



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102239266 A

(43) 申请公布日 2011. 11. 09

(21) 申请号 200980148812. 8

(22) 申请日 2009. 09. 30

(30) 优先权数据

61/103, 202 2008. 10. 06 US

12/272, 663 2008. 11. 17 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 06. 03

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/059090 2009. 09. 30

(87) PCT申请的公布数据

W02010/042370 EN 2010. 04. 15

(71) 申请人 奎斯特诊断投资公司

地址 美国特拉华州

(72) 发明人 A·戈沙尔 N·J·克拉克 R·瑞茨

(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 赵蓉民 陆惠中

(51) Int. Cl.

C12Q 1/02 (2006. 01)

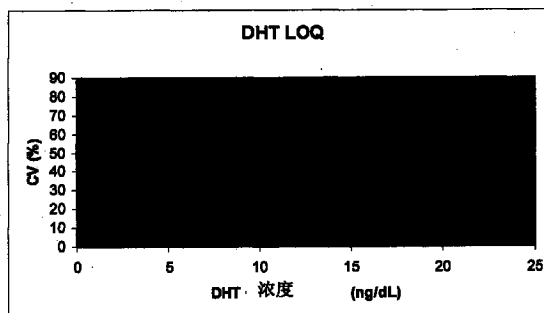
权利要求书 2 页 说明书 15 页 附图 2 页

(54) 发明名称

通过质谱分析法检测双氢睾酮的方法

(57) 摘要

提供的是使用质谱分析法测定样品中双氢睾酮 (DHT) 的量的方法。一般而言,该方法包括离子化样品中的 DHT, 并且检测和定量所述离子的量以测定样品中 DHT 的量。



1. 测定体液样品中未衍生的双氢睾酮 (DHT) 的量的方法,所述方法包括:
 - a. 在适合于产生一种或多种通过质谱分析法可检测的离子的条件下,离子化通过固相萃取 (SPE) 从所述体液样品纯化的未衍生的 DHT ;其中所述离子包括选自具有质荷比 291.10 ± 0.50 、 255.20 ± 0.50 和 79.20 ± 0.50 的离子的一种或多种离子 ;和
 - b. 通过质谱分析法测定一种或多种离子的量,并且使用测定的所述量计算所述体液样品中未衍生的 DHT 的量。
2. 权利要求 1 所述的方法,其中所述质谱分析法是串联质谱分析法。
3. 权利要求 1-2 任一项所述的方法,其中所述离子化包括生成具有质 / 荷比 291.10 ± 0.50 的先驱离子以及生成选自具有质 / 荷比 255.20 ± 0.50 和 79.20 ± 0.50 的离子的一种或多种碎片离子。
4. 权利要求 1-3 任一项所述的方法,其中所述 SPE 和质谱分析法以联机方式进行。
5. 权利要求 1-4 任一项所述的方法,其中所述 SPE 作为高紊度液相色谱 (HTLC) 进行。
6. 权利要求 1-5 任一项所述的方法,其中所述纯化进一步包括用高效液相色谱 (HPLC) 进行纯化。
7. 权利要求 6 所述的方法,其中所述 SPE 和所述 HPLC 被连接以进行所述样品的联机处理。
8. 权利要求 1-7 任一项所述的方法,其中所述体液样品是血浆或血清。
9. 权利要求 1-8 的任一项所述的方法,其中所述方法具有在 5ng/dL 到 200ng/dL ——包括 5ng/dL 和 200ng/dL ——的范围内的定量限制。
10. 权利要求 1-9 任一项所述的方法,其中通过与内标比较,将由质谱分析法测定的所述一种或多种离子的量与测试样品中未衍生的 DHT 的存在或量相关联。
11. 权利要求 10 所述的方法,其中所述内标包括 $16,16,17\text{-d}_3$ 双氢睾酮。
12. 通过质谱分析法测定测试样品中未衍生的双氢睾酮 (DHT) 的量的方法,所述方法包括:
 - a. 在适合于产生一种或多种质谱分析法可检测的离子的条件下,离子化通过高紊度液相色谱 (HTLC) 从所述测试样品纯化的未衍生的 DHT ;和
 - b. 通过质谱分析法测定一种或多种离子的量,并且使用测定的所述量来计算体液样品中未衍生的 DHT 的量。
13. 权利要求 12 所述的方法,其中所述质谱分析法是串联质谱分析法。
14. 权利要求 12-13 任一项所述的方法,其中所述纯化进一步包括用高效液相色谱 (HPLC) 进行纯化。
15. 权利要求 12-14 任一项所述的方法,其中所述 HTLC 和所述 HPLC 被配置用于联机处理。
16. 权利要求 12-15 任一项所述的方法,其中所述测试样品是体液样品。
17. 权利要求 12-16 任一项所述的方法,其中所述测试样品是血浆或血清。
18. 权利要求 12-17 任一项所述的方法,其中质谱分析法可检测的所述一种或多种离子包括选自具有质 / 荷比 291.10 ± 0.50 、 255.20 ± 0.50 和 79.20 ± 0.50 的离子的一种或多种离子。
19. 权利要求 12-18 任一项所述的方法,其中所述离子化包括生成具有质 / 荷比

291.10±0.50 的先驱离子以及选自具有质 / 荷比 255.20±0.50 和 79.20±0.50 的离子的一种或多种碎片离子。

20. 权利要求 12-19 任一项所述的方法,其中所述方法具有在 5ng/dL 到 200ng/dL——包括 5ng/dL 和 200ng/dL——的范围内的定量限制。

21. 权利要求 12-20 任一项所述的方法,其中通过与内标比较,将由质谱分析法测定的所述一种或多种离子的量与所述测试样品中未衍生的 DHT 的存在或量相关联。

22. 权利要求 21 所述的方法,其中所述内标包括 16,16,17-d₃ 双氢睾酮。

23. 通过串联质谱分析法测定体液样品中未衍生的双氢睾酮 (DHT) 的量的方法,所述方法包括:

a. 生成通过高紊度液相色谱 (HTLC) 从体液样品纯化的未衍生的 DHT 的先驱离子,其具有 291.10±0.50 的质 / 荷比;

b. 生成所述先驱离子的一种或多种碎片离子,其中所述一种或多种碎片离子的至少一种包括选自具有质 / 荷比 255.20±0.50 和 79.20±0.50 的离子的碎片离子;和

c. 测定在步骤 (b) 或 (c) 或两者中生成的所述离子的一种或多种的量,并且使用测定的所述量计算所述测试样品中未衍生的 DHT 的量。

24. 权利要求 23 所述的方法,其中所述纯化进一步包括用高效液相色谱 (HPLC) 进行纯化。

25. 权利要求 24 所述的方法,其中所述 HTLC 和所述 HPLC 被配置用于联机处理。

26. 权利要求 23-25 任一项所述的方法,其中所述体液样品是血浆或血清。

27. 权利要求 23-26 任一项所述的方法,其中所述方法具有在 5ng/dL 到 200ng/dL——包括 5ng/dL 和 200ng/dL——的范围内的定量限制。

28. 权利要求 23-27 任一项所述的方法,其中通过与内标比较,将由质谱分析法测定的所述一种或多种离子的量与所述测试样品中未衍生的 DHT 的存在或量相关联。

29. 权利要求 28 所述的方法,其中所述内标包括 16,16,17-d₃ 双氢睾酮。

通过质谱分析法检测双氢睾酮的方法

[0001] 相关专利申请的交叉参考

[0002] 本申请要求 2008 年 11 月 17 日提交的美国申请号 12/272,663 的优先权,并且要求 2008 年 10 月 6 日提交的美国临时申请号 No. 61/103,202 的权益,每一篇申请以其全部通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本申请涉及双氢睾酮 (DHT) 的检测。在具体方面中,本申请涉及通过质谱分析法检测双氢睾酮 (DHT) 的方法。

背景技术

[0004] 提供下列的背景技术描述仅作为帮助理解本发明,并不承认其描述或构成本发明的现有技术。

[0005] 双氢睾酮 (DHT) [(17 β -羟基-5 α -雄烷-3-酮)] 是分子量为 290.4 道尔顿的类固醇激素。DHT 是由睾酮外周组织合成的有效雄激素。过量的 DHT 分泌经由转化为睾酮可以产生痤疮、多毛症和男性化。DHT 是前列腺增生的病因 (causal agent), 并且血液中的测量可用于评估对睾酮到 DHT 转化的抑制剂的顺应性和应答。

