(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103323561 B
(45)授权公告日 2019.05.07

(21)申请号 201310193851.8

(22)申请日 2008.11.24

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103323561 A

(43)申请公布日 2013.09.25

(30)优先权数据
11/946,017 2007.11.27 US

(62)分案原申请数据
200880125151.2 2008.11.24

(73)专利权人 奎斯特诊断投资公司
地址 美国特拉华州

(72)发明人 M·M·戈尔德曼 N·J·克拉克
R·E·赖茨

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245
代理人 张全信 董志勇

(51)Int.Cl.
G01N 30/88(2006.01)

(56)对比文件
WO 2004090525 A1,2004.10.21,
CN 1834641 A,2006.09.20,
Tiedong Guo et al.Simultaneous determination of 12 steroids by isotope dilution liquid chromatography-photospray ionization tandem mass spectrometry.《Clinica Chimica Acta》.2006,76-82.
Aldo Lagana et al.Trace analysis of estrogenic chemicals in sewage effluent using liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry.《Rapid Commun. Mass Spectrom》.2001,第14卷401-407.
K.F. Breuel et al.Effect of holding time and temperature of bovine whole blood on concentration of progesterone, estradiol-17β and estrone in plasma and serum samples.《Theriogenology》.1988,第30卷(第3期),613-627.

审查员 肖锡峰

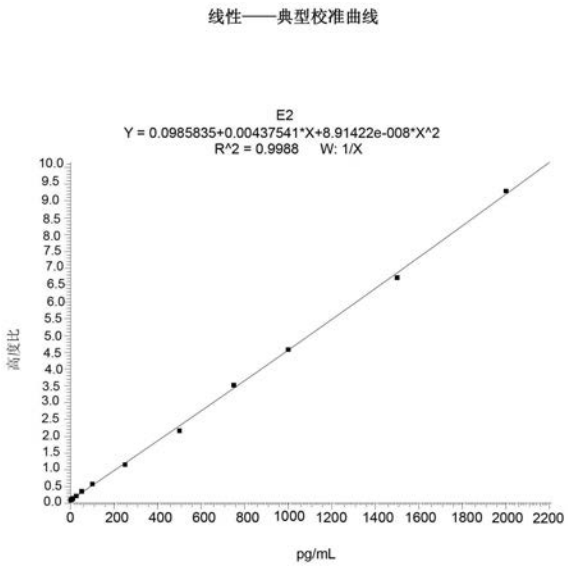
权利要求书1页 说明书15页 附图1页

(54)发明名称

通过质谱法检测雌二醇的方法

(57)摘要

提供的是采用质谱法检测样品中雌二醇的量的方法。方法一般包括电离样品中的雌二醇以及检测和定量离子的量以确定样品中雌二醇的量。



CN 103323561 B

1.通过串联质谱法测定体液样品中雌二醇的量的方法,所述方法包括:

(a)通过高湍流液相层析(HTLC)和高效液相层析(HPLC)从所述体液样品中纯化雌二醇;

(b)通过用负离子模式的大气压化学电离(APCI)电离所述雌二醇而产生所述雌二醇的前体离子;

(c)产生所述前体离子的一种或多种碎片离子;和

(d)检测步骤(b)或(c)或二者中产生的一种或多种所述离子的量并将所述检测的离子与所述体液样品中所述雌二醇的量相关联;

其中所述方法的量化极限小于25pg/mL。

2.权利要求1的方法,其中所述方法具有小于或等于10pg/mL的量化极限。

3.权利要求1的方法,其中所述雌二醇在质谱法之前不被衍生。

4.权利要求1的方法,其中步骤(a)-(d)以在线自动方式进行。

5.权利要求1的方法,其中在所述电离步骤之前,试剂以足以将雌二醇从可存在于所述体液样品中的蛋白分离的量添加至所述体液样品。

6.权利要求5的方法,其中所述试剂是硫酸铵。

7.权利要求5的方法,其中所述试剂是乙醇。

8.权利要求1的方法,其中所述体液中存在的葡萄糖醛酸化的和非葡萄糖醛酸化的雌二醇通过所述方法检测并测量。

9.测定测试样品中雌二醇的量的方法,所述方法包括:

(a)以足以将雌二醇从可能存在于所述测试样品中的蛋白分离的量加入硫酸铵;

(b)通过高湍流液相层析(HTLC)和高效液相层析(HPLC)从所述测试样品中纯化雌二醇;

(c)用负离子模式的大气压化学电离(APCI)电离来自所述测试样品的所述纯化的雌二醇以产生一种或多种通过串联质谱法可检测的离子;以及

(d)通过串联质谱法检测所述雌二醇离子的量,其中所述雌二醇离子的量被关联到所述测试样品中的雌二醇的量;

其中所述方法的量化极限小于25pg/mL。

10.权利要求9的方法,其中所述方法具有小于或等于10pg/mL的量化极限。

11.权利要求9的方法,其中所述雌二醇在质谱法之前不被衍生。

12.权利要求9的方法,其中步骤(a)-(d)以在线自动方式进行。

13.权利要求9的方法,其中所述测试样品中存在的葡萄糖醛酸化的和非葡萄糖醛酸化的雌二醇通过所述方法检测并测量。

14.权利要求9的方法,其中所述测试样品是体液。

通过质谱法检测雌二醇的方法

[0001] 本申请是分案申请，原申请的申请日是2008年11月24日，申请号为200880125151.2(PCT/US2008/084561)，发明名称为“通过质谱法检测雌二醇的方法”。

技术领域

[0002] 本发明涉及雌二醇的检测。在具体的方面，本发明涉及通过质谱法检测雌二醇的方法。

背景技术

[0003] 本发明的下列背景技术的描述仅作为辅助理解本发明而提供，并且不被认为是描述或构成了本发明的现有技术。

[0004] 雌二醇[17β-雌二醇或雌-1,3,5(10)-三烯-3,17-二醇,(17-β)]或E2是分子量为272.38道尔顿的C_{18}甾体激素。它是性激素，称为“雌性”激素(也存在于雄性中)，其是一组内源甾体中最有效的雌激素，其包括雌酮(E1)和雌三醇(E3)。在女性中，主要由卵巢产生雌二醇，由肾上腺次级产生，并在脂肪组织中将甾体前体转化至雌激素。雌二醇负责乳腺和生殖上皮的生长以及第二性征的发育。除了促进健康的骨结构和调节女性胆固醇水平外，雌二醇的正常水平提供适当的排卵、受孕和妊娠。在男性中，睾丸和肾上腺是雌二醇的主要来源。雌二醇被需要用于维持激素平衡和其他腺体的功能。

[0005] 采用质谱法检测具体雌二醇离子的方法已被描述。例如，Nelson R,et al.,Clinical Chem2004,50(2):373-84;Mellon-Nussbaum S,et al.,J Biol Chem1982,257(10):5678-5684;和Xu X,et al.,Nature Protocols2007,2(6):1350-1355公开了使用液相层析和质谱法检测多种雌二醇离子的方法。这些方法在通过质谱法检测前衍生雌二醇。通过液相层析/质谱法检测未衍生的雌二醇的方法被公开在Guo T,et al.,Arch Pathol Lab Med2004,128:469-475;Sun Y,et al.,J Am Soc Mass Spectrom2005,16(2):271-279;和Diaz-Cruz S,et al.,J Mass Spectrom2003,38:917-923中。通过气相层析/质谱法检测雌二醇的方法被公开在Nachtigall L,et al.,Menopause:J of N.Amer.Menopause Society2000,7(4):243-250;Santen R,et al.,Steriods2007,72:666-671;Dorgan J,et al.,Steriods2002,67:151-158;Biancotto G,et al.,J Mass Spectrom2002,37(12):1266-1271;Fedeniuk RW,et al.,J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci2004,802(2):307-315;和Biddle S,et al.,Anal Chim Acta,2007,586(1-2);115-121中。

