

(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
2023 年 1 月 5 日 (05.01.2023)



(10) 国际公布号
WO 2023/274367 A1

(51) 国际专利分类号:
G01N 27/64 (2006.01)

200240 (CN)。李顺祥(LI, Shunxiang); 中国上海市闵行区东川路800号, Shanghai 200240 (CN)。

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/102857

(22) 国际申请日: 2022 年 6 月 30 日 (30.06.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202110751014.7	2021年7月2日 (02.07.2021)	CN
202110756337.5	2021年7月5日 (05.07.2021)	CN
202110780476.1	2021年7月9日 (09.07.2021)	CN
202110852545.5	2021年7月27日 (27.07.2021)	CN

(71) 申请人: 上海交通大学(SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国上海市闵行区东川路800号, Shanghai 200240 (CN)。

(72) 发明人: 钱昆(QIAN, Kun); 中国上海市闵行区东川路800号, Shanghai 200240 (CN)。曹敬(CAO, Jing); 中国上海市闵行区东川路800号, Shanghai

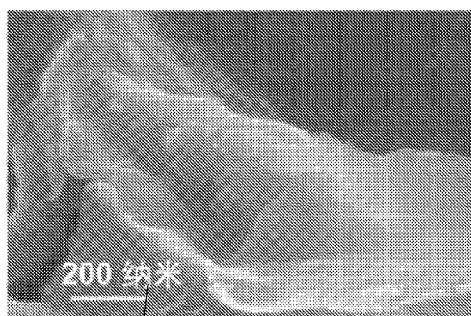
(74) 代理人: 上海科盛知识产权代理有限公司(SHANGHAI KESHENG INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY LTD.); 中国上海市徐汇区零陵路899号飞洲国际大厦18F座, Shanghai 200030 (CN)。

(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, IQ, IR, IS, IT, JM, 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, 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, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,

(54) **Title:** PREPARATION OF NANO-ENHANCED CHIP AND USE THEREOF IN LASER DISSOCIATION MASS SPECTROMETRY DETECTION OF SMALL MOLECULE METABOLITE

(54) 发明名称: 纳米增强芯片的制备及其在小分子代谢物激光解离质谱检测中的应用



AA

图 1

AA

Nanometer

(57) **Abstract:** A method for preparing a metal organic framework material and the use thereof in the detection of a small molecule. The preparation method comprises: mixing dimethylformamide, ethanol, deionized water, triethylamine and terephthalic acid, adding the mixture to a closed container, and adding metal chloride to form a mixture; performing ultrasonic treatment with a water bath and then centrifuging and washing same; and dispersing the product in deionized water, and separating an ultra-thin metal organic framework material by means of low-speed centrifugation. The metal ion in the metal organic framework material and the thickness thereof can be accurately adjusted, the defect of a traditional matrix is overcome, and a low-sample volume, high-speed, high-throughput and high-sensitivity detection of the small molecule in serum is realized.

(57) **摘要:** 一种金属有机框架材料的制备方法及其小分子检测应用, 制备方法包括将二甲基甲酰胺、乙醇、去离子水、三乙胺、对苯二甲酸混合加入一密闭容器中, 并加入金属氯化物形成混合物; 水浴超声后离心并洗涤; 产物分散在去离子水中, 采用低速离心分离出超薄金属有机框架材料。可对金属有机框架材料中金属离子和厚度进行精准调节, 克服传统基质的缺陷, 实现低样本量、快速、高通量、高灵敏度地对血清小分子进行检测。

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)。

根据细则4.17的声明：

- 关于发明人身份(细则4.17(i))
- 发明人资格(细则4.17(iv))

本国际公布：

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

纳米增强芯片的制备及其在小分子代谢物激光解离质谱检测中的应用

技术领域

本发明涉及复合纳米材料芯片合成领域，尤其是涉及纳米增强芯片及其在小分子代谢物激光解离质谱检测中的应用。

背景技术

生物标志物（蛋白质、核酸、代谢物等）检测因其无创等特点，在体外诊断中发挥越来越重要的作用。与功能受表观遗传调控的基因和翻译后修饰的蛋白质不同，代谢物是生化活性的直接标志，更易与表型相关联。大分子物质如核酸、蛋白等，可经由聚合酶链式反应、荧光增强等技术支持下，将微量物质扩展至可检测水平，从而用于疾病诊断。相比于大分子物质，针对小分子代谢物的信号扩增仍然面临巨大挑战，需要开发用于小分子代谢物的高灵敏度检测方法。

目前，小分子代谢物的检测主要依托于两大技术：质谱技术和核磁共振波谱技术。由于核磁共振波谱技术的灵敏度和分子识别方面均存在固有的局限性，因此质谱被认为是小分子代谢物的首要检测技术。其中，气相/液相色谱-质谱联用技术是代谢物检测最主要的质谱技术手段，然而这些方法需要对样品进行脱盐、除蛋白、衍生化、浓缩等复杂的预处理，才能实现代谢物检测，对样本量需求高且耗时。基质辅助激光解吸电离质谱(MALDI MS)通过引入基质材料用于光子吸收，促进待测物质从固相至气相转换，可以直接实现微量待测物质的高灵敏度、高通量检测。

基质材料决定 MALDI MS 检测性能，传统的有机基质容易在小分子量端($m/z < 400$)产生强的背景信号，而这些噪声对于小分子的检测带来极大的干扰，影响检测效果。此外，复杂生物样品中存在着各种的生物大分子，且不同的酸碱度以及高盐度都会对小分子的检测带来阻碍，因此传统的有机基质难以满足小分子的检测需求。传统的无机纳米材料（如碳基、硅基、贵金属材料等）虽然可以用于小分子代谢物的检测，但在对复杂生物样本检测时，仍然存在局限性。

发明内容

本发明的目的在于开发纳米增强芯片及其在小分子代谢物激光解离质谱检测中的应用。

具体而言，本发明涉及的方案包括：

- (一) 提供一种金属有机框架材料的制备方法及其小分子检测应用；
- (二) 提供一种亚微反应器的制备方法及其基于其的血清代谢物检测方法；
- (三) 提供一种多角星形状 Au@ZnO 纳米复合材料及其制备方法和应用；
- (四) 提供一种多孔合金纳米材料的制备方法及其在检测血浆代谢物中的应用。

也就是本申请中涉及的纳米增强芯片可以为下述的金属有机框架材料、亚微反应器、多角星形状 Au@ZnO 纳米复合材料以及多孔合金纳米材料。

本发明的目的可以通过以下技术方案来实现：

- (一) 提供一种金属有机框架材料的制备方法及其小分子检测应用

首先提供了一种金属有机框架材料的制备方法，所述方法包括以下步骤：

步骤 1、将二甲基甲酰胺，乙醇，去离子水，三乙胺，对苯二甲酸混合加入一密闭容器中，并加入金属氯化物形成混合物；

步骤 2、将所述混合物进行水浴超声反应，得到反应物；

步骤 3、将所述反应物进行离心并洗涤，除去残留的所述二甲基甲酰胺，得到产物；

步骤 4、将步骤 3 中所述产物分散在去离子水中，采用低速离心分离出超薄金属有机框架材料。

进一步地，步骤 1 所述金属氯化物为氯化亚铁、氯化钴和氯化镍中的一种，对应步骤 4 分别得到超薄铁金属有机框架材料、超薄钴金属有机框架材料和超薄镍金属有机框架材料。

进一步地，步骤 2 所述水浴超声反应条件为 0°C 条件下反应 4 小时。

进一步地，步骤 3 所述洗涤方法为采用去离子水和异丙醇各洗涤五次。

进一步地，所述超薄铁金属有机框架材料进一步分离得到多层铁金属有机框架材料。

进一步地，所述超薄镍金属有机框架材料为单层镍金属有机框架材料。

进一步，本发明还提供一种金属有机框架材料在小分子检测中的应用。

进一步地，包括以下步骤：

步骤 1、将基质辅助激光解吸电离质谱检测模式设置为正离子反射模式；

步骤 2、对血清样品进行比例稀释；

步骤 3、在质谱靶板上进行样品制备，所述超薄金属有机框架材料作为基质，室温下干燥；

步骤 4、对所述血清样品中的小分子进行检测；

步骤 5、分析原始质谱图谱，并获得检测结果。

进一步地，步骤 4 所述小分子的分子量范围为小于 1000Da。

进一步地，步骤 4 所述小分子包括氨基酸、核苷等。

(二) 提供一种亚微反应器的制备方法及其基于其的血清代谢物检测方法；

本发明中提供了一种亚微反应器的制备方法，包括如下步骤：

步骤 2.1：将 3-氨基苯酚 APF 溶解于去离子水中，并加入甲醛溶液和氨水溶液；

步骤 2.2：将步骤 2.1 的混合物在 30℃ 条件下，反应 30 分钟；

步骤 2.3：将步骤 2.2 中的反应物进行离心洗涤，得到 APF 亚微材料。

进一步地，直接将步骤 2.2 中的反应物进行离心，并采用去离子水洗涤，得到球形的 APF 亚微材料 APF-sphere。

进一步地，还包括向步骤 2.2 中的反应物中加入丙酮溶液，在 30℃ 条件下，反应 180 分钟；将反应物进行离心，并采用去离子水洗涤，得到碗形的 APF 亚微材料 APF-bowl。

进一步地，将得到的所述 APF-sphere 分散在去离子水中，并加入氯金酸溶液，反应得到 APF-sphere&Au。

进一步地，所述氯金酸溶液的加入量为 2ml。

进一步地，将得到的所述 APF-bowl 分散在去离子水中，制备三份反应液，分别加入 1.5、2 和 2.5ml 氯金酸溶液中，反应得到 APF-bowl&Au-1、APF-bowl&Au-2 以及 APF-bowl&Au-3。

进一步地，反应条件为在 70℃ 条件下，反应 10 分钟。

本发明中还提供一种根据上述的亚微反应器的血清代谢物检测方法，包括如下步骤：

(1) 仪器与试剂的准备：将基质辅助激光解吸电离质谱检测模式设置为正离子反射模式；

(2) 将得到的 APF-sphere&Au、APF-bowl&Au-1、APF-bowl&Au-2 以及 APF-bowl&Au-3 分散在去离子水中，作为基质使用

(3)对血清样品进行比例稀释；

(4)在质谱靶板上进行样品制备，采用(2)中的所述基质，室温下干燥；

(5)对血清样品中的小分子进行检测；

(6)分析原始质谱图谱，并获得检测结果。

进一步地，检测分子量范围为小于 1000Da。

进一步地，检测的物质包括氨基酸和糖醇。

(三) 提供一种多角星形状 Au@ZnO 纳米复合材料及其制备方法和应用

本发明提供一种多角星形状 Au@ZnO 纳米复合材料作为基质材料在小分子代谢物的基质辅助激光解吸电离质谱检测中的应用。

优选地，小分子代谢物中的小分子选自脯氨酸、赖氨酸、精氨酸、蔗糖和葡萄糖中的一种以上。

本发明提供一种多角星形状 Au@ZnO 纳米复合材料作为基质材料在血清代谢物的基质辅助激光解吸电离质谱检测中的应用。

本发明提供一种根据上述的多角星形状 Au@ZnO 纳米复合材料的制备方法，其包括如下步骤：

(1)、纳米金溶液的制备：水合四氯金酸溶液搅拌加热至 $120 \pm 1^\circ\text{C}$ 后，加入二水合柠檬酸钠，恒温下搅拌 $30 \pm 0.1\text{min}$ ，冷却至室温备用；

(2)、氧化锌的制备：将醋酸锌溶液加入氢氧化钠溶液中，加热至 $60 \pm 1^\circ\text{C}$ 且保温 $1 \pm 0.1\text{h}$ ，离心收集沉淀，洗涤，在 $50 \pm 1^\circ\text{C}$ 下干燥备用；