[0006] 测量样品中 DHT 的质谱分析法已被报导。参见,例如 Chang, Y., 等人, *Analyst* 2003,128:363-8; Caruso, D., 等人, *Neurochem Int* 2008,52:560-8; Wang, C., 等人, *Steroids* 2008,XXX:XXX-XXX (doi:10.1016/j.steroids.2008.05.004); Zhao, M., 等人, *Steroids* 2004,69:721-6; Janzen, N., 等人, *J Chroma B* 2008,861:117-22; Licea-Perez, H., 等人, *Steroids* 2008,73:601-10; Kashiwagi, B., 等人, *J Andrology* 2005,26:586-91; Kashiwagi, B., 等人, *Urology* 2005,66:218-23; Umera, M., 等人, *Cancer Sci* 2007,99:81-86; 和 Mohler, 等人, 美国专利申请号 11/973,127 (2007 年 10 月 8 日提交)。

发明内容

[0007] 本发明提供通过包括串联质谱分析法在内的质谱分析法检测样品中双氢睾酮 (DHT) 的量的方法。优选地,本发明的方法不包括在质谱分析法分析之前衍生样品中的 DHT。

[0008] 在一个方面,提供测定体液样品中未衍生的双氢睾酮 (DHT) 的量的方法。该方面的方法包括:(a) 通过固相萃取 (solid phase extraction) 纯化体液样品中的 DHT; (b) 离子化来自体液样品的 DHT 以产生一种或多种通过质谱分析法可检测的 DHT 离子,其中所产生的离子选自质荷比为 291.10 ± 0.50 的 DHT 先驱离子,和选自 255.20 ± 0.50 和 79.20 ± 0.50 的一种或多种 DHT 碎片离子;和 (c) 通过质谱分析法测定一种或多种 DHT 离子的量。在测量一种或多种 DHT 离子的量之后,DHT 离子(一种或多种)的量被用于计算测试样品中的未衍生的 DHT 的量。在一些实施方式中,质谱分析法是串联质谱分析法。在一些

实施方式中,固相萃取和质谱分析以联机方式进行。在一些实施方式中,作为高紊度液相色谱 (high turbulence liquid chromatography, HTLC) 进行固相萃取。在一些实施方式中,方法进一步包括在质谱分析法之前使用高效液相色谱 (HPLC) 纯化体液样品中的 DHT ;优选使用联机处理。在一些实施方式中,体液样品是血浆或血清。在一些实施方式中,方法具有在 5ng/dL 到 200ng/dL——包括 5ng/dL 和 200ng/dL——的范围内的定量限制。在一些实施方式中,通过质谱分析法检测的一种或多种 DHT 离子 (一种或多种) 的量通过与内标比较被用于计算测试样品中未衍生的 DHT 的量 ;内标优选地为 16,16,17-d₃ 双氢睾酮。上面列出的实施方式的特征在本发明的方法中可以没有限制地进行组合使用。

[0009] 在第二方面,提供通过质谱分析法测定测试样品中未衍生的双氢睾酮 (DHT) 的量的方法。该方面的方法包括 : (a) 使用高紊度液相色谱 (HTLC) 纯化测试样品中的 DHT ; (b) 离子化来自测试样品的 DHT 以产生一种或多种通过质谱分析法可检测的 DHT 离子 ;和 (c) 通过质谱分析法测定一种或多种 DHT 离子的量。在这些方法中,测量的 DHT 离子 (一种或多种) 的量被用于计算测试样品中的 DHT 的量。在一些实施方式中,质谱分析法是串联质谱分析法。在一些实施方式中,纯化测试样品中的 DHT 包括用高效液相色谱 (HPLC) 纯化 ;优选地配置用于联机处理。在一些实施方式中,测试样品是体液样品 ;优选地是血浆或血清。在一些实施方式中,通过质谱分析法可检测的 DHT 离子包括选自质 / 荷比为 291.10 ± 0.50、255.20 ± 0.50 和 79.20 ± 0.50 的离子的一种或多种离子。在一些实施方式中,离子化 DHT 的步骤包括生成质 / 荷比为 291.10 ± 0.50 的先驱离子,和生成选自质 / 荷比为 255.20 ± 0.50 和 79.20 ± 0.50 的离子的一种或多种碎片离子。在一些实施方式中,方法具有在 5ng/dL 到 200ng/dL——包括 5ng/dL 和 200ng/dL——的范围内的定量限制。在一些实施方式中,通过质谱分析法检测的一种或多种 DHT 离子 (一种或多种) 的量通过与内标比较被用于确定测试样品中未衍生的 DHT 的量 ;内标优选地为 16,16,17-d₃ 双氢睾酮。上面列出的实施方式的特征在本发明的方法中可以没有限制地进行组合使用。

[0010] 在第三方面,提供通过串联质谱分析法测定体液样品中未衍生的双氢睾酮 (DHT) 的量的方法。该方面的方法包括 : (a) 通过高紊度液相色谱 (HTLC) 从体液样品纯化 DHT ; (b) 生成具有 291.10 ± 0.50 的质 / 荷比的所述 DHT 的先驱离子 ; (c) 生成先驱离子的一种或多种碎片离子,其中所述的一种或多种碎片离子的至少一种包括选自具有 255.20 ± 0.50 和 79.20 ± 0.50 的质 / 荷比的碎片离子的碎片离子 ;和 (d) 检测在步骤 (b) 或 (c) 或两者中生成的所述离子的一种或多种的量。检测的离子的量被用于计算体液样品中未衍生的 DHT 的量。在一些实施方式中,从测试样品纯化 DHT 进一步包括用高效液相色谱 (HPLC) ;优选地配置进行联机处理。在一些实施方式中,体液样品是血浆或血清。在一些实施方式中,方法具有在 5ng/dL 到 200ng/dL——包括 5ng/dL 和 200ng/dL——的范围内的定量限制。在一些实施方式中,通过质谱分析法检测的一种或多种 DHT 离子 (一种或多种) 的量通过与内标比较被用于计算测试样品中未衍生的 DHT 的量 ;内标优选地为 16,16,17-d₃ 双氢睾酮。上面列出的实施方式的特征在本发明的方法中可以没有限制地进行组合使用。

[0011] 本发明的方法包括液相色谱与质谱分析法的组合。在优选的实施方式中,液相色谱是 HPLC。一个优选的实施方式只使用 HPLC 或者与一种或多种纯化方法例如诸如 HTLC 和 / 或蛋白质沉淀和过滤组合使用 HPLC,以纯化样品中的 DHT。在另一优选的实施方式中,质谱分析法是串联质谱分析法 (MS/MS)。

[0012] 在本文公开的方法的某些优选实施方式中,质谱分析法以正离子模式进行。可选地,质谱分析法以负离子模式进行。多种离子化源——包括例如大气压化学电离(atmospheric pressure chemical ionization) (APCI) 或电喷射离子化 (ESI)——可被用于本发明的实施方式中。在某些优选的实施方式中,以正离子模式使用 APCI 测量 DHT。

[0013] 在优选的实施方式中,质谱仪中可检测的 DHT 离子选自质/荷比 (m/z) 为 291.10 ± 0.50 、 255.20 ± 0.50 和 79.20 ± 0.50 的正离子。在特别优选的实施方式中,DHT 先驱离子具有 291.10 ± 0.50 的 m/z , 和一种或多种碎片离子选自具有 255.20 ± 0.50 和 79.20 ± 0.50 的 m/z 的离子。

[0014] 在优选的实施方式中,单独地可检测内标在样品中提供,其量也在样品中测定。在这些实施方式中,在样品中存在的内源性 DHT 和内标的全部或部分被离子化以产生在质谱仪中可检测的多种离子,并且从内源性 DHT 和内标每个产生的一种或多种离子通过质谱分析法进行检测。

[0015] 优选的内标是 $16,16,17-d_3$ 双氢睾酮 ($16,16,17-d_3$ DHT)。在优选的实施方式中,在质谱仪中可检测的内标离子选自具有 294.10 ± 0.50 和 258.20 ± 0.50 的 m/z 的正离子。在特别优选的实施方式中,内标先驱离子具有 294.10 ± 0.50 的 m/z ; 和内标碎片离子具有 258.20 ± 0.50 的 m/z 。

