和普鲁士蓝微粒子的尺寸是 μm 级或 nm 级的。

4. 如权利要求 1 所述的基于普鲁士蓝仿生标记检测小分子化合物的方法，其特征在于：所述具有类过氧化氢酶催化活性的材料为普鲁士蓝。

5. 如权利要求 1 所述的基于普鲁士蓝仿生标记检测小分子化合物的方法，其特征在于：所述的待测物是有机小分子化合物。

6. 如权利要求 1 所述的基于普鲁士蓝仿生标记检测小分子化合物的方法，其特征在于：在所述电化学检的步骤中，电化学电极为玻碳电极及其经修饰后的电极。

7. 如权利要求 1 所述的基于普鲁士蓝仿生标记检测小分子化合物的方法，其特征在于：所述普鲁士蓝微粒子通过化学方法固定待测物小分子的类似物，形成标记抗原。

8. 如权利要求 1 所述的基于普鲁士蓝仿生标记检测小分子化合物的方法，其特征在于：所述竞争性免疫反应在磷酸缓冲液中发生。

9. 如权利要求 1 所述的基于普鲁士蓝仿生标记检测小分子化合物的方法，其特征在于：所述竞争性免疫反应通过借助磁性微粒以及外加磁场的作用形成。

10. 如权利要求 1 所述的基于普鲁士蓝仿生标记检测小分子化合物的方法，其特征在于：在步骤 d) 中，所述电化学检测体系中的氧化电流信号进而对待测物实现定量测量，具体包括：

通过检测上清中残留的标记抗原对于含有过氧化氢和对苯二酚的溶液的催化氧化反应产生的电信号，实现对于待测小分子的定量电化学检测。

基于普鲁士蓝仿生标记检测小分子化合物的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及电化学免疫技术领域，是一种基于普鲁士蓝仿生标记检测小分子化合物的方法。

背景技术

[0002] 在目前的生物医药检测领域，对于环境污染物、农药、激素、抗生素等小分子的高灵敏度定量免疫检测已成为广大研究人员关注的焦点问题之一。为了实现微量或痕量的小分子化合物的高灵敏度检测，各种基于生物特异性反应，如抗原抗体技术、蛋白配体技术等不同的方法和体系已经被建立。其中，具有典型性的是竞争性免疫检测技术，其利用标记抗原和待测分析物对抗体的竞争，通过检测被抗体吸附的标记抗原可以推断出体系中含有的待测分析物的浓度。但常用的标记技术有放射性标记、辣根过氧化物酶 (HRP) 等酶标记，以及荧光化学探针等光学标记。

[0003] 电化学免疫分析技术是将免疫分析技术与电化学技术结合的一种免疫分析方法，通过将一些易于测定并具有高度敏感性的物质标记到抗原或抗体分子上，并结合抗原与抗体间的特异性结合反应，通过检测标记物的产生或放大的电信号，可以实现对于待测物质的高灵敏度特异性检测。电化学免疫标记的物质一般是生物酶类，如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酯酶、葡萄糖氧化酶等，但这些酶类对于温度、溶剂等外界条件要求严格，难以制备且价格昂贵。

[0004] 普鲁士蓝微粒具有类似过氧化物酶的催化能力，可以催化过氧化氢的分解，通过电化学工作站检测其分解的过氧化氢对还原性物质对苯二酚氧化产生的电流。通过静电作用，可以将普鲁士蓝标记在带氨基的壳聚糖等分子的表面，再通过化学偶联方法将待测小分子与带普鲁士蓝标记的壳聚糖分子偶联，可以制得普鲁士蓝标记的小分子标记抗原。

[0005] 磁性纳米粒子具有比表面积大、易富集等特点，经修饰后可以在其表面标记抗体，制得磁性抗体。通过分散在反应体系中和外加磁场的作用，可以快速富集分离与抗体特异性识别的小分子化合物。因此，建立基于仿生材料标记结合磁性微粒竞争性免疫反应及电化学技术的小分子化合物检测体系，对于环境污染物、农药、激素、抗生素等小分子的高灵敏度定量免疫检测具有重要意义。

发明内容

[0006] 有鉴于此，本发明提供了一种基于普鲁士蓝仿生标记检测小分子化合物的方法检测方法，以实现对于环境污染物、农药、激素、抗生素等小分子的高灵敏度定量免疫检测的目的。