(3)、多角星形状 Au@ZnO 纳米复合材料的制备：醋酸锌溶液和纳米金溶液混合，得到混合液，在混合液内加入氢氧化钠溶液，加热至 $60 \pm 1^\circ\text{C}$ 且保温 $1 \pm 0.1\text{h}$ ，离心收集沉淀，洗涤，在 $50 \pm 1^\circ\text{C}$ 下干燥备用。

优选地，步骤(1)中，搅拌的转速为 $800 \pm 10\text{rpm}$ 。

优选地，步骤(2)和步骤(3)中，离心的转速为 $1000 \pm 10\text{rpm}$ 。

本发明提供一种多角星形状 Au@ZnO 纳米复合材料，其由上述的制备方法得到。

(四)提供一种多孔合金纳米材料的制备方法及其在检测血浆代谢物中的应用

本发明所要解决的技术问题是如何具有更好的 LDI 效率的 MALDI MS 基质，用于复杂生物样本(血浆)代谢物的检测。基于此，本发明提供一种多孔合金纳米材料的制备方法，所述方法包括以下步骤：

步骤 1、将 Na_2PdCl_4 、 $\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、盐酸和 F127 充分混合，超声溶解；

步骤 2、待完全溶解后，加入抗坏血酸溶液，并立刻置于水浴超声反应；

步骤 3、随后加入 $\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 溶液反应；

步骤 4、最后分别用无水乙醇和水离心洗涤后干燥得到所述多孔合金纳米材料 PdPtAu。

进一步地，步骤 1 所述 Na_2PdCl_4 、 $\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、盐酸和 F127 用量分别为 20Mm 的 Na_2PdCl_4 加入 0.6mL，20Mm 的 $\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 加入 3mL，6.0M 的盐酸加入 60 μL ，F127 加入 60mg。

进一步地，步骤 2 所述抗坏血酸溶液加入量为 0.1M 的抗坏血酸溶液加入 3mL。

进一步地，步骤 2 所述水浴超声反应为在 45℃ 反应 3h。

进一步地，步骤 3 所述 $\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 溶液的浓度为 10Mm-40 Mm，加入量为 1.2mL。

进一步地，步骤 3 所述离心洗涤次数为 3 次，转速为 10000rpm，干燥温度为 50.℃ 上述多孔合金纳米材料在检测血浆代谢物中的应用，所述多孔合金纳米材料作为基质辅助激光解吸电离质谱的基质。

进一步地，包括以下步骤：

步骤 1、将所述多孔合金纳米材料 PdPtAu 分散在去离子水中；

步骤 2、将血浆与等体积甲醇/乙腈混合液混合，所述甲醇/乙腈体积比为 1:1，摇床震荡 10min，离心 10min，取上清液用于质谱检测；

步骤 3、所述基质辅助激光解吸电离质谱采用正离子反射模式，在所述基质辅助激光解吸电离质谱的质谱靶板上进行样品制备，所述样品为 1 μL 血浆提取液，对血浆样品中的小分子进行检测。

进一步地，所述小分子的分子量范围为小于 1000Da。

进一步地，所述小分子为糖类或氨基酸。

与现有技术相比，本发明具有以下优点及有益效果：

（一）提供的一种金属有机框架材料的制备方法及其小分子检测应用中，可以对金属有机框架材料中金属离子(包括铁、钴、镍)和厚度(包括超薄和多层)进行精准调节，实现了克服传统基质的缺陷，样本量低(0.1 微升)、快速(小于 1 分钟)、高通量(约 120000 个数据点，300 多个代谢特征)、高灵敏度地对血清进行检测。金属有机框架材料采用过渡金属，相较于贵金属制备成本低，具有优越的成本效益，

且可以通过一步法制备，合成步骤简易。通过对系列金属有机框架材料进行优化，优化后的超薄铁金属有机框架材料，为分子检测提供了大量的活性位点，作为 MALDI-TOF-MS 检测中的基质材料，可以解决传统有机基质在低分子量段 ($m/z < 1000$) 的干扰以及热点效应等固有缺陷，实现血清样本的高效分析。血清样本仅需经过简单的，就可高效、快速的检测分析血清中的小分子代谢物。

(二) 提供的一种亚微反应器的制备方法及基于其的血清代谢物检测方法中，系列亚微反应器芯片材料制备步骤简单，合成过程安全且产量较大，具有优越的成本效益。将优化的亚微反应器芯片材料作为激光解吸电离飞行时间质谱的基底材料，相较于传统的有机基质材料，在低分子量段 ($m/z < 400$) 可实现血清代谢小分子物质的灵敏检测。优化后的亚微反应器芯片材料仅 0.1 微升的血清样本，即可实现血清的高通量(约 120000 个数据点，300 多个代谢特征)、快速(小于 1 分钟)检测。基于以上显著优势，亚微反应器芯片材料有望实现临床大范围的血清检测，并应用于治疗检测中并筛选出相应的治疗疗效代谢生物标志物。

(三) 提供的多角星形状 Au@ZnO 纳米复合材料及其制备方法和应用中，与有机基质相比，Au@ZnO 纳米复合材料作为激光解吸电离质谱的基质，可以解决传统有机基质的热点效应以及在低分子量区有干扰的问题。与无机基质相比，本发明的 Au@ZnO 纳米复合材料却能结合贵金属和半导体材料两者的优势，通过肖特基效应提高热载流子产生效应，具有高度的可调控性，通过两者的协同效应提高检测效率并降低成本。本发明特殊多角星形状的复合纳米颗粒，与传统核壳纳米材料或者球状纳米材料相比，在尖端和凹陷处增强了电磁场，有助于增强表面等离子共振，提高了激光解吸电离效应，同时有助于提高比表面积增强小分子代谢物的吸附性，故多角星形的 Au@ZnO 复合纳米材料用于 LDI MS 中的小分子代谢物和血清代谢物的检测。

(四) 提供的多孔合金纳米材料的制备方法及其在检测血浆代谢物中的应用中，多孔 PdPtAu 合金，通过一步法即可合成，合成步骤简单，制备成本低。该纳米材料作为激光解吸电离质谱的基质，可以解决传统有机基质的热点效应以及在低分子量区有干扰的问题。本发明中，血浆样本只需经过简单的预处理，并且每份样本只需要 1 μ L 血浆提取液，就可快速、灵敏的检测血浆中的小分子代谢物。这种方法准确率高、成本低、检测通量高，满足了临床血浆检测的需求。

附图说明

图 1 是金属有机框架材料的制备方法及其小分子检测应用中一个较佳实施例制备得到的超薄铁金属有机框架的扫描电子显微镜表征图片；

图 2 是金属有机框架材料的制备方法及其小分子检测应用中制备得到的金属有机框架基质辅助激光解吸电离质谱检测脯氨酸标准分子的质谱图；

图 3 是金属有机框架材料的制备方法及其小分子检测应用中较佳实施例制备得到的金属有机框架基质辅助激光解吸电离质谱检测肌酐标准分子的质谱图；

图 4 是金属有机框架材料的制备方法及其小分子检测应用中较佳实施例制备得到的金属有机框架解吸基质辅助激光解吸电离质谱检测血清低分子量段的质谱图；

图 5 是金属有机框架材料的制备方法及其小分子检测应用中较佳实施例制备得到的金属有机框架解吸基质辅助激光解吸电离质谱检测不同血清样本的小分子，在 MATLAB 进行疾病组和对照组的血清样本检测及鉴别。

图 6 是亚微反应器的制备方法及其基于其的血清代谢物检测方法中一个较佳实施例的 APF-sphere 的扫描电子显微镜图；

图 7 是亚微反应器的制备方法及其基于其的血清代谢物检测方法中一个较佳实施例的 APF-bowl 透射电子显微镜表征图；

图 8 是亚微反应器的制备方法及其基于其的血清代谢物检测方法中一个较佳实施例的 APF-sphere&Au 扫描电子显微镜表征图；

图 9 是亚微反应器的制备方法及其基于其的血清代谢物检测方法中一个较佳实施例的 APF-bowl&Au 扫描电子显微镜表征图；

图 10 是亚微反应器的制备方法及其基于其的血清代谢物检测方法实施例一中采用系列亚微反应器芯片材料(包括 APF-sphere&Au、APF-bowl&Au-1、APF-bowl&Au-2 以及 APF-bowl&Au-3)用于 MALDI-TOF-MS 检测亮氨酸标准分子的五次独立实验的统计柱状图结果；

图 11 是亚微反应器的制备方法及其基于其的血清代谢物检测方法实施例二中采用系列亚微反应器芯片材料(包括 APF-sphere&Au、APF-bowl&Au-1、APF-bowl&Au-2 以及 APF-bowl&Au-3)用于 MALDI-TOF-MS 检测甘露醇标准分子的五次独立实验的统计柱状图结果；

图 12 是亚微反应器的制备方法及其基于其的血清代谢物检测方法中实施例三中

基质辅助激光解吸电离质谱检测血清低分子量段的质谱图；

图 13 是亚微反应器的制备方法及其基于其的血清代谢物检测方法中实施例四中基质辅助激光解吸电离质谱检测不同血清样本的小分子，在患者进行化疗前和化疗后的差异监测。

图 14 为现有技术中 ZnO 和本发明的多角星形状 Au@ZnO 纳米复合材料的表征图(图 14a 为现有技术中纳米 ZnO 的扫描电镜图，图 14b 为本发明的多角星形状 Au@ZnO 纳米复合材料的扫描电镜图，图 14c 为本发明的多角星形状 Au@ZnO 纳米复合材料的线扫能量色散 x 射线(EDX)分析图，图 14d 为本发明的多角星形状 Au@ZnO 纳米复合材料的元素分布图，图 14e 为 ZnO 和本发明的多角星形状 Au@ZnO 纳米复合材料的 EDX 结果图，图 14f 为 Au、ZnO 和本发明的多角星形状 Au@ZnO 纳米复合材料的紫外可见吸收光谱图，图 14g 为本发明的多角星形状 Au@ZnO 纳米复合材料的选区电子衍射图)。

图 15 为本发明的实施例中多角星形状 Au@ZnO 纳米复合材料的 MALDI MS 检测中 4 种标准小分子的质谱图(图 15a 为葡萄糖(Glucose)，图 15b 为蔗糖(Saccharose)，图 15c 为脯氨酸(Proline)，图 15d 为赖氨酸(Lysine))。

图 16 为本发明的实施例中多角星形状 Au@ZnO 纳米复合材料的 MALDI MS 检测中 4 种标准小分子和血清代谢物的质谱图(图 16a 为含有氯化钠的四种代谢物混合溶液，图 16b 为含有牛血清白蛋白的四种代谢物混合溶液，图 16c 为含有 CHCA 的四种代谢物混合溶液，图 16d 为含有 CHCA 的四种代谢物混合溶液，图 16e 是标准血清的质谱检测图)。

图 17 是多孔合金纳米材料的制备方法及其在检测血浆代谢物中的应用中一个较佳实施例的多孔 PdPtAu 纳米材料的扫描电镜表征图片；

图 18 是多孔合金纳米材料的制备方法及其在检测血浆代谢物中的应用中一个较佳实施例的多孔 PdPtAu 纳米材料的透射电镜表征图片；

图 19 是多孔合金纳米材料的制备方法及其在检测血浆代谢物中的应用中一个较佳实施例的多孔 PdPtAu 纳米材料作为基质辅助激光解吸电离质谱检测标准小分子的质谱图；

图 20 是多孔合金纳米材料的制备方法及其在检测血浆代谢物中的应用中一个较佳实施例的多孔 PdPtAu 纳米材料作为基质辅助激光解吸电离质谱检测含有 a) NaCl 和 b) 牛血清白蛋白的小分子的质谱图；

图 21 是多孔合金纳米材料的制备方法及其在检测血浆代谢物中的应用中一个较佳实施例的多孔 PdPtAu 纳米材料作为基质辅助激光解吸电离质谱检测血浆样本中小分子代谢物的质谱图。

具体实施方式

下面结合附图和具体实施例对本发明进行详细说明。

(一) 提供关于金属有机框架材料的制备方法及其小分子检测应用的实施例 制备方法实施例 1

步骤 1: 仪器与试剂的准备: 将基质辅助激光解吸电离质谱检测模式设置为正离子反射模式;