[0016] 在优选的实施方式中,通过与参比物例如 $16,16,17-d_3$ 双氢睾酮比较,将 DHT 离子的存在或量与测试样品中 DHT 的存在或量相关联。

[0017] 在某些优选的实施方式中,DHT 的定量限制 (LOQ) 在 5.0ng/dL 到 200ng/dL 的范围内——包括 5.0ng/dL 和 200ng/dL ; 优选地在 5.0ng/dL 到 100ng/dL 的范围内——包括 5.0ng/dL 和 100ng/dL ; 优选地在 5.0ng/dL 到 50ng/dL 的范围内——包括 5.0ng/dL 和 50ng/dL ; 优选地在 5.0ng/dL 到 25ng/dL 的范围内——包括 5.0ng/dL 和 25ng/dL ; 优选地在 5.0ng/dL 到 15ng/dL 的范围内——包括 5.0ng/dL 和 15ng/dL ; 优选地在 5.0ng/dL 到 10ng/dL 的范围内——包括 5.0ng/dL 和 10ng/dL ; 优选地为大约 5.0ng/dL 。

[0018] 如本文使用的,除非另有陈述,单数形式“一”、“一”和“该”(“a”,“an”and “the”) 包括复数参考。因此,例如提及“蛋白质 (a protein)”包括多个蛋白质分子。

[0019] 如本文使用的,“衍生”指使两个分子反应以形成新的分子。衍生雄激素的分子,例如 DHT 的分子,可以使用本领域熟知的多种衍生试剂进行。参见,例如,Kashiwagi, B., 等人, J Andrology 2005, 26 :586-91 和 Kashiwagi, B., 等人, Urology 2005, 66 :218-23, 其报告在萃取前使用氟 -1- 甲基吡啶 -P- 甲苯磺酸酯衍生 DHT。如本文使用的,“未衍生的”指没有被衍生。因此,没有指出衍生的双氢睾酮 (DHT) 是未衍生的 DHT。

[0020] 如本文使用的,术语“纯化”(“purification”或“purifying”) 不是指从样品除去目的分析物(一种或多种)以外的所有物质。相反地,纯化指相对于样品中可能干扰目的分析物检测的其他组分富集一种或多种目的分析物的量的方法。通过多种方法纯化样品可使一种或多种干扰物质相对减少,例如可能干扰或可能不干扰通过质谱分析法检测选择的 DHT 母离子或子离子的一种或多种物质。如使用的术语,相对减少并不要求在待被纯化的物质中与目的分析物一起存在的任何物质通过纯化被完全除去。

[0021] 如本文使用的,术语“测试样品(试样)”指可包含 DHT 的任何样品。如本文使用的,术语“体液”指可从个体的身体分离的任何流体。例如,“体液”可包括血液、血浆、血清、

胆汁、唾液、尿液、眼泪、汗液等。

[0022] 如本文使用的,术语“色谱法”指其中由液体或气体携带的化学混合物当绕或通过固定液或固相流动时由于化学个体的差别分配而被分离成组分的方法。

[0023] 如本文使用的,术语“液相色谱”或“LC”指当流体均匀渗滤通过细分物质的柱或通过毛细管路径时,流体溶液的一种或多种组分选择性延迟的方法。延迟是当流体相对于固定相(一种或多种)移动时,由混合物组分在一种或多种固定相和主体流体(即,流动相)之间的分配产生。“液相色谱”的实例包括反相液相色谱(RPLC)、高效液相色谱(HPLC)和高紊度液相色谱(HTLC)。

[0024] 如本文使用的,术语“高效液相色谱”或“HPLC”指其中通过在压力下迫使流动相通过固定相——通常为致密填充柱——增加分离程度的液相色谱。

[0025] 如本文使用的,术语“高紊度液相色谱”或“HTLC”指这样的色谱法形式,其使用分析物质通过填充作为进行分离的基础的柱的紊流。HTLC在通过质谱分析法以前,已应用于含有两种不知名药物的样品的制备。参见,例如 Zimmer 等人, JChromatogr A 854: 23-35(1999);也参见美国专利号 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“紊流”。当流体缓慢且平稳地流动时,流体被称为“层流”。例如,以低流速移动通过 HPLC 柱的流体是层流的。在层流中,流体的颗粒运动是有序的,其中颗粒大体上以直线移动。在较快的速度下,水的惯性克服了流体摩擦力,并且紊流产生。不与不规则边界接触的流体比被摩擦减慢或被不均匀表面转向的流体“移动更快(outruns)”。当流体紊流地流动时,其以旋涡和回旋(或涡流)形式流动,其比流动为层流时具有更大的“阻力”。许多参考文献可用于帮助确定何时流体流动为层流或紊流(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))。

[0026] 如本文使用的,术语“气相色谱”或“GC”指如此色谱法,其中样品混合物被汽化并且注入移动通过含有由液体或颗粒固体组成的固定相的柱的载气流(如氮气或氦气),并且样品混合物根据对固定相的化合物的亲和力被分离成其组分化合物。

[0027] 如本文使用的,术语“大颗粒柱”或“提取柱”指含有大于大约 50 μm 的平均粒径的色谱柱。如该内容中使用的,术语“大约”指 $\pm 10\%$ 。

[0028] 如本文使用的,术语“分析柱”指具有充足色谱板(chromatographic plate)以实现样品中物质分离的色谱柱,所述物质从柱洗脱足以对分析物的存在或量进行测定。这样的柱通常与“提取柱”不同,所述提取柱具有从未保留(non-retained)的物质分离或提取保留的物质以获得用于进一步分析的纯化样品的一般目的。如该内容中使用的,术语“大约”指 $\pm 10\%$ 。在优选的实施方式中,分析柱含有直径大约 4 μm 的颗粒。

[0029] 如本文使用的,术语“联机(on-line)”或“在线(inline)”,例如如在“联机自动方式”或“联机提取”中使用的,指不需要操作员介入而进行的过程。相反地,如本文使用的术语“脱机的(off-line)”指要求操作员手动介入的过程。因此,如果样品经历沉淀并且然后将上清液手动加载到自动采样器中,那么沉淀和加载步骤是与接下来的步骤脱机的。在该方法的不同实施方式中,一个或多个步骤可以以联机自动方式进行。

[0030] 如本文使用的,术语“质谱分析法”或“MS”指通过其质量鉴定化合物的分析技术。

MS 指基于其质荷比或“ m/z ”的过滤、检测和测量离子的方法。MS 技术通常包括 (1) 离子化化合物以形成带电化合物;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法离子化并检测。“质谱仪”一般包括电离器和离子检测器。一般而言,一种或多种目的分子被离子化,并且随后将离子引入质谱仪,在那里由于磁场和电场的组合,离子遵从空间中沿依赖于质量 (“ m ”) 和电荷 (“ z ”) 的路径。参见例如美国专利号 6,204,500,其名称为“Mass Spectrometry From Surfaces”;6,107,623,其名称为“Methods and Apparatus for Tandem Mass Spectrometry”;6,268,144,其名称为“DNA Diagnostics Based On Mass Spectrometry”;6,124,137,其名称为“Surface-Enhanced Photolabile Attachment And Release For Desorption And Detection Of Analytes”;Wright 等人, Prostate Cancer and Prostatic Diseases 1999,2:264-76;和 Merchant 和 Weinberger, Electrophoresis 2000,21:1164-67。

[0031] 如本文使用的,术语“以负离子模式操作”指其中生成和检测负离子的那些质谱分析法。如本文使用的,术语“以正离子模式操作”指其中生成和检测正离子的那些质谱分析法。

[0032] 如本文使用的,术语“离子化 (ionization)”或“电离 (ionizing)”指生成具有等于一个或多个电子单位 (electron unit) 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那些,而正离子是具有一个或多个电子单位的净正电荷的那些。

[0033] 如本文使用的,术语“电子电离”或“EI”指其中气相或蒸汽相的目的分析物与电子流相互作用的方法。电子冲击分析物产生分析物离子,其然后经历质谱分析法技术。