[0007] 为了实现上述发明目的，本发明提供以下技术方案 :基于普鲁士蓝仿生标记检测小分子化合物的方法，其特征在于，包括以下步骤 :

[0008] a) 以一种具有类过氧化氢酶催化活性的普鲁士蓝微粒子标记待测物的类似物作为标记抗原 ;

[0009]　b) 将磁性四氧化三铁微粒固定抗体，并将其分散在反应液中；

[0010]　c) 在反应液中加入步骤 a 中制得的标记抗原和待测物后，标记抗原与待测物竞争抗体，形成竞争性免疫反应；

[0011]　d) 通过磁铁分离，将磁性抗体及其吸附的抗原分离至试管底部，吸取上清，在其中加入含有对苯二酚和过氧化氢的溶液，通过差分脉冲伏安法，电化学检测体系中的氧化电流信号进而对待测物实现定量测量。

[0012]　可选的，所述小分子化合物是指分子量在 1000 以下，且不能直接产生免疫原性的有机化合物分子。

[0013]　可选的，所述四氧化三铁微粒和普鲁士蓝微粒子的尺寸是 μm 级或 nm 级的。

[0014]　可选的，所述具有类过氧化氢酶催化活性的材料为普鲁士蓝。

[0015]　可选的，所述的待测物是有机小分子化合物。

[0016]　可选的，在所述电化学检的步骤中，电化学电极为玻碳电极及其经修饰后的电极。

[0017]　可选的，所述普鲁士蓝微粒子通过化学方法固定待测物小分子的类似物，形成标记抗原。

[0018]　可选的，所述竞争性免疫反应在磷酸缓冲液中发生。

[0019]　可选的，所述竞争性免疫反应通过借助磁性微粒以及外加磁场的作用形成。

[0020]　可选的，在步骤 d) 中，所述电化学检测体系中的氧化电流信号进而对待测物实现定量测量，具体包括：

[0021]　通过检测上清中残留的标记抗原对于含有过氧化氢和对苯二酚的溶液的催化氧化反应产生的电信号，实现对于待测小分子的定量电化学检测。

[0022]　该检测方法采用普鲁士蓝代替生物酶分子标记小分子抗原，并结合磁性微粒进行竞争性免疫反应，通过电化学检测标记抗原对于过氧化氢和对苯二酚的催化氧化反应产生的电信号，由于其电信号大小与待测小分子浓度呈线性相关，可实现对小分子化合物的高灵敏度定量检测。

附图说明

[0023]　图 1 为本发明实施例的方法中，普鲁士蓝催化免疫电化学差分脉冲伏安图；

[0024]　图 2 利用本发明实施例的方法所测的浓度与电流的线性关系图；

[0025]　图 3 利用本发明实施例的方法所测的浓度的对数与电流的线性关系图。

具体实施方式

[0026]　本发明提出了一种利用普鲁士蓝催化活性作为抗原标记的竞争免疫反应电化学检测方法。本方法首先借助带多个氨基的壳聚糖，将普鲁士蓝粒子标记于待测小分子化合物的类似物上构成标记抗原。通过将抗体与磁性纳米粒子偶联，借助标记抗原与待测目标物对磁性抗体的竞争以及外加磁场对于磁性抗体结合目标物和标记抗原后的分离，构建了竞争免疫反应体系。然后通过电化学检测上清液中剩余的标记抗原对过氧化氢的催化分解及其对对苯二酚的氧化电流，建立了小分子化合物高灵敏度的检测体系。

[0027]　另外，需要指出的是，在本发明的所有实施例中，优选的，可以具备以下一个或者多个限定条件；可选的，所述小分子化合物是指分子量在 1000 以下，且不能直接产生免疫

