



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106404879 B

(45) 授权公告日 2020.12.08

(21) 申请号 201610753002.7

WO 2005064330 A1,2005.07.14

(22) 申请日 2009.01.14

US 2005133715 A1,2005.06.23

JP 2007309860 A,2007.11.29

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106404879 A

Zhu Y.F. et al..The Effect of

(43) 申请公布日 2017.02.15

Ammonium Salt and Matrix in the Detection of DNA by Matrix-assisted Laser

(30) 优先权数据

12/014,671 2008.01.15 US

Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry.《RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY》.1996,第10卷(第13期),第1591-1596页.

(62) 分案原申请数据

200980108864.2 2009.01.14

Bart.A.O'Brien et al..Mass

(73) 专利权人 基纳生物技术有限公司

地址 美国加利福尼亚州

spectrometric screening for polyphenolic protein adducts.《PROCEEDINGS 50TH ASMS CONFERENCE ON MASS SPECTROMETRY AND ALLIED TOPICS》.2002,409-410.

(72) 发明人 T·贝克

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

Shahgholi M et al..Sugar additives for MALDI matrices improve signal allowing the smallest nucleotide change (A:T) in a DNA sequence to be resolved.

代理人 樊云飞

《Nucleic Acids Research》.2001,第29卷(第19期),e91第1-10页.

(51) Int.Cl.

G01N 27/62 (2006.01)

G01N 27/64 (2006.01)

审查员 颜春艳

(56) 对比文件

US 6558902 B1,2003.05.06

US 5506348 A,1996.04.09

权利要求书2页 说明书19页 附图4页

(54) 发明名称

用于改进的质谱分析的组合物和方法

(57) 摘要

本发明提供了用于改进的质谱分析的新颖的添加剂。更具体地,已经发现抗坏血酸能减少或消除目前质谱分析中经常存在的加合物。本发明的改进的方法和组合物能提高质谱分析样品的精确度、灵敏度和分析通量。

1. 一种用于基体辅助激光解吸/电离 (MALDI) 质谱进行核酸分析的基质材料,其包含:
减少加合物的添加剂,所述添加剂包含抗坏血酸或其盐;以及
一种或多种选自下组的化合物:3-羟基吡啶甲酸 (3-HPA)、柠檬酸二铵 (DAC)、2,5-二羟基苯甲酸 (DHB)、 α -氰基-4-羟基肉桂酸 (CHCA)、2,4,6-三羟基苯乙酮 (THAP)、T-2- (3- (4-叔丁基苯基)-2-甲基-2-亚丙烯基) 丙二腈 (DCTB)、地蒽酚 (DIT)、芥子酸 (SA)、反式-3-吡啶丙烯酸 (IAA)、2- (4-羟基苯基偶氮) 苯甲酸 (HABA)。
2. 如权利要求1所述的基质材料,其中减少加合物的添加剂的含量范围为占基质材料总重量的99重量%至1重量%。
3. 如权利要求1所述的基质材料,其中减少加合物的添加剂包含抗坏血酸。
4. 如权利要求1所述的基质材料,其中所述化合物包含3-羟基吡啶甲酸 (3-HPA)。
5. 如权利要求1-4中任一项所述的基质材料,其中所述化合物包含柠檬酸二铵 (DAC)。
6. 如权利要求4所述的基质材料,还包含草酸铵。
7. 如权利要求1-4和6中任一项所述的基质材料,所述减少加合物的添加剂的浓度为5-50mM。
8. 如权利要求1-4和6中任一项所述的基质材料,所述化合物的浓度为1mg/ml-20mg/ml。
9. 如权利要求7所述的基质材料,所述化合物的浓度为1mg/ml-20mg/ml。
10. 一种包括斑点阵列的基材,其中一个或多个所述斑点包含权利要求1所述的基质材料。
11. 如权利要求10所述的基材,其特征在于,减少加合物的添加剂包含抗坏血酸。
12. 如权利要求10所述的基材,其特征在于,所述基质材料包含3-羟基吡啶甲酸 (3-HPA)。
13. 如权利要求12所述的基材,其特征在于,所述基质材料还包含草酸铵。
14. 如权利要求13所述的基材,其特征在于,所述减少加合物的添加剂的浓度为5-50mM。
15. 如权利要求13所述的基材,其特征在于,包含300mM的3-羟基吡啶甲酸 (3-HPA)。
16. 如权利要求15所述的基材,其特征在于,包含20mM的抗坏血酸。
17. 如权利要求16所述的基材,其特征在于,还包含20mM的草酸铵。
18. 如权利要求10所述的基材,其特征在于,一个或多个所述斑点包括分析物。
19. 如权利要求18所述的基材,其特征在于,所述分析物是核酸。
20. 一种制备适合用于基体辅助激光解吸/电离 (MALDI) 质谱的基材的方法,该方法包括:
在质谱条件下能减少加合物形成的量在基材上沉积如权利要求1所述的基质材料;
其中所述基质材料以斑点阵列的方式沉积在基材上,并且
所述减少加合物的添加剂包含抗坏血酸或其盐。
21. 如权利要求20所述的方法,其特征在于,所述基材包括硅石。
22. 如权利要求20或21所述的方法,其特征在于,阵列上的各斑点包含(i) 3-羟基吡啶甲酸 (3-HPA) 和(ii) 抗坏血酸或其盐。
23. 如权利要求22所述的方法,其特征在于,阵列上的各斑点还包含草酸铵。