[0034] 如本文使用的,术语“化学电离”或“CI”指其中反应气体 (例如氦) 经历电子冲击并且分析物离子通过反应气体离子与分析物分子相互作用形成的方法。

[0035] 如本文使用的,术语“快原子轰击”或“FAB”指其中高能原子束 (通常为 Xe 或 Ar) 冲击不挥发性样品,解吸并离子化样品中包含的分子的方法。测试样品被溶解在粘性液体基质例如甘油、硫代甘油、 m -硝基苄醇、18-冠-6 冠醚 (18-crown-6-crown ether)、2-硝基苯基辛醚、环丁砜、二乙醇胺和三乙醇胺。化合物或样品的适当基质的选择是经验过程。

[0036] 如本文使用的,术语“基质辅助激光解吸电离 (matrix-assisted laser desorption ionization)”或“MALDI”指其中不挥发性样品暴露于激光辐照,其通过不同的离子化途径解吸和离子化样品中分析物的方法,所述离子化途径包括光致电离、质子化、去质子化和线束衰减 (cluster decay)。对于 MALDI,样品与促进分析物分子解吸的能量吸收基质混合。

[0037] 如本文使用的,术语“表面增强的激光解吸电离”或“SELDI”指其中非挥发性样品暴露于激光辐照,其通过不同的离子化途径解吸和离子化样品中分析物的另一种方法,所述离子化途径包括光致电离、质子化、去质子化和线束衰减。对于 SELDI,样品一般结合到优先保留一种或多种目的分析物的表面。如在 MALDI 中一样,该方法也可使用能量吸收物质以促进离子化。

[0038] 如本文使用的,术语“电喷射离子化”或“ESI”指其中溶液沿着毛细管的短的长度通过到被施加高的正或负电势的末端的方法。到达管末端的溶液被汽化 (使雾化) 成溶剂蒸汽中的非常小的溶液液滴的喷出或喷射。该液滴雾流过蒸发室,所述蒸发室被稍微加热

以防止冷凝和使溶剂蒸发。随着液滴变得更小,电表面电荷密度增加,直到相同电荷之间的天然排斥力引起离子以及中性分子被释放的时刻。

[0039] 如本文使用的,术语“大气压化学电离”或“APCI”指与 ESI 相似的质谱分析法;然而,APCI 通过在大气压下等离子体内部发生的离子-分子反应产生离子。等离子体通过喷射毛细管和对电极(counter electrode)之间的放电而得以保持。然后,一般地利用差别泵送的分离器(skimmer)阶段将离子提取入质量分析器。干燥和预热的 N_2 气体的逆流可用来提高溶剂去除。对于分析较小极性的种类,APCI 的气相离子化可比 ESI 更有效。

[0040] 如本文使用的,术语“大气压光致电离”或“APPI”指这样的质谱分析法形式,其中分子 M 的光致电离机理是光子吸收和电子发射以形成分子离子 M^+ 。因为一般地,光子能量刚好高于电离电势,所以分子离子不易于解离。在很多情况下,分析样品而无需进行色谱法也许是可能的,因此节省了大量时间和费用。在水蒸气或质子溶剂的存在下,分子离子可以夺取 H 以形成 MH^+ 。在 M 具有高的质子亲和力情况下,这倾向于发生。这不影响定量准确性,因为 M^+ 和 MH^+ 的和是常数。质子溶剂中的药物化合物通常被观测为 MH^+ ,而非极性化合物例如萘或睾酮通常形成 M^+ 。参见例如,Robb 等人,Anal. Chem. 2000, 72(15):3653-3659。

[0041] 如本文使用的,术语“电感耦合等离子体”或“ICP”指其中样品与部分离子化的气体在足够高的温度下相互作用以便大多数元素被原子化和离子化的方法。

[0042] 如本文使用的,术语“场解吸”指其中不挥发性测试样品被置于离子化表面上,使用强电场生成分析物离子的方法。

[0043] 如本文使用的,术语“解吸”指从表面移出分析物和/或使分析物进入气相。激光解吸热解吸是其中包含分析物的样品通过激光脉冲热解吸入气相的技术。激光撞击具有金属基底的特制 96 孔板的背面。激光脉冲加热基底并且热使样品转移入气相。然后将气相样品吸入质谱仪。

[0044] 如本文使用的,术语“选择的离子监控”是质谱仪的检测方式,其中仅相对窄质量范围内的离子——一般是大约一个质量单位——被检测。

[0045] 如本文使用的,有时被称为“选择反应监控”的“多重反应模式”是质谱仪的检测方式,其中选择检测先驱离子和一种或多种碎片离子。

[0046] 如本文使用的,术语“量化限制”、“定量限制”或“LOQ”指测量在数量上有意义的点。在该 LOQ 下的分析物反应是可鉴定的、离散的和可重现的,其相对标准差(RSD%)为 20%,准确度为 80%到 120%。

[0047] 如本文使用的,术语“检测限(检测极限,limit of detection)”或“LOD”是如此点,在该点下测量值大于与其相关的不确定度。LOD 是如此点,在该点值超过与其测量相关的不确定度,并且被定义为在 0 浓度下二倍的平均值的 RSD。

[0048] 如本文使用的,体液样品中 DHT 的“量”一般指反映液体体积中可检测的 DHT 的质量的绝对值。然而,量也考虑与其他 DHT 的量相比的相对量。例如体液中的 DHT 的量可以是大于对照或正常存在的 DHT 的正常水平的量。

[0049] 如本文使用的,涉及定量测量——不包括离子质量测量——的术语“大约”指所示出的值加或减 10%。质谱分析法仪器在测定给定分析物的质量可以稍微变化。在离子质量或离子质/荷比的情况中的术语“大约”指 ± 0.50 原子质量单位。

[0050] 上述的发明内容是非限制性的,并且根据下面的具体实施方式和权利要求书,本

发明的其他特征和优点将是明显的。

附图说明

[0051] 图 1 示出用于测定 DHT 分析的定量限制的空白和 5 个标准品的分析的变异系数的图。细节在实施例 5 中讨论。

[0052] 图 2 示出使用 LC-MS/MS 分析的系列稀释的原料样品 (stock sample) 中 DHT 的定量的线性。细节在实施例 6 中描述。

[0053] 图 3A 和 3B 示出通过本发明的示例性 HPLC-MS 方法的 DHT 测定与通过参照放射免疫测定法 (RIA) 的 DHT 测定的相关性。图 3A 中示出的相关性通过线性回归测定。图 3B 中示出的相关性通过 Deming 分析测定。细节在实施例 10 中描述。

具体实施方式

[0054] 描述了用于测量样品中 DHT 的量的本发明的方法。更具体地说,描述了用于检测并定量测试样品中的 DHT 的质谱法。方法可利用高紊度液相色谱 (HTLC) 以进行选择的分析物的纯化,并将该纯化与质谱分析法 (MS) 组合,从而提供用于检测并定量测试样品中 DHT 的高通量分析系统。优选实施方式特别适合于在大规模临床实验室中应用,用于自动 DHT 分析。

[0055] 用于本发明方法的适当的测试样品包括可包含目的分析物的任何测试样品。在一些优选实施方式中,样品是生物样品;即,从任何生物源例如动物、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,样品从哺乳动物例如狗、猫、马等获得。特别优选的哺乳动物是灵长类,最优选地是男人或女人。特别优选的样品包括体液例如血液、血浆、血清、唾液、脑脊髓液、或组织样品。这类样品例如可以从患者获得;患者即活人,男性或女性,它们本身处于临床环境中进行疾病或状况的诊断、预后或治疗。测试样品优选地从患者获得,例如血清或血浆。大约 0.5mL 的样品体积是优选的;然而可以分析大约 0.1mL 的样品。

[0056] 本发明考虑用于 DHT 定量分析的试剂盒。本发明的用于 DHT 定量分析的试剂盒可包括包含足以进行至少一个分析的量的内标的试剂盒。一般地,试剂盒也将包括以有形形式记录的说明书(例如包含在纸上或电子介质上)用以将包装的试剂在测定 DHT 量的测量分析中使用。

[0057] 用于本发明实施方式的校准和 QC 库(pool)可以使用“贫化((stripped)”血浆或血清(贫化 DHT)进行制备;例如,双活性炭解吸并去脂的血清。所有的人或非人贫化血浆或血清的源应该被检查以确保它们不含有可测量数量的 DHT。