原性的有机化合物分子。可选的，所述四氧化三铁微粒和普鲁士蓝微粒子的尺寸是μm级或nm级的。可选的，所述具有类过氧化氢酶催化活性的材料为普鲁士蓝。可选的，所述的待测物是有机小分子化合物。可选的，在所述电化学检的步骤中，电化学电极为玻碳电极及其经修饰后的电极。可选的，所述普鲁士蓝微粒子通过化学方法固定待测物小分子的类似物，形成标记抗原。可选的，所述竞争性免疫反应在磷酸缓冲液中发生。可选的，所述竞争性免疫反应通过借助磁性微粒以及外加磁场的作用形成。可选的，在步骤d) 中，所述电化学检测体系中的氧化电流信号进而对待测物实现定量测量，具体包括：通过检测上清中残留的标记抗原对于含有过氧化氢和对苯二酚的溶液的催化氧化反应产生的电信号，实现对于待测小分子的定量电化学检测。

[0028] 实施例一

[0029] 本实施例提供的检测方法包括以下步骤：

[0030] 1、普鲁士蓝标记分子抗原的制备：

[0031] 将带有氨基或羧基等活性基团的小分子化合物通过酰胺化反应（EDC/NHS 反应）、重氮化法、戊二醛法等偶联到壳聚糖分子上，通过调节 PH 值，使标记了小分子化合物的壳聚糖带正电，然后在其分散液中加入硫酸亚铁和铁氰化钾，其表面合成带负电的普鲁士蓝，通过静电作用实现普鲁士蓝对小分子抗原的标记。

[0032] 2、磁性抗体的制备：

[0033] 将氯化亚铁和三氯化铁比例 1:2，分别加入水中溶解加热至 70℃，加入氯化亚铁摩尔数 8 倍的氢氧化钠溶液，迅速混合，可见生成棕黑色的磁性纳米粒子，然后缓慢滴加与氯化亚铁等摩尔数的油酸，熟化 20min 后加入高锰酸钾溶液，氧化 24h，使磁性纳米粒子表面的油酸被氧化成羧基，用超纯水洗涤数次，获得带有羧基的磁性纳米粒子。将带羧基的磁性纳米粒子分散在磷酸盐缓冲液中，并加入一定量的抗体，通过酰胺化反应（EDC/NHS 反应）与抗体偶联 2h。之后，与 1％的脱脂乳粉在 37℃下孵育 1h，封闭掉未反应的羧基，洗涤一次，即获得磁性抗体。

[0034] 3、电化学检测方法：

[0035] 该方法为基于普鲁士蓝仿生标记检测小分子化合物的方法，具体包括以下步骤：

[0036] 步骤 1：以一种具有类过氧化氢酶催化活性的普鲁士蓝微粒子标记待测物的类似物作为标记抗原：

[0037] 具体的，称取一定量修饰有氨基的半抗原溶于含有甲醇的 ddH_2O 构成 I 液；称取一定量脱乙酰度为 90％的壳聚糖溶于 PH 值 6.5 的磷酸盐缓冲液中，构成 II 液；量取 100μ125％的戊二醛，加蒸馏水稀释至 5ml，构成 III 液。在室温搅拌下，将 I 液和 III 液逐滴加入 II 液中搅拌，8h 后装入透析袋，用蒸馏水透析 3d，每天更换 2 到 3 次透析液至透析完全，即获得偶联壳聚糖的抗原（Ag-CS）。在其中加入 1ml1mol/l 氯化亚铁和 2‰的盐酸，再加入 1mol/l 铁氰化钾即可见蓝色的普鲁士蓝粒子的形成，冷冻干燥，即可获得标记了普鲁士蓝的壳聚糖待测物分子标记抗原（PB/CS/Ag）。

[0038] 步骤 2：合成带羧基的磁性纳米粒子，将磁性四氧化三铁微粒固定抗体，并将其分散在反应液中：将 8.1g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 在 142.5mL 去离子水中溶解后，转移到三口烧瓶中，搅拌加热至 70℃。称取 4.4g$FeCl_2 \cdot 4H_2O$ 溶于 10mL 去离子水，过滤，取 7.5mL 加入到三口烧瓶中。在剧烈搅拌下，快速加入 24mL20％的 NaOH 溶液，1min 后逐滴加入 4.66g 油酸，于 70℃