24. 一种减少包含待用基体辅助激光解吸/电离 (MALDI) 质谱分析的分析物的样品中加合物形成的方法, 该方法包括以下步骤: 以在质谱条件下能减少加合物形成的量向样品中加入权利要求1所述的基质材料。

25. 如权利要求24所述的方法, 其特征在于, 所述分析物是核酸。

26. 如权利要求24所述的方法, 该方法还包括以下步骤: 在用质谱对分析物进行分析之前, 还向所述分析物中加入减少加合物的添加剂。

27. 如权利要求24所述的方法, 其特征在于, 所述基质材料包含3-羟基吡啶甲酸 (3-HPA)。

28. 如权利要求24所述的方法, 其特征在于, 所述基质材料还包含草酸铵。

29. 如权利要求24或28所述的方法, 其特征在于, 所述基质材料还包含柠檬酸二铵 (DAC)。

30. 一种组合物, 其包含:

(i) 一种用于基体辅助激光解吸/电离 (MALDI) 质谱的基质材料, 该基质材料包含减少加合物的添加剂, 该添加剂包含抗坏血酸或其盐; 以及一种或多种选自下组的化合物: 3-羟基吡啶甲酸 (3-HPA)、柠檬酸二铵 (DAC)、2,5-二羟基苯甲酸 (DHB)、 α -氰基-4-羟基肉桂酸 (CHCA)、2,4,6-三羟基苯乙酮 (THAP)、T-2- (3- (4-叔丁基苯基)-2-甲基-2-亚丙烯基) 丙二腈 (DCTB)、地蒽酚 (DIT)、芥子酸 (SA)、反式-3-吲哚丙烯酸 (IAA) 和2- (4-羟基苯基偶氮) 苯甲酸 (HABA); 和

(ii) 草酸铵。

31. 一种用于质谱的靶位, 其包含:

(i) 基材;

(ii) 一种用于基体辅助激光解吸/电离 (MALDI) 质谱的基质材料, 该基质材料包含减少加合物的添加剂, 该添加剂包含抗坏血酸或其盐; 以及一种或多种选自下组的化合物: 3-羟基吡啶甲酸 (3-HPA)、柠檬酸二铵 (DAC)、2,5-二羟基苯甲酸 (DHB)、 α -氰基-4-羟基肉桂酸 (CHCA)、2,4,6-三羟基苯乙酮 (THAP)、T-2- (3- (4-叔丁基苯基)-2-甲基-2-亚丙烯基) 丙二腈 (DCTB)、地蒽酚 (DIT)、芥子酸 (SA)、反式-3-吲哚丙烯酸 (IAA) 和2- (4-羟基苯基偶氮) 苯甲酸 (HABA); 和