发明内容

[0006] 本发明提供通过包括在串联质谱法内的质谱法检测样品中雌二醇的量的方法。

[0007] 一方面，提供了测定测试样品中雌二醇的量的方法。所述方法可包括：(a)通过液相层析纯化测试样品中的雌二醇；(b)电离测试样品中的雌二醇；和(c)通过质谱法检测雌二醇离子(或多种)的量并且将检测的雌二醇离子(或多种)的量关联到测试样品中的雌二

醇的量。在这方面某些优选的实施方式中，所述方法量化极限是小于或等于80pg/mL；以及优选地，雌二醇在质谱法之前没有进行衍生。在某些优选的实施方式中，所述方法包括产生雌二醇的一种或多种前体离子，其中至少一种前体离子具有271.14±.5或255.07±.5的质/荷比。在相关优选的实施方式中，所述方法可包括产生雌二醇前体离子的一种或多种碎片离子，其中至少一种碎片离子具有183.10±.5、159.20±.5、145.10±.5或133.20±.5的质/荷比；优选地，一种或多种碎片离子选自具有183.10±.5和133.20±.5的质/荷比的离子。在这方面某些优选的实施方式中，测试样品是体液。在某些优选的实施方式中，所述方法可包括将试剂以足以将雌二醇从可能存在于测试样品中的蛋白分离的量添加至测试样品。在相关优选的实施方式中，所述方法可包括酸化测试样品；优选地在电离前酸化；更优选地在纯化前酸化；优选地用甲酸酸化。在不同的优选实施方式中，所述方法可包括将盐以足以将雌二醇从可能存在于测试样品中的蛋白分离的量添加至测试样品；优选地在电离前添加；更优选地在纯化前添加；优选地添加硫酸铵。在特别优选的实施方式中，100mM硫酸铵添加至测试样品以使测试样品中硫酸铵终浓度为～57mM。

[0008] 如本文所用，除非另有所述，单数形式“一”(“a”、“an”和“the”)包括复数指代。因此，例如，“一个蛋白”的指代包括多个蛋白分子。

[0009] 如本文所用，术语“纯化(purification)”或“纯化(purifying)”不是指将除感兴趣分析物(或多种)之外的所有物质从样品中去除。而是，纯化是指相对于样品中可干扰感兴趣分析物检测的其他组分，富集一种或多种感兴趣分析物的量的方法。样品在本文中通过多种方法纯化以使得一种或多种干扰物质——例如可干扰通过质谱法检测所选择的雌二醇母离子和子离子的一种或多种物质——去除。

[0010] 如本文所用，术语“测试样品”是指可能含有雌二醇的任何样品。如本文所用，术语“体液”是指可从个体的身体上分离的任何液体。例如，“体液”可包括血液、血浆、血清、胆汁、唾液、尿液、泪液、汗液等。

[0011] 如本文所用，术语“衍生”是指使两个分子反应以形成一个新分子。衍生化试剂可包括异硫氰酸酯基团、二硝基-氟代苯基基团、硝基苯氧基羰基基团和/或苯二醛基团和类似物。

[0012] 如本文所用，术语“层析”是指这样的方法，其中由液体或气体携带的化学混合物当它们在固定液相或固相周围或之上流动时由于化学实体的微分分布而被分成各种组分。

[0013] 如本文所用，术语“液相层析”或“LC”是指当流体均一地通过细微分开的物质的柱或者通过毛细管道过滤时流体溶液的一种或多种组分选择性滞留的方法。滞留是由于当该流体相对于固定相(或多个)移动时混合物的组分在一个或多个固定相和本体流体(bulk fluid)(即流动相)之间的分布。“液相层析”的实例包括反相液相层析(RPLC)、高效液相层析(HPLC)和高湍流液相层析(HTLC)。

[0014] 如本文所用，术语“高效液相层析”或“HPLC”是指这样的液相层析，其中分离程度通过使流动相在压力下穿过固定相——通常为紧密填充柱——而增加。

[0015] 如本文所用，术语“高湍流液相层析”或“HTLC”是指这样的层析形式，其利用要分析物质通过柱填充的湍流作为进行分离的基础。HTLC已经被用于在通过质谱法分析之前含有两种未命名药物的样品的制备。参见例如Zimmer,et al.,J.Chromatogr.A854:23-35(1999)；也可参见美国专利号5,968,367、5,919,368、5,795,469和5,772,874，其进一步解

释HTLC。本领域普通技术人员理解“湍流”。当流体缓缓并平稳地流动时，这种流动称为“层流”。例如，以低流速穿过HPLC柱运动的流体是层状的。在层流中，流体颗粒的运动以一般以直线运动的颗粒顺序进行。在更快的速度下，水的惯性克服了流体摩擦力并且形成湍流。不与不规则边界接触的流体“超过”(“outruns”)由于摩擦而减慢或不均匀表面而偏斜的流体。当流体湍急流动时，它以涡流和漩涡(或旋流)流动，比流体平流时具有更多的“牵引”。许多参考可用于当流体流动是层流或湍流时辅助测定(例如Turbulent Flow Analysis: Measurement and Prediction,P.S.Bernard&J.M.Wallace,John Wiley&Sons,Inc.,(2000);An Introduction to Turbulent Flow,Jean Mathieu&Julian Scott,Cambridge University Press(2001))。

[0016] 如本文所用，术语“气相层析”或“GC”是指这样的层析，其中样品混合物被汽化并且被注射到穿过包含由液体或颗粒固体组成的固定相的柱而移动的载气(如氮气或氦气)流中，并且根据化合物对固定相的亲和力被分离成其组分化合物。

[0017] 如本文所用，术语“大颗粒柱”或“提取柱”是指含有平均颗粒直径大于约35μm的层析柱。如该上下文中所用，术语“约”意思是±10%。在优选的实施方式中，柱含有直径约60μm的颗粒。

[0018] 如本文所用，术语“分析柱”是指这样的层析柱，其具有足够的层析板以进行从柱中洗脱的样品中物质的分离得以测定分析物的存在或量。这种柱通常区别于“提取柱”，提取柱具有从未保留的物质中分离或萃取保留的物质的一般目的以获得纯化的样品用于进一步分析。如该上下文中所用，术语“约”意思是±10%。在优选的实施方式中，分析柱含有直径约4μm的颗粒。

[0019] 如本文所用，术语“在线”(“on-line”)或“线上”(“inline”)，例如用在“在线自动方式”或“在线提取”中，是指不需要操作者介入而进行的步骤。相反，术语“离线”(“off-line”)如本文所用是指需要操作者人工介入的步骤。因此，如果样品进行沉淀，然后上清液人工地装载至自动取样器，沉淀和装载步骤对于后续步骤是离线的。在该方法的多个实施方式中，一个或多个步骤可以在线自动方式进行。

[0020] 如本文所用，术语“质谱法”或“MS”是指通过它们的质量鉴定化合物的分析技术。MS是指基于它们的质荷比或“m/z”过滤、检测和测量离子的方法。MS技术一般包括：(1)使化合物电离以形成带电化合物；和(2)检测带电化合物的分子量并计算质荷比。化合物可通过任何合适的方式电离并检测。“质谱仪”一般包括电离器和离子检测器。通常，感兴趣的一个或多个分子被电离，然后离子被引入质谱仪器，其中由于磁场和电场的组合，离子在空间上沿着取决于质量(“m”)和电荷(“z”)的路径而行。参见例如美国专利号6,204,500，发明名称为“Mass Spectrometry From Surfaces”；6,107,623，发明名称为“Methods and Apparatus for Transerm Mass Spectrometry”；6,268,144，发明名称为“DNA Diagnostics Based On Mass Spectrometry”；6,124,137，发明名称为“Surface-Enhanced Photolabile Attachment And Release For Desorption And Detection Of Analytes”；Wright,et al.,Prostate Cancer and Prostatic Diseases2:264-76(1999)；以及Merchant和Weinberger,Electrophoresis21:1164-67(2000)。