下继续快速搅拌 20min。反应结束后，得到黑色溶胶状物质，利用外加磁场将所得的沉淀从反应体系中分离出来。

[0039]　用乙醇洗涤 2 次除去多余的油酸，再用去离子水洗涤至 pH ＝ 7。然后加入 160mL 浓度为 10mg/mL 的 $KMnO_4$ 溶液，在超声波清洗仪中超声振荡 24h，磁分离后用去离子水洗涤 3 次，得到磁流体。或者在洗涤后真空冷冻干燥 40h，得到表面修饰有羧基的磁性纳米粒子。将 25mg 带羧基的磁性纳米粒子分散在 1mL PH ＝ 6.5 的 PBS 磷酸盐缓冲液中，在其中分别加入 25mgEDC 和 NHS，在 37℃中活化 30min，并加入一定量的抗体，通过酰胺化反应（EDC/NHS 反应）与抗体偶联 2h。之后，与 1％的脱脂乳粉在 37℃下孵育 1h，封闭掉未反应的羧基，洗涤一次，即获得磁性抗体。

[0040]　步骤 3：在反应液中加入步骤 1 中制得的标记抗原和待测物后，标记抗原与待测物竞争抗体，形成竞争性免疫反应：将 100μL 含有 25mg 磁性四氧化三铁微粒固定抗体分散在 5mL 反应液中，在反应液中加入 100μL 步骤 a 中制得的标记抗原和一组不同浓度待测物（磺胺二甲基嘧啶）后，在 37℃下孵育 1h，标记抗原与待测物竞争抗体，形成竞争性免疫反应。

[0041]　步骤 4：通过磁铁分离，将磁性抗体及其吸附的抗原分离至试管底部，吸取 4mL 上清，加入 1mL 含有 77mg 对苯二酚和 11μL30％过氧化氢的溶液中，以玻碳电极为工作电极，铂片电极为对电极，饱和甘汞电极为参比电极通，在 -0.6 ～ 2.0V 间，通过差分脉冲伏安法（DPV 法）电化学检测体系中的氧化电流信号进而对待测物实现定量测量（请参考图 1）。结果发现在 20ng/mL ～ 10μg/mL 之间，电流信号大小与待测目标物浓度呈现良好的线性关系。

[0042]　本发明方法在实施过程中使用的试剂包括以下几种成分：

[0043]　抗体和抗原分子：抗体一般是指可特异识别环境污染物、农药、激素、抗生素等小分子的抗体。壳聚糖，脱乙酰度 70％～ 90％的壳聚糖含有大量氨基，磁性纳米粒子（表面带有羧基），普鲁士蓝粒子，玻碳电极，铂片电极，饱和甘汞电极，普鲁士蓝，待测物抗原分子及其类似物，过氧化氢，对苯二酚，亚硝酸钠，戊二醛，高锰酸钾，六水合氯化铁，四水合氯化亚铁。

[0044]　使用的装置包括：水浴锅、电化学工作站、超纯水制水机。

[0045]　以玻碳电极为工作电极，铂片电极为对电极，饱和甘汞电极为参比电极，采用差分脉冲伏安法，电化学检测体系中的氧化电流信号进而对待测物实现定量测量。

[0046]　具体的，以普鲁士蓝为标记催化材料，以四氧化三铁纳米粒子为磁性微粒，以磺胺类抗体为检测抗体，磺胺二甲基嘧啶为待测分析物，磺胺对二甲氧基嘧啶为待测分析物的类似物为例，说明本方法的具体实施流程。

[0047]　1、普鲁士蓝标记的待测分析物、类似物作为标记抗原的合成方法：

[0048]　称取 28mg 磺胺对二甲氧基嘧啶溶于含有 50μl 甲醇的 1ml ddH20 构成 I 液；称取 20mg 脱乙酰度为 90％的壳聚糖溶于 0.35ml PH 值 6.5 的磷酸盐缓冲液中，构成 II 液；量取 100μ125％的戊二醛，加蒸馏水稀释至 5ml，构成 III 液。在室温搅拌下，将 I 液和 III 液逐滴加入 II 液中搅拌，8h 后装入透析袋，用蒸馏水透析 3d，每天更换 2 到 3 次透析液至透析完全，即获得偶联壳聚糖的磺胺二甲基嘧啶（SD-CS）。在其中加入 1ml1mol/1 氯化亚铁和 2‰的盐酸，再加入 1mol/1 铁氰化钾即可见蓝色的普鲁士蓝粒子的形成，冷冻干燥，即可获