(iii) 草酸铵。

32. 一种通过基体辅助激光解吸/电离 (MALDI) 质谱对核酸进行分析的方法, 该方法包括:

(a) 将样品引入质谱, 所述样品包含核酸和抗坏血酸或其盐;

(b) 通过质谱对核酸进行分析。

33. 如权利要求32所述的方法, 其特征在于, 所述样品还包含用于基体辅助激光解吸/电离 (MALDI) 质谱的基质材料。

34. 如权利要求33所述的方法, 其特征在于, 所述基质材料包含3-羟基吡啶甲酸 (3-HPA)。

35. 如权利要求32所述的方法, 其特征在于, 所述样品包含5-50mM的抗坏血酸或其盐。

用于改进的质谱分析的组合物和方法

[0001] 本发明专利申请是2009年1月14日提交的发明名称为“用于改进的质谱分析的组合物和方法”、国家申请号为200980108864.2 (国际申请号为PCT/US2009/031020) 的PCT国际申请的中国国家阶段的分案申请。

[0002] 相关专利申请

[0003] 本专利申请要求于2008年1月15日提交的美国非临时专利申请第12/014671号的优先权,该非临时专利申请的申请人为托马斯·贝克尔(Thomas Becker),发明名称为“用于改进的质谱分析的组合物和方法 (COMPOSITIONS AND PROCESSES FOR IMPROVED MASS SPECTROMETRY ANALYSIS)”,代理人案卷号为SEQ-6015-UT。在允许的权限内,该非临时专利申请的全部内容通过引用结合于此,包括所有文字和附图。

发明领域

[0004] 本发明一般涉及用于质谱分析的组合物和方法。

[0005] 背景

[0006] 质谱分析是用于测量样品中分析物的分子量的非常有效的分析工具。当使用飞行时间质谱仪时,离子飞行的速度比分子在电泳凝胶中迁移的速度大约快 10^7 倍,因此质谱分析提供了一种极快的分析方法,哪怕质谱测量须重复10-100次以获得良好的信噪比。

[0007] 质谱分析通常最先通过各种方法使样品离子化,例如通过基体辅助激光解吸电离(MALDI)或电喷雾电离(ES)使样品离子化。MALDI准备和测量步骤包括:首先将分析物分子嵌在样品容器中,使之处于固体或液体红外或紫外吸收基质中,所述基质通常是有机酸。将包含基质和分析物的样品容器放在质谱仪的离子源中。通过短激光脉冲使基质气化,从而将分析物分子以非破碎态传输到气相中。分析物分子通过与同时产生的基质离子碰撞并反应而离子化。施加电压,加快离子进入无场飞行管中。由于离子的质量不同,离子源中的离子被加快到不同的速度,较小的离子比较大的离子更早到达检测器。不同的飞行时间转换为不同的离子质量。

[0008] 另一种使分析物离子化的方法是电喷雾电离(或ES)。与MALDI类似,电喷雾电离使极性分子电离/气化。首先,将待分析的样品溶解在溶剂中,在此溶剂中样品某种程度上将以离子化形式存在。在常规ES方法中,随后用泵使溶液通过被提高到高电位的薄毛细管。在大气压下,将较小的带电液滴从ES毛细管中喷雾到浴气体中,向下经过压力和电位梯度向质谱仪高真空系统的孔口处移动。随着液滴经过该路径,它们脱溶剂化并且尺寸减小,使得表面库仑力克服了表面张力。因此,液滴破碎成更小的液滴,直到离子从液滴上解吸,或者溶剂被完全除去。离子形成的确切机理还不完全清楚,但是结果是形成离子束,其被质谱仪取样。关于ES方法的更多详细说明见Cole编的《电喷雾电离质谱分析:基本原理、仪器和应用(Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation and Applications) (John Wiley and Sons, New York)。

[0009] 无论使用何种电离方法,在电离过程中形成不利的加合物会降低质谱分析所产生的谱图的质量和分辨率。更具体地,存在不利的加合物会导致分析物的检测和分析变得困