[0021] 如本文所用，术语“负离子模式运行”是指产生并检测负离子的那些质谱法。如本文所用，术语“正离子模式运行”是指产生并检测正离子的那些质谱法。

[0022] 如本文所用，术语“电离”(“ionization”)或“电离”(“ionizing”)是指产生具有等于一个或多个电子单位的净电荷的分析物离子的过程。负离子是具有一个或多个电子单位的净负电荷的离子，而正离子是具有一个或多个电子单位的净正电荷的离子。

[0023] 如本文所用，术语“电子电离”或“EI”是指这样的方法，其中气态或蒸汽相中的感兴趣分析物与电子流相互作用。电子与分析物的相互作用产生分析物离子，其然后可用于质谱法技术。

[0024] 如本文所用，术语“化学电离”或“CI”是指这样的方法，其中试剂气体(例如氨)经历电子碰撞，并且分析物离子通过试剂气体离子与分析物分子相互作用而形成。

[0025] 如本文所用，术语“快速原子轰击”或“FAB”是指这样的方法，其中高能原子束(通常为Xe或Ar)碰撞非挥发性样品，使样品中包含的分子解吸并电离。测试样品被溶解在粘性液体基质诸如甘油、硫代甘油、间硝基苄醇、18-冠-6冠醚、2-硝基苯辛醚、环丁砜、二乙醇胺和三乙醇胺。对于化合物或样品适合的介质的选择是经验过程。

[0026] 如本文所用，术语“基质辅助激光解吸电离”或“MALDI”是指这样的方法，其中非挥发性样品被暴露至激光照射，其通过包括光致电离、质子化作用、去质子化作用和群集衰变在内的多种电离方式解吸并电离样品中的分析物。对于MALDI，样品与能量吸收基质混合，所述能量吸收基质促进分析物分子的解吸。

[0027] 如本文所用，术语“表面增强激光解吸电离”或“SELDI”是指另一种方法，其中非挥发性样品被暴露至激光照射，其通过包括光致电离、质子化作用、去质子化作用和群集衰变在内的多种电离方式解吸并电离样品中的分析物。对于SELDI，样品通常结合至优选地保留一种或多种感兴趣分析物的表面。如在MALDI中，该过程也可使用能量吸收物质以促进电离。

[0028] 如本文所用，术语“电喷雾电离”或“ESI”是指这样的方法，其中溶液沿短长度的毛细管穿过至被施加高正电压或负电压的末端。到达管末端的溶液被蒸发(被雾化)至在溶剂蒸汽中溶液微小液滴的喷射或喷雾。这种雾滴流经蒸发室——其被略微加热以防止冷凝并蒸发溶剂。随着液滴变小，电表面电荷密度增加直至相同电荷之间的自然排斥引起离子以及中性分子被释放的时间。

[0029] 如本文所用，术语“大气压化学电离”或“APCI”是指与ESI相似的质谱法；但是，APCI通过在大气压下发生在等离子体中的离子-分子反应产生离子。等离子体通过喷射毛细管与对电极之间的放电维持。然后，离子通常通过使用一系列差动泵抽的撇油器阶段被提取至质量分析仪。干燥并预热的N_2气反流可用于提高溶剂的去除。APCI中的气相电离可以比ESI更有效地用于分析更小极性的种类。

[0030] 如本文所用，术语“大气压光致电离”或“APPI”是指这种形式的质谱法，其中分子M光致电离的机理是光子吸收和电子射出以形成分子的离子M+。由于光子能量通常仅在电离电压之上，所以分子的离子解离的可能性较小。在许多情况下，可能的是在不需层析下分析样品，从而节省明显时间和费用。在水蒸汽或质子溶剂存在的情况下，分子的离子可吸取H以形成MH+。如果M具有高质子亲和力，这可能发生。这不影响量化精确度，原因在于M+与MH+的总数是恒定的。质子溶剂中的药物化合物通常观察到为MH+，而非极性化合物诸如萘或睾酮通常形成M+。Robb,D.B.,Covey,T.R.和Bruins,A.P.(2000):参见例如，Robb,et al., Atmospheric pressure phtoionization:An ionization method for liquid

chromatography-mass spectrometry.Anal.Chem.72(15):3653-3659。

[0031] 如本文所用,术语“感应耦合等离子体”或“ICP”是指这样的方法,其中样品与部分电离的气体在足够高的温度下相互作用以使大部分元素原子化和离子化。

[0032] 如本文所用,术语“场致解吸”是指这样的方法,其中非挥发性测试样品被置于电离表面上,并且强电场被用于产生分析物离子。

[0033] 如本文所用,术语“解吸”是指将分析物从表面的去除和/或分析物进入气相。

[0034] 如本文所用,术语“定量极限”(“limit of quantification”)、“量化极限”(“limit of quantitation”)或“LOQ”是指测量变得在数量上有意义的点。在该LOQ的分析物反应是可以确认的、离散的以及可重复的,精密度为20%以及精确度为80%至120%。

[0035] 如本文所用,术语“检测极限”(“limit of detection”)或“LOD”是测量值大于与之相关的不确定性的点。LOD被独断地定义为零浓度的2倍标准差(SD)。

[0036] 如本文所用,体液样品中雌二醇的“量”一般是指反映体液体积中可检测的雌二醇质量的绝对值。但是,量还可理解为与另一种雌二醇的量比较的相对量。例如,体液中雌二醇的量可以是大于对照或正常存在的雌二醇正常水平的量。

[0037] 在第二方面,提供了通过串联质谱法测定体液样品中雌二醇的量的方法,其包括:(a)通过液相层析纯化体液样品中的雌二醇;(b)产生质/荷比为255.07±.5的雌二醇的前体离子;(c)产生前体离子的一种或多种碎片离子,其中至少一种碎片离子具有133.20±.5的质/荷比;和(d)检测步骤(b)或(c)或两者中产生的一种或多种离子的量并且将检测的离子关联到体液样品中的雌二醇的量。在某些优选的实施方式中,所述方法的量化极限小于或等于80pg/mL。在其他优选的实施方式中,雌二醇在质谱法之前没有进行衍生。在某些优选的实施方式中,所述方法可进一步包括产生雌二醇前体离子的一种或多种碎片离子,其中至少一种碎片离子具有159.20±.5的质/荷比。在某些优选的实施方式中,所述方法可包括将试剂以足以将雌二醇从可能存在于体液样品中的蛋白分离的量添加至体液样品。在相关优选的实施方式中,所述方法可包括酸化体液样品;优选地在电离前酸化;更优选地在纯化前酸化;优选地用甲酸酸化。

[0038] 在第三方面,提供了通过串联质谱法测定体液样品中雌二醇的量的方法,其包括:(a)通过液相层析纯化体液样品中的雌二醇;(b)产生质/荷比为271.14±.5的雌二醇的前体离子;(c)产生前体离子的一种或多种碎片离子,其中至少一种碎片离子具有183.10±.5的质/荷比;和(d)检测步骤(b)或(c)或两者中产生的一种或多种离子的量并且将检测的离子关联到体液样品中的雌二醇的量。在某些优选的实施方式中,所述方法的量化极限小于或等于80pg/mL。在其他优选的实施方式中,雌二醇在质谱法之前没有进行衍生。在某些优选的实施方式中,所述方法可进一步包括产生雌二醇前体离子的一种或多种碎片离子,其中至少一种碎片离子具有145.10±.5的质/荷比。在某些优选的实施方式中,所述方法可包括将试剂以足以将雌二醇从可能存在于体液样品中的蛋白分离的量添加至体液样品。在相关优选的实施方式中,所述方法可包括将盐添加至体液样品;优选地在电离前添加;更优选地在纯化前添加;优选地添加硫酸铵。在特别优选的实施方式中,100mM硫酸铵添加至体液样品以使体液样品中硫酸铵终浓度为~57mM。