得标记了普鲁士蓝的壳聚糖待测物分子标记抗原(PB/CS/SD)。

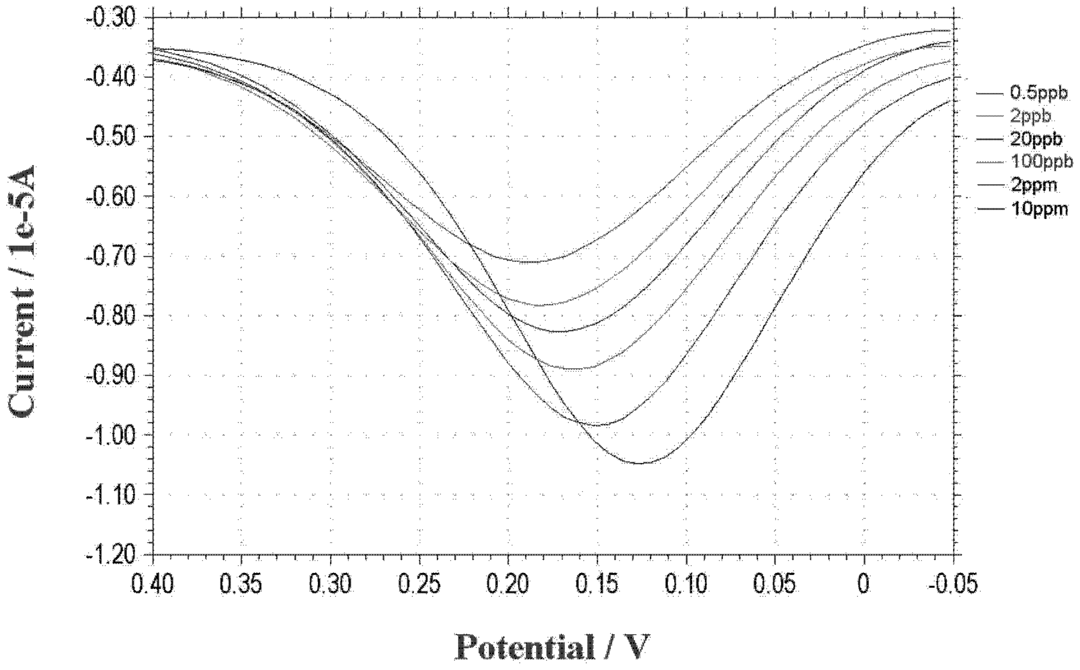
[0049] 2、四氧化三铁磁性抗体的合成：

[0050] 将 8.1g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 在 142.5mL 去离子水中溶解后，转移到三口烧瓶中，搅拌加热至 70℃。称取 4.4g$FeCl_2 \cdot 4H_2O$ 溶于 10mL 去离子水，过滤，取 7.5mL 加入到三口烧瓶中。在剧烈搅拌下，快速加入 24mL20％的 NaOH 溶液，1min 后逐滴加入 4.66g 油酸，于 70℃下继续快速搅拌 20min。反应结束后，得到黑色溶胶状物质，利用外加磁场将所得的沉淀从反应体系中分离出来。用乙醇洗涤 2 次除去多余的油酸，再用去离子水洗涤至 pH ＝ 7。然后加入 160mL 浓度为 10mg/mL 的 $KMnO_4$ 溶液，在超声波清洗仪中超声振荡 24h，磁分离后用去离子水洗涤 3 次，得到磁流体。或者在洗涤后真空冷冻干燥 40h，得到表面修饰有羧基的磁性纳米粒子。将 25mg 带羧基的磁性纳米粒子分散在 1mL PH ＝ 6.5 的 PBS 磷酸盐缓冲液中，在其中分别加入 25mgEDC 和 NHS，在 37℃中活化 30min，并加入一定量的抗体，通过酰胺化反应(EDC/NHS 反应) 与抗体偶联 2h。之后，与 1％的脱脂乳粉在 37℃下孵育 1h，封闭掉未反应的羧基，洗涤一次，即获得磁性抗体。