步骤 2: 制备金属有机框架系列基质, 包括以下步骤;

步骤 2.1: 将二甲基甲酰胺, 乙醇, 去离子水, 三乙胺, 对苯二甲酸混合加入一密闭容器中, 并分别加入金氯化亚铁或氯化钴或氯化镍;

步骤 2.2: 在步骤 2.1 的混合物在 0℃ 条件下, 水浴超声反应 4 小时;

步骤 2.3: 将步骤 2.2 中的反应物进行离心, 并采用去离子水和异丙醇各洗涤五次, 除去残留的二甲基甲酰胺;

步骤 2.4: 将步骤 2.3 中的产物分散在去离子水中, 采用低速离心分离出超薄金属有机框架材料(MOF-UL), 根据金属氯化物的差异, 分别得到超薄铁金属有机框架材料(Fe-MOF-UL)、超薄钴金属有机框架材料(Co-MOF-UL)和单层镍金属有机框架材料(Ni-MOF-UL);

步骤 2.5: 将步骤 2.4 中的沉积物中分离出多层铁金属有机框架材料(Fe-MOF-Bulk);

步骤 2.6: 将步骤 2.4 和步骤 2.5 中得到的 Fe-MOF-UL, Co-MOF-UL 或 Ni-MOF-UL, 以及 Fe-MOF-Bulk, 分散在去离子水中, 作为基质使用;

步骤 3: 对血清样品进行比例稀释;

步骤 4: 在质谱靶板上进行样品制备, 基质采用优化的 Fe-MOF-UL, 室温下干燥;

步骤 5: 对血清样品中的小分子进行检测;

步骤 6: 分析原始质谱图谱, 并获得检测结果。

如图 1 所示, 采用 Hitachi S-4800 扫描电子显微镜获取透射电镜结果。所制备的超薄铁金属有机框架材料呈层状结构, 合成的材料厚度较薄, 表面结构均一。

应用实施例 1

对脯氨酸标准品的检测:

(1) 仪器与试剂的准备: 将基质辅助激光解吸电离质谱检测模式设置为正离子反射模式; 所制备 MOF 材料; 配置好的脯氨酸标准溶液;

(2) 在质谱靶板上进行样本制备, 室温下干燥;

(3) 在质谱仪下进行检测, 并对质谱图像进行分析, 结果如图 2 所示;

应用实施例 2

对肌酐标准品的检测:

(1) 仪器与试剂的准备: 将基质辅助激光解吸电离质谱检测模式设置为正离子反射模式; 所制备 MOF 材料; 配置好的肌酐标准溶液;

(2) 在质谱靶板上进行样本制备, 室温下干燥;

(3) 在质谱仪下进行检测, 并对质谱图像进行分析, 结果如图 3 所示;

应用实施例 3

对血清样本小分子的检测:

(1) 仪器与试剂的准备: 将基质辅助激光解吸电离质谱检测模式设置为正离子反射模式; 所制备的系列金属有机框架材料, 包括 Fe-MOF-UL, Co-MOF-UL, Ni-MOF-UL, 以及 Fe-MOF-Bulk;

(2) 按一定比例稀释血清样本;

(3) 在质谱靶板上进行样本制备, 室温下干燥;

(4) 在质谱仪下进行检测, 并对质谱图像进行分析, 结果如图 4 所示。

应用实施例 4

对疾病组和对照组血清样本检测及鉴别, 其中疾病组为 23 例病人血清样本, 对照组为 23 个健康志愿者血清样本:

(1) 仪器与试剂的准备: 将基质辅助激光解吸电离质谱检测模式设置为正离子反射模式; 所制备 MOF 材料; MATLAB 分析软件;

(2) 按一定比例稀释血清样本;

(3) 在质谱靶板上进行样本制备, 室温下干燥;

(4) 在质谱仪下进行检测, 收集质谱数据;

(5)对质谱数据进行预处理,并采用 MATLAB 分析软件进行分析,结果如图 5 所示。

(二)提供一种亚微反应器的制备方法及其基于其的血清代谢物检测方法的实施例;

技术方案如下:

步骤 1: 仪器与试剂的准备: 将基质辅助激光解吸电离质谱检测模式设置为正离子反射模式;

步骤 2: 制备亚微反应器, 包括以下步骤;

步骤 2.1: 将 0.1 克 3-氨基苯酚(APF)溶解于 30 毫升去离子水中, 加入 0.1 毫升甲醛溶液和 0.1 毫升氨水溶液;

步骤 2.2: 步骤 2.1 的混合物在 30℃条件下, 反应 30 分钟;

步骤 2.3: 将步骤 2.2 中的反应物进行离心, 并采用去离子水洗涤五次, 得到球形的 APF 亚微材料(APF-sphere);

步骤 2.4: 向步骤 2.2 中的反应物中加入 40 毫升丙酮溶液, 在 30℃条件下, 反应 180 分钟;

步骤 2.5: 将步骤 2.4 中的反应物进行离心, 并采用去离子水洗涤五次, 得到碗形的 APF 亚微材料(APF-bowl);

步骤 2.6: 将步骤 2.3 得到的 APF-sphere, 取 10 毫克分散在 10 毫升去离子水中, 并加入 2 毫升质量浓度为 1%的氯金酸溶液;

步骤 2.7: 将步骤 2.5 得到的 APF-bowl, 取 10 毫克分散在 10 毫升去离子水中, 制备三份上述反应液, 并分别加入 1.5、2、2.5 毫升质量浓度为 1%的氯金酸溶液;

步骤 2.8: 将步骤 2.6 和步骤 2.7 中分别得到的反应物在 70℃条件下, 反应 10 分钟, 离心水洗, 依次得到 APF-sphere&Au、APF-bowl&Au-1、APF-bowl&Au-2 以及 APF-bowl&Au-3;

步骤 2.9: 将步骤 2.8 中得到的 APF-sphere&Au、APF-bowl&Au-1、APF-bowl&Au-2、以及 APF-bowl&Au-3 分散在去离子水中, 作为基质使用;

步骤 3: 对血清样品进行比例稀释, 10 倍比例稀释;

步骤 4: 在质谱靶板上进行样品制备, 采用步骤 2.9 中基质, 优选采用 APF-bowl&Au-2, 室温下干燥;

步骤 5: 对血清样品中的小分子进行检测;

步骤 6: 分析原始质谱图谱, 并获得检测结果。

进一步地, 采用碗形结构、以及 2 毫升氯金酸反应所得的 APF-bowl&Au-2 质谱检测性能最佳。检测分子量范围为小于 1000Da。检测的物质包括氨基酸和糖醇。

表征所用仪器

采用 Hitachi S-4800 扫描电子显微镜获取 SEM 结果。采用 JEOL JEM-2100F 透射电子显微镜获取 TEM 结果。

表征结果为:

如图 6 至图 9 所示, 所制备的 APF-sphere、APF-bowl 表面光滑, 形态均一, 而经过氯金酸修饰后的 APF-sphere&Au 和 APF-bowl&Au 表面粗糙, 可以看到明显的金颗粒。

实施例一: 亮氨酸标准品的检测

仪器与试剂的准备: 将基质辅助激光解吸电离质谱检测模式设置为正离子反射模式; 所制备亚微反应器基质材料, 包括 APF-sphere&Au、APF-bowl&Au-1、APF-bowl&Au-2 以及 APF-bowl&Au-3; 配置好亮氨酸标准溶液; 在质谱靶板上进行样本制备, 室温下干燥; 在质谱仪下进行检测, 并对质谱图像进行分析, 如图 10 所示。

实施例二: 甘露醇标准品的检测

仪器与试剂的准备: 将基质辅助激光解吸电离质谱检测模式设置为正离子反射模式; 所制备亚微反应器基质材料, 包括 APF-sphere&Au、APF-bowl&Au-1、APF-bowl&Au-2、以及 APF-bowl&Au-3; 配置好甘露醇标准溶液; 在质谱靶板上进行样本制备, 室温下干燥; 在质谱仪下进行检测, 并对质谱图像进行分析, 如图 11 所示;

实施例三: 血清样本小分子的检测

仪器与试剂的准备: 将基质辅助激光解吸电离质谱检测模式设置为正离子反射模式; 所制备优化的亚微反应器 APF-bowl&Au-2 作为基质材料; 按一定比例稀释血清样本; 在质谱靶板上进行样本制备, 室温下干燥; 在质谱仪下进行检测, 并对质谱图像进行分析, 如图 12 所示。

实施例四: 化疗前后血清样本的检测及监测

仪器与试剂的准备: 将基质辅助激光解吸电离质谱检测模式设置为正离子反射模式; 所制备优化的亚微反应器 APF-bowl&Au-2 作为基质材料; MATLAB 和

Metaboanalyst 分析软件；按一定比例稀释血清样本；在质谱靶板上进行样本制备，室温下干燥；在质谱仪下进行检测，收集质谱数据；对质谱数据进行预处理，并采用 MATLAB 分析软件进行分析，如图 13。

本发明中提供的一种新型的亚微反应器芯片作为基质，用于辅助将基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)，提高其检测性能，尤其是针对复杂的血清样本。通过对亚微反应器芯片材料的形态结构(球性、碗形)和组成成分(金负载含量)进行调控，从而克服传统基质的缺陷，实现快速、高通量、高灵敏度的血清代谢小分子检测。

亚微反应器芯片材料制备简易，合成过程安全且产量较高。通过对亚微反应器芯片材料进行优化，优化后负载金纳米颗粒的 APF-bowl&Au 作为 MALDI-TOF-MS 检测中的基质材料，可以解决传统有机基质在低分子量段的干扰以及热点效应等固有缺陷，实现血清样本的高效分析。本发明中，亚微反应器芯片材料可以辅助质谱实现血清样本中的小分子代谢物检测，且此方法检测灵敏度高、通量高，有应用于临床的潜力。

(三) 提供多角星形状 Au@ZnO 纳米复合材料及其制备方法和应用的实施例

本实施例中提供了一种多角星形状 Au@ZnO 纳米复合材料及其制备方法和应用。

本发明的多角星形状 Au@ZnO 纳米复合材料作为基质材料可以在 MALDI MS 检测中得以应用。进一步地，本发明的多角星形状 Au@ZnO 纳米复合材料作为基质材料在小分子代谢物的 MALDI MS 检测中得以应用。其中，小分子代谢物中的小分子选自脯氨酸、赖氨酸、精氨酸、蔗糖和葡萄糖中的一种以上。

进一步地，本发明的多角星形状 Au@ZnO 纳米复合材料作为基质材料在血清代谢物的 MALDI MS 检测中得以应用。

本发明的多角星形状 Au@ZnO 纳米复合材料的制备方法包括如下步骤：

(1)、采用柠檬酸还原法合成纳米金溶液：水合四氯金酸溶液搅拌加热至 $120 \pm 1^\circ\text{C}$ 后，加入二水合柠檬酸钠，恒温下搅拌 $30 \pm 0.1\text{min}$ ，冷却至室温备用；

(2)、氧化锌的制备：将醋酸锌溶液加入氢氧化钠溶液中，搅拌加热至 $60 \pm 1^\circ\text{C}$ 且保温 $1 \pm 0.1\text{h}$ ，弃去上清液，再用乙醇和水分别洗涤三次，在 $50 \pm 1^\circ\text{C}$ 下干燥备用；

(3)、多角星形状 Au@ZnO 纳米复合材料的制备：醋酸锌溶液和纳米金溶液

混合，得到混合液，在混合液内加入氢氧化钠溶液，继续搅拌加热至 $60 \pm 1^\circ\text{C}$ 且保温 $1 \pm 0.1\text{h}$ ，弃去上清液，再用乙醇和水分别洗涤三次，在 $50 \pm 1^\circ\text{C}$ 下干燥备用。

其中，在步骤(1)中，搅拌的转速为 $800 \pm 10\text{rpm}$ 。在步骤(2)和步骤(3)中，离心的转速为 $1000 \pm 10\text{rpm}$ 。

