

(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
2019年2月28日 (28.02.2019)

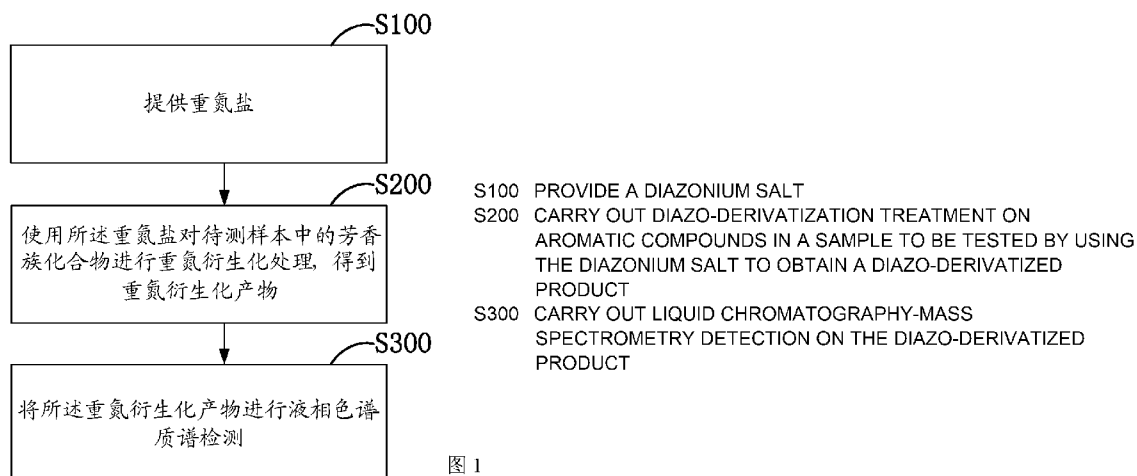


(10) 国际公布号
WO 2019/037665 A1

- (51) 国际专利分类号:
G01N 30/02 (2006.01) *G01N 30/72* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2018/101114
- (22) 国际申请日: 2018年8月17日 (17.08.2018)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201710726075.1 2017年8月22日 (22.08.2017) CN
- (71) 申请人: 杭州谱景柏泰科技有限公司 (APPLIN BIOTECH CO., LTD.) [CN/CN]; 中国浙江省杭州市下沙经济开发区12号大街368号, Zhejiang 310018 (CN)。
- (72) 发明人: 骆亦奇 (LUO, Yiqi Ruben); 中国浙江省杭州市滨江区钱塘春晓10-1-1001, Zhejiang 310051 (CN)。
- (74) 代理人: 北京华进京联知识产权代理有限公司 (ACIP LAW OFFICES); 中国北京市海淀区知春路7号致真大厦A1403, Beijing 100191 (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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, 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,

(54) Title: METHOD FOR DETECTING AN AROMATIC COMPOUND, AND KIT

(54) 发明名称: 芳香族化合物的检测方法及试剂盒



(57) Abstract: A method for detecting an aromatic compound, comprising: providing a diazonium salt; carrying out diazo-derivatization treatment on aromatic compounds in a sample to be tested by using the diazonium salt to obtain a diazo-derivatized product; and carrying out liquid chromatography-mass spectrometry detection on the diazo-derivatized product. Also provided is a kit, for use in detecting an aromatic compound by means of liquid chromatography-mass spectrometry. The kit comprises a diazo-derivatization reagent. The diazo-derivatization reagent comprises at least one of a diazonium salt for carrying out diazo-derivatization treatment on aromatic compounds in a sample to be tested and a raw material for preparing the diazonium salt.

(57) 摘要: 一种芳香族化合物的检测方法, 包括: 提供重氮盐; 使用重氮盐对待测样本中的芳香族化合物进行重氮衍生化处理, 得到重氮衍生化产物; 以及将重氮衍生化产物进行液相色谱-质谱检测。一种试剂盒, 用于通过液相色谱-质谱检测芳香族化合物, 包括重氮衍生化试剂, 重氮衍生化试剂包括用于对待测样本中的芳香族化合物进行重氮衍生化处理的的重氮盐或者重氮盐的制备原料中的至少一种。

SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, 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, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, 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, 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))。

芳香族化合物的检测方法及其试剂盒

相关申请

本申请要求 2017 年 8 月 22 日申请的，申请号为 201710726075.1，名称为“芳香族化合物的检测方法及其试剂盒”的中国专利申请的中国专利申请的优先权，在此将其全文引入作为参考。

技术领域

本申请涉及分析化学技术领域，特别是涉及芳香族化合物的检测方法及其试剂盒。

背景技术

具备结构分辨能力的液相色谱-质谱 (LC-MS) 检测方法已逐渐成为生物活性物质定量测试的主要方法之一。LC-MS 检测方法在临床检测领域的应用也日趋广泛，尤其是对于小分子化合物的定量测试。在临床检测实际应用中，当目标分析物在待测样品中浓度低时，对于检测方法的灵敏度要求就会提高。在血液检测中，当血液样本量有限，例如样本是微量血样本 (1 μ l~10 μ l 血液量) 或者干血样本 (DBS)，检测方法的灵敏度将会限制定量测试的可行性。

芳香族化合物为带有苯环或者其他芳香环结构的化合物。很多生物活性物质都属于芳香族化合物，例如雌二醇、雌三醇、雌酮、胆红素、胆绿素、苯二氮草类药物、维生素 B1、维生素 B2、大麻酚类等。芳香族化合物作为生物活性物质中的一个重要类别，其 LC-MS 检测方法时常在灵敏度方面遇到挑战。以雌二醇的 LC-MS 检测方法为例，作为一种雌性激素，雌二醇在临床样本中的浓度很低。为了提高 LC-MS 检测灵敏度，有报道使用酰氯对雌二醇进行衍生化，但是这种衍生化方法只是针对具有羟基的芳香族化合物 (酚类化合物) 有效。而目前尚未报道有能够提高 LC-MS 检测灵敏度的芳香族化合物的普适性衍生化方法。

发明内容

基于此，有必要提供一种兼具普适性和高灵敏度的芳香族化合物的检测方法及其试剂盒。

一种芳香族化合物的检测方法，包括：

提供重氮盐；

使用所述重氮盐对待测样本中的芳香族化合物进行重氮衍生化处理，得到重氮衍生化产物；以及

将所述重氮衍生化产物进行液相色谱-质谱检测。

在其中一个实施例中，所述重氮盐具有芳香环基团。

在其中一个实施例中，所述重氮盐具有苯基。

在其中一个实施例中，所述重氮衍生化处理包括使所述重氮盐与所述芳香族化合物进行重氮偶联反应。

在其中一个实施例中，所述待测样本为液相样本。

在其中一个实施例中，所述液相样本包括溶剂，所述溶剂选自水和有机溶剂中的一种或多种。

在其中一个实施例中，所述待测样本为含水样本，所述重氮衍生化处理的步骤为使用所述重氮盐直接对所述含水样本进行所述重氮衍生化处理。

在其中一个实施例中，所述重氮盐具有在进行所述液相色谱-质谱检测过程中能够带负电荷的基团和能够带正电荷的基团中的至少一种。通过所述重氮衍生化处理，使得到的重氮衍生化产物具有所述在进行所述液相色谱-质谱检测过程中能够带负电荷的基团和能够带正电荷的基团中的至少一种。所述能够带负电荷的基团为本身带负电荷的基团或者在进行所述液相色谱-质谱检测过程中通过电离产生负电荷的基团，所述能够带正电荷的基团为本身带正电荷的基团或者在进行所述液相色谱-质谱检测过程中通过质子化产生正电荷的基团。

在其中一个实施例中，所述本身带负电荷的基团包括磺酸盐基（ SO_3^- ）及羧酸盐基（ COO^- ）中的至少一种，所述在进行液相色谱-质谱检测过程中通过电离产生负电荷的基团包括磺酸基（ SO_3H ）及羧酸基（ COOH ）中的至少一种。

在其中一个实施例中，所述本身带正电荷的基团包括季铵基，所述在进行液相色谱-质谱检测过程中通过质子化产生正电荷的基团包括氨基及巯基中的至少一种。

在其中一个实施例中，所述重氮衍生化处理之后，进一步包括使用淬灭剂对所述未反应的重氮盐进行淬灭的步骤，所述淬灭剂能够与所述未反应的重氮盐的带正电荷的重氮根基团（ $-\text{N}_2^+$ ）反应，去除所述重氮根基团。

在其中一个实施例中，所述淬灭剂包括抗坏血酸、卤化物及具有活泼亚甲基的脂肪族化合物中的一种或多种。

在其中一个实施例中，所述淬灭剂包括作为淬灭剂使用的芳香族化合物。

在其中一个实施例中，所述作为淬灭剂使用的芳香族化合物包括苯酚、苯酚衍生物、萘酚、萘酚衍生物及苯胺衍生物中的一种或多种。

在其中一个实施例中，所述作为淬灭剂使用的芳香族化合物具有供电子基团。

一种试剂盒，用于通过液相色谱-质谱检测芳香族化合物，包括重氮衍生化试剂，所述重氮衍生化试剂包括用于对待测样本中的芳香族化合物进行重氮衍生化处理的重氮盐或者所述重氮盐的制备原料中的至少一种。

在其中一个实施例中，所述重氮盐具有芳香环基团。

在其中一个实施例中，所述重氮盐具有苯基。

在其中一个实施例中，所述重氮盐具有在进行所述液相色谱-质谱检测过程中能够带负电荷的基团和能够带正电荷的基团中的至少一种，所述能够带负电荷的基团为本身带负电荷的基团或者在进行所述液相色谱-质谱检测过程中通过电离产生负电荷的基团，所述能够带正电荷的基团为本身带正电荷的基团或者在进行所述液相色谱-质谱检测过程中通过质子化产生正电荷的基团。

在其中一个实施例中，所述本身带负电荷的基团包括磺酸盐基（ SO_3^- ）及羧酸盐基（ COO^- ）中的至少一种，所述在进行液相色谱-质谱检测过程中通过电离产生负电荷的基团包括磺酸基（ SO_3H ）及羧酸基（ COOH ）中的至少一种。

在其中一个实施例中，所述本身带正电荷的基团包括季铵基，所述在进行液相色谱-质谱检测过程中通过质子化产生正电荷的基团包括氨基及巯基中的至少一种。

在其中一个实施例中，所述重氮盐的所述制备原料包括氨基化合物与亚硝酸或者亚硝酸的制备原料，所述亚硝酸的制备原料包括亚硝酸盐及酸。

在其中一个实施例中，还包括样本提取液、样本复溶液、样本沉淀剂、样本稀释液、洗脱液、内标、校准品及对未反应的重氮盐进行淬灭的淬灭剂中的至少一种。

本申请实施例提供的检测方法，采用重氮盐对待测样本中的芳香族化合物进行重氮衍生化处理，例如进行重氮偶联反应，从而将一个附加结构通过偶氮基（ $-\text{N}=\text{N}-$ ）连接到芳香族化合物的分子结构上，得到所述重氮衍生化产物，具体为重氮偶联反应产物。在将待测样本中的芳香族化合物衍生化之后，分子结构中增加了容易带电荷的基团，改变了分析物的性质，可以提高分析物的极性使其利于离子化，从而提高离子化效率，进而提高液相色谱-质谱的检测灵敏度。

在一实施例中，所述重氮偶联反应产物中的偶氮基在所述重氮盐与芳香族化合物的重氮偶联反应中生成，是待测样本中的芳香族化合物与所述附加结构之间的连接基团。

所述附加结构可以具有所述能够带负电荷的基团或能够带正电荷的基团，以分别提高质谱负离子模式检测或正离子模式检测时的离子化效率。

具体的，当重氮盐具有所述能够带负电荷的基团时，使得衍生化之后的芳香族化合物（即所述重氮衍生化产物）能够电离带负电荷，可以提高质谱负离子模式检测时的离子化效率。液相色谱-质谱检测在负离子模式下排除杂质干扰能力更强，从而在检测血液样本这类成分复杂样本时可以加强被测物的检测灵敏度。当重氮盐具有能够带正电荷的基团时，可以进一步提高质谱正离子模式检测时的离子化效率。

可以理解，由于偶氮基本身带有两个氮原子，可以质子化带正电荷。在正离子模式的液相色谱-质谱检测中，这个特性可以提高离子化效率。因此，由于偶氮基的存在，即使所述附加结构不带有所述能够带正电荷的基团，重氮偶联反应产物在正离子模式的液相色谱-质谱检测中的离子化效率仍然可以提高。

芳香族化合物带有苯环或者其他芳香环结构，芳香环结构具有共性，可以发生亲电取代等反应。本申请实施例提供的检测方法，不仅可以提高液相色谱-质谱对芳香族化合物的检测灵敏度，而且可以应用于所有可以发生重氮偶联反应的芳香族化合物，是一种利用液相色谱-质谱检测芳香族化合物的普适性的方法。应用范围广，可推广使用。

所述重氮偶联反应可以为水相反应，在水相中或者混溶的混合有机相-水相中进行。当待测样本为含水样本时，可以直接对该样本使用，例如血液、血浆、血清、唾液、尿液等临床样本。大多数应用于液相色谱-质谱检测的有机相衍生化反应，必须在样本处理步骤中加入样本干燥的操作。相比之下，本方法操作更加简单便捷，节约时间的同时还可以避免过多的操作流程带来的待测样本损失。

本申请提供的试剂盒在对芳香族化合物的液相质谱-色谱检测方法中具有本申请提供的检测方法的优点，同时还可以使对芳香族化合物的液相色谱-质谱的检测方法更加方便快捷。

附图说明

图 1 为本申请实施例衍生化测定芳香族化合物的方法示意图；

图 2 为本申请实施例衍生化的雌二醇的全扫描质谱图；

图 3 为本申请实施例未衍生化的雌二醇的全扫描质谱图；

图 4 为本申请实施例衍生化的雌二醇的单离子监测离子色谱图；

图 5 为本申请实施例未衍生化的雌二醇的单离子监测离子色谱图；

图 6 为本申请实施例衍生化的雌三醇的全扫描质谱图；

图 7 为本申请实施例未衍生化的雌三醇的全扫描质谱图；

图 8 为本申请实施例衍生化的雌三醇的单离子监测离子色谱图；

图 9 为本申请实施例未衍生化的雌三醇的单离子监测离子色谱图；

图 10 为本申请实施例苯酚淬灭苯磺酸重氮盐反应产物的全扫描质谱图；

图 11 为本申请实施例苯酚淬灭苯磺酸重氮盐反应产物的单离子监测离子色谱图；

图 12 为本申请实施例雌二醇的标准曲线图；

图 13 为本申请实施例雌三醇的标准曲线图；

图 14 为本申请实施例 7-4-2 使用固红 RC 重氮盐衍生化的雌二醇的多反应监测离子色谱图；

图 15 为本申请实施例 7-4-3 使用固红 TR 重氮盐衍生化的雌二醇的多反应监测离子色谱图；

图 16 为对比例 7-4 未衍生化的雌二醇的多反应监测离子色谱图；

图 17 为本申请实施例 7-5-2 使用固红 RC 重氮盐衍生化的雌三醇的多反应监测离子色谱图；

图 18 为本申请实施例 7-5-3 使用固红 TR 重氮盐衍生化的雌三醇的多反应监测离子色谱图；

图 19 为对比例 7-5 未衍生化的雌三醇的多反应监测离子色谱图。

具体实施方式

为了使本申请的目的、技术方案及技术效果更加清楚明白，以下结合附图对本申请的具体实施例进行描述。应当理解，此处所描述的具体实施例仅用以解释本申请，并不用于限定本申请。