[0051] 3、竞争免疫反应的进行和电化学检测 ：

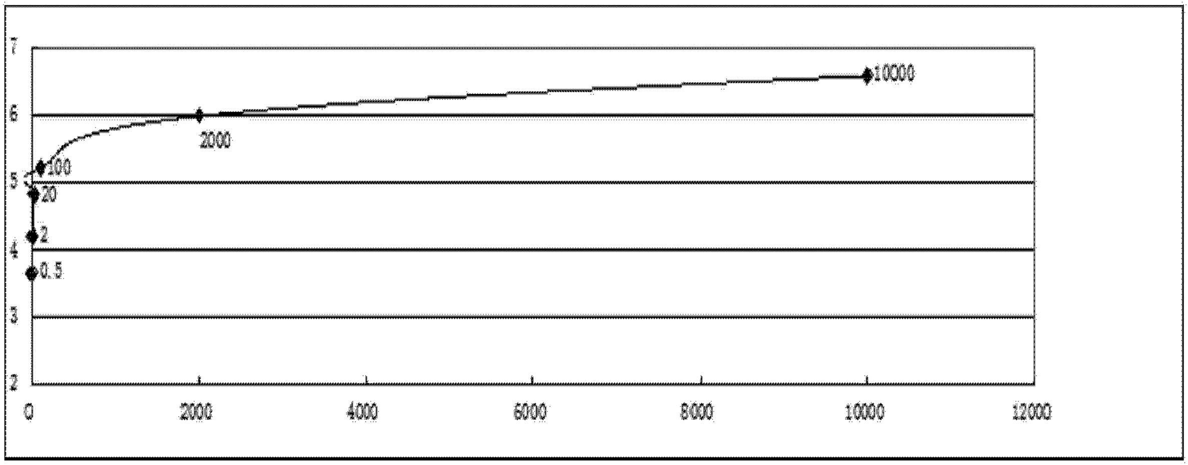
[0052] 将 100μL 含有 25mg 磁性四氧化三铁微粒固定抗体分散在 5mL 反应液中，在反应液中加入 100μL 的标记抗原和一组不同浓度待测物 (磺胺二甲基嘧啶) 后，在 37℃下孵育 1h，标记抗原与待测物竞争抗体，形成竞争性免疫反应。通过磁铁分离，将磁性抗体及其吸附的抗原分离至试管底部，吸取 4mL 上清，加入 1mL 含有 77mg 对苯二酚和 11μL30％过氧化氢的溶液中 . 以玻碳电极为工作电极，铂片电极为对电极，饱和甘汞电极为参比电极，在 -0.6 ～ 2.0V 间，通过差分脉冲伏安法 (DPV 法) 电化学检测体系中的氧化电流信号进而对待测物实现定量测量 (请参考图 2 和图 3，其中，在图 2 中，横坐标为电流，纵坐标为浓度 ；在图 3 中，横坐标为电流，纵坐标的浓度的对数)。结果发现在 20ng/mL ～ 10μg/mL 之间，电流信号大小与待测目标物浓度呈现良好的线性关系。

[0053] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已，并不用于限制本发明，对于本领域的技术人员来说，本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内，所作的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。



Current / 1e-5A
-0.30
-0.40
-0.50
-0.60
-0.70
-0.80
-0.90
-1.00
-1.10
-1.20
0.40 0.35 0.30 0.25 0.20 0.15 0.10 0.05 0 -0.05
Potential / V
0.5ppb
2ppb
20ppb
100ppb
2ppm
10ppm