由上述的制备方法得到本发明的多角星形状 Au@ZnO 纳米复合材料。

总之，本发明的多角星形状 Au@ZnO 纳米复合材料作为基质辅助激光解吸电离质谱用于小分子代谢物和血清代谢物的检测。首先，由于其复合了半导体氧化锌和金属金，通过肖特基效应增强了光电效应和热载流子生成效率，有助于待测物的电离；其次，由于其特殊的多角星形状，在尖端和凹陷处增强了电磁场，有助于增强表面等离子共振，同时增加了比表面积，有助于吸附待检测的代谢物小分子；最后该纳米复合材料在 355nm 波长处有很强的吸收，与基质辅助激光解吸电离质谱的光源波长相匹配，因此通过简单的预处理，简化了样本处理步骤，提高了 LDI 效率，克服了传统 GC/LC MS 需要复杂样本预处理的过程，也克服了传统 LDI MS 基质的缺陷，实现了小分子代谢物和血清代谢物的快速、灵敏和高通量检测。

本发明的多角星形状 Au@ZnO 纳米复合材料制备方法简单，形貌均一，该纳米粒子作为 LDI MS 的基质，可以解决传统基质存在的问题，如低分子量区的背景干扰。本发明中血清样本只需 $1.5 \mu\text{L}$ 血清提取液，就可高效、快速地检测血清中的小分子代谢物。这种检测方法灵敏度高、成本低、检测通量高，满足了临床血清检测的需求，有应用于临床的潜力。

表征所用仪器：

利用 AuCy UV1900 分光光度计和马尔文 Zetasizer NanZS90 获得了纳米材料的消光光谱和表面电荷值。

采用 Hitachi SU8100 获取扫描电子显微镜图片，用 JEOL JEM-2100F 获得透射电子显微镜图片、线扫能量色散 X 光谱和选取电子衍射图谱。

表征结果为：

从图 14a 和图 14b 可以看出纳米 ZnO 和纳米 Au@ZnO 都是多角星形结构， Au@ZnO (图 14b)明显角更多，形貌也更均一，从线扫分析(图 14c，从上至下依次为 Zn、O 和 Au)和元素分布分析(图 14d)来看，得到的 Au@ZnO 包含 Zn、O 和 Au 三种元素，证明了纳米金对氧化锌的形貌影响，由于金属种子粒径较小(30nm)，形成了像花瓣一样的多角星形结构。图 14e 所示的能量色散 x 射线光谱进一步记录了

金属含量从 0% 增加到 1.51% (按重量计算), 表明结果与其他表征一致。紫外-可见光谱分析显示 Au@ZnO 在 355nm 处的吸收最高, 与质谱的 Nd:YAG 激光器的波长一致, 有利于质谱检测(图 14f)。进一步表征了 p-ZnO 复合材料的晶体结构, 与锌铁矿的 [1,0,3]、[1,0,2] 和 [0,0,2] 的晶面相关(图 14g)。综上所述, 等离子体 ZnO 复合材料具有独特的结构和成分, 有 LDI MS 检测的潜力。

本实施例的多角星形状 Au@ZnO 纳米复合材料的制备方法包括如下步骤:

(1)、纳米金溶液的制备: 将 10.45mg 水合四氯金酸溶解在 100mL 烧瓶的去离子水中, 剧烈搅拌下(800rpm)加热至 120℃ 后, 加入 2.0mL、1wt% 二水合柠檬酸钠, 保持 120℃ 搅拌 30min, 冷却至室温备用。

(2)、ZnO 的制备: 将醋酸锌溶液(39mL、0.01mol/L)加入氢氧化钠溶液(65mL、0.03mol/L)中, 加热至 60℃ 且保温 1h, 然后以 10000rpm 下离心 10min, 收集沉淀, 弃去上清液, 再用乙醇和水分别洗涤三次, 得到的沉淀在 50℃ 烘箱中干燥备用。

(3)、多角星形状 Au@ZnO 纳米复合材料的制备: 醋酸锌溶液(39mL、0.01mol/L)和 39mL 纳米金溶液混合搅拌 2min(600rpm), 得到混合液, 在混合液内加入氢氧化钠溶液(65mL、0.03mol/L), 继续搅拌并加热至 60℃ 且保温 1h, 然后以 10000rpm 下离心 10min, 收集沉淀, 弃去上清液, 再用乙醇和水分别洗涤三次, 得到的沉淀在 50℃ 烘箱中干燥备用。

将实施例得到的多角星形状 Au@ZnO 纳米复合材料进行如下实验。

LDI MS 检测:

小分子代谢物的检测: 将标准品小分子(脯氨酸、赖氨酸、蔗糖和葡萄糖)用超纯水配成 1mg/mL 的溶液。

耐盐检测样本是在四种标准品小分子(脯氨酸、赖氨酸、精氨酸和葡萄糖)的混和溶液中加入氯化钠, 最终氯化钠以及小分子的终浓度分别是 0.2mg/mL 和 1mg/mL。对于耐蛋白检测, 检测样本则是在白蛋白与标准品小分子(脯氨酸、赖氨酸、精氨酸和葡萄糖)的混合物, 白蛋白和小分子的终浓度都是 1mg/mL, 从而探索不同基质在高盐浓度和蛋白质中的检测效果。

在一个典型的 LDI MS 实验中, 将 Au@ZnO 纳米复合材料以 1mg/mL 的浓度分散在水中作为基质。对于 Au 纳米颗粒和 ZnO 纳米颗粒作为基质的情况下, 同样以 1mg/mL 的浓度分散在水中。将 1.5 μ L 的分析物溶液(标准小分子溶液或标准血清)滴在抛光型的靶板上, 室温干燥后覆盖上 1.5 μ L 的基质悬浮液, 干燥后进行

LDI 质谱分析。质谱检测采用 AutoFlex TOF/TOF 质谱仪(Bruker, 德国), 装有 Nd:YAG 激光器(2kHz, 355nm)。采集在正反射离子模式下进行, 采用延迟提取, 重复频率为 1000Hz, 加速电压为 20 千伏。本实验的延迟时间优化为 250ns。在所有 LDI MS 实验中, 每次分析的激光射击数为 2000 次。

小分子物质的质谱检测及耐盐耐蛋白测试:

(1)、仪器与试剂的准备: 基质辅助激光解吸电离质谱, 采用阳离子反射模式检测; 将 Au@ZnO 纳米复合材料配制成悬浮液, 并配制单一的标准品小分子(葡萄糖、蔗糖、脯氨酸、赖氨酸)溶液以及混和标准品(脯氨酸、赖氨酸、精氨酸和葡萄糖)溶液和高浓度盐和蛋白的混合溶液;

(2)、在质谱靶板上进行样本制备, 室温下干燥;

(3)、在质谱仪下进行检测, 并对质谱图像进行分析, 如图 15 所示, 本实施例的多角星形状 Au@ZnO 纳米复合材料, 即 p-ZnO 的四种典型小分子代谢物(葡萄糖、蔗糖、脯氨酸和赖氨酸)的检测效果比纯的氧化锌(ZnO)纳米颗粒效果更好, 尤其是蔗糖, 质谱信号相差 17 倍多, 因此可以说多角星形状 Au@ZnO 纳米复合材料(p-ZnO)比氧化锌更适用于 LDI 质谱检测。

在耐盐耐蛋白实验中, 如图 16a 和 16b 所示, p-ZnO 在高盐和高蛋白浓度下仍能很好地检测这四种代谢物的混合物。

血清代谢物的质谱检测:

(1)、仪器与试剂的准备: 基质辅助激光解吸电离质谱, 采用阳离子反射模式检测; 将 Au@ZnO 纳米复合材料配制成悬浮液检测标准血清;

(2)、在质谱靶板上进行样本制备, 室温下干燥;

(3)、在质谱仪下进行检测, 并对质谱图像进行分析, 生理条件下的血浆含有各种无机盐和蛋白质, 因此要考虑基质在质谱检测中的耐盐耐蛋白性质, 如图 16 所示, 图 16a 是含有 0.2mg/mL 氯化钠的四种代谢物混合溶液(脯氨酸、赖氨酸、精氨酸和葡萄糖均为 1mg/mL)的质谱检测结果, 由图可知, 本实施例的多角星形状 Au@ZnO 纳米复合材料能在高盐浓度条件下将四种代谢物全部检测出来, 与图 16c 中 CHCA 作为基质只检测出了精氨酸的加氢峰, 因此四种代谢物混合溶液(脯氨酸、赖氨酸、精氨酸和葡萄糖均为 1mg/mL)具有较好耐盐性。图 16b 则是加入了 1mg/mL 的牛血清白蛋白的四种代谢物混合溶液(脯氨酸、赖氨酸、精氨酸和葡萄糖均为 1mg/mL), 由图 16b 可知, 四种代谢物也能被本实施例中的多角星形状 Au@ZnO

纳米基质检测出来，图 16d 中 CHCA 也只检测出了精氨酸的加氢峰，因此多角星形状 Au@ZnO 纳米复合材料具有较好的耐蛋白性质。

由此可知，CHCA 对于高盐和高蛋白混合溶液中的代谢物检测效果较差，只检测出了精氨酸的加氢峰，而本发明的多角星形状 Au@ZnO 纳米复合材料能将四种氨基酸都检测出来，证明本发明的多角星形状 Au@ZnO 纳米复合材料与传统的有机基质 CHCA 相比更适用于复杂生物样本的检测，背景干扰更低。

(四) 提供的多孔合金纳米材料的制备方法及其在检测血浆代谢物中的应用

实施例 1 多孔合金纳米材料的制备

步骤 1: 仪器与试剂的准备: 基质辅助激光解吸电离质谱, 采用正离子反射模式;

步骤 2: 多孔 PdPtAu 合金的制备, 包括以下步骤;

步骤 2.1: 将 0.6mL Na₂PdCl₄(20mM), 3mL H₂PtCl₆·6H₂O(20mM), 60 μL 盐酸(6.0M)和 60mg F127 充分混合, 超声溶解, 待 F127 完全溶解后, 加入 3mL 抗坏血酸溶液(0.1M), 立刻置于 45℃ 水浴超声反应 3h, 分别加入 1.2mL HAuCl₄·4H₂O 溶液(浓度分别为 10mM、20mM、30mM、40mM), 反应 1h。反应结束后, 分别用无水乙醇和水离心(10000rpm)洗涤 3 次, 50 干℃ 干燥备用。

步骤 2.2: 将上述多孔 PdPtAu 合金分散在去离子水中, 作为基质使用;

步骤 3: 配比(葡萄糖、苯丙氨酸、赖氨酸)溶解在去离子水中, 检测不同孔径和金含量的 PdPtAu 质谱性能;

步骤 4: 将血浆与等体积甲醇/乙腈混合液(甲醇/乙腈, v/v=1:1)混合, 摇床震荡 10min, 离心 10min, 取上清液用于质谱检测;

步骤 5: 在质谱靶板上进行样品制备, 基质采用优化的 PdPtAu 材料, 室温下干燥;

步骤 6: 对血浆样品中的小分子进行检测;

步骤 7: 对质谱检测结果进行分析, 得出结论。

采用 Hitachi S-4800 获取扫描电子显微镜与能量色散 X 射线光谱结果, 如图 17 所示, 合成的多孔 PdPtAu 合金, 粒径约为 170nm, 粒径均匀, 存在多孔结构。

采用 JEOL JEM-2100F 获得透射电子显微镜结果。如图 18 所示, 纳米材料存在多孔结构, 与扫描电镜结果一致。

实施例 2 标准小分子物质检测

(1)仪器与试剂的准备：基质辅助激光解吸电离质谱，采用阳离子反射模式检测；将多孔合金配制成悬浮液，并配制标准品小分子(葡萄糖、苯丙氨酸、赖氨酸)溶液；

(2)在质谱靶板上进行样本制备，室温下干燥；

(3)在质谱仪下进行检测，并对质谱图像进行分析，结果如图 19 所示，图 19a、19b、19c 分别是葡萄糖、苯丙氨酸、赖氨酸标准小分子溶液。

实施例 3 含有 NaCl 和牛血清白蛋白的小分子物质检测

(1)仪器与试剂的准备：基质辅助激光解吸电离质谱，采用阳离子反射模式检测；将多孔合金配制成悬浮液，并配制高浓度盐或蛋白的混合小分子(葡萄糖、苯丙氨酸、赖氨酸)溶液；