请参阅图 1，本申请实施例提供一种基于化学衍生化的芳香族化合物的检测方法，包括：

S100，提供重氮盐；

S200，使用提供的重氮盐对待测样本中的芳香族化合物进行重氮衍生化处理，得到重氮衍生化产物；以及

S300，将重氮衍生化产物进行液相色谱-质谱检测。

待测样本中的芳香族化合物为目标分析物。采用重氮盐对待测样本中的芳香族化合物

进行重氮衍生化处理,例如进行重氮偶联反应,从而将一个附加结构通过偶氮基(-N=N-)连接到芳香族化合物的分子结构上,得到所述重氮衍生化产物,具体为重氮偶联反应产物。在将待测样本中的芳香族化合物衍生化之后,分子结构中增加了容易带电荷的基团,改变了分析物的性质,可以提高分析物的极性使其利于离子化,从而可以提高离子化效率,进而提高液相色谱-质谱的检测灵敏度。

偶氮基带有两个氮原子,可以质子化带正电荷。在正离子模式的液相色谱-质谱检测中,这个特性可以提高离子化效率。因此,由于偶氮基的存在,即使所述附加结构不带有所述能够带正电荷的基团,重氮偶联反应产物在正离子模式的液相色谱-质谱检测中的离子化效率仍然可以提高。

芳香族化合物是具有芳香环结构的化合物,例如是具有芳基的化合物。芳基可以为任何从简单芳香环衍生出的官能团或取代基,例如苯基、吡啶基、吡嗪基、嘧啶基或哒嗪基等从六元芳香环衍生出的官能团,或者呋喃基、吡咯基、噻吩基、咪唑基或噻唑基等从五元芳香环衍生出的官能团,其中芳香环具有共性,可以发生亲电取代等反应。该方法不仅可以提高液相色谱-质谱对芳香族化合物的检测灵敏度,而且可以应用于所有的芳香族化合物,是一种利用液相色谱-质谱检测芳香族化合物的普适性的方法。应用范围广,可推广使用。

该方法中的重氮偶联反应可以在水相中或者混溶的混合有机-水相中进行。当待测样本为含水样本时,可以直接对该样本使用,例如血液、血浆、血清、唾液、尿液等临床样本。大多数应用于液相色谱-质谱检测的有机相衍生化反应,必须在样本处理步骤中加入样本干燥的操作。相比之下,本方法操作更加简单便捷,节约时间的同时还可以避免过多的操作流程带来的待测样本损失。

在步骤 S100 中,提供的重氮盐可具有芳香环基团。在一实施例中,重氮盐具有苯基。但是不局限于苯基。

在一实施例中,所述重氮盐具有在进行液相色谱-质谱检测过程中能够带负电荷的基团,通过所述重氮衍生化处理,使得到的重氮衍生化产物具有所述在进行所述液相色谱-质谱检测过程中能够带负电荷的基团,使得重氮衍生化产物可以在质谱负离子模式下进行检测。

所述能够带负电荷的基团为本身带负电荷的基团或者在进行液相色谱-质谱检测过程中通过电离产生负电荷的基团,可以使衍生化之后的偶氮化合物易于带负电荷,提高质谱负离子模式检测时的离子化效率。液相色谱-质谱检测方法在负离子模式下抗杂质干扰的能力更强,在检测复杂样本,例如血液样本的时候有利于提高对目标分析物的检测灵敏度。

本身带负电荷的基团可以包括磺酸盐基 (SO_3^-) 及羧酸盐基 (COO^-) 等固有带电荷基团中的至少一种。在进行液相色谱-质谱检测过程中通过电离产生负电荷的基团包括磺酸基 (SO_3H) 及羧酸基 (COOH) 中的至少一种。磺酸基 (SO_3H) 及羧酸基 (COOH) 等能够在溶液中解离释放出氢离子, 从而带有负电荷。

在一实施例中, 重氮盐具有在进行液相色谱-质谱检测过程中能够带正电荷的基团, 通过所述重氮衍生化处理, 使得到的重氮衍生化产物具有所述在进行所述液相色谱-质谱检测过程中能够带正电荷的基团, 进一步提高重氮衍生化产物在质谱正离子模式下检测的灵敏度。

所述能够带正电荷的基团可以为本身带正电荷的基团或者在进行液相色谱-质谱检测过程中通过质子化产生正电荷的基团, 可以使衍生化之后的偶氮化合物易于带正电荷, 提高质谱正离子模式检测时的离子化效率, 从而进一步提高使用其衍生化之后的偶氮化合物的液相色谱-质谱检测方法的灵敏度。

本身带正电荷的基团包括季铵基等固有带电荷基团。在进行液相色谱-质谱检测过程中通过质子化产生正电荷的基团包括氨基及巯基中的至少一种。氨基及巯基等能够在溶液中结合氢离子。季铵基 (NR_3^+) 中 N 所连接的 R 为烃基, 可以相同或不同。氨基可以包括 NH_2 、 NHR 及 NR_2 中的一种或多种, R 为烃基, 连接至同一氮原子的 R 可以相同或不同。巯基可以包括 SH 及 SR 。其中, R 代表烃基。

重氮盐还可以包括其他基团, 例如烷基、烯基、炔基、烷氧基、羟基、羰基及磷酸基中的一种或多种。上述基团可以通过任何形式任何数量化学键与芳香环基团连接, 例如为 σ 单键。

应当理解, 在步骤 S100 中, 可以直接提供重氮盐; 或者步骤 S100 可以包括: 提供重氮盐的制备原料; 以及利用重氮盐的制备原料制备重氮盐。

在一实施例中, 重氮盐通过氨基化合物与亚硝酸之间的反应制取, 提供的重氮盐的制备原料可以包括氨基化合物、反应所需要的溶剂及亚硝酸或者制备亚硝酸的原料。

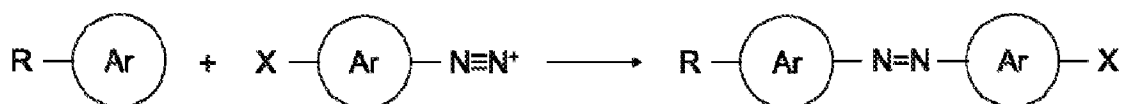
在一实施例中, 氨基化合物为芳香胺类化合物, 如苯胺、邻/对氨基苯磺酸、邻/对硝基苯胺或二氯苯胺等。

亚硝酸通常不稳定, 因此, 在一实施例中, 步骤 S100 可以包括: 使用亚硝酸的反应原料反应制备亚硝酸; 以及将制成的亚硝酸与氨基化合物进行反应制备重氮盐。制备亚硝酸的反应原料包括亚硝酸盐及酸。可选的, 酸包括盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸及磷酸中的一种或多种。亚硝酸盐为亚硝酸钠或亚硝酸钾等。

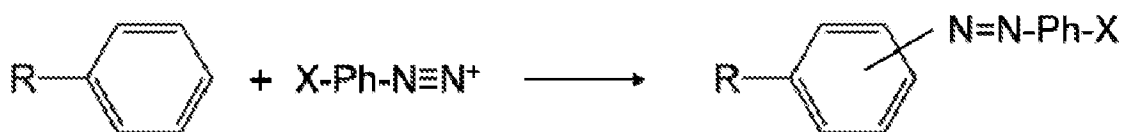
可选的，所述重氮盐的制备中，反应所需要的溶剂包括水、氢氧化钠溶液、碳酸钠溶液或碳酸氢钠溶液。可以用于溶解氨基磺酸以及氨基羧酸类的化合物，防止出现氨基磺酸以及氨基羧酸类的化合物在酸性介质中形成内盐沉淀，而无法进行后续反应的情况。

可选的，亚硝酸盐固体和氨基化合物固体可以事先混合，加入酸溶液进行“一锅化”反应制取重氮盐。

在步骤 S200 中，重氮衍生化处理可以包括重氮盐与芳香族化合物进行的重氮偶联反应。在其中一个实施例中，芳香族化合物与重氮盐之间的重氮偶联反应可以表示为下述反应方程式：



在一实施例中，表示为下述反应方程式：



在步骤 S200 中，待测样本可以为液相样本，例如含水样本。重氮衍生化处理的步骤为使用重氮盐直接对含水样本进行重氮衍生化处理，也就是进行重氮偶联反应。该实施例中重氮偶联反应为水相反应，可以直接对临床样本使用，例如血液、血浆、血清、唾液、尿液等。大多数应用于液相色谱-质谱检测的有机相衍生化反应，必须样本处理步骤中加入样本干燥的操作。相比之下，本方法操作更加简单便捷，节约时间的同时还可以避免过多的操作流程带来的待测样本损失。待测的含水样本的溶剂可以是纯水相，也可以是混溶的混合有机相-水相。待测的含水样本可以是经过简单处理之后的含水样本，也可以是未经任何处理的含水样本。对待测含水样本的简单处理可以包括沉淀、离心、过滤、浓缩等。

在一实施例中，在步骤 S200 后进一步包括：

S400，使用淬灭剂对未反应的重氮盐进行淬灭。具体的，重氮偶联反应结束之后，可以使用淬灭剂与未反应的重氮盐进行淬灭。淬灭剂能够与重氮盐的带正电荷的重氮根基团 ($-\text{N}_2^+$) 反应，通过消耗重氮根基团 ($-\text{N}_2^+$)，去除重氮根基团 ($-\text{N}_2^+$)，实现对重氮盐的淬灭效果。对未反应的重氮盐进行淬灭可以防止具有重氮盐干扰后续的检测。

淬灭剂可包括芳香族化合物。

在一实施例中，作为淬灭剂使用的芳香族化合物具有供电子基团。供电子基团可以是氨基、羟基、烷氧基及烷基中的一种或多种。供电子基团可以影响芳香环的电子云密度，

使芳香环的部分位置的电子云密度增加，提高发生亲电取代反应的活性。供电子基团的邻位和对位电子云密度更容易增加，从而更加容易发生亲电取代反应。使用具有供电子基团的芳香族化合物对未反应的重氮盐进行淬灭，反应过程更加容易，在一定程度上保证对未反应的重氮盐淬灭的彻底性。当然，也可以通过添加过量的芳香族化合物对未反应的重氮盐进行淬灭来保证淬灭的彻底性。作为淬灭剂淬灭重氮盐的芳香族化合物可以包括苯酚、苯酚衍生物（如水杨酸）、萘酚、萘酚衍生物、苯胺衍生物（如 N,N-二甲基苯胺）等化合物中的一种或多种。

淬灭剂并不局限于芳香族化合物，只要是消耗重氮盐中的重氮根基团（ $-N_2^+$ ）即可。在一实施例中，淬灭剂淬灭重氮盐之后可以生成稳定的化合物（也称重氮淬灭产物或者淬灭重氮盐反应产物），且生成的稳定化合物与待测样本中的芳香族化合物进行重氮衍生化处理后得到的重氮衍生化产物不同，能够在液相色谱-质谱检测中被区分。可选的，淬灭剂可以包括抗坏血酸、卤化物及具有活泼亚甲基的脂肪族化合物中的一种或多种。

为提高检测精确度，进一步排除所述重氮淬灭产物对液相色谱-质谱检测的影响，在 S300 的液相色谱-质谱检测步骤可以利用液相色谱出峰时间差异将所述重氮盐淬灭产物导入旁支液路，避免进入质谱检测装置，消除其对于液相色谱-质谱检测的影响。

可以理解，步骤 S400 并非必要步骤。即使不进行步骤 S400 的重氮盐淬灭步骤，也可以利用其它方法消除未反应的重氮盐对液相色谱-质谱检测的影响。在一实施例中，可以利用不同物质在液相色谱中出峰时间的差异，将未反应的重氮盐导入旁支液路，避免进入质谱检测装置，达到防止未反应的重氮盐干扰质谱检测结果的目的。

在步骤 S300 中，液相色谱-质谱检测可以使用单离子监测扫描（SIM）或者多反应监测扫描（MRM），通常应用后者比应用前者可以获得更高的灵敏度。

步骤 S300 可包括对所述重氮衍生化产物进行定量分析的步骤，例如可以采用无内标物定量法或内标物加入定量法对所述重氮衍生化产物进行定量分析。

内标物是一种与目标分析物具有相似化学性质的化合物（通常是结构类似物或者稳定同位素标记的目标分析物），以固定浓度加入待测样本中，用来纠正在待测样本的处理过程中或者液相色谱-质谱离子化过程中（通常是电喷雾离子化）的目标分析物损失。

在一实施例中，所述定量分析的步骤具体可以包括：

S310，提供目标分析物浓度与标准品的测试信号的相关关系；

S320，对含有所述重氮衍生化产物的待测样品进行液相色谱-质谱检测，获得所述重氮衍生化产物的测试信号；以及

S330, 利用所述重氮衍生化产物的测试信号和所述相关关系得到目标分析物在所述待测样本中的浓度。

在使用无内标物定量法的实施例中, 测试信号为液相色谱-质谱检测的离子色谱图中目标分析物色谱峰的面积。在使用内标物加入定量法的实施例中, 测试信号为液相色谱-质谱检测的离子色谱图中目标分析物色谱峰与相应内标物色谱峰的面积比值。

在一实施例中, 所述标准品是目标分析物的浓度已知的标准样本, 例如, 可以制备多个浓度已知的衍生化前的目标分析物溶液作为标准品。

在一实施例中, 所述目标分析物浓度与标准品的测试信号的相关关系可以通过以下步骤得到:

S311, 提供多个具有不同目标分析物浓度的标准品, 使用所述重氮盐对标准品中的目标分析物进行重氮衍生化处理;

S312, 对重氮衍生化处理后的标准品进行液相色谱-质谱检测, 获得对应的多个重氮衍生化处理后的标准品的测试信号;