[0039] 第四方面,提供测定测试样品中的雌二醇的量的方法,其包括:(a)用试剂以足以将雌二醇从可能存在于测试样品中的蛋白分离的量酸化测试样品;(b)通过液相层析纯化

测试样品中的雌二醇；(c)电离测试样品中的雌二醇以产生一种或多种通过串联质谱法可检测的离子；和(d)通过串联质谱法以正离子模式检测雌二醇离子(或多种)的量并且将检测的雌二醇离子(或多种)的量关联到测试样品中的雌二醇的量。在某些优选的实施方式中，测试样品是体液。在某些优选的实施方式中，所述方法的量化极限小于或等于80pg/mL。在其他优选的实施方式中，雌二醇在质谱法之前没有进行衍生。在某些优选的实施方式中，所述方法包括产生雌二醇的一种或多种前体离子，其中至少一种前体离子具有255.07±.5的质/荷比。在相关优选的实施方式中，所述方法可包括产生雌二醇前体离子的一种或多种碎片离子，其中至少一种碎片离子具有159.20±.5或133.20±.5的质/荷比。在某些优选的实施方式中，所述方法可包括在电离前酸化测试样品；更优选地在纯化前酸化；优选地用甲酸酸化。

[0040] 第五方面，提供测定测试样品中的雌二醇的量的方法，其包括：(a)将试剂以足以将雌二醇从可能存在于测试样品中的蛋白分离的量添加至测试样品；(b)通过液相层析纯化测试样品中的雌二醇；(c)电离测试样品中的纯化的雌二醇以产生一种或多种通过串联质谱法可检测的离子；和(d)通过串联质谱法以负离子模式检测雌二醇离子(或多种)的量并且将检测的雌二醇离子(或多种)的量关联到测试样品中的雌二醇的量。在某些优选的实施方式中，测试样品是体液。在某些优选的实施方式中，所述方法的量化极限小于或等于80pg/mL。在其他优选的实施方式中，雌二醇在质谱法之前没有进行衍生。在某些优选的实施方式中，所述方法包括产生雌二醇的一种或多种前体离子，其中至少一种前体离子具有271.14±.5的质/荷比。在相关优选的实施方式中，所述方法可包括产生雌二醇前体离子的一种或多种碎片离子，其中至少一种碎片离子具有183.10±.5或145.10±.5的质/荷比。在其他优选的实施方式中，所述方法可包括将盐试剂添加至体液样品，优选地在电离前添加；更优选地在纯化前添加，优选地添加硫酸铵。在特别优选的实施方式中，100mM硫酸铵添加至测试样品以使测试样品中的硫酸铵终浓度为～57mM。

[0041] 在某些优选的实施方式中，雌二醇可在质谱法之前进行衍生；但是，在某些优选的实施方式中，样品制备排除了衍生的使用。

[0042] 在上述方面某些优选的实施方式中，使用HTLC和HPLC进行液相层析，优选地HTLC与HPLC结合使用，但是可使用其他方法，包括例如与HPLC结合的蛋白质沉淀和纯化。

[0043] 优选的实施方式单独利用高效液相层析(HPLC)或与一种或多种纯化方法例如HTLC或蛋白质沉淀结合以纯化样品中的雌二醇。

[0044] 在本文公开的方法的某些优选的实施方式中，质谱法以负离子模式进行。可选地，质谱法以正离子模式进行。在特别优选的实施方式中，雌二醇使用正离子模式和负离子模式测量。在某些优选的实施方式中，雌二醇使用APCI或ESI以正模式或负模式测量。

[0045] 在上述方面优选的实施方式中，体液样品中存在的葡萄糖醛酸化的和非葡萄糖醛酸化的雌二醇被检测并测量。

[0046] 在优选的实施方式中，在质谱仪中可检测的雌二醇离子选自质/荷比(m/z)为271.14±.5、255.07±.5、183.10±.5、159.20±.5、145.10±.5和133.20±.5的离子；后四种为前体离子的碎片离子。在特别优选的实施方式中，前体离子具有271.14±.5或255.07±.5的质/荷比，以及碎片离子具有183.10±.5或133.20±.5的质/荷比。

[0047] 在优选的实施方式中，在样品中提供分离的可检测的雌二醇内标，其量也在样品

中测定。在这些实施方式中，样品中存在的内源雌二醇和内标二者的全部或一部分被电离以产生质谱仪可检测的多种离子，并且从各个产生的一种或多种离子通过质谱法检测。

[0048] 优选的雌二醇内标是2,4,16,16,17-d_5雌二醇。在优选的实施方式中，质谱仪可检测的雌二醇内标离子选自具有276.15±.5、260.10±.5、187.10±.5、161.10±.5、147.10±.5和135.10±.5的质/荷比的离子。在特别优选的实施方式中，雌二醇内标的前体离子选自具有276.15±.5和260.10±.5的质/荷比的离子；以及一种或多种碎片离子选自具有187.10±.5、161.10±.5、147.10±.5和135.10±.5的质/荷比的离子。

[0049] 在优选的实施方式中，雌二醇离子的存在或量通过比较参考诸如2,4,16,16,17-d_5雌二醇被关联到测试样品中的雌二醇的存在或量。

[0050] 在一个实施方式中，所述方法包括液相层析与质谱法的组合。在优选的实施方式中，液相层析是HPLC。优选的实施方式单独利用HPLC或与一种或多种纯化方法例如HTLC或蛋白质沉淀结合以纯化样品中的雌二醇。在另一个优选的实施方式中，质谱法是串联质谱法(MS/MS)。

[0051] 在本文公开的方面的某些优选的实施方式中，雌二醇的量化极限(LOQ)小于或等于80pg/mL；优选地小于或等于75pg/mL；优选地小于或等于50pg/mL；优选地小于或等于25pg/mL；优选地小于或等于10pg/mL；优选地小于或等于5pg/mL；优选地小于或等于4.5pg/mL；优选地小于或等于4pg/mL；优选地小于或等于3.5pg/mL；优选地小于或等于3pg/mL；优选地小于或等于2.5pg/mL；优选地2pg/mL。

[0052] 如本文所用，术语“约”在提及不包括离子质量测量的定量测量时，是指所示值加上或减去10%。质谱仪可在测定给定分析物的质量中轻微变化。术语“约”在离子质量或离子质/荷比的上下文中是指+/-0.5原子质量单位。

[0053] 上述的发明内容是非限制性的，并且本发明的其他特征和优势将从以下的具体实施方式和权利要求书中显而易见。

附图说明

[0054] 图1显示了使用LC-MS/MS分析在连续稀释的储存样品中雌二醇定量的线性。在实施例6中进行详细描述。

具体实施方式

[0055] 检测和量化测试样品中雌二醇的方法被描述。所述方法采用液相层析(LC)——最优选为HTLC与HPLC结合——来进行所选分析物的最初纯化，并且将该纯化与质谱法(MS)的独特方法组合，由此提供高通量测试系统用于检测并量化测试样品中的雌二醇。优选的实施方式特别适于大的临床实验室应用。雌二醇方法被提供，其具有提高的特异性并且以比其它雌二醇测试所需的更少的时间和更少的样品制剂实现。

[0056] 在优选的实施方式中，测试样品中雌二醇的检测极限(LOD)小于或等于80pg/mL；优选地小于或等于75pg/mL；优选地小于或等于50pg/mL；优选地小于或等于25pg/mL；优选地小于或等于10pg/mL；优选地小于或等于5pg/mL；优选地小于或等于4.5pg/mL；优选地小于或等于4pg/mL；优选地小于或等于3.5pg/mL；优选地小于或等于3pg/mL；优选地小于或等于2.5pg/mL；优选地2pg/mL。