(2)在质谱靶板上进行样本制备，室温下干燥；

(3)在质谱仪下进行检测，并对质谱图像进行分析，结果如图 20 所示，图 20a 是含有 NaCl 的溶液中检测葡萄糖、苯丙氨酸和赖氨酸的质谱图，图 20b 牛血清白蛋白的溶液中检测葡萄糖、苯丙氨酸和赖氨酸的质谱图。

实施例 4 血浆代谢物的检测

(1)仪器与试剂的准备：基质辅助激光解吸电离质谱，采用阳离子反射模式检测；将多孔合金配制成悬浮液；对血浆用有机溶剂进行简单的预处理；

(2)在质谱靶板上进行样本制备，室温下干燥；

(3)在质谱仪下进行检测，并对质谱图像进行分析，如图 21 所示，图 21a, 21b 分别为健康血浆样本和癌症血浆样本的质谱图。

上述的对实施例的描述是为便于该技术领域的普通技术人员能理解和使用发明。熟悉本领域技术的人员显然可以容易地对这些实施例做出各种修改，并把在此说明的一般原理应用到其他实施例中而不必经过创造性的劳动。因此，本发明不限于上述实施例，本领域技术人员根据本发明的揭示，不脱离本发明范畴所做出的改进和修改都应该在本发明的保护范围之内。

权 利 要 求

1.一种金属有机框架材料的制备方法，其特征在于，所述方法包括以下步骤：
步骤 1、将二甲基甲酰胺，乙醇，去离子水，三乙胺，对苯二甲酸混合加入一密闭容器中，并加入金属氯化物形成混合物；步骤 2、将所述混合物进行水浴超声反应，得到反应物；步骤 3、将所述反应物进行离心并洗涤，除去残留的所述二甲基甲酰胺，得到产物；步骤 4、将步骤 3 中所述产物分散在去离子水中，采用低速离心分离出超薄金属有机框架材料。

2.如权利要求 1 所述金属有机框架材料在小分子检测中的应用。

3.根据权利要求 2 所述的金属有机框架材料在小分子检测中的应用，其特征在于，包括以下步骤：步骤 1、将基质辅助激光解吸电离质谱检测模式设置为正离子反射模式；步骤 2、对血清样品进行比例稀释；步骤 3、在质谱靶板上进行样品制备，所述超薄金属有机框架材料作为基质，室温下干燥；步骤 4、对所述血清样品中的小分子进行检测；步骤 5、分析原始质谱图谱，并获得检测结果。

4.一种亚微反应器的制备方法，其特征在于，包括如下步骤：步骤 2.1：将 3-氨基苯酚 APF 溶解于去离子水中，并加入甲醛溶液和氨水溶液；步骤 2.2：将步骤 2.1 的混合物在 30℃ 条件下，反应 30 分钟；步骤 2.3：将步骤 2.2 中的反应物进行离心洗涤，得到 APF 亚微材料。

5.权利要求 4 所述亚微反应器的血清代谢物检测方法，其特征在于，包括如下步骤：(1)仪器与试剂的准备：将基质辅助激光解吸电离质谱检测模式设置为正离子反射模式；(2)将得到的 APF-sphere&Au、APF-bowl&Au-1、APF-bowl&Au-2 以及 APF-bowl&Au-3 分散在去离子水中，作为基质使用(3)对血清样品进行比例稀释；(4)在质谱靶板上进行样品制备，采用(2)中的所述基质，室温下干燥；(5)对血清样品中的小分子进行检测；(6)分析原始质谱图谱，并获得检测结果。

6.一种多角星形状 Au@ZnO 纳米复合材料的制备方法，其特征在于：其包括如下步骤：(1)、纳米金溶液的制备：水合四氯金酸溶液搅拌加热至 $120 \pm 1^\circ\text{C}$ 后，加入二水合柠檬酸钠，恒温下搅拌 $30 \pm 0.1\text{min}$ ，冷却至室温备用；(2)、氧化锌的制备：将醋酸锌溶液加入氢氧化钠溶液中，加热至 $60 \pm 1^\circ\text{C}$ 且保温 $1 \pm 0.1\text{h}$ ，离心收集沉淀，洗涤，在 $50 \pm 1^\circ\text{C}$ 下干燥备用；(3)、多角星形状 Au@ZnO 纳米复合材料的制备：醋酸锌溶液和所述纳米金溶液混合，得到混合液，在所述混合液内加入

氢氧化钠溶液，加热至 $60 \pm 1^\circ\text{C}$ 且保温 $1 \pm 0.1\text{h}$ ，离心收集沉淀，洗涤，在 $50 \pm 1^\circ\text{C}$ 下干燥备用。

7.一种多角星形状 Au@ZnO 纳米复合材料，其特征在于：其由权利要求 6 所述的制备方法得到。

8.权利要求 7 所述多角星形状 Au@ZnO 纳米复合材料作为基质材料在基质辅助激光解吸电离质谱检测、小分子代谢物的基质辅助激光解吸电离质谱检测或血清代谢物的基质辅助激光解吸电离质谱检测中的应用。

9.一种多孔合金纳米材料的制备方法，其特征在于，所述方法包括以下步骤：
步骤 1、将 Na_2PdCl_4 、 $\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、盐酸和 F127 充分混合，超声溶解；步骤 2、待完全溶解后，加入抗坏血酸溶液，并立刻置于水浴超声反应；步骤 3、随后加入 $\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 溶液反应；步骤 4、最后分别用无水乙醇和水离心洗涤后干燥得到所述多孔合金纳米材料 PdPtAu 。

10.一种如权利要求 9 所述多孔合金纳米材料在检测血浆代谢物中的应用，其特征在于，包括以下步骤：步骤 1、将所述多孔合金纳米材料 PdPtAu 分散在去离子水中；步骤 2、将血浆与等体积甲醇/乙腈混合液混合，所述甲醇/乙腈体积比为 1:1，摇床震荡 10min，离心 10min，取上清液用于质谱检测；步骤 3、所述基质辅助激光解吸电离质谱采用正离子反射模式，在所述基质辅助激光解吸电离质谱的质谱靶板上进行样品制备，所述样品为 $1 \mu\text{L}$ 血浆提取液，对血浆样品中的小分子进行检测。