[0058] 用于质谱分析法的样品分离

[0059] 测试样品可在室温以下储存。首先使储存在室温以下的测试样品(包括对照)达到室温,并且通过机械涡旋混合。在该时刻,可将内标加至测试样品。

[0060] 然后,可通过液-液或固相萃取制备样品进行质谱分析法。可使用多种方法以在质谱分析法之前相对于样品中其他组分(例如蛋白质)富集 DHT,所述方法包括例如液相色谱、过滤、离心、薄层层析(TLC)、电泳——包括毛细管电泳、亲和分离——包括免疫亲和分离、提取法——包括乙酸乙酯或甲醇提取、和使用离液剂或任何上述组合等。

[0061] 蛋白质沉淀是制备测试样品特别是生物测试样品例如血清或血浆的一种方法。这类蛋白纯化方法是本领域熟知的,例如 Polson 等, *Journal of Chromatography B*2003, 785:263-275, 描述适合用于本发明方法的蛋白质沉淀技术。蛋白质沉淀可用于从样品除去大多数蛋白质,在上清液中留下 DHT。样品可被离心以将液体上清液与沉淀蛋白质分离;可选地,可过滤样品以除去沉淀蛋白质。然后,所形成的上清液或滤液可直接应用到质谱分析法分析;或可选地,应用到液相色谱和随后的质谱分析法分析。在某些实施方式中,利用蛋白质沉淀例如甲酸蛋白质沉淀可避免在质谱分析法或 HPLC 和质谱分析法之前对 HTLC 或其他联机提取的需要。

[0062] 因此,在一些实施方式中,蛋白质沉淀单独或与一种或多种纯化方法组合可用于在质谱分析法之前纯化 DHT。在这些实施方式中,方法可包括 (1) 进行目的样品的蛋白质沉淀;和 (2) 将上清液直接加载到 LC- 质谱仪上,而无需使用联机提取或 HTLC。可选地,该方法可包括 (1) 进行目的样品的蛋白质沉淀;和 (2) 在质谱分析法之前,使用联机提取将上清液加载到 HTLC 上以进一步纯化。

[0063] 可在质谱分析法之前使用的一个样品纯化方法是液相色谱 (LC)。液相色谱的某些方法——包括 HPLC, 依赖于相对慢的层流技术。传统的 HPLC 分析依赖于柱填充物,其中通过该柱的样品的层流是将目的分析物从样品分离的基础。本领域普通技术人员将理解在这类柱中的分离是扩散过程,并且可选择适用于 DHT 使用的 HPLC 仪器和柱。一般地,色谱柱包括介质 (即填充材料) 以促进化学部分的分离 (即分级)。介质可包括微小的颗粒。颗粒包括与不同的化学部分相互作用以促进化学部分分离的键合表面 (bonded surface)。一种适当的键合表面是疏水键合表面,例如烷基键合或氰基键合表面。烷基键合表面可包括 C-4、C-8、C-12 或 C-18 键合的烷基。在优选的实施方式中,柱是氰基柱。色谱柱包括用于从固相萃取或 HTLC 柱直接地或间接地接收样品的入口和排放包括分馏样品的流出液的出口。

[0064] 在一个实施方式中,样品可在入口处被施加到 LC 柱,用溶剂或溶剂混合物洗脱,并在出口处排放。可选择不同的溶剂模式以洗脱目的分析物 (一种或多种)。例如,可使用梯度模式、等度模式或多型 (polytypic) (即混合的) 模式进行液相色谱。在色谱法期间,物质的分离用过多个变量例如洗脱液 (也称为“流动相”)、洗脱方式、梯度条件、温度等的选择来实现。

[0065] 在某些实施方式中,可在目的分析物通过柱填充物质可逆地保留而一种或多种其他物质不保留的条件下,通过将样品施加到柱来纯化分析物。在这些实施方式中,可以使用第一流动相条件,其中目的分析物被柱保留,并且在未保留物质被洗涤通过后,可随后使用第二流动相条件以从柱移出保留的物质。可选地,可以在其中目的分析物以与一种或多种其他物质相比的差别速度洗脱的流动相条件下,通过将样品施加到柱来纯化分析物。这类过程可相对于样品的一种或多种其他组分,富集一种或多种目的分析物的量。

[0066] 在一个优选的实施方式中,用疏水柱色谱系统进行 HPLC。在某些优选的实施方式中,使用氰基分析柱 (例如, Thermo Scientific, Inc. 的 BetaBasic 氰基分析柱 (5 μ m 颗粒大小, 50 $\times$ 2.1mm) 或等同物)。在某些优选的实施方式中,使用 HPLC 级 0.1% 含水甲酸和 100% 甲醇作为流动相,进行 HTLC 和 / 或 HPLC。

[0067] 通过小心选择阀和连接器管道 (connector plumbing), 两个或更多色谱柱可根据

需要连接,以便物质从一个通过到下一个,而无需任何手动步骤。在优选的实施方式中,阀和管道的选择通过预编程的计算机控制,以进行必要的步骤。最优选地,也以这样的联机方式连接色谱系统至检测器系统,例如 MS 系统。因此,操作员可将样品托盘置于自动采样器中,并且剩余操作在计算机控制下进行,这导致所有选择的样品的纯化和分析。

[0068] 在一些实施方式中,HTLC 可被用于在质谱分析法之前纯化 DHT。在这类实施方式中,可以使用俘获分析物的 HTLC 提取柱柱体 (HTLC extraction cartridge) 提取样品,然后洗脱并在第二 HTLC 柱或分析 HPLC 柱上进行色谱,然后离子化。例如,使用 HTLC 提取柱柱体的提取样品可使用大粒子大小 (50 μ m) 填充柱进行。然后,该柱洗脱出的样品可被转移到 HPLC 分析柱,例如氰基分析柱,以在质谱分析法之前进一步纯化。因为涉及这些色谱过程的步骤可以以自动方式连接,所以在分析物纯化期间操作员介入的需要可被最小化。该特征可导致节约时间和成本,并且消除操作员错误的机会。

[0069] 通过质谱分析法检测和定量

[0070] 在不同的实施方式中,在测试样品中存在的 DHT 可通过本领域普通技术人员已知的任何方法进行离子化。使用质谱仪进行质谱分析法,所述质谱仪包括用于离子化分馏样品和产生带电分子以进行进一步分析的离子源。例如,样品的离子化可通过如下进行:电子电离、化学电离、电喷射离子化 (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)、快原子轰击 (FAB)、液体次级电离 (LSI)、基质辅助激光解吸电离 (MALDI)、场致电离、场解吸、热喷射 / 等离子体喷射电离、表面增强的激光解吸电离 (SELDI)、电感耦合等离子体 (ICP) 和粒子束电离。本领域普通技术人员将理解选择离子化方法可基于待被测量的分析物、样品类型、检测器类型、正对负模式的选择等进行确定。

[0071] 可以以正或负模式离子化 DHT。在优选的实施方式中,以正模式,通过 APCI 离子化 DHT。在相关的优选实施方式中,DHT 离子处于气状态,并且惰性碰撞气体为氩气或氮气;优选地为氩气。

[0072] 在质谱分析法技术中,通常地,在样品已经离子化之后,可分析由此产生的带正电或带负电的离子,以测定质荷比。测定质荷比的适当的分析器包括四极分析器、离子阱分析器和飞行时间分析器 (time-of-flight analyzer)。可以使用数种检测模式检测离子。例如,可以检测选择的离子,即使用选择的离子监测模式 (selective ion monitoring mode) (SIM),或可选地,使用扫描模式例如多重反应监测 (multiple reaction monitoring) (MRM) 或选择反应监测 (selected reaction monitoring) (SRM) 检测离子。优选地,使用四极分析器测定质荷比。例如,在“四极”或“四极离子阱”仪器中,振荡射频场 (oscillating radio frequency field) 中的离子经历与施加在电极之间的直流电势、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便仅具有特定质 / 荷比的离子行进四极的长度,而所有其他的离子被偏转。因此,对于注入该仪器的离子,四极仪器可充当“质量过滤器”和“质量检测器”。

[0073] 通过使用“串联质谱分析法”或“MS/MS”,可提高 MS 技术的分辨率。在该技术中,从目的分子生成的先驱离子 (也称为母离子) 可在 MS 仪器中过滤,并且随后,将先驱离子碎裂,以产生一种或多种碎片离子 (也称为子代离子或产物离子),然后将其在第二 MS 过程中分析。通过小心的选择先驱离子,仅某些分析物产生的离子被传送到碎裂室,在那里与惰性气体原子的碰撞产生碎片离子。因为在给定组的离子化 / 碎裂条件下,先驱离子和碎片