S313, 对所述多个测试信号进行曲线拟合, 得到反映所述相关关系的函数。

所述标准品与待测样品的重氮衍生化处理步骤所用重氮盐及反应条件相同, 后续的液相色谱-质谱检测的条件也相同。

所述函数例如可以是线性函数、二次函数或者指数函数。如果通过曲线拟合能够得到所述函数, 则证明所述目标分析物浓度与标准品的测试信号具有函数关系, 可以通过定量分析获得待测样本中目标分析物的具体浓度。例如, 若能够拟合得到线性函数, 则标准品的测试信号与目标分析物浓度之间具有良好的线性关系。

具体的, 所述步骤 S330 可包括将所述重氮衍生化产物的测试信号代入所述函数, 得到对应的目标分析物浓度值。

应当指出的是, 在基于化学衍生化的分析方法中, 测试信号来自目标分析物重氮衍生化之后的所述重氮衍生化产物, 而目标分析物浓度是指初始分析物即未衍生化之前的分析物浓度。这是因为 (1) 初始分析物才是分析目标, (2) 衍生化产物浓度与初始分析物浓度成比例相关, 使用重氮衍生化产物浓度或者初始分析物浓度得到的测试信号与分析物浓度的相关关系在数学上是一致的。在上述实施例中, 标准品提供为未衍生化的目标分析物, 与待测样本在相同的条件下采用相同的重氮盐进行衍生化处理, 并且液相色谱-质谱检测的检测条件也基本相同。可以理解, 如果标准品与待测样本的重氮衍生化处理条件不同, 例如在一者中引入了额外的溶剂, 则在步骤 S330 将测试信号代入所述函数中得到的浓度需

要经过浓度换算才是目标分析物的浓度。另外，当采用内标法时，内标物优选提供为未衍生化的物质，在所述步骤 S200 前即加入待测样本，从而一并在步骤 S200 中进行重氮衍生化处理。

本申请实施例还提供一种试剂盒，用于通过液相色谱-质谱检测芳香族化合物，包括重氮衍生化试剂。重氮衍生化试剂可以包括所述重氮盐，从而使用重氮盐对待测样本中的芳香族化合物进行重氮衍生化处理；或者可以包括制备重氮盐所需要的原料，在使用过程中先由原料制备重氮盐，再使用制备的重氮盐对待测样本中的芳香族化合物进行重氮衍生化处理。

本申请实施例提供的试剂盒在对芳香族化合物的液相质谱-色谱检测方法中具有本申请提供的芳香族化合物检测方法的优点，同时还可以使对芳香族化合物的液相色谱-质谱的检测方法更加方便快捷。

本申请实施例提供的试剂盒还可以包括样本提取液、样本复溶液、样本沉淀剂、样本稀释液、洗脱液、内标、校准品及对未反应的重氮盐进行淬灭的淬灭剂中的至少一种。

样本提取液可以用来对复杂基质样本中的分析物进行提取，例如干血点样本。样本复溶液可以用来对干性的样本复溶，例如氮气干燥样本或干血点样本。样本沉淀剂可以用来对样本基质中不需要的组分进行沉淀分离，例如血清样本中的蛋白质。样本稀释液可以用来对样本进行适当的稀释，以便进行进一步样本处理。洗脱液（即流动相）用在液相色谱-质谱对样本的检测分析中。洗脱液可以包括水（如蒸馏水）；缓冲液或用于制备缓冲液的盐、酸或碱；以及流动相如甲醇、乙腈等。内标液和校准品溶液用于对样本进行定量分析。淬灭剂可以选择为与步骤 S400 中描述的相同。

实施例 1 重氮盐的制备

实施例 1-1

称量 31.5 mg 对氨基苯磺酸，完全溶于 15 mL 质量分数为 1% 的 NaOH 溶液中，加入 12 mg NaNO_2 ，再加入 3 mL 浓度为 1 M 的 HCl 溶液，反应生成苯磺酸重氮盐。

实施例 1-2

称量 21 mg 对氨基苯磺酸，完全溶于 10 mL 质量分数为 1% 的 NaOH 溶液中，加入 8.0 mg NaNO_2 ，再加入 2 mL 浓度为 1 M 的 HCl 溶液，反应生成苯磺酸重氮盐溶液。

实施例 1-3

将 21 mg 对氨基苯磺酸和 8.0 mg NaNO_2 混合，然后加入 5.0 mL 浓度为 0.1 mM 的 HCl 溶液，反应生成苯磺酸重氮盐溶液。

实施例 2 雌二醇 (Estradiol) 与苯磺酸重氮盐的衍生化

S100, 提供苯磺酸重氮盐。

S200, 使用提供的苯磺酸重氮盐对芳香族化合物雌二醇进行衍生化处理, 雌二醇的浓度为 5 $\mu\text{g/ml}$ 。反应方程式如下:

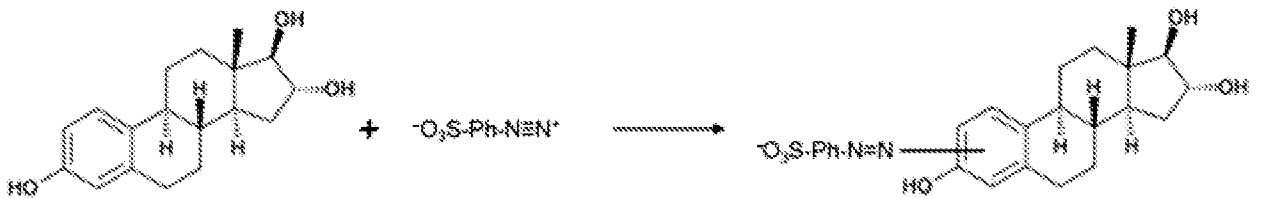


S300, 将反应生成的含有雌二醇衍生物的待测样本 (衍生化样本) 以及未衍生化的待测样本 (未衍生化样本) 进行液相色谱-质谱检测。请参阅图 2 及图 4, 负离子模式下利用全扫描质谱图检测衍生化样本中是否有雌二醇衍生物, 然后使用单离子监测扫描对衍生化样本进行定量测试。请参阅图 3 及图 5, 负离子模式下使用全扫描质谱图检测未衍生化样本中是否有雌二醇, 然后使用单离子监测扫描对未衍生化样本进行定量测试 (无内标物定量分析法)。相比之下, 衍生化样本中的衍生化的雌二醇的测试信号显著高于未衍生化样本中的未衍生化的雌二醇的测试信号。

实施例 3 雌三醇 (Estriol) 与苯磺酸重氮盐的重氮衍生化

S100, 提供苯磺酸重氮盐。

S200, 使用提供的苯磺酸重氮盐对芳香族化合物雌三醇进行衍生化处理, 雌三醇的浓度为 5 $\mu\text{g/ml}$ 。反应方程式如下:



S300, 将反应生成的含有雌三醇衍生物的待测样本 (衍生化样本) 以及未衍生化的待测样本 (未衍生化样本) 进行液相色谱-质谱检测。请参阅图 6 及图 8, 负离子模式下利用全扫描质谱图检测衍生化样本中是否有雌三醇衍生物, 然后使用单离子监测扫描对衍生化样本进行定量测试。请参阅图 7 及图 9, 负离子模式下使用全扫描质谱图检测未衍生化样本中是否有雌三醇, 然后使用单离子监测扫描对未衍生化样本进行定量测试 (无内标物定量分析法)。相比之下, 衍生化样本中的衍生化的雌三醇的测试信号显著高于未衍生化样本中的未衍生化的雌三醇的测试信号。

实施例 4 衍生化与未衍生化定量测试信号比较

对雌二醇及雌三醇的衍生化样本与未衍生化样本进行液相色谱-质谱测试。对雌二醇的衍生化步骤与实施例 2 相似。对雌三醇的衍生化步骤与实施例 3 相似。不同之处在于本实施例中雌二醇和雌三醇的浓度分别为 1 $\mu\text{g/ml}$ 、5 $\mu\text{g/ml}$ 、10 $\mu\text{g/ml}$ 三个梯度。衍生化样本的液相色谱-质谱定量测试（无内标物定量分析）采用负离子模式下单离子监测扫描进行。表 1 为雌二醇及雌三醇的衍生化与未衍生化样本的液相色谱-质谱测试信号（色谱峰面积）比较。衍生化与未衍生化样本中的分析物色谱峰面积比值用来量化液相色谱-质谱测试信号增强幅度。

表 1 为雌二醇及雌三醇的衍生化样本与未衍生化样本的液相色谱-质谱测试信号比较。

表 1

目标分析物	浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	衍生化样本中重氮衍生化产物的色谱峰面积 (2 倍稀释)	未衍生化样本中目标分析物的色谱峰面积	色谱峰面积比值 (测试信号增强)
雌二醇	1.0	533730	23480	45.5
	5.0	4722451	154045	61.3
	10	2845744	913169	6.2
雌三醇	1.0	7825428	64230	243.7
	5.0	11655912	642621	36.3
	10	15307553	1814941	16.9

可以看出，雌二醇衍生物的色谱峰面积是未衍生化的雌二醇色谱峰面积的数倍至数十倍。而雌三醇衍生物的色谱峰面积是未衍生化的雌三醇色谱峰面积的数十倍至数百倍。衍生化样本与未衍生化样本的液相色谱-质谱检测条件各自经过优化处在最佳检测状态。在检测条件基本一致的情况下，灵敏度可以用质谱图的响应值，即离子色谱图上的峰面积进行比较。由此可以得出结论，通过重氮衍生化可以将雌二醇和雌三醇的液相色谱-质谱检测灵敏度提高几个数量级。有理由推断，该重氮衍生化方法可以应用于其他芳香族化合物，将目标分析物的液相色谱-质谱检测灵敏度提高多个数量级。

实施例 5 未反应的重氮盐的淬灭

S400，雌二醇与苯磺酸重氮盐进行重氮偶联反应之后使用苯酚淬灭过量的苯磺酸重氮盐。雌二醇与苯磺酸重氮盐衍生化之后有剩余的苯磺酸重氮盐。使用苯酚对剩余的苯磺酸重氮盐进行了淬灭后，可以观察到明显的重氮盐淬灭产物的质谱峰（见图 10 全扫描质谱图）和色谱峰（见图 11 离子色谱图），其中两个色谱峰分别为来自苯酚邻位和对位重氮偶联得到的同分异构体。在样本测试中，可以利用 LC 出峰时间差异将重氮盐淬灭产物导入旁支液路，消除其对于液相色谱-质谱测试的影响。

实施例 6 使用内标物加入法进行定量测试的线性分析

将含有雌二醇及雌三醇的已知浓度样本 2 倍稀释 12 个梯度水平，即稀释为原溶液浓度的 1/2、1/4、1/8、1/16……，以此类推，得到 12 个已知浓度的溶液，浓度范围为 0.49 ng/mL~1000 ng/mL，并提供甲醇代替雌二醇和雌三醇的溶液作为空白对照组；

在得到的不同浓度的溶液及空白对照组中加入未衍生化的内标物 Estradiol-¹³C₃ 和 Estriol-¹³C₃，进行重氮衍生化处理，然后进行液相色谱-质谱测试。具体为使用灵敏度比 LC-MS 单离子检测扫描更高的 LC-MS 多反应检测扫描来进行定量测试，以衍生化雌二醇和衍生化雌三醇作为目标分析物，分别以衍生化 Estradiol-¹³C₃ 和衍生化 Estriol-¹³C₃ 作为内标物，校准样本前处理损失及 LC-MS 离子化效率变化。

以测试信号为 Y 轴，对应的初始被测物样品浓度为 X 轴，进行权重为 1/X 的加权线性拟合得到标准曲线方程。请参阅图 12 及图 13，初始被测物雌二醇及雌三醇的浓度范围均为 0.49 ng/ml ~1000 ng/mL，在此范围内线性关系优良 ($R^2 > 0.99$)。其中，拟合得到的

雌二醇的相关线性关系为： $Y = 0.000661 + 0.00399 * X$ ； $R^2 = 0.993$ ；

雌三醇的相关线性关系为： $Y = 0.0232 + 0.0628 * X$ ； $R^2 = 0.992$ 。

有理由推断，这种具备普适性的对于芳香族化合物的衍生化方法可以用于微量血样本（1 μ l~10 μ l 血液量），或者唾液样本的定量测试。为了防止样本基质中可能存在的芳香族化合物消耗重氮盐衍生化试剂，可以加入过量的重氮盐衍生化试剂来消除这种可能性。

实施例 7 多种芳香族化合物分别与不同重氮盐的重氮衍生化处理及液相-色谱质谱检测

实施例 7-1-1 (N,N-二甲基苯胺，对氨基苯磺酸重氮盐)

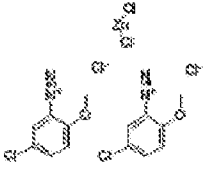
将 N,N-二甲基苯胺溶解于甲醇中，形成浓度为 1.0 μ g/ml 的 N,N-二甲基苯胺溶液。

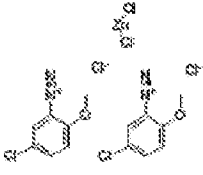
将 21 mg 对氨基苯磺酸和 8.0 mg NaNO₂ 混合，然后加入 5.0 mL 浓度为 25 mM 的 HCl 溶液，反应得到苯磺酸重氮盐溶液。

向 800 μ L N,N-二甲基苯胺溶液中加入 180 μ L 浓度为 5 mM 乙酸铵缓冲液和 20 μ L 苯磺酸重氮盐溶液，在室温下孵育 0.5 小时，对 N,N-二甲基苯胺进行衍生化处理，反应产物作为 N,N-二甲基苯胺的衍生化样本。

实施例 7-1-2 (N,N-二甲基苯胺，固红 RC 重氮盐)

将 N,N-二甲基苯胺溶解于甲醇中，形成浓度为 1.0 μ g/ml 的 N,N-二甲基苯胺溶液。

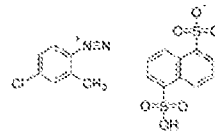


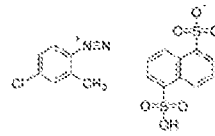
将固红 RC 重氮盐（也称重氮红 RC，Fast Red RC salt，结构式为 ）溶解于浓度为 5 mM 乙酸铵缓冲液或 10 mM pH=7.4 的磷酸盐缓冲液中，配制重氮根浓度为 1.5 mM 固红 RC 重氮盐溶液。

向 800 μ L N,N-二甲基苯胺溶液中加入 200 μ L 固红 RC 重氮盐溶液，在室温下孵育 0.5 小时，对 N,N-二甲基苯胺进行衍生化处理，反应产物作为 N,N-二甲基苯胺的衍生化样本。