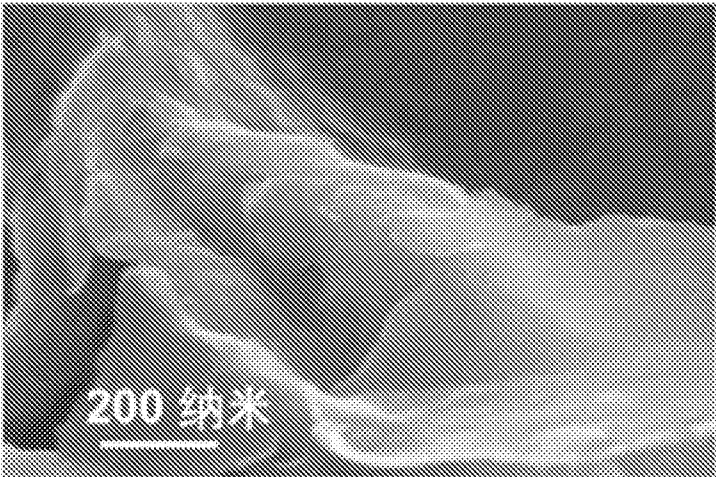


图 1

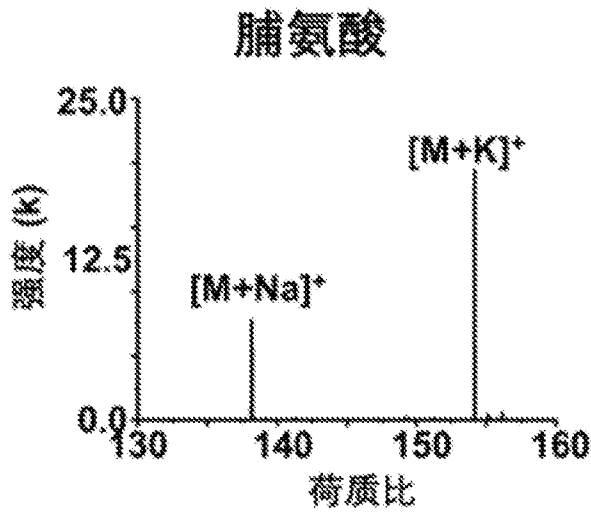


图 2

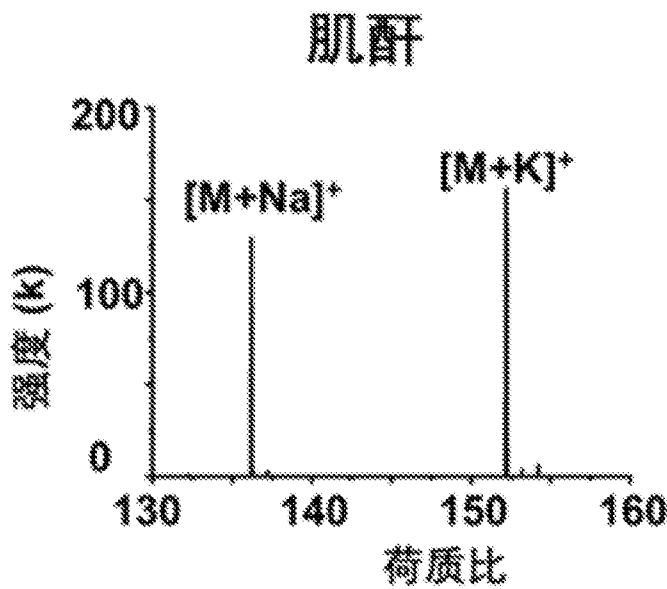


图 3

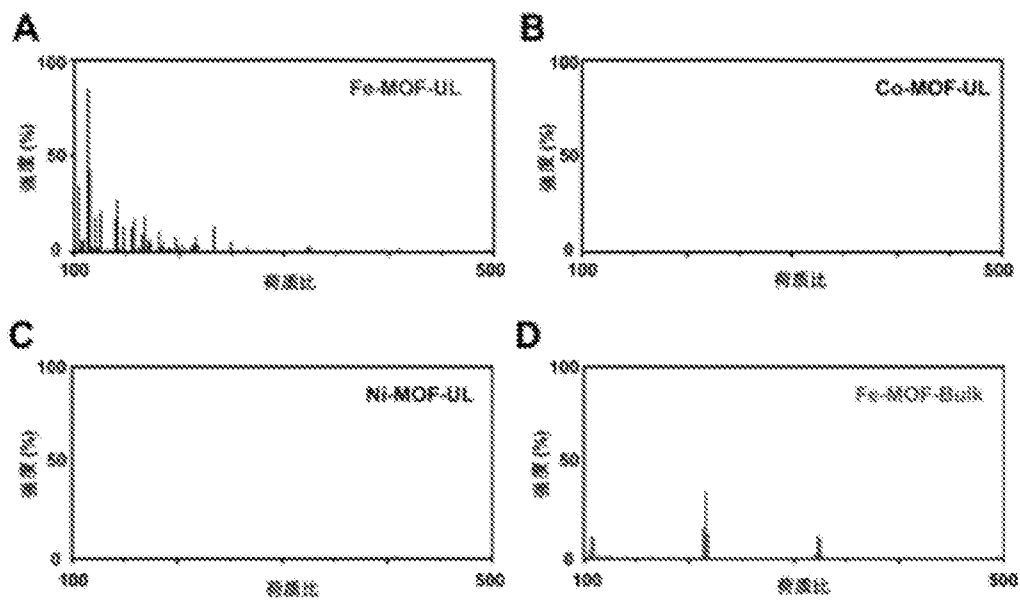


图 4

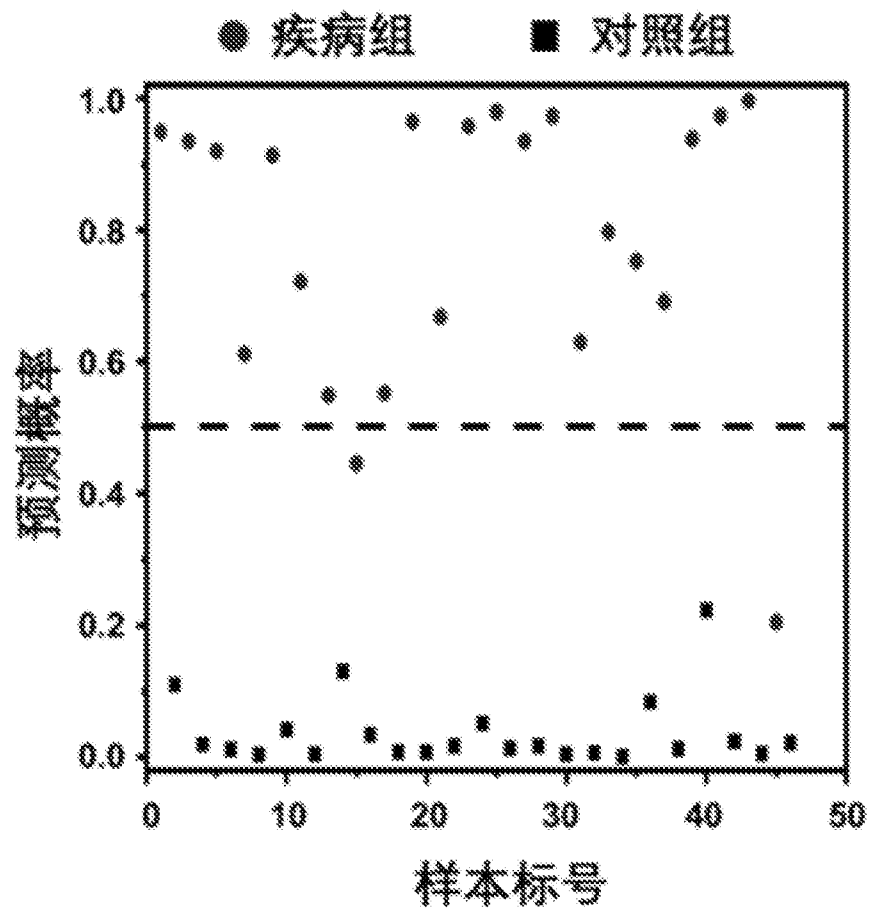


图 5

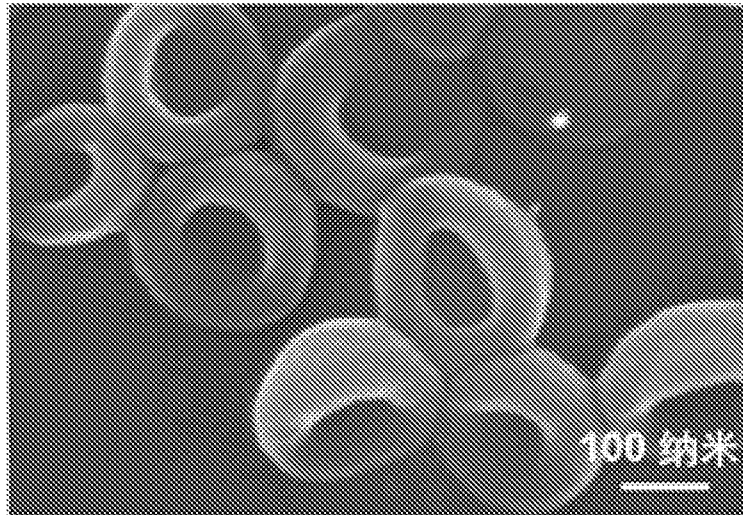


图 6

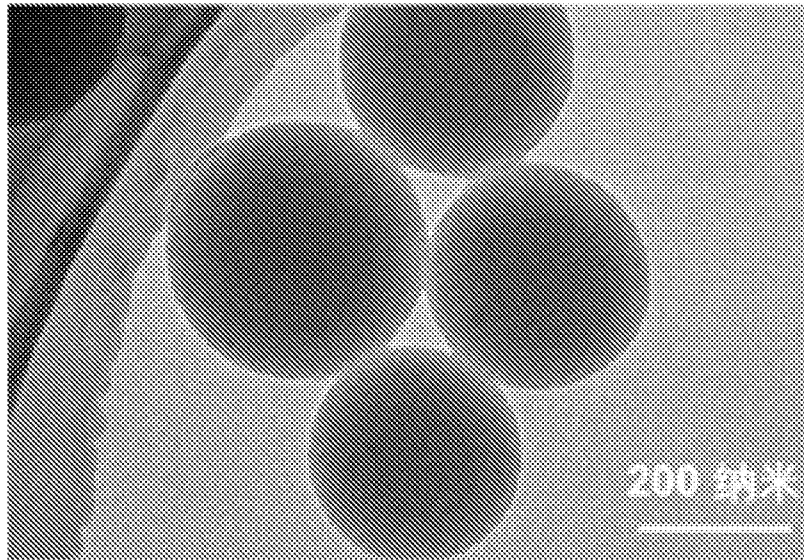


图 7

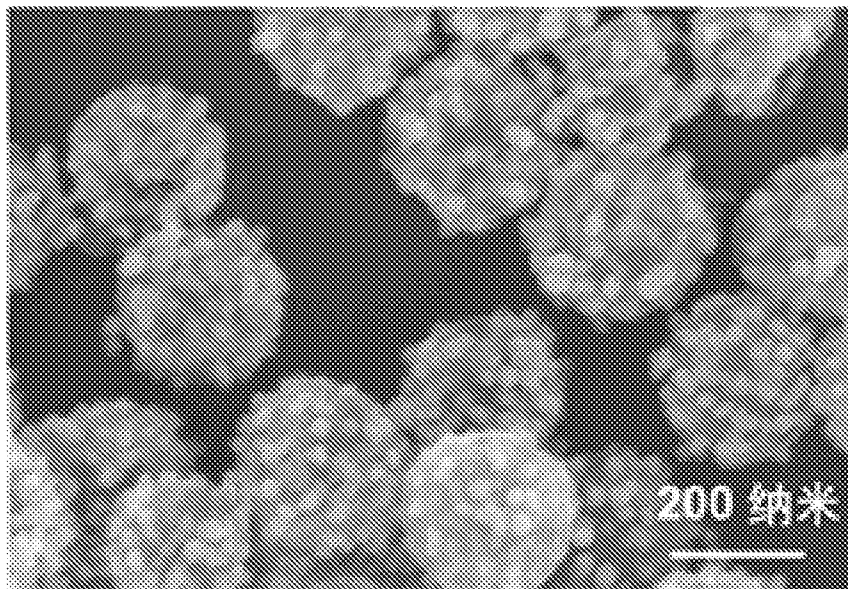


图 8

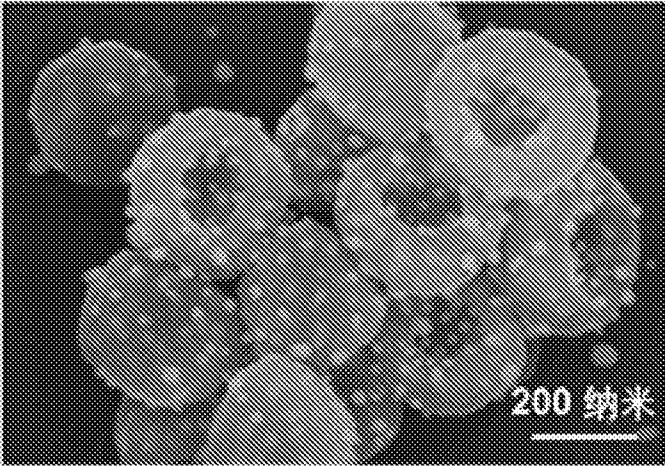


图 9

亮氨酸

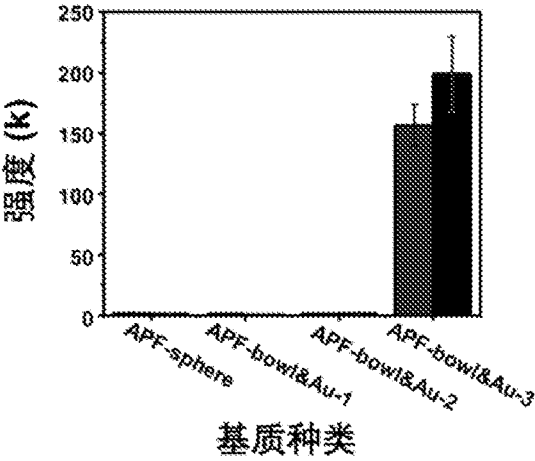


图 10

甘露醇

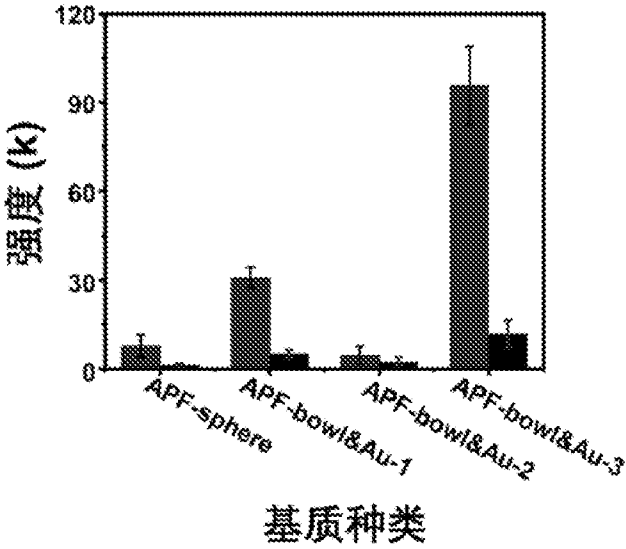


图 11

APF-bowl&Au

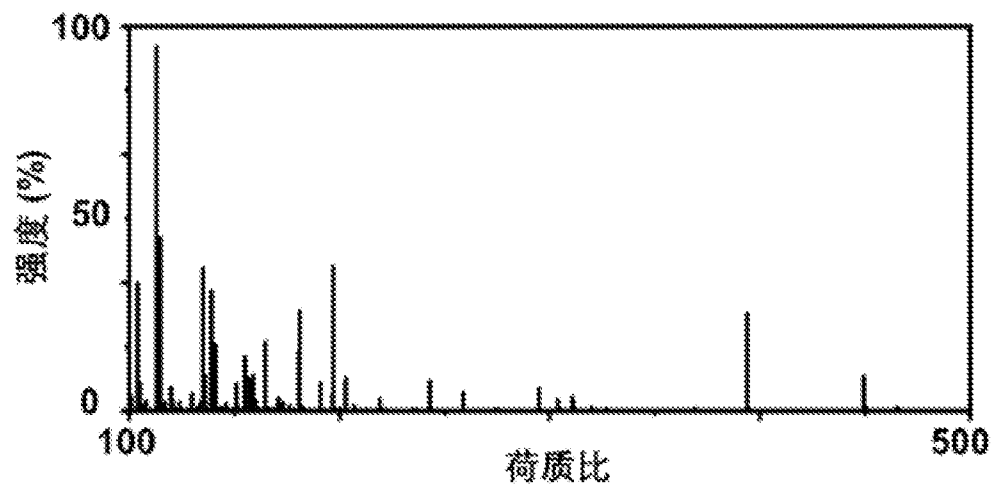


图 12

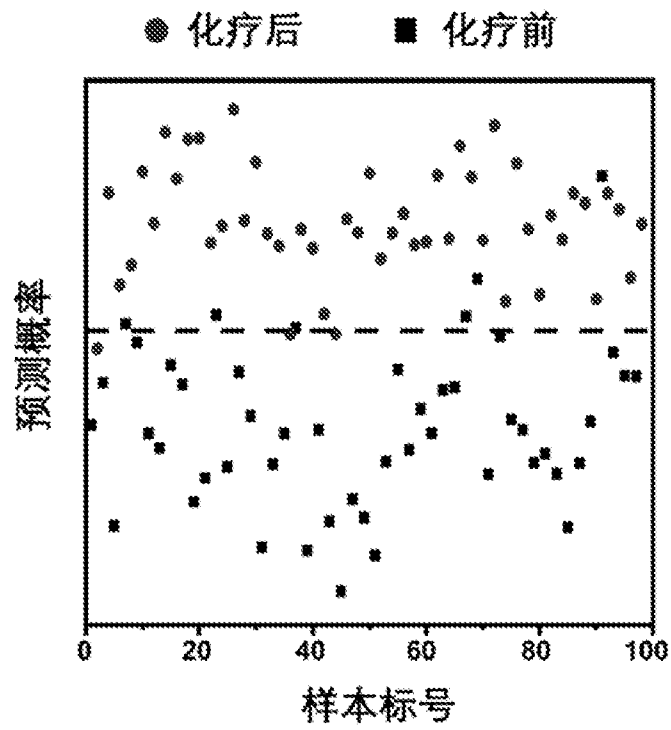


图 13

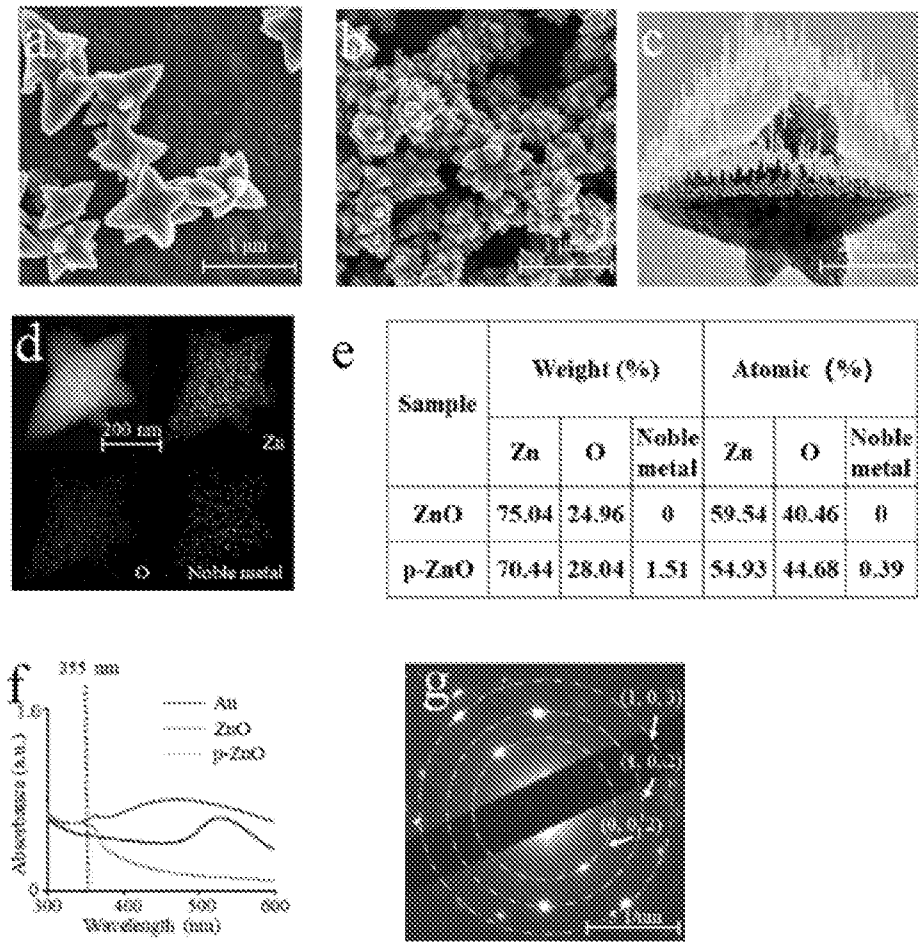


图 14

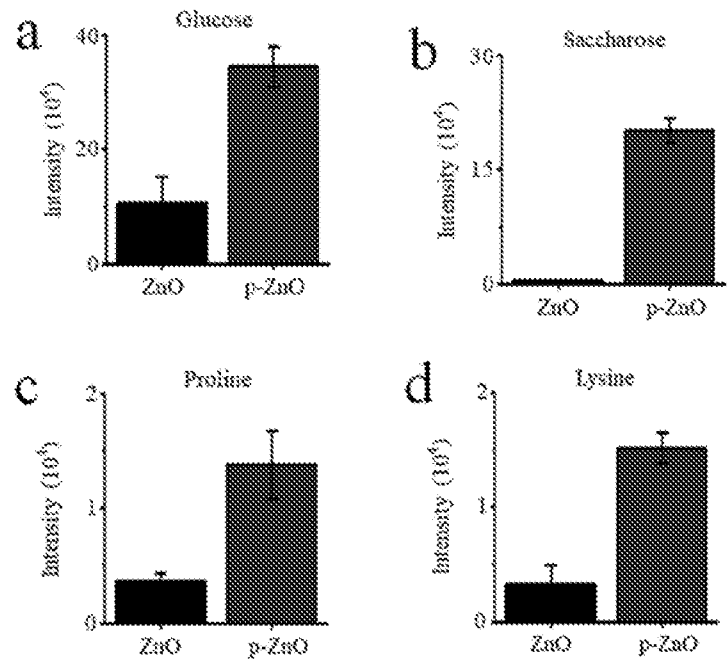


图 15

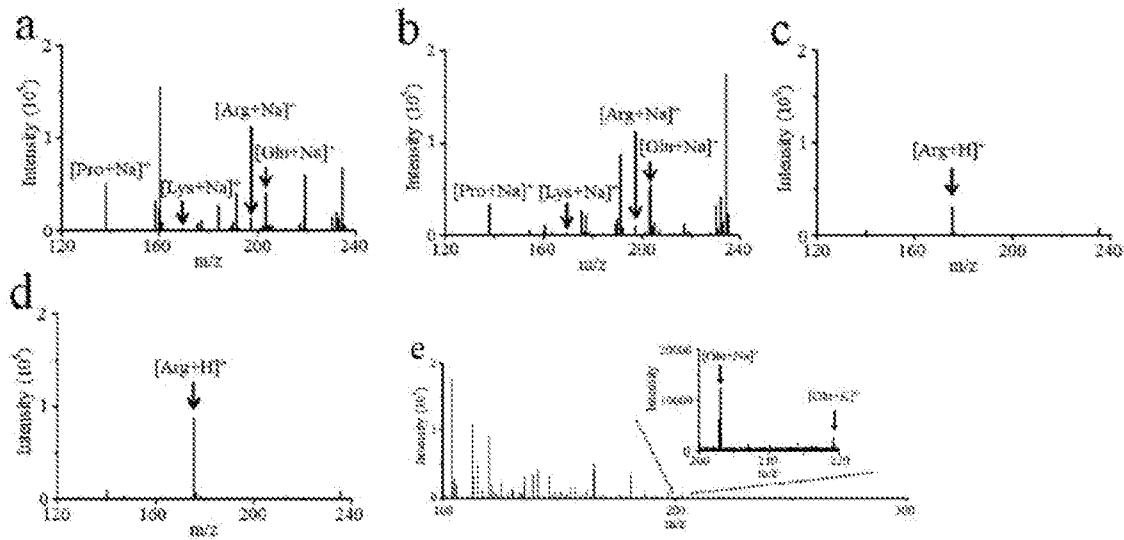


图 16

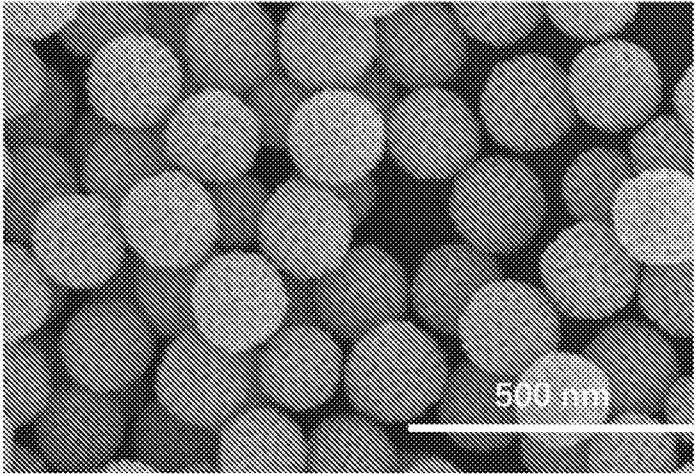


图 17

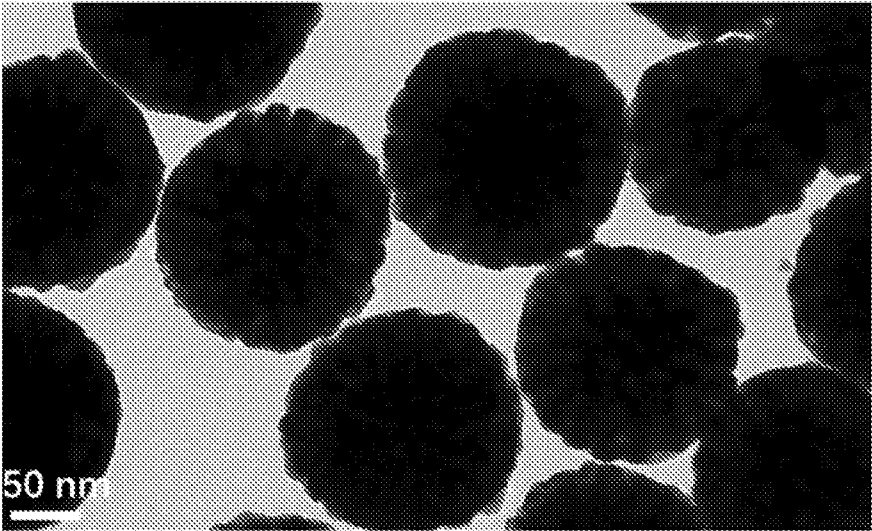


图 18

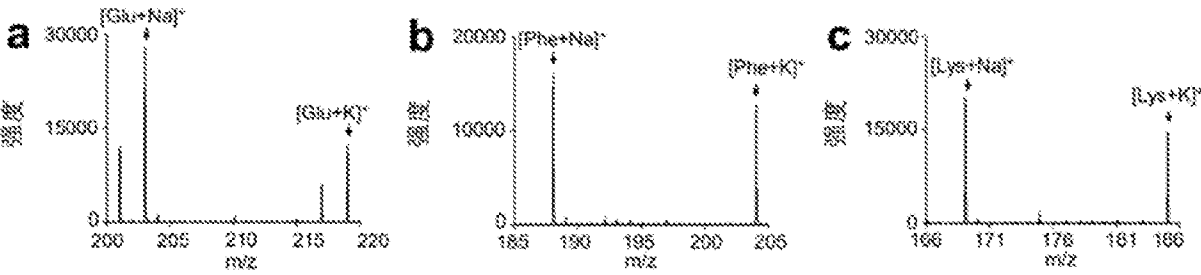


图 19

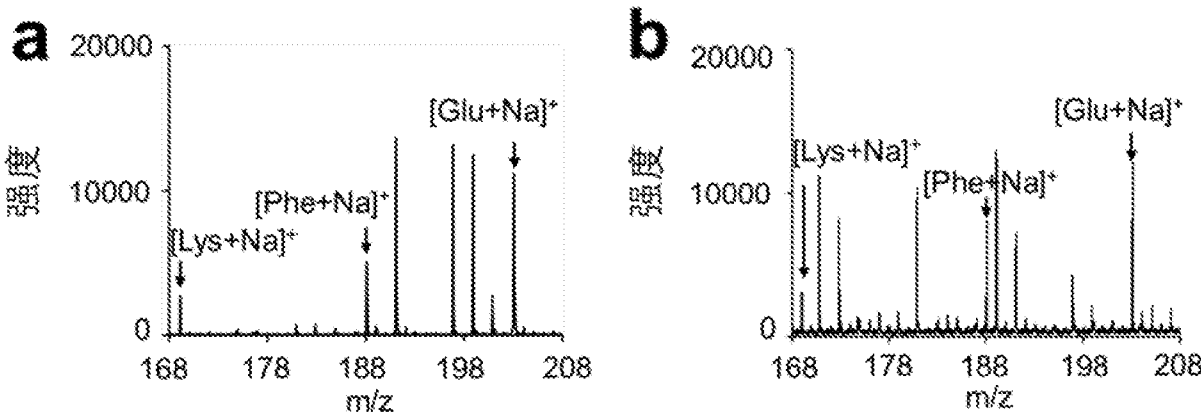


图 20

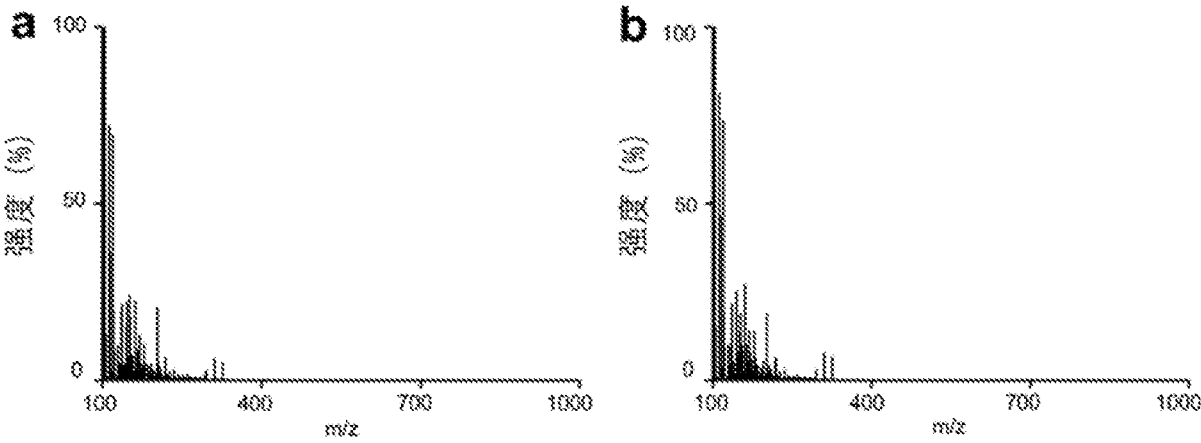


图 21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/102857

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 27/64(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)

G01N 27/-; B01J 20/-;

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, ENTXTC, VEN, WEB OF SCIENCE: 有机框架, 有机骨架, 金属, 激光解吸电离质谱, 基质辅助, 血清, organic framework?, metal, MOF?, laser desorption ionization mass spectrometry, LDI, MS, matrix assist+, MALDI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 113484404 A (SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY) 08 October 2021 (2021-10-08) claims 1 and 7-8	1-3
X	CN 105732728 A (NATIONAL CENTER FOR NANOSCIENCE AND TECHNOLOGY) 06 July 2016 (2016-07-06) description, paragraphs 0012-0043 and 0077-0084, and figures 1-3	1
Y	CN 105732728 A (NATIONAL CENTER FOR NANOSCIENCE AND TECHNOLOGY) 06 July 2016 (2016-07-06) description, paragraphs 0012-0043 and 0077-0084, and figures 1-3	2-3
Y	CN 112730323 A (SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY) 30 April 2021 (2021-04-30) description, paragraphs 0004-0027 and 0064-0068	2-3
X	CN 112295604 A (UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY OF CHINA) 02 February 2021 (2021-02-02) description, paragraphs 0032-0065	1
Y	CN 112295604 A (UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY OF CHINA) 02 February 2021 (2021-02-02) description, paragraphs 0032-0065	2-3



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

16 September 2022

Date of mailing of the international search report

28 September 2022

Name and mailing address of the ISA/CN

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

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/102857

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 110467731 A (UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY BEIJING) 19 November 2019 (2019-11-19) entire document	1-3
A	CN 103787875 A (TIANJIN UNIVERSITY) 14 May 2014 (2014-05-14) entire document	1-3
A	CN 106512965 A (FUDAN UNIVERSITY) 22 March 2017 (2017-03-22) entire document	1-3
A	WO 2021007988 A1 (SOUTH CHINA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) 21 January 2021 (2021-01-21) entire document	1-3

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- [1] First invention: claims 1-3, relating to a preparation method for a metal organic framework material and an application thereof in small molecule detection.