离子以可再现的方式产生,所以 MS/MS 技术可提供极强大的分析工具。例如,过滤 / 碎裂的组合可用于消除干扰物质,并且特别可用于复杂样品,例如生物样品。

[0074] 一般地,质谱仪给用户提供了离子扫描;即,在给定范围(例如 100 到 1000 原子质量单位 (amu)) 内具有特定质量 / 电荷的每种离子的相对丰度。通过多种本领域已知的方法,分析物分析的结果——即质谱——可与在原始样品中分析物的量相关。例如,倘若采样样品和分析参数被小心地控制,则给定离子的相对丰度可以与转换那些相对丰度为原始分子绝对量的表进行比较。可选地,分子标准品可以与样品一起分析 (run),并且基于从那些标准品生成的离子构造标准曲线。使用这类标准曲线,给定离子的相对丰度可以被转变为原始分子的绝对量。在某些优选的实施方式中,使用内标生成计算 DHT 量的标准曲线。生成和使用这类标准曲线的方法是本领域熟知的,并且普通技术人员能够选择适当的内标。例如,同位素标记的类固醇可以用作内标;在某些优选实施方式中,标准是 16,16,17- d_3 双氢睾酮 (16,16,17- d_3 DHT)。将离子的量与原始分子的量相关联的许多其他方法是本领域普通技术人员熟知的。

[0075] 该方法的一个或多个步骤可以使用自动仪器进行。在某些实施方式中,一个或多个纯化步骤联机进行,更优选地,所有纯化和质谱分析法步骤可以以联机方式进行。

[0076] 在某些实施方式中,例如 MS/MS,其中先驱离子被分离以进行进一步碎裂,碰撞活化解离经常用于生成碎片离子以进行进一步检测。在 CAD 中,先驱离子通过与惰性气体碰撞获得能量,并且随后通过称为“单分子分解”的方法破碎。足够的能量必须沉积在先驱离子中,以便离子内的某些键可由于振动能增加而破裂。

[0077] 在特别优选的实施方式中,如下使用 MS/MS 检测和 / 或定量 DHT。使样品经历液相色谱,优选地 HTLC;来自色谱柱的液体溶剂流进入 MS/MS 分析器的加热的雾化器界面;和在界面的加热管中,将溶剂 / 分析物混合物转化为蒸汽。包含在雾化溶剂中的分析物(例如 DHT)通过界面的电晕放电针头离子化,所述针头将大的电势施加到雾化溶剂 / 分析物混合物。离子例如先驱离子通过仪器的孔,并且进入第一四极。四极 1 和 3(Q1 和 Q3)是质量过滤器,其允许基于其质荷比 (m/z) 选择离子(即,在 Q1 和 Q3 中分别选择“先驱”和“碎片”离子)。四极 2(Q2)是碰撞室,在那里离子破碎。质谱仪的第一四极(Q1)选择具有 DHT 质荷比的分子。允许具有正确质 / 荷比的前驱离子传送进入碰撞室(Q2),而具有任何其他质 / 荷比的不想要离子与四极的侧面碰撞,并被消除。进入 Q2 的先驱离子与中性氦气体分子碰撞并破碎。该过程被称为碰撞活化解离 (collision activated dissociation) (CAD)。生成的碎片离子被传送到四极 3(Q3),在那里选择 DHT 的碎片离子,而其他离子被消除。

[0078] 该方法可包括以正或负离子模式进行的 MS/MS;优选正离子模式。使用本领域熟知的标准方法,本领域普通技术人员能够鉴定可被用于选择四极 3(Q3) 的 DHT 的特定先驱离子的一种或多种碎片离子。

[0079] 当离子与检测器碰撞时,它们产生转变为数字信号的电子脉冲。获得的数据被传递到计算机,其绘制收集的离子个数对时间的图。得到的质谱图与在传统的 HPLC 方法中生成的色谱图相似。在与特定离子相应的峰下面的面积或这类峰的振幅被测量,并且面积或振幅与目的分析物的量相关。在某些实施方式中,对于碎片离子(一种或多种)和 / 或先驱离子,曲线下的面积或峰的振幅被测量以测定 DHT 的量。如上所述,可以使用基于内标分子例如 16,16,17- d_3 双氢睾酮的一种或多种离子峰的校准标准曲线,将给定离子的相对丰

度转化为原始分析物例如 DHT 的绝对量。

[0080] 下面的实施例用于说明本发明。这些实施例绝不意图限制本方法的范围。

[0081] 实施例

[0082] 实施例 1 : 血清样品和试剂制备

[0083] 通过在不具有添加剂的 Vacutainer 管中收集血液制备血浆样品, 并且使血浆样品在室温下凝块大约 30 分钟。然后离心样品, 并且将血清与细胞分离。显示总溶血 (gross hemolysis) 的样品被排除。

[0084] 使用 DHT (Sigma Chemical Company, 目录号 A7755, 或等价物) 制备三份储液 (stock solution)。在容量瓶中制备甲醇中的 1mg/mL 的 DHT 储备标准溶液。然后, 以 1 : 100 稀释 DHT 储备标准溶液的部分, 以制备甲醇中 1,000,000ng/dL 的 DHT 中间储备标准溶液。使用中间储备标准溶液的部分部分制备甲醇中 2,000ng/dL 的第二中间储备标准溶液。使用第二中间储备标准溶液制备贫化血清中的 200ng/dL 的 DHT 工作标准品。

[0085] 使用 16,16,17-d₃ 双氢睾酮 (CDN, 目录号 D-5079, 或等价物) 制备氘化甲醇中 1.0mg/mL 的 16,16,17-d₃ 双氢睾酮内标储液, 其被用于制备氘化甲醇中 1,000,000ng/dL 的 16,16,17-d₃ 双氢睾酮中间内标储液。使用 1.0mL 的该中间储液制备水中的 1000ng/dL 的 16,16,17-d₃ 双氢睾酮的第二中间内标储液。通过用 DI 水稀释 20mL 的第二中间内标储液至 200mL 容量瓶的体积, 制备 500ng/dL 的 16,16,17-d₃ 双氢睾酮内标工作溶液。

[0086] 实施例 2 : 使用液相色谱从样品提取 DHT

[0087] 通过使用机械涡旋首先混合, 制备用于液相色谱 (LC) 的室温标准品、对照和患者样品。

[0088] 然后将 300 μ L 的每种涡旋的标准品、对照和患者样品转移到 96 孔板的孔中。然后, 将 300 μ L 的 20% 甲酸和 100 μ L 的 500ng/mL 的 16,16,17-d₃ 双氢睾酮内标工作溶液加入到每一孔中。然后, 涡旋并在室温下温育所述板 30 分钟, 然后将其加载到自动采样器取出器 (autosampler drawer) 中。

[0089] 用使用 Aria OS V 1.5 或更新软件的 Cohesive Technologies Aria TLX-1HTLC 系统进行样品注入。使用 60% 乙腈、30% 异丙醇和 10% 丙酮 (v/v) 制备自动采样器洗涤溶液。

[0090] HTLC 系统自动地将 100 μ L 的上述制备的样品注入填充有大颗粒的 TurboFlow 柱 (来自 Cohesive Technologies 的 50 $\times$ 1.0mm, 50 μ m C-18 柱)。以高流速 (5.0mL/min, 加载试剂 0.1% 甲酸) 加载样品以在提取柱内产生紊流。该紊流确保 DHT 与柱中大颗粒优化结合, 以及残留蛋白质通过和碎片废弃。

[0091] 在加载后, 使流动方向变得相反, 并且将样品洗脱出到分析柱 (Thermo Scientific, BetaBasic 氰基柱, 5 μ m 颗粒大小, 50 $\times$ 2.1mm)。将二元 HPLC 梯度施加到分析柱以将 DHT 与样品中包含的其他分析物分离。流动相 A 是 0.1% 甲酸, 流动相 B 是 100% 甲醇。HPLC 梯度开始于 3% 有机梯度 (organic gradient), 其在大约 4.75 分钟内, 上升到 50%。然后, 使分离的样品经历 MS/MS, 进行 DHT 的量化。