实施例 7-1-3（N,N-二甲基苯胺，固红 TR 重氮盐）

将 N,N-二甲基苯胺溶解于甲醇中，形成浓度为 1.0 μ g/ml 的 N,N-二甲基苯胺溶液。



将固红 TR 重氮盐（Fast Red TR salt，结构式为 ）溶解于浓度为 5mM 乙酸铵缓冲液或 10 mM pH=7.4 的磷酸盐缓冲液中，配制重氮根浓度为 1.5 mM 固红 TR 重氮盐溶液。

向 800 μ L N,N-二甲基苯胺溶液中加入 200 μ L 固红 TR 重氮盐溶液，在室温下孵育 0.5 小时，对 N,N-二甲基苯胺进行衍生化处理，反应产物作为 N,N-二甲基苯胺的衍生化样本。

实施例 7-2-1（1-萘酚，对氨基苯磺酸重氮盐）

除将 N,N-二甲基苯胺替换为 1-萘酚外，与实施例 7-1-1 完全相同。

实施例 7-2-2（1-萘酚，固红 RC 重氮盐）

除将 N,N-二甲基苯胺替换为 1-萘酚外，与实施例 7-1-2 完全相同。

实施例 7-3-1（苯酚，对氨基苯磺酸重氮盐）

除将 N,N-二甲基苯胺替换为苯酚外，与实施例 7-1-1 完全相同。

实施例 7-3-2（苯酚，固红 RC 重氮盐）

除将 N,N-二甲基苯胺替换为苯酚外，与实施例 7-1-2 完全相同。

实施例 7-3-3（苯酚，固红 TR 重氮盐）

除将 N,N-二甲基苯胺替换为苯酚外，与实施例 7-1-3 完全相同。

实施例 7-4-2（雌二醇，固红 RC 重氮盐）

除将 N,N-二甲基苯胺替换为雌二醇外，与实施例 7-1-2 完全相同。

实施例 7-4-3（雌二醇，固红 TR 重氮盐）

除将 N,N-二甲基苯胺替换为雌二醇外，与实施例 7-1-3 完全相同。

实施例 7-5-2（雌三醇，固红 RC 重氮盐）

除将 N,N-二甲基苯胺替换为雌三醇外，与实施例 7-1-2 完全相同。

实施例 7-5-3（雌三醇，固红 TR 重氮盐）

除将 N,N-二甲基苯胺替换为雌三醇外，与实施例 7-1-3 完全相同。

对比例 7-1

将 800 μL N,N-二甲基苯胺与 200 μL 浓度为 5 mM 乙酸铵缓冲液混合，混合物作为 N,N-二甲基苯胺未衍生化样本。

对比例 7-2

将 800 μL 1-萘酚与 200 μL 浓度为 5 mM 乙酸铵缓冲液混合，混合物作为 1-萘酚未衍生化样本。

对比例 7-3

将 800 μL 苯酚与 200 μL 浓度为 5 mM 乙酸铵缓冲液混合，混合物作为苯酚未衍生化样本。

对比例 7-4

将 800 μL 雌二醇与 200 μL 浓度为 5 mM 乙酸铵缓冲液混合，混合物作为雌二醇未衍生化样本。

对比例 7-5

将 800 μL 雌三醇与 200 μL 浓度为 5 mM 乙酸铵缓冲液混合，混合物作为雌三醇未衍生化样本。

在液相色谱-质谱（LC-MS）分析中，全扫描质谱（Full-Scan）模式用于识别衍生化或非衍生化样本，单离子监测扫描（SIM）模式或多反应监测扫描（MRM）模式用于定量分析。通常 SIM 模式因为无需优化转化离子对（Transition）条件所以更易于操作，而 MRM 模式由于较低背景噪音可以拥有更高的灵敏度。

将实施例 7 制备的各样本分别进行液相色谱-质谱（LC-MS）检测，质谱扫描类型为多

反应监测扫描 (MRM), 条件参数是根据各样本中的目标分析物分别优化得到的。请参阅图 14 至图 19, 从未衍生化以及使用不同重氮盐衍生化的雌二醇和雌三醇样本的 MRM 离子色谱图可以看到, 衍生化的目标分析物的测试信号 (色谱峰面积) 显著高于未衍生化的目标分析物的测试信号 (色谱峰面积)。另外, 也可以看到, 相对于 SIM 谱图 (例如图 4、5、8、9), MRM 谱图中背景噪声更低, 灵敏度和特异性更高。

请参阅表 2, 表 2 为质谱扫描类型为 MRM 的各样本的离子色谱图的色谱峰面积, 以及衍生化与未衍生化样本的峰面积比, 以显示 LC-MS 信号增强的幅度。由于在实施例 2 和实施例 3 中已经进行过雌二醇和雌三醇的苯磺酸重氮盐衍生化样本的 LC-MS 检测, 因此实施例 7 中未重复测试。从表 2 可以看到, 相对于对比例 7-1 至 7-5 的芳香族化合物的未衍生化样本, 对应的实施例 7-1-1 至 7-5-3 的衍生化样本的检测信号均有所增强, 证明重氮衍生化方法对多种芳香族化合物具有普适性。

表 2

芳香族化合物	无重氮盐处理		对氨基苯磺酸重氮盐			固红 RC 重氮盐			固红 TR 重氮盐		
	模式	峰面积	模式	峰面积	峰面积比	模式	峰面积	峰面积比	模式	峰面积	峰面积比
N,N-二甲基苯胺	正离子	9.06E+04	负离子	1.25E+05	1.4	正离子	8.01E+05	8.8	正离子	8.01E+05	8.8
1-萘酚	负离子	5.43E+05	负离子	6.61E+05	1.2	正离子	1.00E+06	1.8	/	/	/
苯酚	负离子	未测到	负离子	1.80E+06	/	正离子	1.21E+05	/	正离子	1.30E+05	/
雌二醇	负离子	1.88E+04	/	/	/	正离子	3.13E+05	16.6	正离子	2.81E+05	14.9
雌三醇	负离子	6.21E+04	/	/	/	正离子	1.82E+05	2.9	正离子	4.91E+05	7.9

表 2 中峰面积数值均采用科学计数法表示。

实施例 8 多种大麻酚类化合物分别与不同重氮盐的重氮衍生化处理及液相-色谱质谱检测 (THC - Δ^9 -Tetrahydrocannabinol; 11-OH-THC - 11-Hydroxy- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol; THCCOOH - 11-Nor-9-Carboxy- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol; CBD - Cannabidiol; CBN - Cannabinol)

实施例 8-1-1 (四氢大麻酚 THC, 固红 RC 重氮盐)

将 THC 溶解于甲醇中, 形成浓度为 1.0 ng/ml 的 THC 溶液。

将固红 RC 重氮盐溶解于浓度为 5 mM 乙酸铵缓冲液或 10 mM pH=7.4 的磷酸盐缓冲液

中，配制重氮根浓度为 1.5 mM 固红 RC 重氮盐溶液。

向 800 μ L THC 溶液中加入 200 μ L 固红 RC 重氮盐溶液，在室温下孵育 0.5 小时，对 THC 进行衍生化处理，反应产物作为 THC 的衍生化样本。

实施例 8-1-2（四氢大麻酚 THC，固红 TR 重氮盐）

将 THC 溶解于甲醇中，形成浓度为 1.0 ng/ml 的 THC 溶液。

将固红 TR 重氮盐溶解于浓度为 5 mM 乙酸铵缓冲液或 10 mM pH=7.4 的磷酸盐缓冲液中，配制重氮根浓度为 1.5 mM 固红 TR 重氮盐溶液。

向 800 μ L THC 溶液中加入 200 μ L 固红 TR 重氮盐溶液，在室温下孵育 0.5 小时，对 THC 进行衍生化处理，反应产物作为 THC 的衍生化样本。

实施例 8-2-1（11-羟基四氢大麻酚 11-OH-THC，固红 RC 重氮盐）

除将 THC 替换为 11-OH-THC 外，与实施例 8-1-1 完全相同。

实施例 8-2-2（11-羟基四氢大麻酚 11-OH-THC，固红 TR 重氮盐）

除将 THC 替换为 11-OH-THC 外，与实施例 8-1-2 完全相同。

实施例 8-3-1（9-羧基四氢大麻酚 THCCOOH，固红 RC 重氮盐）

除将 THC 替换为 THCCOOH 外，与实施例 8-1-1 完全相同。

实施例 8-3-2（9-羧基四氢大麻酚 THCCOOH，固红 TR 重氮盐）

除将 THC 替换为 THCCOOH 外，与实施例 8-1-2 完全相同。

实施例 8-4-1（大麻二酚 CBD，固红 RC 重氮盐）

除将 THC 替换为 CBD 外，与实施例 8-1-1 完全相同。

实施例 8-4-2（大麻二酚 CBD，固红 TR 重氮盐）

除将 THC 替换为 CBD 外，与实施例 8-1-2 完全相同。

实施例 8-5-1（大麻酚 CBN，固红 RC 重氮盐）

除将 THC 替换为 CBN 外，与实施例 8-1-1 完全相同。

实施例 8-5-2（大麻酚 CBN，固红 TR 重氮盐）

除将 THC 替换为 CBN 外，与实施例 8-1-2 完全相同。

对比例 8-1

将 800 μL THC 与 200 μL 浓度为 5 mM 乙酸铵缓冲液混合，混合物作为 THC 未衍生化样本。

对比例 8-2

将 800 μL 11-OH-THC 与 200 μL 浓度为 5 mM 乙酸铵缓冲液混合，混合物作为 11-OH-THC 未衍生化样本。

对比例 8-3

将 800 μL THCCOOH 与 200 μL 浓度为 5 mM 乙酸铵缓冲液混合，混合物作为 THCCOOH 未衍生化样本。

对比例 8-4

将 800 μL CBD 与 200 μL 浓度为 5 mM 乙酸铵缓冲液混合，混合物作为 CBD 未衍生化样本。

对比例 8-5

将 800 μL CBN 与 200 μL 浓度为 5 mM 乙酸铵缓冲液混合，混合物作为 CBN 未衍生化样本。

可以将实施例 8 制备的各样本分别进行液相色谱-质谱检测。建议对未衍生化样本采用负离子模式(THC 可以采用正离子模式或者负离子模式)，对衍生化样本使用正离子模式。建议使用全扫描质谱通常用于识别衍生化或非衍生化样本，MRM 用于定量分析，条件参数应当是根据各样本中的目标分析物分别优化得到的。使用质谱扫描类型为 MRM 的各样本的离子色谱图，对衍生化与未衍生化样本的色谱峰面积进行比较，LC-MS 信号增强的幅度可以为几倍到几百倍。

以上所述实施例仅表达了本申请的几种实施方式，其描述较为具体和详细，但并不能因此而理解为对本申请专利范围的限制。应当指出的是，对于本领域的普通技术人员来说，在不脱离本申请构思的前提下，还可以做出若干变形和改进，这些都属于本申请的保护范围。因此，本申请专利的保护范围应以所附权利要求为准。

权利要求

1、一种芳香族化合物的检测方法，包括：

提供重氮盐；

使用所述重氮盐对待测样本中的芳香族化合物进行重氮衍生化处理，得到重氮衍生化产物；以及

将所述重氮衍生化产物进行液相色谱-质谱检测。

2、根据权利要求1所述的芳香族化合物的检测方法，其特征在于，所述重氮盐具有芳香环基团。

3、根据权利要求1所述的芳香族化合物的检测方法，其特征在于，所述重氮盐具有苯基。

4、根据权利要求1所述的芳香族化合物的检测方法，其特征在于，所述重氮衍生化处理包括使所述重氮盐与所述芳香族化合物进行重氮偶联反应。

5、根据权利要求1所述的芳香族化合物的检测方法，其特征在于，所述待测样本为含水样本，所述重氮衍生化处理的步骤为使用所述重氮盐直接对所述含水样本进行所述重氮衍生化处理。

6、根据权利要求1所述的芳香族化合物的检测方法，其特征在于，所述重氮盐具有在进行所述液相色谱-质谱检测过程中能够带负电荷的基团和能够带正电荷的基团中的至少一种，通过所述重氮衍生化处理，使得到的重氮衍生化产物具有所述在进行所述液相色谱-质谱检测过程中能够带负电荷的基团和能够带正电荷的基团中的至少一种。

7、根据权利要求6所述的芳香族化合物的检测方法，其特征在于，所述能够带负电荷的基团为本身带负电荷的基团或者在进行所述液相色谱-质谱检测过程中通过电离产生负电荷的基团，所述本身带负电荷的基团包括磺酸盐基（ SO_3^- ）及羧酸盐基（ COO^- ）中的至少一种，所述在进行液相色谱-质谱检测过程中通过电离产生负电荷的基团包括磺酸基（ SO_3H ）及羧酸基（ COOH ）中的至少一种。

8、根据权利要求6所述的芳香族化合物的检测方法，其特征在于，所述能够带正电荷的基团为本身带正电荷的基团或者在进行所述液相色谱-质谱检测过程中通过质子化产生正电荷的基团，所述本身带正电荷的基团包括季铵基，所述在进行液相色谱-质谱检测过程中通过质子化产生正电荷的基团包括氨基及巯基中的至少一种。

9、根据权利要求1所述的芳香族化合物的检测方法，其特征在于，所述重氮衍生化处

理之后，进一步包括使用淬灭剂对所述未反应的重氮盐进行淬灭的步骤，所述淬灭剂能够与所述重氮盐的带正电荷的重氮根基团 ($-N_2^+$) 反应，去除所述重氮根基团。

10、根据权利要求 9 所述的芳香族化合物的检测方法，其特征在于，所述淬灭剂包括作为淬灭剂使用的具有供电子基团的芳香族化合物。

11、根据权利要求 9 所述的芳香族化合物的检测方法，其特征在于，所述淬灭剂包括苯酚、苯酚衍生物、萘酚、萘酚衍生物及苯胺衍生物中的一种或多种。

12、根据权利要求 9 所述的芳香族化合物的检测方法，其特征在于，所述淬灭剂包括抗坏血酸、卤化物及具有活泼亚甲基的脂肪族化合物中的一种或多种。

13、一种试剂盒，用于通过液相色谱-质谱检测芳香族化合物，其特征在于，包括重氮衍生化试剂，所述重氮衍生化试剂包括用于对待测样本中的芳香族化合物进行重氮衍生化处理的重氮盐或者所述重氮盐的制备原料中的至少一种。