- [2] Second invention: independent claims 4-5, relating to a method for preparing a submicroreactor and a serum metabolite detection method based thereon.
- [3] Third invention: independent claims 6-8, relating to a Au@ZnO nanocomposite in a multi-pointed star shaped, a preparation method for the Au@ZnO nanocomposite and an application thereof.
- [4] Fourth invention: independent claims 9-10, relating to a method for preparing a porous alloy nanomaterial and an application thereof in plasma metabolite detection.
- [5] The international authority considered that the described four inventions do not share a same or corresponding technical feature, do not share a same or corresponding special technical feature defining the contribution that the inventions make over the prior art, are not technically linked, do not belong to a single general inventive concept, and therefore do not comply with the requirement of unity of invention as defined in PCT Rule 13.1.

- 1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: **claims 1-3**

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/102857

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	113484404	A	08 October 2021	None			
CN	105732728	A	06 July 2016	None			
CN	112730323	A	30 April 2021	None			
CN	112295604	A	02 February 2021	None			
CN	110467731	A	19 November 2019	None			
CN	103787875	A	14 May 2014	None			
CN	106512965	A	22 March 2017	None			
WO	2021007988	A1	21 January 2021	CN	110548544	A	10 December 2019

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/102857

A. 主题的分类 G01N 27/64 (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) G01N 27/-; B01J 20/-; 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, ENTXTC, VEN, WEB OF SCIENCE: 有机框架, 有机骨架, 金属, 激光解吸电离质谱, 基质辅助, 血清, organic framework?, metal, MOF?, laser desorption ionization mass spectrometry, LDI, MS, matrix assist+, MALDI																													
C. 相关文件 <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 113484404 A (上海交通大学) 2021年10月8日 (2021 - 10 - 08) 权利要求1、7-8</td> <td>1-3</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 105732728 A (国家纳米科学中心) 2016年7月6日 (2016 - 07 - 06) 说明书0012-0043、0077-0084段, 图1-3</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 105732728 A (国家纳米科学中心) 2016年7月6日 (2016 - 07 - 06) 说明书0012-0043、0077-0084段, 图1-3</td> <td>2-3</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 112730323 A (上海交通大学) 2021年4月30日 (2021 - 04 - 30) 说明书0004-0027、0064-0068段</td> <td>2-3</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 112295604 A (中国科学技术大学) 2021年2月2日 (2021 - 02 - 02) 说明书0032-0065段</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 112295604 A (中国科学技术大学) 2021年2月2日 (2021 - 02 - 02) 说明书0032-0065段</td> <td>2-3</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 110467731 A (北京科技大学) 2019年11月19日 (2019 - 11 - 19) 全文</td> <td>1-3</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 103787875 A (天津大学) 2014年5月14日 (2014 - 05 - 14) 全文</td> <td>1-3</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	CN 113484404 A (上海交通大学) 2021年10月8日 (2021 - 10 - 08) 权利要求1、7-8	1-3	X	CN 105732728 A (国家纳米科学中心) 2016年7月6日 (2016 - 07 - 06) 说明书0012-0043、0077-0084段, 图1-3	1	Y	CN 105732728 A (国家纳米科学中心) 2016年7月6日 (2016 - 07 - 06) 说明书0012-0043、0077-0084段, 图1-3	2-3	Y	CN 112730323 A (上海交通大学) 2021年4月30日 (2021 - 04 - 30) 说明书0004-0027、0064-0068段	2-3	X	CN 112295604 A (中国科学技术大学) 2021年2月2日 (2021 - 02 - 02) 说明书0032-0065段	1	Y	CN 112295604 A (中国科学技术大学) 2021年2月2日 (2021 - 02 - 02) 说明书0032-0065段	2-3	A	CN 110467731 A (北京科技大学) 2019年11月19日 (2019 - 11 - 19) 全文	1-3	A	CN 103787875 A (天津大学) 2014年5月14日 (2014 - 05 - 14) 全文	1-3