[0092] DHT 对相似分析物的特异性针对下述化合物 (每一种浓度在贫化血清中为 1000ng/dL) 进行确定: 睾酮、雌三醇、脱氢表雄酮 (DHEA)、雌酮、孕烯醇酮、雌二醇、雄烯二酮、17-OH 孕烯醇酮、皮质酮和醛甾酮。对于这些化合物的任一种, 没有观察到显著干扰。

[0093] 实施例 3 :通过 MS/MS 检测和量化 DHT

[0094] 使用Finnigan TSQ Quantum Ultra MS/MS系统 (Thermo Electron Corporation) 进行 MS/MS。全部来自 ThermoElectron 的下述软件程序被用于本文描述的实施例中: Quantum Tune Master V 1.2 或更新的、Xcalibur V 1.4 SR1 或更新的、TSQ Quantum1.4 或更新的和具有 SP1 的 LCQuan V 2.0 或更新的。排出分析柱的液体溶剂 / 分析物流动到 Thermo Finnigan MS/MS 分析器的加热的雾化器界面。在界面的加热管中,将溶剂 / 分析物混合物转化为蒸汽。雾化溶剂中的分析物通过 APCI 离子化。

[0095] 离子传送到第一四极 (Q1),其选择质荷比为 $291.10 \pm 0.50 m/z$ 的离子。进入四极 2 (Q2) 的离子与氦气碰撞以生成离子碎片,其被传送到四极 3 (Q3),以进一步选择。同时,用内标 16,16,17- d_3 双氢睾酮,进行使用同位素稀释质谱分析法的相同过程。在正极性上进行确认期间,使用下述质量转变用于检测和定量。

[0096] 表 1. DHT 的质量转变 (正极性)

[0097]

分析物	先驱离子 (m/z)	产物离子 (m/z)
DHT	291.10	255.20 和 79.2
16,16,17- d_3 双氢睾酮 (内标)	294.10	258.2

[0098] 实施例 4 :批内分析 (intra-assay) 和批间分析 (inter-assay) 的精确度和准确度

[0099] 从掺有 (spiked with) DHT 的活性炭解吸的人血清 (Golden West Biologicals, Temecula, CA), 制备三个质量对照 (QC) 库, 浓度为 25、75 和 150 ng/dL, 以包括分析的假定的可报告范围。

[0100] 来自三个 QC 库的每一个的等分试样以单次分析进行分析, 从而测定分析中样品的变异系数 (CV (%))。下列值被测定:

[0101] 表 2. 批内分析的变异和准确度

[0102]

	水平 I (25 ng/dL)	水平 I (75 ng/dL)	水平 III (150 ng/dL)
平均值 (ng/dL)	26.8	73.83	145.23
标准差 (ng/dL)	3.98	3.02	4.58
CV (%)	14.8 %	4.09 %	3.16 %
准确度 (%)	107.2 %	98.44 %	96.82 %

[0103] 在 10 天内, 分析来自三个 QC 库的每一个的 10 个等分试样, 以测定分析之间的变异系数 (CV (%))。下列值被测定:

[0104] 表 3. 批间分析的变异和准确度

[0105]

	水平 I (25 ng/dL)	水平 I (75 ng/dL)	水平 III (150 ng/dL)
平均值(ng/dL)	24.51	75.18	152.31
标准差(ng/dL)	2.47	3.32	5.81
CV (%)	10.06 %	4.42 %	3.82 %
准确度(%)	98.04 %	100.24 %	101.54 %

[0106] 实施例 5 :分析灵敏性 :检测限 (Limit of Detection) (LOD) 和定量限 (Limit of Quantitation) (LOQ)

[0107] LOQ 是其中测量在定量上变得有意义的点。在该 LOQ 下,分析物反应是可鉴定的、离散的和可重现的,其精确度为 20%,准确度为 80%到 120%。通过分析掺有 1.25、2.5、5.0、10.0 和 20.0ng/dL 浓度的 DHT 的贫化分析物血清样品(每个水平 5 次重复),然后测定 CV,测定 LOQ。绘制结果(在图 1 中示出),并且从曲线测定 LOQ 为 5.0ng/dL。

[0108] LOD 是如此点,在该点值超过与其测量相关的不确定度,并且被定义为 0 浓度下的 2 倍标准差。为了测定 DHT 分析的 LOQ,检测(run)活性炭解吸的血清的空白样品,进行 10 次重复。这些分析的结果被统计学分析,其中平均值为 1.0ng/dL,标准差为 0.5ng/dL。因此,DHT 的 LOD 为 2.0ng/dL。

[0109] 实施例 6 :分析可报告的范围和线性

[0110] 为了建立分析中 DHT 检测的线性,指定为零标准的一个空白和 5 个浓度范围为 10 到 200ng/dL 的掺杂血清标准品被分析。检测的浓度范围(0 到 200ng/dL)的相关值大于 0.995。示出上至 200ng/dL 的标准品曲线的线性的图在图 2 中示出。

[0111] 实施例 7 :基质特异性

[0112] 通过用下列基质稀释患者血清样品两倍和四倍来评估基质特异性:脱色分析物血清(活性炭解吸的血清,目录号 SP1070, Golden West Biologicals, Inc.)、正常人去纤维蛋白的血清(目录号 1101-00, Biocell Labs, Carson, CA 90746, 或等价物)和去离子(DI)水。两个血清样品掺杂有下列浓度的 DHT :92.4ng/dL、64.1ng/dL。然后掺杂血清用上述基质稀释 2× 和 4×,并进行分析。研究表明,所有三种基质可被用于稀释具有高于线性范围的分析物值的样品。该研究的结果在表 4 中提供。

[0113] 表 4. DHT 的基质特异性

[0114]

	稀释系数	期望浓度(ng/dL)	贫化血清(ng/dL)	生物细胞血清 (ng/dL)	DI 水 (ng/dL)
样品 1	--	92.4			
	2x	46.2	47.7	50.8	49
	4x	21.1	24.1	21.1	22.5
样品 2	--	64.1			
	2x	32.05	37.3	34.6	34.8
	4x	16.03	19.1	18.9	16.4

[0115] 实施例 8 :回收研究

[0116] 使用质量对照 (QC) 样品进行回收研究。低、中和高 QC 样品被分别掺杂浓度为 112.5、137.5 和 175ng/dL 的 DHT。

[0117] 进行这些 DHT 掺杂样品的回收研究 (每个浓度 5 个分析)。通过将在聚集样品中检测的 DHT 浓度除以样品中期望 DHT 浓度, 计算绝对回收。平均回收分别为 89.01%、90.15% 和 94.93%。所有回收是可接受的, 即在 80% 到 120% 的范围内。

[0118] 实施例 9 : 样本研究

[0119] 样本源自于没有添加剂 (对血清) 的样品收集管、血清分离管 (SST)、EDTA 管或肝素钠管 (36 个样品, 18 个来自雄性, 18 个来自雌性)。四个雄性和一个雌性 EDTA 样品以及一个雌性肝素样品被排除为不适合进行分析——因为它是总溶血的或脂血的。其余样品被检测本方法对不同样品类型的适用性。数据分析显示在不同样品类型中检测的 DHT 水平之间存在很小差异 (参见表 5 和 6)。

[0120] 表 5. 对 DHT, 雄性, 样品类型比较

[0121]

样品类型	平均 DHT (ng/dL)	标准差 (ng/dL)
血清	34.1925	20.5794
SST	39.2492	17.1014
EDTA	37.4059	15.6782
肝素	42.7082	15.0552

[0122] 表 6. 对 DHT, 雌性, 样品类型比较

[0123]

样品类型	平均 DHT (ng/dL)	标准差 (ng/dL)
血清	26.6482	14.6048
SST	24.3991	18.8417
EDTA	28.9525	12.8975
肝素	23.0536	18.8463

[0124] 实施例 10 : HTLC-MS 和 RIA 研究的比较

[0125] 使用包括可报告范围的患者样品进行比较研究: 通过本方法和参照放射免疫测定法 (RIA) 方法进行分析。通过线性回归 (图 3A 中所示) 和 Deming 分析 (图 3B 中所示) 确定相关性。线性回归分析的相关系数是 0.88。

[0126] 本文提到或引用的文章、专利和专利申请以及所有其他的文件和电子可得信息的内容因此以其全部通过引用并入, 其程度为如同每个单独出版物被具体地和单独地表示被通过引用并入。申请人保留完全地将来自任何这类文章、专利、专利申请或其他的有形文件和电子文件的任何和所有材料和信息有形地并入本申请的权利。