14、根据权利要求 13 所述的试剂盒，其特征在于，所述重氮盐具有芳香环基团。

15、根据权利要求 13 所述的试剂盒，其特征在于，所述重氮盐具有苯基。

16、根据权利要求 13 所述的试剂盒，其特征在于，所述重氮盐具有在进行所述液相色谱-质谱检测过程中能够带负电荷的基团和能够带正电荷的基团中的至少一种。

17、根据权利要求 16 所述的试剂盒，其特征在于，所述能够带负电荷的基团为本身带负电荷的基团或者在进行所述液相色谱-质谱检测过程中通过电离产生负电荷的基团，所述本身带负电荷的基团包括磺酸盐基 (SO_3^-) 及羧酸盐基 (COO^-) 中的至少一种，所述在进行液相色谱-质谱检测过程中通过电离产生负电荷的基团包括磺酸基 (SO_3H) 及羧酸基 ($COOH$) 中的至少一种。

18、根据权利要求 16 所述的试剂盒，其特征在于，所述能够带正电荷的基团为本身带正电荷的基团或者在进行所述液相色谱-质谱检测过程中通过质子化产生正电荷的基团，所述本身带正电荷的基团包括季铵基，所述在进行液相色谱-质谱检测过程中通过质子化产生正电荷的基团包括氨基及巯基中的至少一种。

19、根据权利要求 13 所述的试剂盒，其特征在于，所述重氮盐的所述制备原料包括氨基化合物与亚硝酸或者亚硝酸的制备原料，所述亚硝酸的制备原料包括亚硝酸盐及酸。

20、根据权利要求 13 所述的试剂盒，其特征在于，还包括样本提取液、样本复溶液、样本稀释液、样本沉淀剂、洗脱液、内标、校准品及对未反应的重氮盐进行淬灭的淬灭剂中的至少一种。

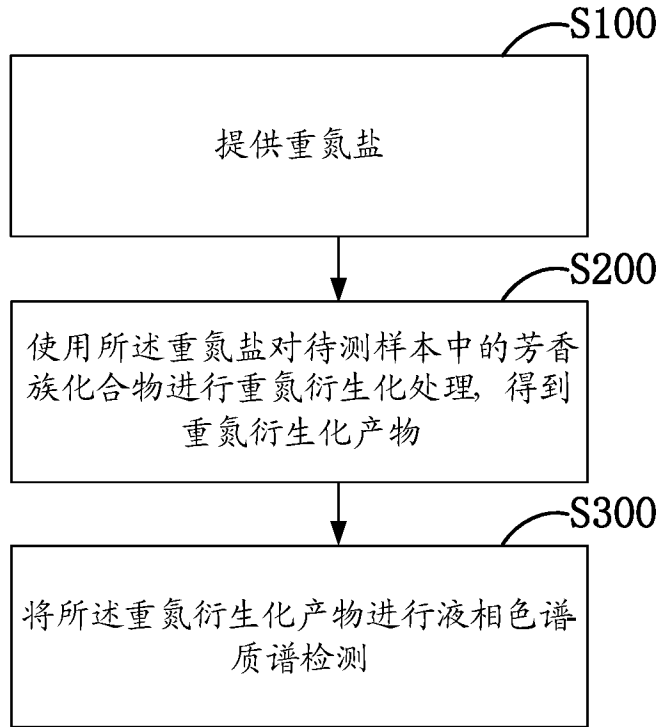


图 1

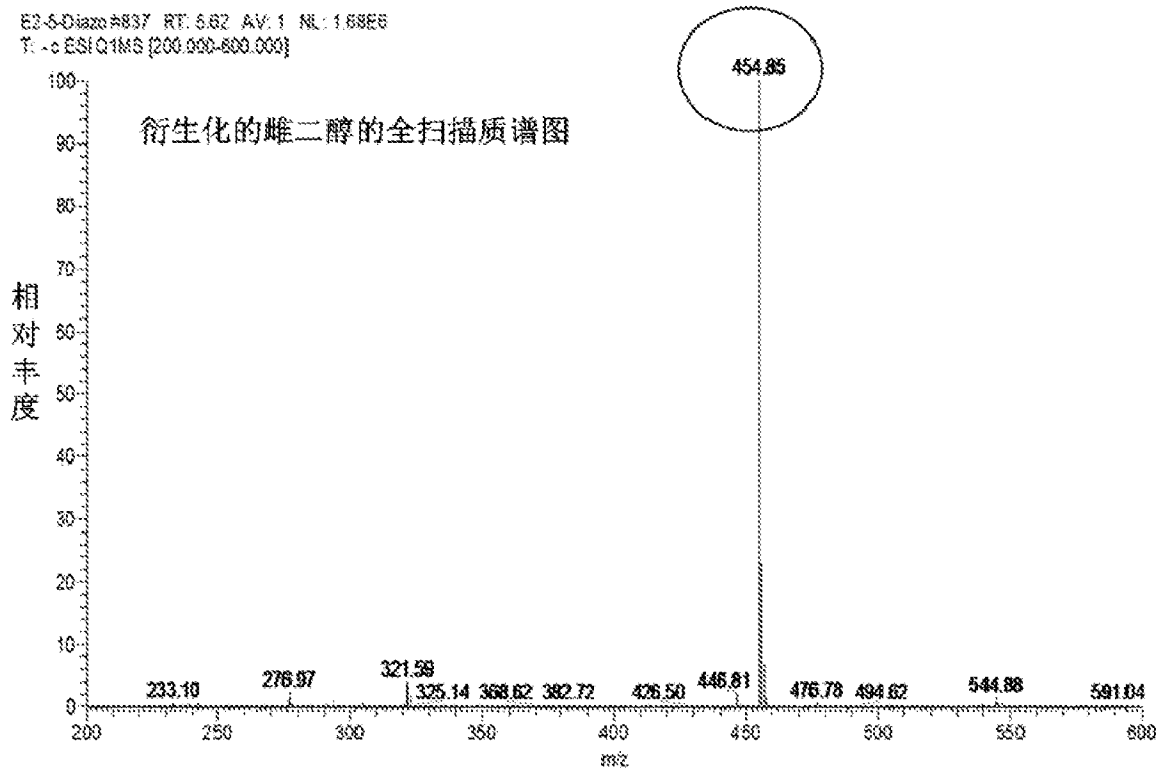


图 2

E2-5#808 RT: 5.42 AV: 1 NL: 1.07E5
F: -c ESI Q1MS [200.000-600.000]