[0057] 合适的测试样品包括任何可包含感兴趣分析物的测试样品。例如，在制备合成雌二醇期间获得的样品可以进行分析以测定组成和制备方法的产率。在某些优选的实施方式中，样品是生物学样品；即，从任何生物来源诸如动物、细胞培养物、器官培养物等获得的样品。在某些优选的实施方式中，样品从哺乳动物诸如狗、猫、马等获得。特别优选的哺乳动物是灵长类，最优选地是男性人类或女性人类。特别优选的样品包括血液、血浆、血清、头发、肌肉、尿液、唾液、泪液、脑脊髓液或其它组织样品。这样的样品可从例如患者——即有生命的个人，男性或女性，其将自己置于临床环境中以诊断、预测或治疗疾病或病症——中得到。测试样品优选地从患者中得到，例如血清。

[0058] 质谱法的样品制备

[0059] 在女性中，大约1.3%的雌二醇以游离形式循环，其余的雌二醇结合性激素结合球蛋白(SHBG)以及结合白蛋白。雌二醇以高亲和力(大约40%)结合SHBG或以较低的亲和力结合白蛋白。

[0060] 可采用的以相对于样品中的其它组分(例如蛋白)富集雌二醇的方法包括例如过滤、离心、薄层层析(TLC)、包括毛细管电泳在内的电泳、包括免疫亲和分离在内的亲和分离、包括乙酸乙酯提取和甲醇提取在内的提取法以及离液剂的应用或上述或类似方法的任何组合。

[0061] 多种方法可用于在层析和/或MS样品分析前破坏雌二醇与蛋白之间的相互作用以使分析可涉及样品中雌二醇的总量(例如游离的雌二醇和结合蛋白的雌二醇)。蛋白质沉淀是制备测试样品特别是生物学测试样品诸如血清或血浆的一种优选的方法。这样的蛋白质纯化方法在本领域中是熟知的，例如，Polson,et al.,Journal of Chromatography B785:263-275(2003)描述了适合用于所述方法的蛋白质沉淀技术。蛋白质沉淀可被用于从样品中去除大部分蛋白质，留下在上清液中的雌二醇。样品可被离心以将液态上清液与沉淀的蛋白质分开。所得上清液然后可应用于液相层析和后来的质谱法分析。在某些实施方式中，蛋白质沉淀诸如例如乙腈蛋白质沉淀的应用消除了在HPLC和质谱法之前对高湍流液相层析(HTLC)或其他在线提取的需要。因此，在这样的实施方式中，所述方法涉及：(1)进行感兴趣样品的蛋白质沉淀；和(2)在没有使用在线提取或高湍流液相层析(“HTLC”)的情况下将上清液直接加样到HPLC-质谱仪上。

[0062] 在其他优选的实施方式中，雌二醇可从该蛋白中释放而不必沉淀蛋白。例如，甲酸或水中40%乙醇可添加至样品以破坏蛋白和雌二醇之间的相互作用。可选地，硫酸铵可添加至样品破坏载体蛋白和雌二醇之间的离子相互作用，而没有沉淀载体蛋白。

[0063] 在某些优选的实施方式中，HTLC，单独地或与一种或多种纯化方法组合，可被用于在质谱法之前纯化雌二醇。在这样的实施方式中，样品可采用捕获分析物的HTLC提取筒进行提取，然后在离子化之前在第二HTLC柱或分析用HPLC柱上洗脱并层析。因为包含在这些层析方法中的步骤可以自动方式连接，所以对分析物纯化期间操作者参与的需求可最小化。该特征可引起时间和费用的节省并排除操作者错误的可能性。

[0064] 应当认为，湍流——诸如HTLC柱和方法提供的——可增强传质速率，改进分离特征。HTLC柱以高层析流速的方式通过含有硬颗粒的填充柱分离组分。通过应用高流速(例如3-5mL/min)，在柱中发生湍流，其引起固定相和感兴趣分析物(或多种)之间几乎完全的相互作用。使用HTLC柱的优势是由于高分子量的种类在湍流条件下不被保留，消除了与生物

流体基质相关的大分子结构。将多个分离组合在一个步骤的HTLC方法减小了对过多样品制备的需要并且以明显高的速度运行。这些方法还获得优于层流(HPLC)层析的分离性能。HTLC允许生物样品(血浆、尿液等)的直接注射。直接注射在传统层析形式中很难获得,原因在于变性的蛋白和其他生物碎片迅速堵塞分离柱。HTLC也允许小于1mL的极低的样品体积,优选地小于.5mL,优选地小于.2mL,优选地.1mL。

[0065] 在质谱法分析前应用于样品制备的HTLC的实例已另外描述。参见例如Zimmer,et al.,J.Chromatogr.A854:23-35(1999);也可参见美国专利号5,968,367、5,919,368、5,795,469和5,772,874。在所述方法的某些实施方式中,样品在加样至HTLC柱前经历如上所述的蛋白质沉淀;在可选的优选实施方式中,样品可直接加样至HTLC而不经历蛋白沉淀。优选地,HTLC与HPLC结合使用以提取并纯化雌二醇而使样品不经历蛋白沉淀。在相关优选的实施方式中,纯化步骤包括:(i)将样品应用至HTLC提取柱,(ii)在雌二醇被柱保留的条件下洗涤HTLC提取柱,(iii)从HTLC提取柱上洗脱保留的雌二醇,(iv)将保留的物质应用至分析柱,以及(v)从分析柱上洗脱纯化的雌二醇。HTLC提取柱优选地是大颗粒柱。在多种实施方式中,所述方法的一个或多个步骤可以在线自动方式进行。例如,在一个实施方式中,步骤(i)-(v)以在线自动方式进行。在另一个实施方式中,电离和检测步骤在步骤(i)-(v)后在线进行。

[0066] 包括高效液相层析(HPLC)在内的液相层析(LC)依赖于相对慢的层流技术。传统的HPLC分析依赖于柱填充,其中样品穿过柱的层流是将感兴趣分析物从样品中分离的基础。本领域普通技术人员会理解这种柱中的分离是扩散过程。HPLC已经成功地用于生物学样品中化合物的分离;但是,在分离和随后的用质谱仪(MS)分析之前需要大量的样品制备,使得该技术需密集劳动。此外,大部分HPLC系统没有尽其最大可能地利用质谱仪,使得仅仅一个HPLC系统连接到单一的MS仪器,导致进行大量测定需要过长的时间。

[0067] 已经描述了各种方法,其使用HPLC用于质谱法分析之前的样品清理(clean-up)。参见例如Taylor,et al.,Therapeutic Drug Monitoring22:608-12(2000)和Salm,et al.,Clin.Therapeutics22Supl.B:B71-B85(2000)。

[0068] 本领域普通技术人员可以选择适合雌二醇使用的HPLC仪器和柱。层析柱通常包括便于分离化学物部分(即分馏)的介质(即填充物质)。介质可包括微小颗粒。颗粒包括结合表面,其与各种化学物部分(chemical moieties)相互作用以促进化学物部分的分离。一个合适的结合表面是疏水性结合表面诸如烷基结合表面。烷基结合表面可包括C-4、C-8或C-18结合烷基基团,优选地C-18结合基团。层析柱包括接收样品的入口和排出包括分馏的样品的流出物的出口。在一实施方式中,样品(或预先纯化的样品)在入口处被施加到柱,用溶剂或溶剂混合物进行洗脱,并且在出口处排出。可选择不同的溶剂模式用于洗脱感兴趣分析物(或多种)。例如,液相层析可采用梯度模式、等度模式或多型(即混合)模式进行。在层析期间,物质的分离受到变量诸如洗脱液(也称为“流动相”)、洗脱模式、梯度条件、温度等的选择的影响。