[0127] 本文说明性描述的方法可适当地在不存在任何一种或多种要素、一种或多种限定的情况下适当地施行,而不特定为本文公开的。因此,例如术语“包含”、“包括”、“含有”等应该被扩张性地而非限制性地理解。另外,本文使用的术语和表达被用作描述性而非限制性的术语,并且在这些术语和表达的使用中不意图排除任何示出和描述的特征或其部分。应该认识到在要求保护的本发明的范围内各种修改是可能的。因此,应该理解尽管本发明已被优选实施方式和任选特征公开,但是本文公开的其中体现本发明的修改和变化可被本领域普通技术人员所进行,并且考虑这类修改和变化在本发明的范围内。

[0128] 本发明在本文已经被宽广地和一般地描述。落于一般公开内容内的每一个较小的种类和亚属的分类也形成本发明的一部分。这包括方法的一般描述,其限制性条款或否定限制从分类除去任何主题,而不管排除的材料是否在本文被具体叙述。

[0129] 其他的实施方式在下述权利要求内。另外,该方法的特征或方面按照马库什分类描述,本领域普通技术人员将认识到本发明也从而按照马库什分类要素的任何独立要素或亚组进行描述。

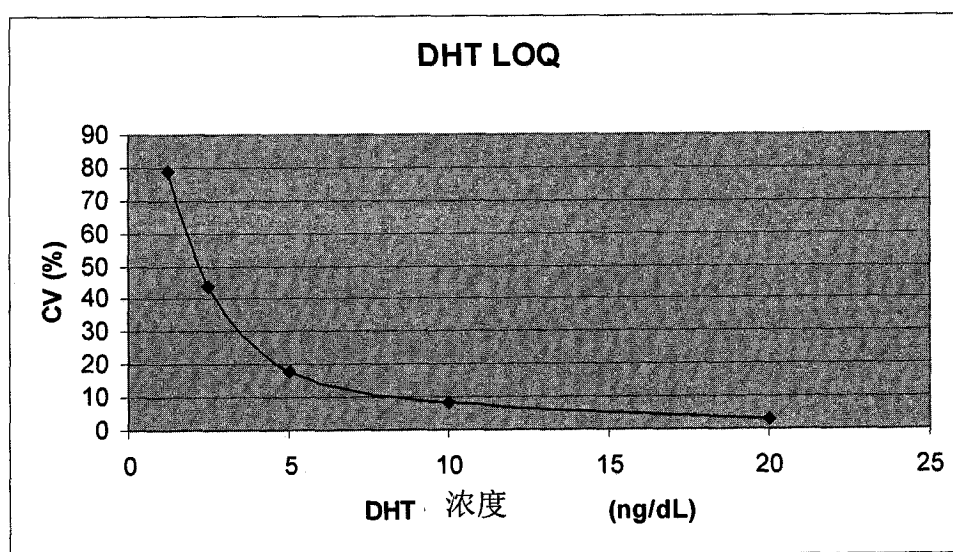


图 1

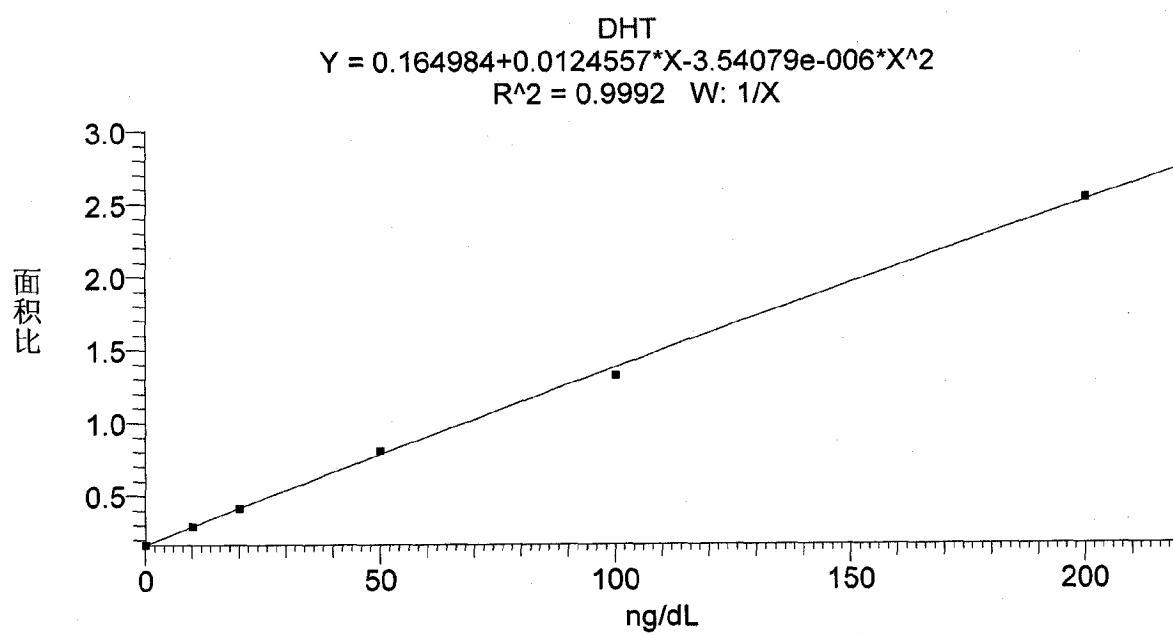


图 2

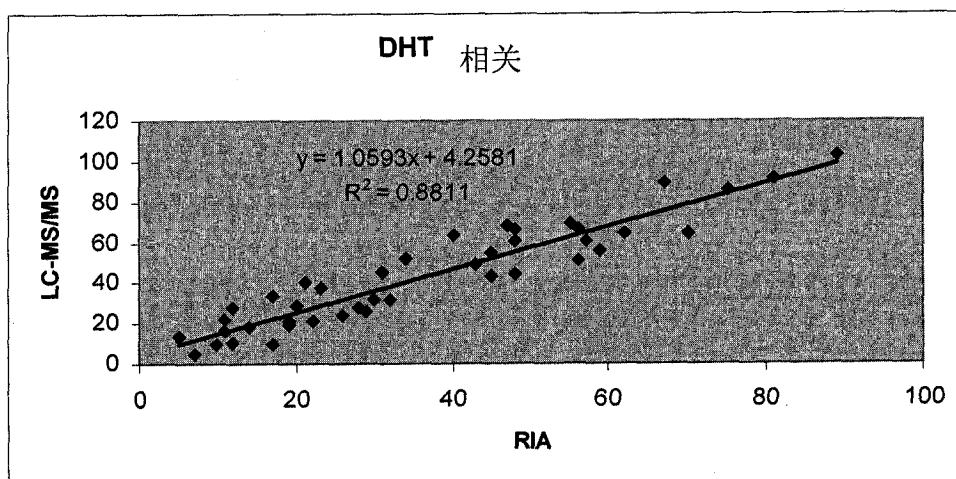


图 3A

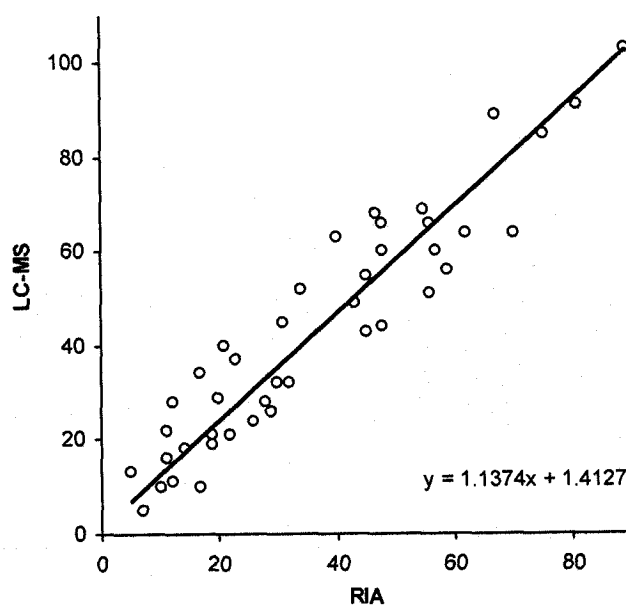


图 3B