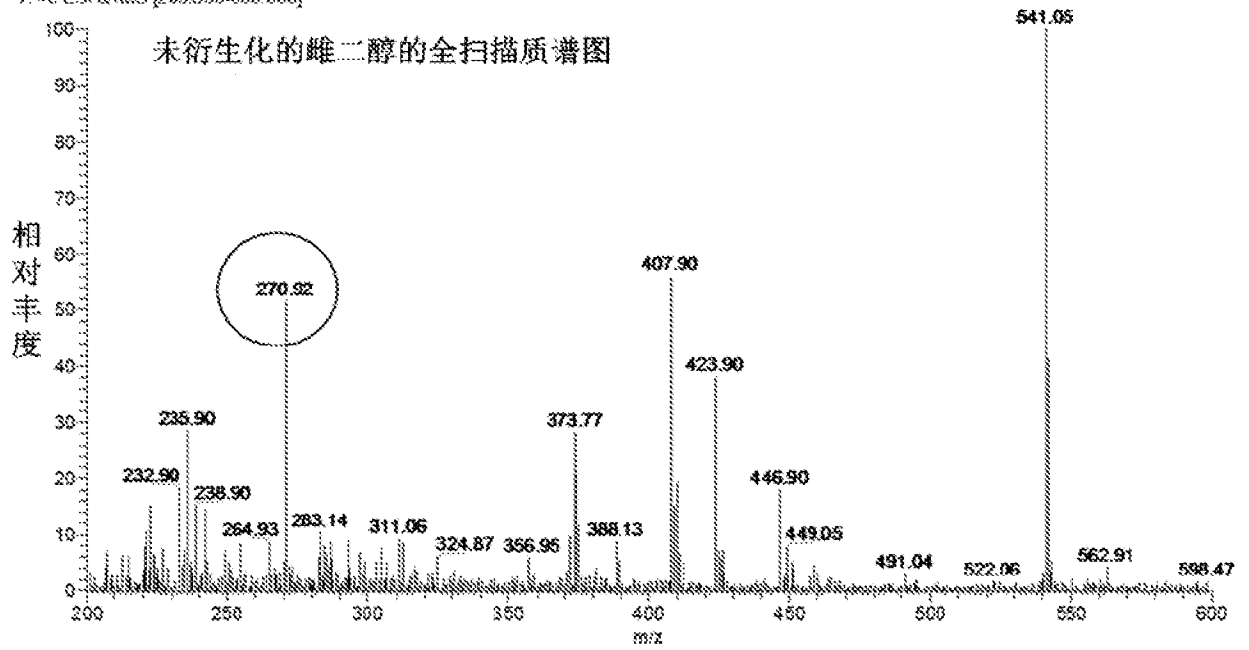


图 3

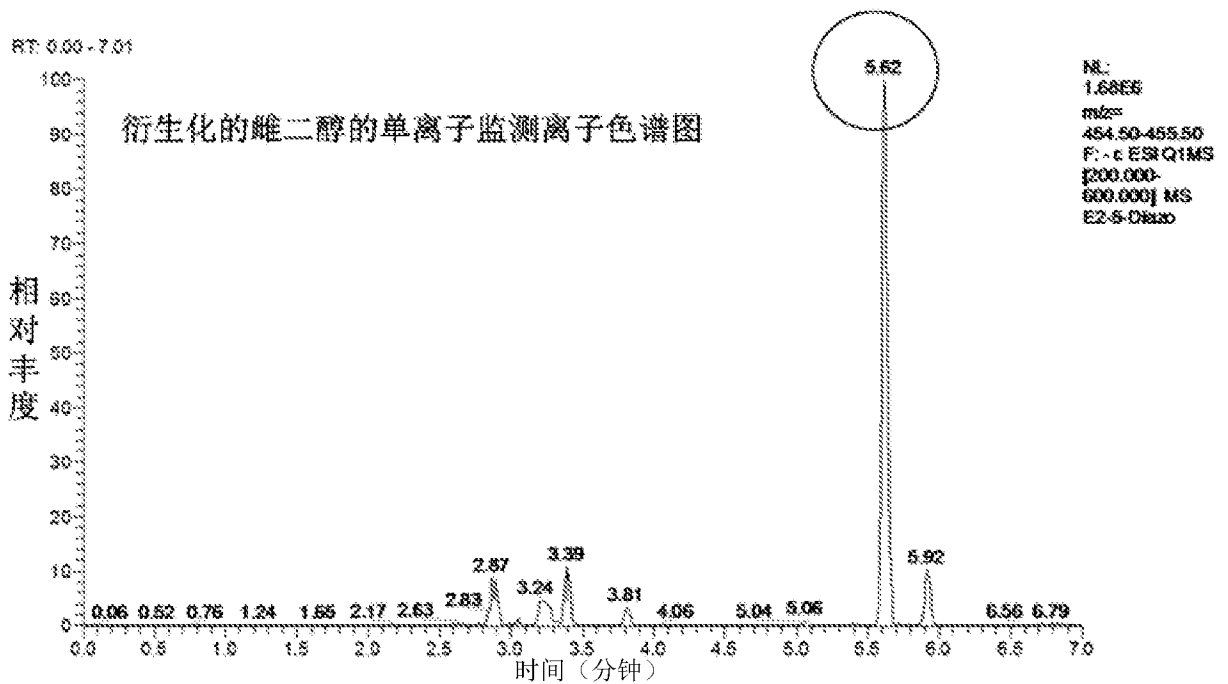


图 4

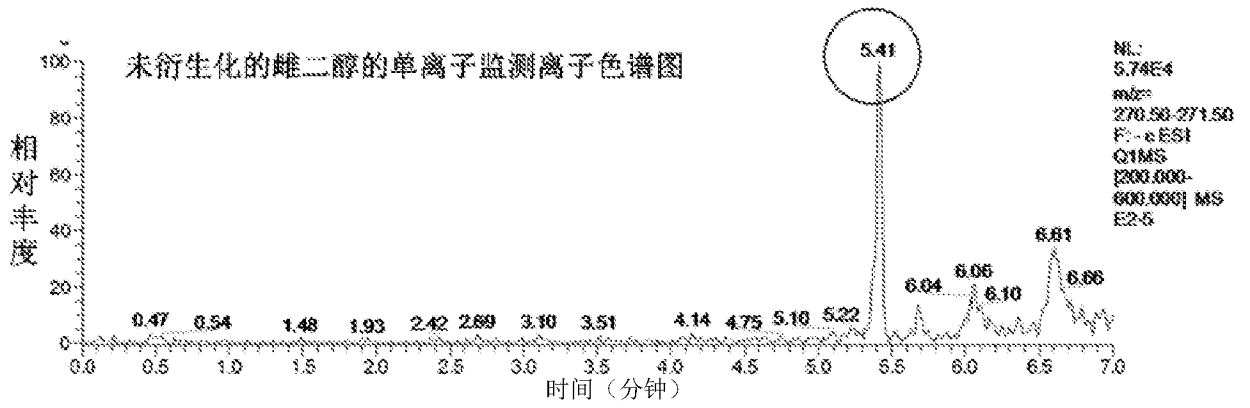


图 5

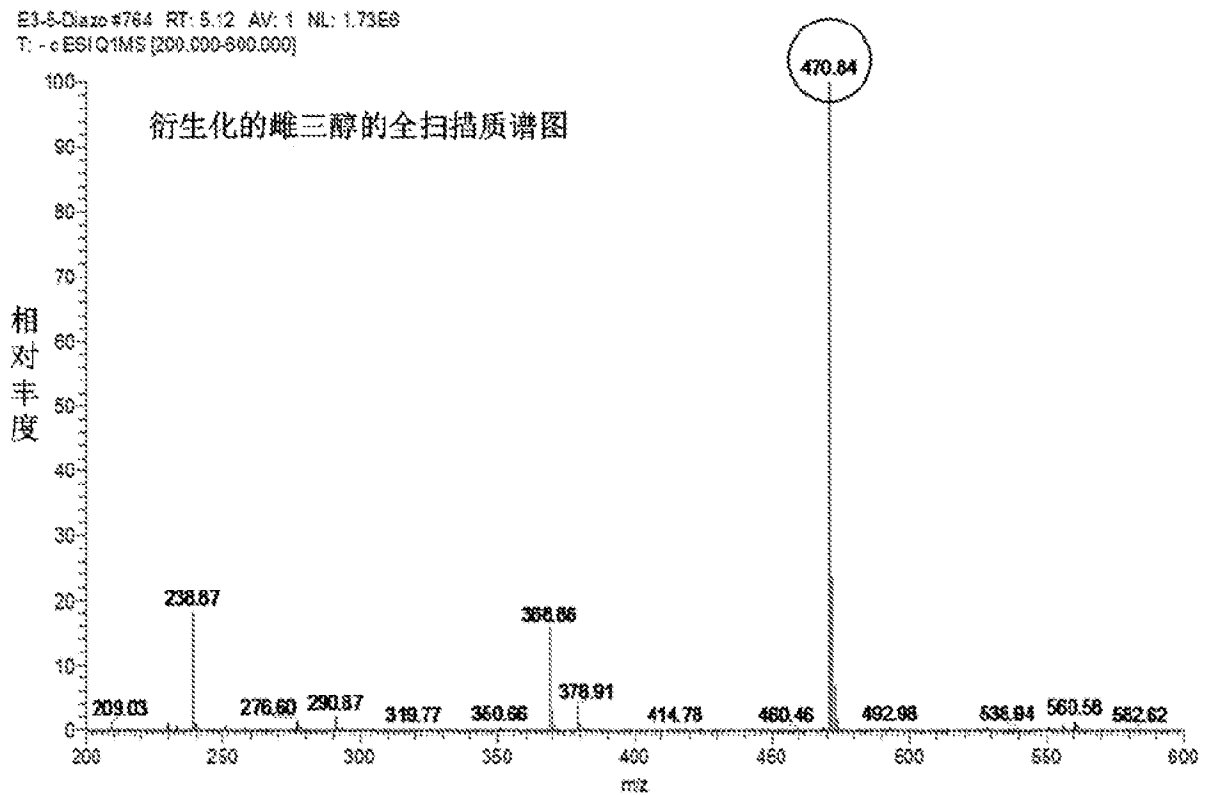


图 6

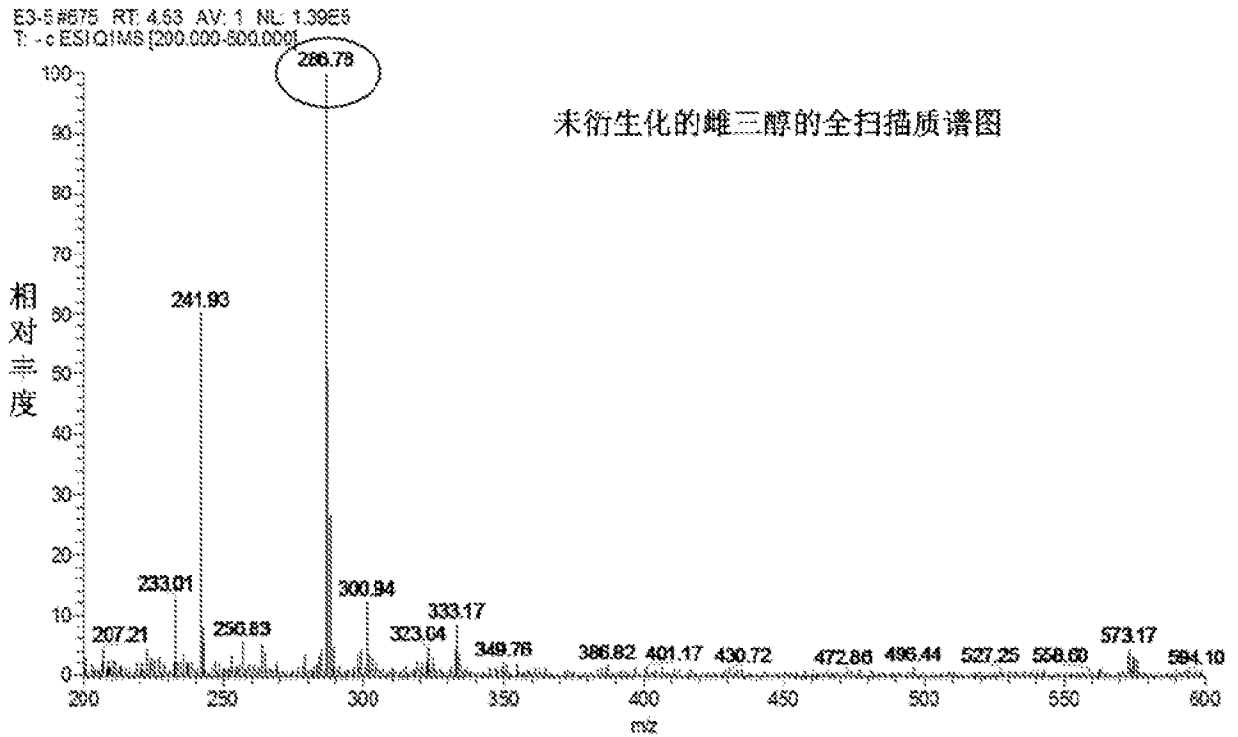


图 7

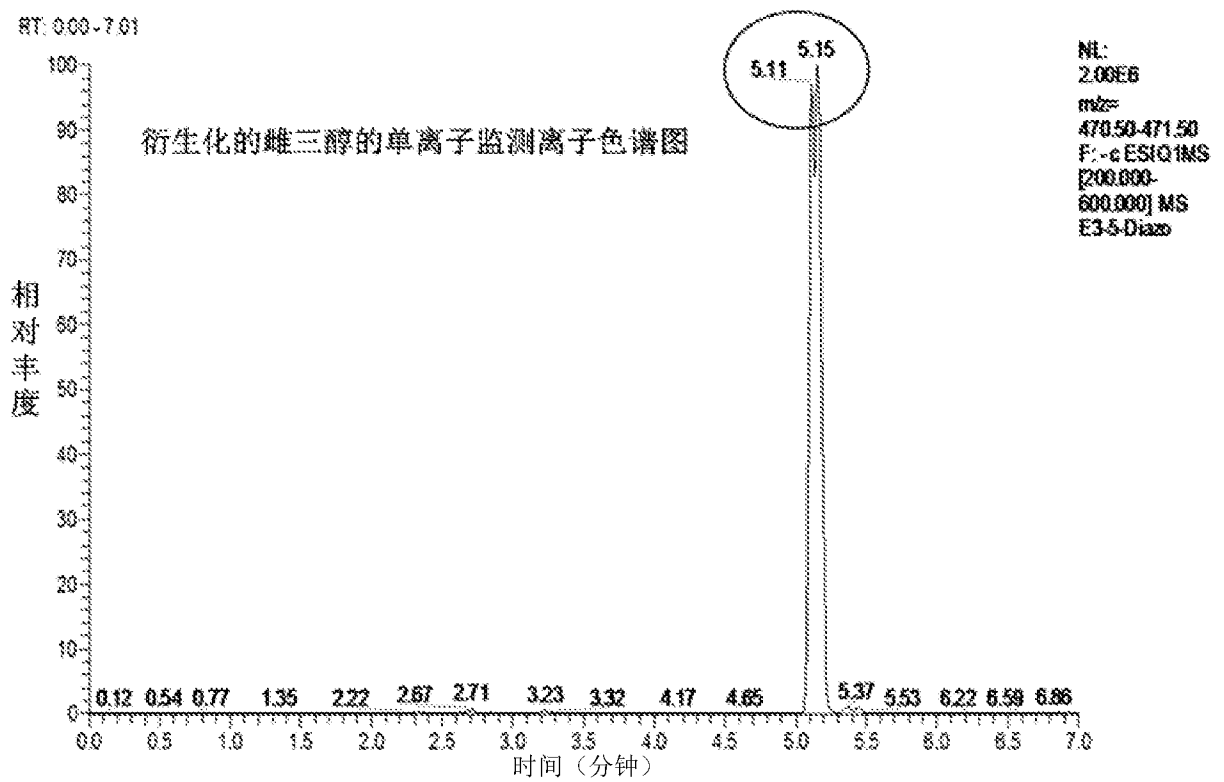