[0069] 在某些实施方式中,分析物可在感兴趣分析物被柱填充物质可逆地保留而一种或多种其它物质没有被保留的条件下通过将样品施加到柱中进行纯化。在这些实施方式中,可应用第一流动相条件,其中感兴趣分析物被柱保留,并且一旦未保留的物质被洗涤穿过,随后可应用第二流动相条件以从柱中去除保留的物质。可选地,分析物可在相比一种或多

种其它物质感兴趣分析物以不同的速度洗脱的流动相条件下通过将样品施加到柱中进行纯化。这种方法可相对于样品的一种或多种其它组分富集一种或多种感兴趣分析物的量。

[0070] 在一个优选的实施方式中，HTLC后可在疏水柱层析系统上进行HPLC。在某些优选的实施方式中，使用的是来自Cohesive Technologies基于TurboFlow Cyclone P®聚合物的柱(60μm粒子大小，50×1.0mm柱尺寸，100Å孔大小)。在相关优选的实施方式中，使用的是具有疏水封端来自Phenomenex Inc的连接Synergi Polar-RP®酯的苯基分析柱(4μm粒子大小，150×2.0mm柱尺寸，80Å孔大小)。在某些优选的实施方式中，使用HPLC Grade Ultra Pure水和100%甲醇作为流动相进行HTLC和HPLC。

[0071] 通过仔细选择阀门和连接器管道，两个或多个层析柱可按需要连接以使物质从一个穿至下一个而不需任何手动步骤。在优选的实施方式中，阀门和管道的选择通过预编程序的计算机进行控制以进行必要步骤。最优选地，层析系统也以这种在线方式连接至检测器系统，例如，MS系统。因此，操作者可将一盘样品置于自动取样器中，并在计算机控制下进行剩余的操作，实现全部所选样品的纯化和分析。

[0072] 在某些优选的实施方式中，测试样品中存在的雌二醇可在电离前被纯化。在特别优选的实施方式中，层析不是气相层析。优选地，所述方法可在质谱分析前不将雌二醇进行气相层析而进行。

[0073] 通过质谱法的检测和量化

[0074] 在多种实施方式中，测试样品中存在的雌二醇可通过本领域普通技术人员已知的任何方法进行电离。质谱法采用质谱仪进行，所述质谱仪包括离子源，用于电离分馏的样品并产生带电分子用于进一步分析。例如样品的电离可通过电子电离、化学电离、电喷雾电离(ESI)、光子电离、大气压化学电离(APCI)、光致电离、大气压光致电离(APPI)、快速原子轰击(FAB)、液体二次电离(LSI)、基质辅助激光解吸电离(MALDI)、场致电离、场致解吸、热喷雾/等离子喷雾电离、表面增强激光解吸电离(SELDI)、感应耦合等离子体(ICP)和粒子束电离进行。本领域普通技术人员应理解电离方法的选择可根据要测量的分析物、样品类型、检测器类型、正-负模式的选择等进行确定。

[0075] 在优选的实施方式中，雌二醇通过电喷雾电离(ESI)以正模式或负模式进行电离。在相关优选的实施方式中，雌二醇离子是气态并且惰性碰撞气体是氩或氮。在可选的优选实施方式中，雌二醇通过大气压化学电离(APCI)以正模式或负模式进行电离。

[0076] 样品已经电离后，由此产生的带正电或带负电的离子可进行分析以测定质荷比。用于测定质荷比的合适分析器包括四极分析器、离子阱分析器和飞行时间分析器。离子可采用几种检测模式进行检测。例如，所选离子可以进行检测，即采用选择离子监测模式(SIM)，或者可选地，离子可采用扫描模式例如多反应监测(MRM)或选择反应监测(SRM)进行检测。优选地，质荷比采用四极分析器进行测定。例如，在“四极”或“四极离子阱”仪器中，振荡射频场中的离子经历与电极之间施加的DC电压、RF信号的振幅和质/荷比成比例的力。可以选择电压和振幅，以致于只有特定质/荷比的离子传播四极的长度，而所有其它离子是偏离的。因此，四极仪器可对注入到仪器的离子起到“质量过滤器”和“质量检测器”的作用。

[0077] 技术人员可通过利用“串联质谱法”或“MS/MS”提高MS技术的分辨率。在该技术中，从感兴趣分子中产生的前体离子(也称为母体离子)可在MS仪器中进行过滤，并且前体离子随后成碎片以产生一种或多种碎片离子(也称为子离子或产物离子)，其然后在第二MS程序

中进行分析。通过仔细选择前体离子，仅仅由某些分析物产生的离子通过至碎裂室，其中与惰性气体原子的碰撞产生子离子(daughter ions)。因为前体和碎片离子都是在给定系列的电离/破裂条件下以可再生方式产生的，所以MS/MS技术可提供极其强大的分析工具。例如，过滤/破裂组合可被用于消除干扰物质，并且可特别用于复杂样品诸如生物学样品。

[0078] 质谱仪一般给用户提供离子扫描；即，在给定范围(例如100至1000amu)内具有特定质荷比(m/z)的各个离子的相对丰度。分析物测试的结果，即质谱，可通过本领域已知的许多方法关联到原始样品中分析物的量。例如，假定取样和分析参数进行仔细控制，可将给定离子的相对丰度与将相对丰度转化成原始分子的绝对量的表进行比较。可选地，分子标准可与样品一起运行，并且基于从那些标准中产生的离子构建标准曲线。利用这种标准曲线，给定离子的相对丰度可被转化成原始分子的绝对量。在某些优选的实施方式中，内标被用于产生计算雌二醇的数量的标准曲线。产生和利用这种标准曲线的方法在本领域中是熟知的，并且本领域普通技术人员能选择合适的内标。例如，雌二醇的同位素可被用作内标；在某些优选的实施方式中，所述标准是d_5-雌二醇。将离子的量与原始分子的量关联的许多其它方法对本领域普通技术人员应是熟知的。

[0079] 所述方法的一个或多个步骤可采用自动仪器进行。在某些实施方式中，一个或多个纯化步骤在线进行，并且更优选地所有纯化和质谱法步骤可以在线的方式进行。

[0080] 在某些实施方式中，诸如MS/MS，其中前体离子被分离以进一步破裂，碰撞活化分裂通常被用于产生碎片离子以进一步检测。在CAD中，前体离子通过与惰性气体碰撞获得能量，并且随后通过被称为“单分子分解”的过程产生碎片。足够的能量必须储蓄在前体离子中以致于离子内的某些键可由于增加的振动能而断开。

[0081] 在特别优选的实施方式中，雌二醇如下采用MS/MS进行检测和/或量化。样品经历液相层析，优选地HTLC接着HPLC，来自层析柱的液体溶剂流进入MS/MS分析仪的加热喷雾器界面，并且溶剂/分析物混合物在界面的加热管中被转化为蒸汽。包含在雾状溶剂中的分析物(例如雌二醇)被界面的冠状放电针电离，其将大的电压施加到雾状溶剂/分析物混合物。离子例如前体离子穿过仪器的孔并且进入第一个四极。四极1和3(Q1和Q3)是质量过滤器，允许根据它们的质荷比(m/z)选择离子(即“前体”和“碎片”离子)。四极2(Q2)为碰撞单元，其中离子被破裂。质谱仪的第一个四极(Q1)选择具有雌二醇的质荷比的分子。具有雌二醇的正确质/荷比的前体离子被允许穿到碰撞室(Q2)中，而具有任何其它m/z的多余离子与四极的侧面碰撞并且被除去。进入Q2的前体离子与中性氩气分子和碎片碰撞。该过程被称为碰撞活化分裂(CAD)。所产生的碎片离子穿到四极3(Q3)，其中雌二醇的碎片离子被选择而其它离子被除去。

[0082] 所述方法可包括在正离子模式或负离子模式下进行的MS/MS。采用本领域熟知的标准方法，本领域普通技术人员能鉴定可用于在四极3(Q3)中选择的雌二醇的特定前体离子的一种或多种碎片离子。