图 1



7
6
5
4
3
2
10000
2000
100
20
2
0.5
0 2000 4000 6000 8000 10000 12000

图 2

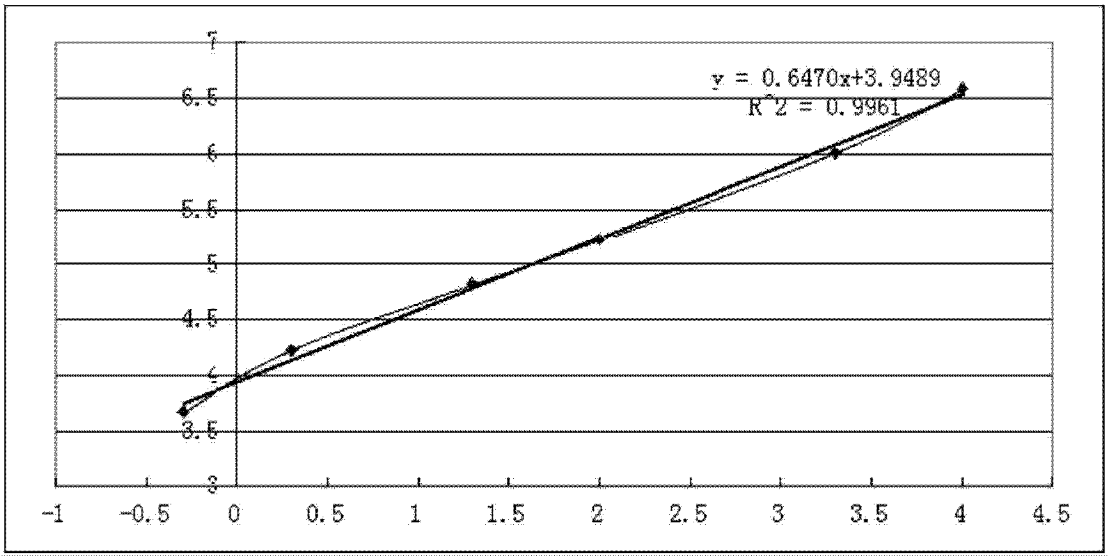

y = 0.6470x+3.9489
R^2 = 0.9961
7
6.5
6
5.5
5
4.5
4
3.5
3
-1
-0.5
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
4
4.5

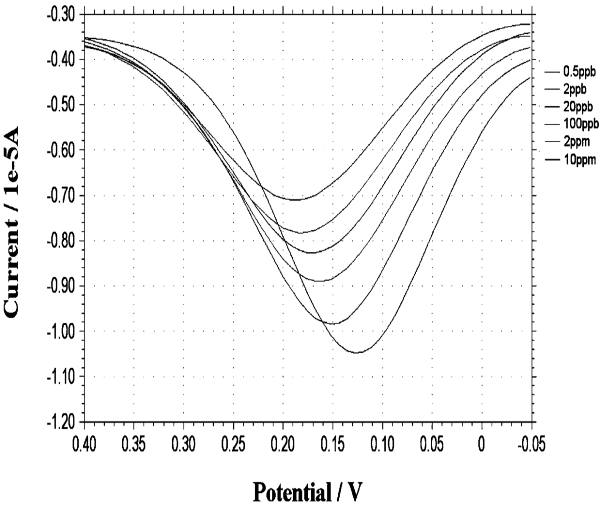
图 3

patsnap

专利名称(译)	基于普鲁士蓝仿生标记检测小分子化合物的方法		
公开(公告)号	CN103995103A	公开(公告)日	2014-08-20
申请号	CN201410258017.7	申请日	2014-06-11
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所		
[标]发明人	王静 王淼 佘永新 李腾飞 刘广洋 杜欣蔚 于海龙 金芬 邵华 金茂俊 王珊珊		
发明人	王静 王淼 佘永新 李腾飞 刘广洋 杜欣蔚 于海龙 金芬 邵华 金茂俊 王珊珊		
IPC分类号	G01N33/53 G01N27/48		
CPC分类号	G01N27/48 G01N33/53 G01N33/54326		
代理人(译)	吴开磊		
其他公开文献	CN103995103B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及电化学免疫技术领域，是一种基于普鲁士蓝仿生标记检测小分子化合物的方法。包括以下步骤：以一种具有类过氧化氢酶催化活性的普鲁士蓝微粒子标记待测物的类似物作为标记抗原；将磁性四氧化三铁微粒固定抗体，并将其分散在反应液中；形成竞争性免疫反应、电化学检测体系中的氧化电流信号进而对待测物实现定量测量。该检测方法采用普鲁士蓝代替生物酶分子标记小分子抗原，并结合磁性微粒进行竞争性免疫反应，通过电化学检测标记抗原对于过氧化氢和对苯二酚的催化氧化反应产生的电信号，由于其电信号大小与待测小分子浓度呈线性相关，可实现对小分子化合物的高灵敏度定量检测。



Current / 1e-5A
Potential / V
0.5ppb
2ppb
20ppb
100ppb
2ppm
10ppm
-0.30
-0.40
-0.50
-0.60
-0.70
-0.80
-0.90
-1.00
-1.10
-1.20
0.40
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0
-0.05