图 8

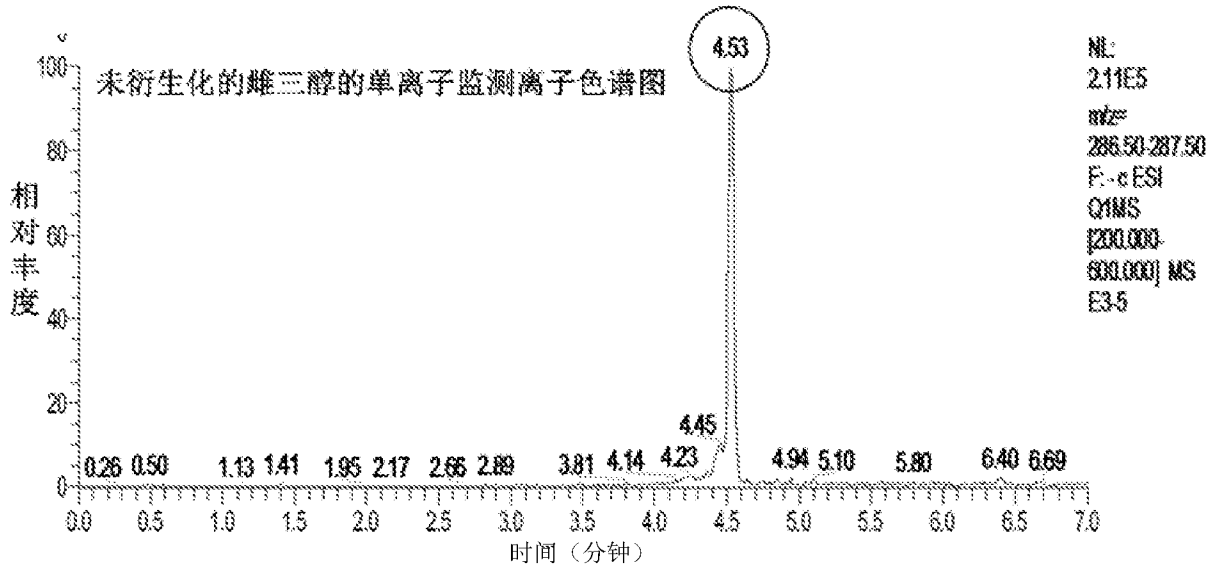


图 9

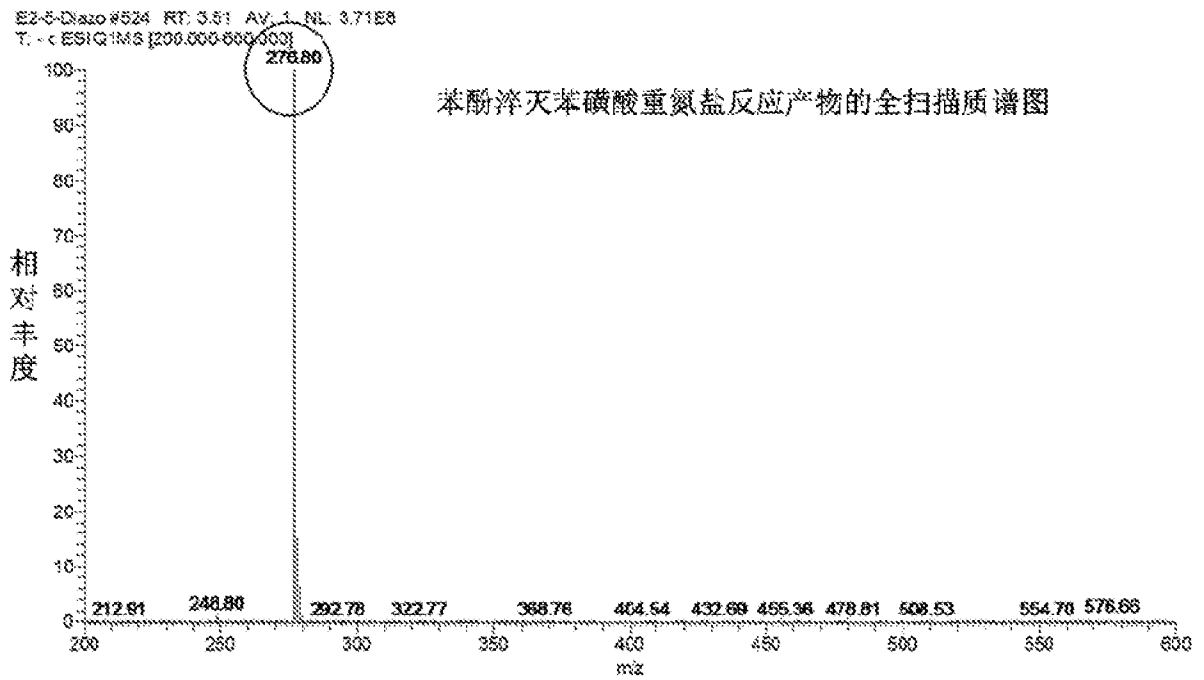


图 10

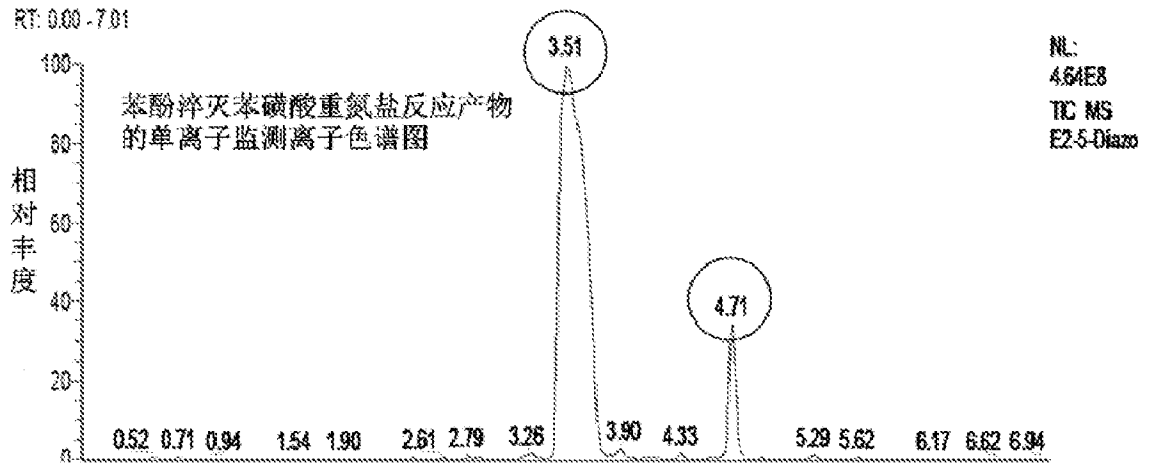


图 11

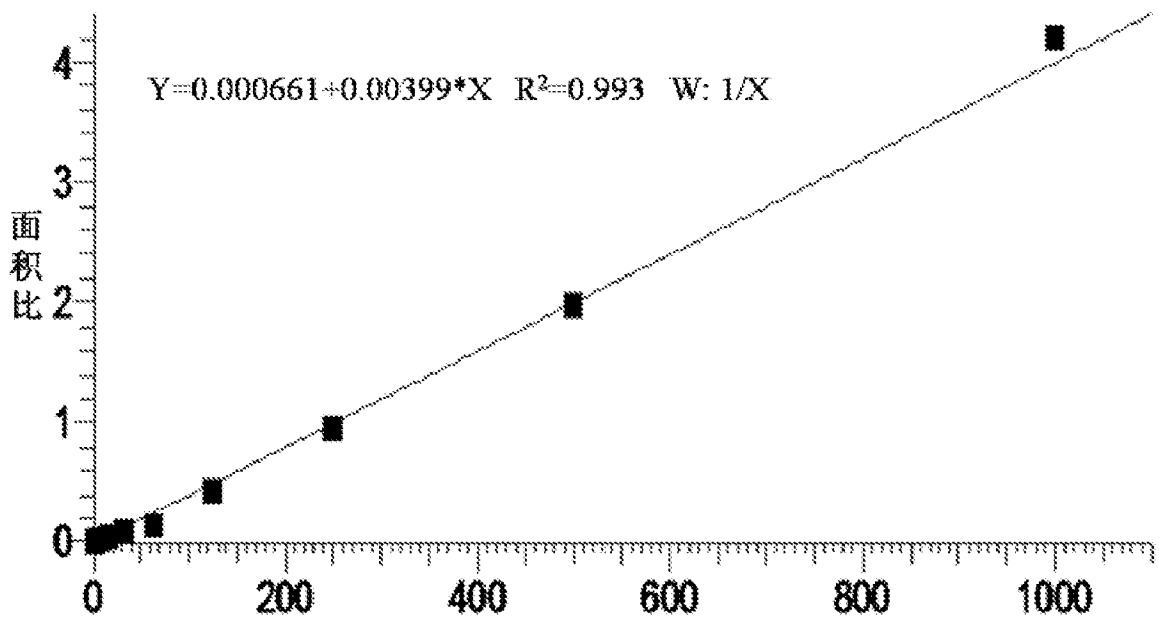


图 12

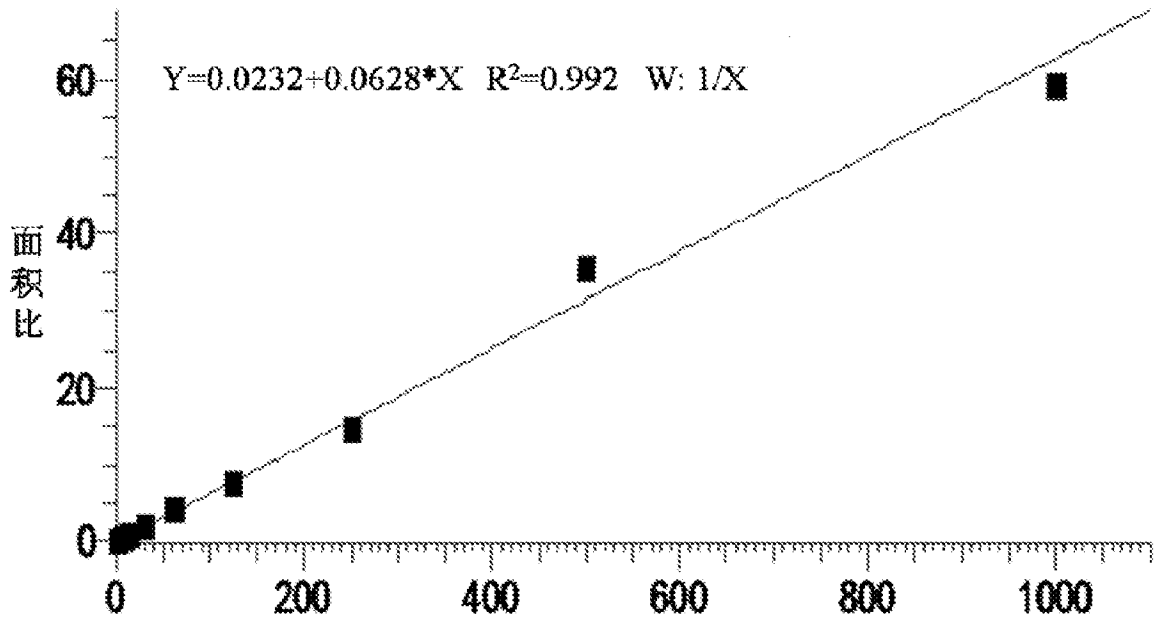


图 13

相对强度
(intensity, cps)