[0083] 如果雌二醇的前体离子包括醇或胺基团，通常形成分别代表前体离子的脱水或去氨基的碎片离子。在包括醇基团的前体离子的情况下，通过脱水形成的这些碎片离子通过从前体离子中失去一个或多个水分子而形成(即，其中前体离子与碎片离子之间的质荷比差对于失去一个水分子来说是大约18，或者对于失去两个水分子来说大约36等)。在包括胺基团的前体离子的情况下，通过去氨基形成的这些碎片离子通过失去一个或多个氨分子而

形成(即,其中前体离子与碎片离子之间的质荷比差对于失去一个氨分子来说是大约17,或者对于失去两个氨分子来说大约34等)。同样,包括一个或多个醇和氨基的前体离子常常形成代表失去一个或多个水分子和/或一个或多个氨分子的碎片离子(即其中前体离子与碎片离子之间的质荷比差对于失去一个水分子和失去一个氨分子来说是大约35)。一般地,代表脱水或去氨基的碎片离子不是对特定分析物的特定碎片离子。因此,在本发明优选的实施方式中,进行MS/MS以使检测到雌二醇的至少一种碎片离子,其不只表现为从前体离子中失去一个或多个水分子和/或失去一个或多个氨分子。

[0084] 随着离子与检测器碰撞,它们产生转化成数字信号的电子脉冲。所获得的数据被传递到计算机,其将所收集的离子数对时间作图。所产生的质量层析图类似于在传统HPLC方法中产生的层析图。测量对应于特定离子的峰下面的面积或这些峰的振幅,并且面积或振幅被关联到感兴趣分析物(雌二醇)的量。在某些实施方式中,对碎片离子(或多种)和/或前体离子来说的曲线下面积或峰的振幅进行测量以测定雌二醇的量。如上所述,给定离子的相对丰度可基于内部分子标准诸如d_5-雌二醇的一种或多种离子的峰采用校准标准曲线转化成原始分析物例如雌二醇的绝对量。

[0085] 下列实施例起到阐明本发明的作用。这些实施例绝对没有意图限制所述方法的范围。

[0086] 实施例

[0087] 实施例1:样品和试剂制备

[0088] 血液收集在不含添加剂的Vacutainer中并使其在室温18℃至25℃凝结30分钟。显示严重溶血和/或脂血的样品被排除。

[0089] 制备甲醇中的1mg/mL雌二醇储存标准并进一步在甲醇中稀释以制备1,000,000pg/mL雌二醇中间储存标准,其用于制备两种10,000pg/mL雌二醇工作标准,对于标准A稀释在甲醇中或对于标准B稀释在汽提的血清中(stripped serum)。

[0090] 含重氢的甲醇(甲基-d_1醇;Fisher目录号AC29913-1000或等同物)用于制备1mg/mL d_5-雌二醇储存标准(2,4,16,16,17-d_5雌二醇),其用于制备含重氢的甲醇中的1,000,000pg/mL中间储存标准。d_5-雌二醇中间储存标准用于制备DI水中的5000pg/mL工作d_5-雌二醇内标:1mL的d_5-雌二醇中间储存标准在200mL容量瓶中用DI水稀释至体积。

[0091] 20%甲酸溶液通过将50mL的甲酸(～98%纯Aldrich目录号06440或等同物)添加至250mL容量瓶制备,其用超纯HPLC级水稀释至体积。DI水中的100mM硫酸铵溶液通过添加13.2克的硫酸铵粉末(CAS#7783-20-2Fisher目录号:A702-500)至1000mL容量瓶制备,其用DI水稀释至体积。

[0092] 用于各次运行的所有校准/标准从10,000pg/mL雌二醇标准的冷冻等分试样在汽提的血清中连续稀释每周新鲜制备。制备的标准从最高浓度至最低浓度,各个标准最终总体积为10mL。

[0093] 实施例2:使用液相层析从血清中提取雌二醇

[0094] 通过吸取200μL的标准、对照或患者样品至96孔板制备液相层析(LC)样品。如果以正离子模式运行,300μL的20%甲酸被递送至各个孔至～11%(V/V)的终浓度。如果以负离子模式运行,300μL的100mM硫酸铵溶液被添加至各个孔至～57mM硫酸铵的终浓度。另外,25μL的5000pg/mL d_5-雌二醇标准被添加至各个孔。在LC前样品在室温被温育30至45分钟。

[0095] 液相层析用Cohesive Technologies Aria TX-4HTLC系统使用Aria OS V1.5或更新的软件进行。自动取样器洗涤溶液使用30%乙腈、30%甲醇、30%异丙醇和10%丙酮(v/v)制备。

[0096] HTLC系统自动注射如上制备的75μL样品至用大颗粒填充的TurboFlow柱(来自Cohesive Technologies的50×1.0mm,60μm Cyclone P柱)。样品以高流速加样(5mL/min,加样试剂100%DI)以在提取柱内部产生湍流。该湍流确保雌二醇与柱中大颗粒的最优化结合,以及残留蛋白和碎片通过至废物。

[0097] 加样后,流动方向被倒转,样品用回路(loop)中200μL的100%甲醇洗脱至分析柱(Phenomenex分析柱,Synergi Polar-RP® 150×2.0mm,4μm柱)。二元HPLC梯度被应用至分析柱以将雌二醇从样品中含有的其他分析物分离。流动相A是超纯水(HPLC级)以及移动相B是100%甲醇。HPLC梯度起始于40%有机梯度,其在大约5.33分钟内斜线上升至100%。分析物在77%甲醇梯度从HPLC柱洗脱。然后,分离的样品进行MS/MS以量化雌二醇。

[0098] 为了测定其他分子的干扰,空白血清被掺加有各个相同重量的1000pg/mL甾体诸如16-β雌二醇和17-α雌二醇以及下列甾体:雌酮、雌三醇、睾酮、17-α羟基孕酮、孕酮、雄烯二酮、17-β雌二醇葡糖苷酸、17-β雌二醇硫酸盐以及二羟基睾酮。样品进行LC。除了17-α雌二醇,甾体不与雌二醇共洗脱,所述17-α雌二醇部分干扰17-β雌二醇但具有足够不同的保留时间以使操作者容易测定它的存在。

[0099] 实施例3:MS/MS对雌二醇的检测和量化

[0100] MS/MS使用Finnigan TSQ Quantum Ultra MS/MS系统(Thermo Electron Corporation)进行。下列均来自ThermoElectron的软件程序用于本文所述的实施例中:Tune Master V1.2或更新的、Xcalibur V2.0SR1或更新的、TSQ Quantum1.4或更新的、LCQuan V2.0或更新的以及XReport1.0或更新的。流出分析HPLC柱的液体溶剂/分析物流至Thermo Finnigan MS/MS分析仪加热的雾化器界面。溶剂/分析物混合物在界面的加热管中被转化至蒸汽。雾化的溶剂中的分析物通过被界面的冠状放电针电离,其将电压施加到雾化溶剂/分析物混合物。

[0101] 离子穿过第一个四极(Q1),其选择具有质荷比为271.14±.5m/z或255.07±.5m/z的离子。进入四极2(Q2)的离子与氩气碰撞以产生离子碎片,其穿过四极3(Q3)用于进一步选择。同时,使用同位素稀释质谱法的相同方法用内标——5-含重氢的雌二醇分子——进行。下列质量转换用于在正极性确认过程中检测并量化。

[0102] 表1.雌二醇质量转换(正极性)

[0103]

分析物	前体离子(m/z)	产物离子(m/z)
雌二醇	255.07	133.20与159.20
2,4,16,16,17-d_5雌二醇	260.10	135.10与161.10

[0104] 下列质量转换用于在负极性确认过程中检测并量化。

[0105] 表2雌二醇质量转换(负极性)

[0106]