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																											
PX	CN 113484404 A (上海交通大学) 2021年10月8日 (2021 - 10 - 08) 权利要求1、7-8	1-3																											
X	CN 105732728 A (国家纳米科学中心) 2016年7月6日 (2016 - 07 - 06) 说明书0012-0043、0077-0084段, 图1-3	1																											
Y	CN 105732728 A (国家纳米科学中心) 2016年7月6日 (2016 - 07 - 06) 说明书0012-0043、0077-0084段, 图1-3	2-3																											
Y	CN 112730323 A (上海交通大学) 2021年4月30日 (2021 - 04 - 30) 说明书0004-0027、0064-0068段	2-3																											
X	CN 112295604 A (中国科学技术大学) 2021年2月2日 (2021 - 02 - 02) 说明书0032-0065段	1																											
Y	CN 112295604 A (中国科学技术大学) 2021年2月2日 (2021 - 02 - 02) 说明书0032-0065段	2-3																											
A	CN 110467731 A (北京科技大学) 2019年11月19日 (2019 - 11 - 19) 全文	1-3																											
A	CN 103787875 A (天津大学) 2014年5月14日 (2014 - 05 - 14) 全文	1-3																											
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。																													
<table border="0"> <tr> <td> * 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 </td> <td> “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 </td> </tr> </table>			* 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																									
* 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																												
国际检索实际完成的日期 2022年9月16日		国际检索报告邮寄日期 2022年9月28日																											
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局 (ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		受权官员 周宏卉 电话号码 (86-10)62089913																											

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
A	CN 106512965 A (复旦大学) 2017年3月22日 (2017 - 03 - 22) 全文	1-3
A	W0 2021007988 A1 (UNIV SOUTH CHINA TECH) 2021年1月21日 (2021 - 01 - 21) 全文	1-3

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明, 即:

- [1] 第1项发明: 即权利要求1-3, 涉及: 一种金属有机框架材料的制备方法及其在小分子检测中的应用。
- [2] 第2项发明: 即独立权利要求4-5, 涉及: 一种亚微反应器的制备方法及其基于其的血清代谢物检测方法。
- [3] 第3项发明: 即独立权利要求6-8, 涉及: 一种多角星形状Au@ZnO纳米复合材料及其制备方法和应用。
- [4] 第4项发明: 即独立权利要求9-10, 涉及: 一种多孔合金纳米材料的制备方法及其在检测血浆代谢产物中的应用。
- [5] 本国际单位认为, 上述4项发明不具有相同或相应的技术特征, 进而不具有相同或相应的体现发明对现有技术做出贡献的特定技术特征, 不存在技术关联, 不属于一个总的发明构思, 因而不满足发明单一性的要求, 不符合专利合作条约实施细则13.1的规定。

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费, 本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索, 本单位未通知缴纳任何加费。
3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费, 本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求, 具体地说, 是权利要求:
4. ☒ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此, 本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明; 包含该发明的权利要求是: 权利要求1-3

对异议的意见

- ☐ 申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 适用时, 缴纳了异议费。
- ☐ 申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
- ☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/102857

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	113484404	A	2021年10月8日	无	
CN	105732728	A	2016年7月6日	无	
CN	112730323	A	2021年4月30日	无	
CN	112295604	A	2021年2月2日	无	
CN	110467731	A	2019年11月19日	无	
CN	103787875	A	2014年5月14日	无	
CN	106512965	A	2017年3月22日	无	
WO	2021007988	A1	2021年1月21日	CN	110548544 A 2019年12月10日