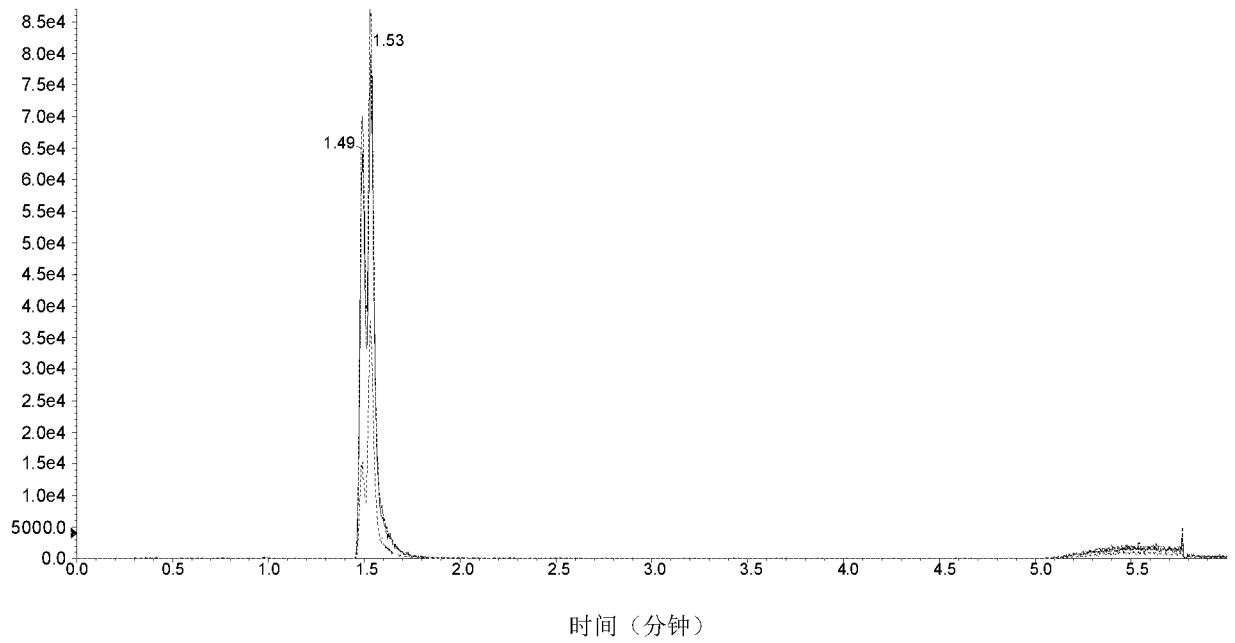


图 14

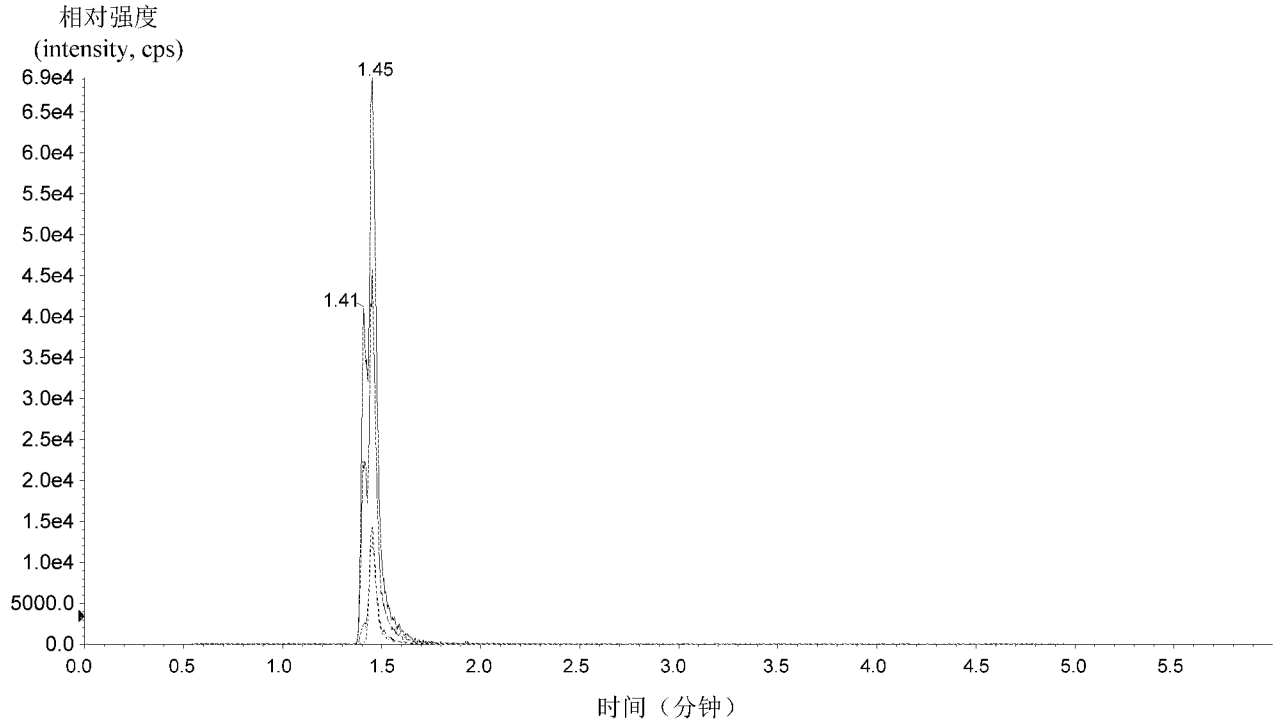


图 15

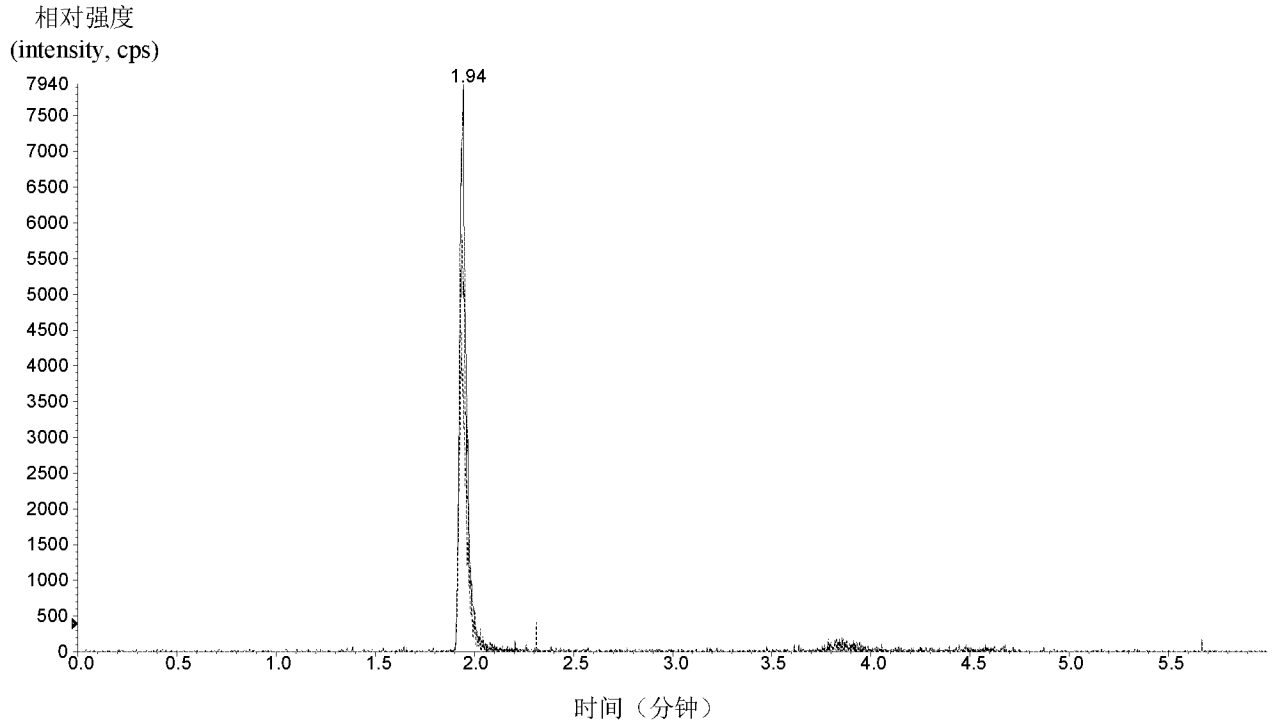


图 16

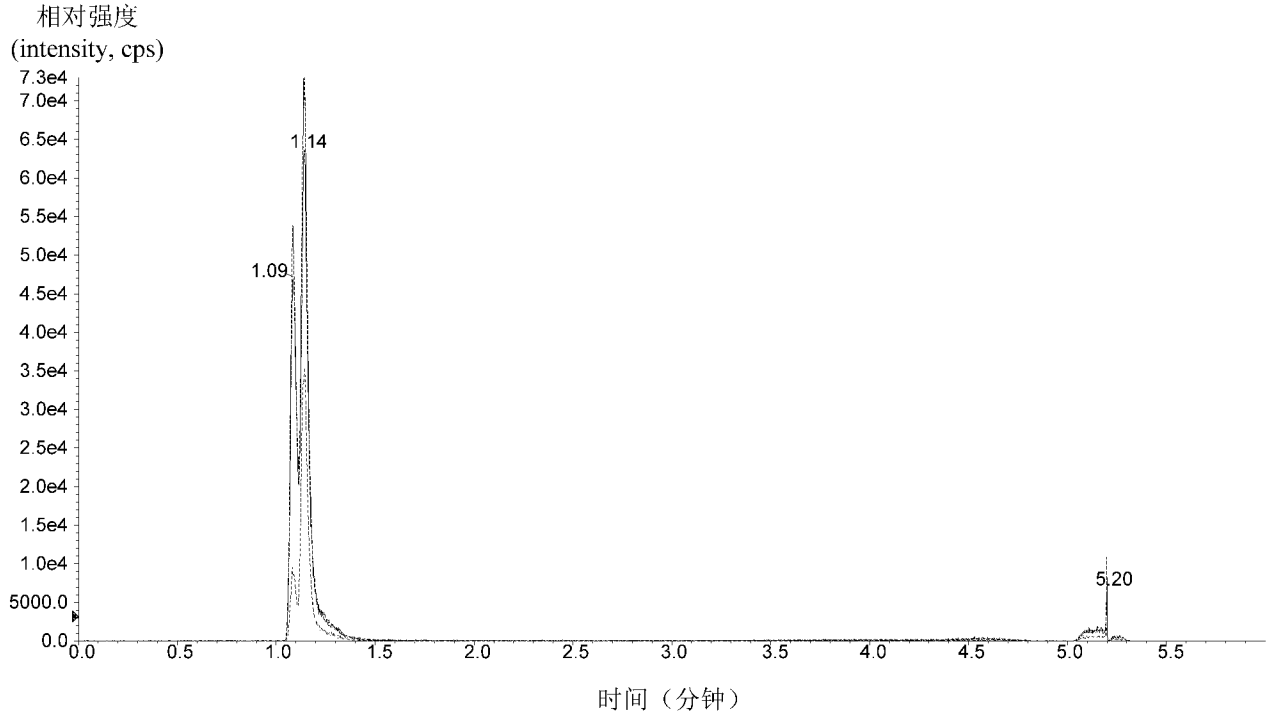


图 17

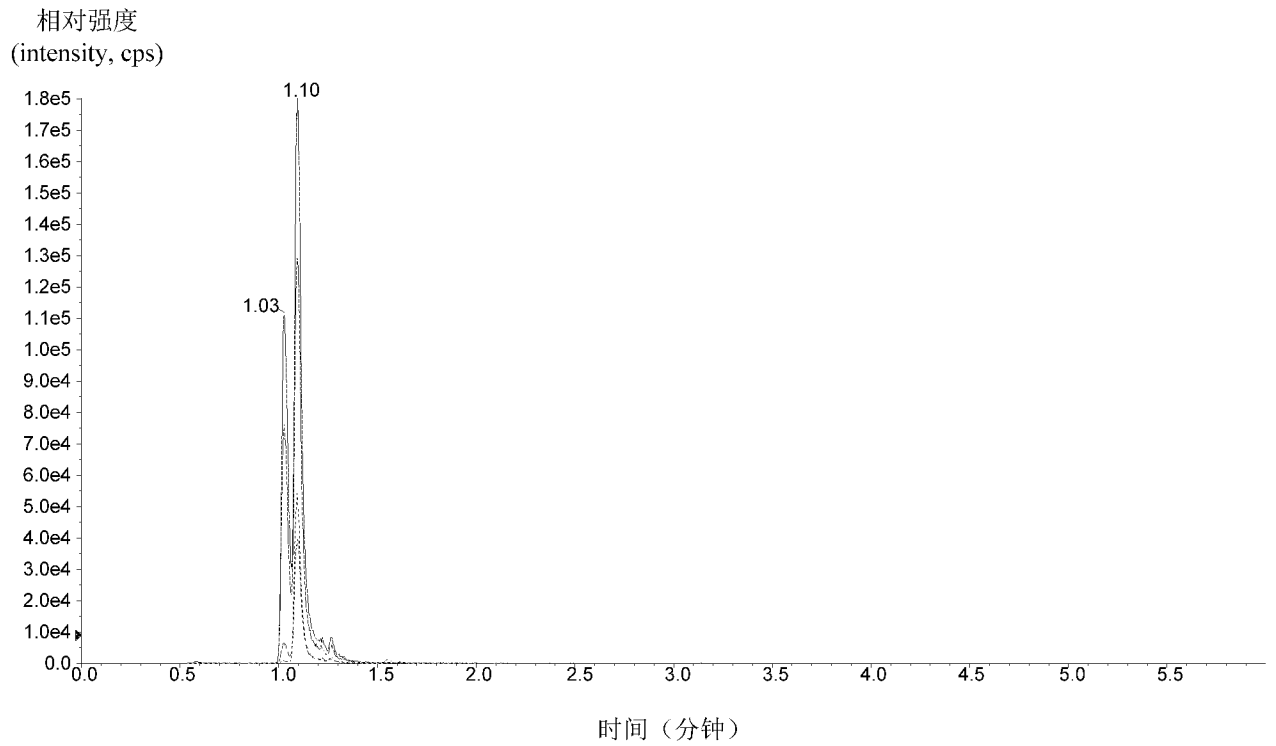


图 18

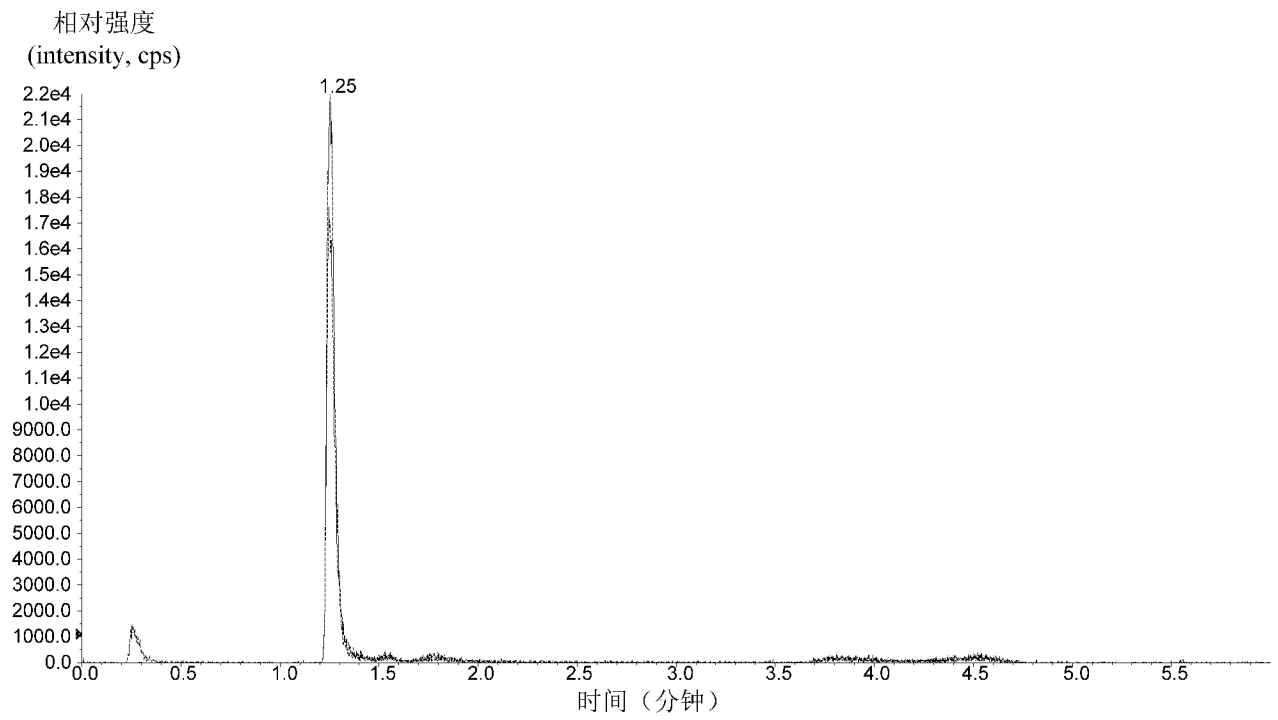


图 19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/101114

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 30/02(2006.01)i; G01N 30/72(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)

G01N30

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)

CPRSABS; CNTXT; CNABS; VEN: 重氮, 雌酮, 胆红素, 液相色谱, 大麻酚, 胆绿素, 雌二醇, 芳香族, 质谱, 雌三醇, 维生素B, 苯二氮卓, 衍生, 酚, 重氮偶联, 试剂盒, aromatic compound, estrogen, bilirubin, cannabinol, biliverdin, estradiol, estriol, vitamin B, benzodiazepine, phenol, diazo+, liquid chromatography, HPLC, mass spectrum, MS, kit

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 107607638 A (LUO, YIQI) 19 January 2018 (2018-01-19) claims 1-20	1-19
Y	CN 106525747 A (CHANGZHOU INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 22 March 2017 (2017-03-22) claims 1-3	1-5, 13-15
Y	CN 106248838 A (HANGZHOU BAICHEN MEDICAL LABORATORY CO., LTD.) 21 December 2016 (2016-12-21) claims 1-4	1-5, 13-15
Y	CN 105842379 A (QUALITY STANDARD AND TESTING TECHNOLOGY INSTITUTE, YUNNAN ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES) 10 August 2016 (2016-08-10) claim 1	1-5, 13-15
Y	CN 106442837 A (HANGZHOU BAICHEN MEDICAL LABORATORY CO., LTD.) 22 February 2017 (2017-02-22) claim 1	1-5, 13-15
A	CN 106018612 A (QUFU NORMAL UNIVERSITY) 12 October 2016 (2016-10-12) entire document	1-20

 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

"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

22 October 2018

Date of mailing of the international search report

01 November 2018

Name and mailing address of the ISA/CN

State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Authorized officer

Facsimile No. (86-10)62019451

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/101114

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2010290948 A1 (SONG, X.D.) 18 November 2010 (2010-11-18) entire document	1-20
<hr/>		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/101114

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	107607638	A	19 January 2018	None			
CN	106525747	A	22 March 2017	None			
CN	106248838	A	21 December 2016	CN	106248838	B	11 September 2018
CN	105842379	A	10 August 2016	None			
CN	106442837	A	22 February 2017	CN	106442837	B	18 May 2018
CN	106018612	A	12 October 2016	None			
US	2010290948	A1	18 November 2010	WO	2010131127	A2	18 November 2010
				WO	2010131127	A3	24 March 2011

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/101114

<p>A. 主题的分类</p> <p>G01N 30/02(2006.01)i; G01N 30/72(2006.01)i</p> <p>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</p>																										
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>G01N30</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>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))</p> <p>CPRSABS;CNTXT;CNABS;VEN:重氮, 雌酮, 胆红素, 液相色谱, 大麻酚, 胆绿素, 雌二醇, 芳香族, 质谱, 雌三醇, 维生素B, 苯二氮卓, 衍生, 酚, 重氮偶联, 试剂盒, aromatic compound, estrogen, bilirubin, cannabinol, biliverdin, estradiol, estriol, vitamin B, benzodiazepine, phenol, diazo+, liquid chromatography, HPLC, mass spectrum, MS, kit</p>																										
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>CN 107607638 A (骆亦奇) 2018年 1月 19日 (2018 - 01 - 19) 权利要求1-20</td> <td>1-19</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 106525747 A (常州工学院) 2017年 3月 22日 (2017 - 03 - 22) 权利要求1-3</td> <td>1-5, 13-15</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 106248838 A (杭州佰辰医学检验所有限公司) 2016年 12月 21日 (2016 - 12 - 21) 权利要求1-4</td> <td>1-5, 13-15</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 105842379 A (云南省农业科学院质量标准与检测技术研究所) 2016年 8月 10日 (2016 - 08 - 10) 权利要求1</td> <td>1-5, 13-15</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 106442837 A (杭州佰辰医学检验所有限公司) 2017年 2月 22日 (2017 - 02 - 22) 权利要求1</td> <td>1-5, 13-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 106018612 A (曲阜师范大学) 2016年 10月 12日 (2016 - 10 - 12) 全文</td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2010290948 A1 (SONG XUEDONG) 2010年 11月 18日 (2010 - 11 - 18) 全文</td> <td>1-20</td> </tr> </tbody> </table> <p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <p>* 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 “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</p>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	CN 107607638 A (骆亦奇) 2018年 1月 19日 (2018 - 01 - 19) 权利要求1-20	1-19	Y	CN 106525747 A (常州工学院) 2017年 3月 22日 (2017 - 03 - 22) 权利要求1-3	1-5, 13-15	Y	CN 106248838 A (杭州佰辰医学检验所有限公司) 2016年 12月 21日 (2016 - 12 - 21) 权利要求1-4	1-5, 13-15	Y	CN 105842379 A (云南省农业科学院质量标准与检测技术研究所) 2016年 8月 10日 (2016 - 08 - 10) 权利要求1	1-5, 13-15	Y	CN 106442837 A (杭州佰辰医学检验所有限公司) 2017年 2月 22日 (2017 - 02 - 22) 权利要求1	1-5, 13-15	A	CN 106018612 A (曲阜师范大学) 2016年 10月 12日 (2016 - 10 - 12) 全文	1-20	A	US 2010290948 A1 (SONG XUEDONG) 2010年 11月 18日 (2010 - 11 - 18) 全文	1-20
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																								
PX	CN 107607638 A (骆亦奇) 2018年 1月 19日 (2018 - 01 - 19) 权利要求1-20	1-19																								
Y	CN 106525747 A (常州工学院) 2017年 3月 22日 (2017 - 03 - 22) 权利要求1-3	1-5, 13-15																								
Y	CN 106248838 A (杭州佰辰医学检验所有限公司) 2016年 12月 21日 (2016 - 12 - 21) 权利要求1-4	1-5, 13-15																								
Y	CN 105842379 A (云南省农业科学院质量标准与检测技术研究所) 2016年 8月 10日 (2016 - 08 - 10) 权利要求1	1-5, 13-15																								
Y	CN 106442837 A (杭州佰辰医学检验所有限公司) 2017年 2月 22日 (2017 - 02 - 22) 权利要求1	1-5, 13-15																								
A	CN 106018612 A (曲阜师范大学) 2016年 10月 12日 (2016 - 10 - 12) 全文	1-20																								
A	US 2010290948 A1 (SONG XUEDONG) 2010年 11月 18日 (2010 - 11 - 18) 全文	1-20																								
国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期																									
2018年 10月 22日	2018年 11月 1日																									
ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员																									
中华人民共和国国家知识产权局 (ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	张羽霖																									
传真号 (86-10) 62019451	电话号码 62084123																									

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/101114

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	107607638	A	2018年 1月 19日	无			
CN	106525747	A	2017年 3月 22日	无			
CN	106248838	A	2016年 12月 21日	CN	106248838	B	2018年 9月 11日
CN	105842379	A	2016年 8月 10日	无			
CN	106442837	A	2017年 2月 22日	CN	106442837	B	2018年 5月 18日
CN	106018612	A	2016年 10月 12日	无			
US	2010290948	A1	2010年 11月 18日	WO	2010131127	A2	2010年 11月 18日
				WO	2010131127	A3	2011年 3月 24日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)