分析物	前体离子(m/z)	产物离子(m/z)
雌二醇	271.14	145.10与183.10

2,4,16,16,17-d_5雌二醇	276.15	147.10与187.10

[0107] 实施例4:测试内和测试间的精密度和精确度

[0108] 三个质量控制(QC)区由活性炭汽提的血清制备,所述活性炭汽提的血清被掺加有雌二醇至10、200和800pg/mL的浓度。

[0109] 来自三个QC区每一个的十个等分试样在单个测试中分析以测定在一个测试内样品的重复性(CV)。测定下列值:

[0110] 表3.测试内变化和精确度

[0111]

	水平I (10 pg/mL)	***水平II (200 pg/mL)***	***水平III (800 pg/mL)***
平均值	12	203	804
标准偏差	0.8	14.8	24.2

[0112]

差			
CV	7.4 %	7.3 %	3.0 %
精确度	115 %	102 %	101 %

[0113] 来自三个QC区每一个的十个等分试样测试五天以测定测试之间的重复性(RSD%)。测定下列值:

[0114] 表4.测试间变化和精确度

[0115]

	水平1 (10 pg/mL)	***水平II (200 pg/mL)***	***水平III (800 pg/mL***
平均值	11	209	797
标准偏差	2.0	26.8	81.6
RSD (%)	17.6	12.8	10.2
精确度 (%)	112.9	104.3	99.7

[0116] 实施例5:分析灵敏度:检测极限(LOD)和量化极限(LOQ)

[0117] 雌二醇零标准以10个重复运行以测定测试的检测极限,其是测量值大于与之相关的不确定性的点。LOD被独断地定义为零浓度的2倍标准差(SD)。产生的零标准的峰面积比进行统计学分析,其平均值为.021和SD为.006。雌二醇测试的LOD为2.0pg/mL。

[0118] 为了测定具有精密度为20%和精确度为80%至120%的量化极限,测试浓度接近于所期望LOQ的的五个不同样品并且对各个测定重复性。雌二醇测试的LOQ被确定为2.0pg/mL。

[0119] 实施例6:测试报告的范围和线性

[0120] 为了建立测试中雌二醇检测的线性,制备被设定为零标准的一个空白以及11个掺料的血清标准并在不同的5天分析。五个连续运行的二次回归产生0.995或更大的相关系数,具有±20%的正确度,其显示2至2000pg/mL的可定量的线性范围。

[0121] 实施例7:基质特异性

[0122] 基质特异性使用水、汽提的血清和混合的血清评估以测定患者样品是否能够以线性方式被稀释。在校准运行后,样品以两个重复运行。精确度如下:

[0123] 表5.基质特异性精确度

[0124]

	水	汽提的血清	混合的血清
1:2稀释	120%	94%	147%
1:4稀释	38%	85%	94%

[0125] 实施例8:回收

[0126] 为了测定从掺料的样品中回收雌二醇的能力,已知浓度的两个患者样品被掺加有3个水平(低、中、高)的雌二醇。回收通过掺加的量除以期望的浓度来计算。平均回收对低、中和高水平分别为92%、108%和98%。

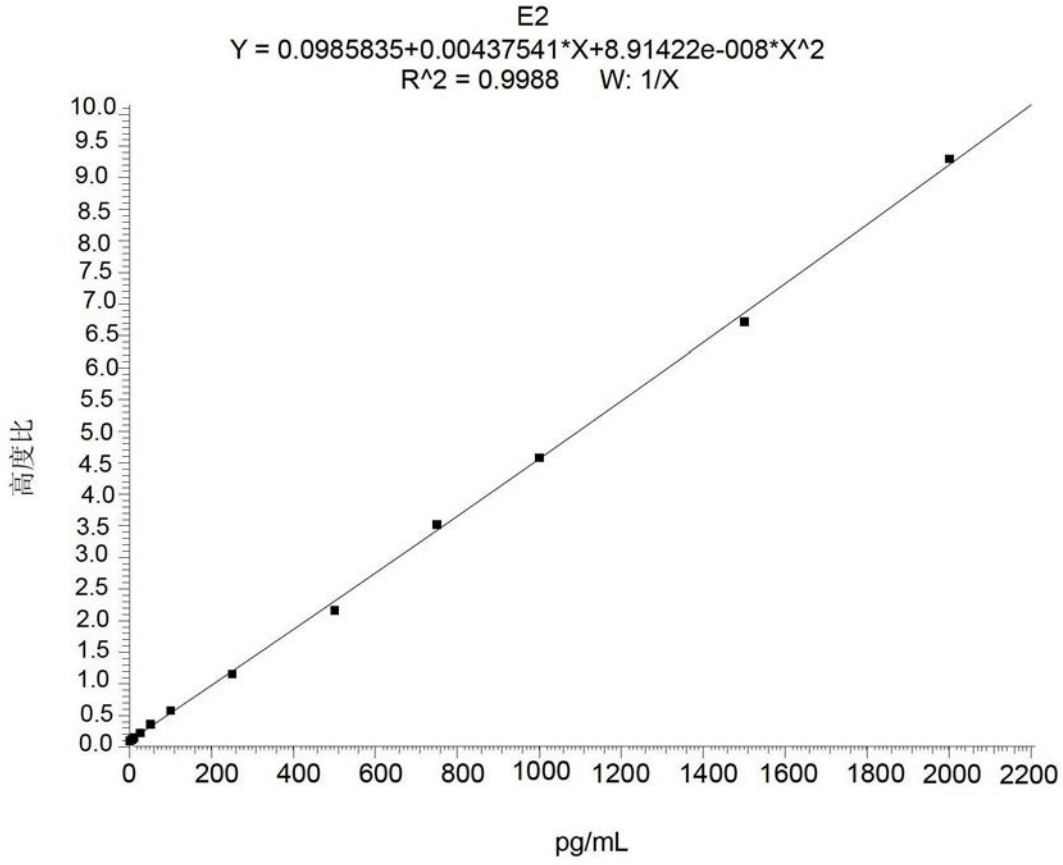
[0127] 本文提到或引用的文章、专利和专利申请以及所有其它文件或电子可得到的信息的内容以其全部内容通过引用并入本文至这样的程度,如同每一单独的出版物被具体且单独地显示通过引用并入。申请人保留将任何和所有的来自任何这些文章、专利、专利申请或其它物理和电子文件的物质和信息物理上并入本申请的权利。

[0128] 本文例证性描述的方法可在本文没有具体公开的任何元素或多个元素、限制或多个限制不存在的情况下合适地实施。因此,例如术语“包括(comprising)”、“包括(including)”、“包含(containing)”等应当广义且非限制性地理解。此外,本文所用的术语和表达已经作为描述性术语而不是限制性术语使用,并且没有意图使用这种将所示和所述特征的等价形式或其部分排除的术语和表达。应当认识到在所请求保护的发明范围内各种改变是可能的。因此,应当理解,尽管本发明通过优选的实施方式和任选特征具体地公开,但是本领域普通技术人员可诉诸于本文公开的其中实施的本发明的改变和变化,并且这种改变和变化被认为在本发明的范围内。

[0129] 本发明在本文中已经作了广泛且一般性的描述。落入上位公开内容中的每一个较窄类别和亚组也构成所述方法的部分。这包括本发明的一般描述,条件是或者否定性的限制是从种类中去除了任何主题内容,无论排除的物质是否在本文中具体描述。

[0130] 其它实施方式在下列权利要求之内。此外,在所述方法的特征或方面按照马库什组进行描述的情况下,本领域普通技术人员应认识到本发明也因此按照马库什组的任何单个成员或成员的亚组进行描述。

图 1. 线性——典型校准曲线


E2
Y = 0.0985835+0.00437541*X+8.91422e-008*X^2
R^2 = 0.9988 W: 1/X
高度比
pg/mL
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
4.0
4.5
5.0
5.5
6.0
6.5
7.0
7.5
8.0
8.5
9.0
9.5
10.0
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
2000
2200