难,特别是低丰度或低质量的分析物。

[0010] 概述

[0011] 本发明提供用于改进的质谱分析的方法和组合物。本发明提供用于质谱分析的样品制备方法,该方法以经济且容易实施的方式减少或最大程度地减少加合物的形成,该方式不会破坏样品离子的电离、质量分析或检测。本发明的改进的方法和组合物更容易识别和量化分析物的峰,从而增加正确呼叫的数目(number of correct calls)。这些改进经证明对被钠盐和/或铵盐污染样品以及具有低分析物浓度的样品特别有用。在下文所述的一些实施方式中使用的是抗坏血酸或其盐、互变异构体或类似物,作为减少加合物的添加剂来减少质谱中加合物的存在,并提高信噪比(s/n)。虽然本发明的实施方式在下文中将提到使用“抗坏血酸”,但是应理解,本领域普通技术人员在本发明所述的方法和组合物中可使用抗坏血酸、抗坏血酸酯、其盐、其互变异构体或其类似物(下文所述)。

[0012] 一方面,本发明提供一种方法,用于减少包含待用质谱分析的分析物的样品中加合物的形成,该方法包括以下步骤:在用质谱对分析物进行分析之前,向样品中加入减少加合物的添加剂,该添加剂包含抗坏血酸。在相关实施方式中,减少加合物的添加剂还可包含草酸铵。在一些实施方式中,该减少加合物的添加剂与其它减少加合物的添加剂(已知的或还未发现的减少加合物的添加剂)组合使用。在一些实施方式中,该减少加合物的添加剂与一种或多种树脂组合使用。

[0013] 在一些实施方式中,分析物是核酸,例如脱氧核糖核酸或核糖核酸。文中所述的改进可用于各种在质谱分析之前的操作步骤中会产生不利的加合物的质谱形式。质谱形式的例子包括但不限于:基体辅助激光解吸/电离飞行时间(MALDI-TOF)质谱(MS)、激光解吸质谱(LDMS)、电喷雾(ES)质谱、离子回旋共振(ICR)质谱和傅立叶变换质谱。文中所述的改进容易应用于其中分析物被气化和离子化的质谱形式(“电离质谱”,例如MALDI-TOF MS, LDMS, ESMS)。

[0014] 本发明还提供一种方法,用于减少包含待用质谱分析的分析物的样品中加合物的形成,该方法包括以下步骤:在用质谱对分析物进行分析之前,向基质中加入减少加合物的添加剂,该添加剂包含抗坏血酸。该方法还包括额外的步骤:在用质谱对分析物进行分析前,向分析物(以及基质)中加入减少加合物的添加剂。在相关实施方式中,减少加合物的添加剂还可包含草酸铵。在一些实施方式中,基质组合物包括3-羟基吡啶甲酸(3-HPA)、柠檬酸二铵(DAC)或它们的组合。在一些实施方式中,分析物是核酸,例如脱氧核糖核酸或核糖核酸。在一些实施方式中,还向分析物中加入减少加合物的添加剂。

[0015] 在一些实施方式中,本发明提供制备适用于质谱分析的基材的方法,该方法包括以下步骤:在基材上沉积包含减少加合物的添加剂的基质材料,其中所述减少加合物的添加剂包含抗坏血酸。在相关实施方式中,减少加合物的添加剂还可包含草酸铵。在另一相关实施方式中,该方法还包括密封基材的步骤。密封基材的方法包括但不限于:通过封装工艺实现的条件,例如真空密封和热密封。在一些实施方式中,该方法还包括用试剂或气体处理基材以最大程度地减少氧化的步骤。在一些实施方式中,在密封之前,用氩气之类的惰性气体冲洗基材。在一些实施方式中,在用质谱分析之前,对基材进行密封和/或封装,以限制或避免其暴露于光或紫外辐射。在一些实施方式中,对基材进行密封和/或封装,以保持给定的pH。在一些实施方式中,将基材封装在容器中,所述容器包括但不限于聚合物容器(例如

聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯容器)。在一些实施方式中,基材包括硅石或二氧化硅。

[0016] 本发明还提供待用质谱分析的组合物,该组合物包含分析物和减少加合物的添加剂。在一些实施方式中,减少加合物的添加剂包含抗坏血酸。在相关实施方式中,减少加合物的添加剂还可包含草酸铵。

[0017] 在一些实施方式中,本发明提供适用于用质谱进行分析的组合物,该组合物包含分析物和减少加合物的添加剂,所述添加剂包含抗坏血酸。该组合物还可包含草酸铵。

[0018] 在一些实施方式中,本发明提供用于质谱分析的靶位,该靶位包括基材和减少加合物的添加剂,所述添加剂包含抗坏血酸。该靶位还可包含草酸铵。在一些实施方式中,该靶位还可包含基质材料。在相关实施方式中,基质材料预负载在基材上。在一些实施方式中,所述靶位还可包含分析物。在一些实施方式中,所述组合物是密封的。密封基材的方法包括但不限于:真空密封和热密封。在一些实施方式中,用试剂或气体处理组合物,以最大程度地减少氧化。在一些实施方式中,在密封之前,用氩气之类的惰性气体冲洗组合物。在一些实施方式中,对组合物进行密封和/或封装,以限制或避免其暴露于光或紫外辐射。在一些实施方式中,对组合物进行密封和/或封装,以保持给定的pH。

[0019] 本发明还提供一种制备用于质谱分析的分析物的方法,该方法包括:(a)使包含分析物的溶液与包含抗坏血酸或其盐、互变异构体或类似物的组合物接触,从而制备用于质谱分析的样品;(b)将该样品引入质谱分析仪中。在一些实施方式中,所述组合物还包含草酸铵。所述分析物有时是核酸,包括但不限于脱氧核糖核酸、核糖核酸和类似的物质或它们的组合。在一些实施方式中,质谱分析选自下组:基体辅助激光解吸/电离飞行时间(MALDI-TOF)质谱、激光解吸质谱(LDMS)、电喷雾(ES)质谱、离子回旋共振(ICR)质谱和傅立叶变换质谱。在一些实施方式中,该组合物包含抗坏血酸,而在一些实施方式中,该组合物不包含抗坏血酸的类似物。

[0020] 本发明还提供一种通过质谱对分析物进行分析的方法,该方法包括:(a)将样品引入质谱分析仪中,所述样品包含分析物和抗坏血酸或其盐、互变异构体或类似物;(b)通过质谱对样品进行分析。在一些实施方式中,所述样品还包含草酸铵。所述分析物有时是核酸,包括但不限于脱氧核糖核酸、核糖核酸和类似的物质或它们的组合。在一些实施方式中,该样品包含分析物和抗坏血酸,而在一些实施方式中,该样品不包含抗坏血酸的类似物。

[0021] 本发明还提供一种包括斑点阵列(array of spots)的基材,所述各斑点包括(i)用于基体辅助激光解吸/电离(MALDI)质谱的基质和(ii)抗坏血酸或其盐、互变异构体或类似物。在一些实施方式中,每个斑点还包括草酸铵,而在一些实施方式中,一个或多个斑点还包括分析物。所述分析物有时是核酸,包括但不限于脱氧核糖核酸、核糖核酸和类似的物质或它们的组合。在一些实施方式中,基质包括3-羟基吡啶甲酸(3-HPA)或其它适用于通过MALDI质谱分析核酸的基质。在一些实施方式中,包含抗坏血酸和基质(例如3-HPA)的斑点的组合物吸收紫外光[例如,吸收约220nm到约300nm(例如约260nm到约270nm;266nm)的紫外光]。在一些实施方式中,基质包含适用于通过MALDI质谱分析蛋白质或肽的组分,该组分包括但不限于:阿魏酸、芥子酸、 α -氰基-3-羟基-肉桂酸和 α -氰基-4-羟基-肉桂酸。在一些实施方式中,基材是芯片(例如硅芯片)。在一些实施方式中,各斑点包含抗坏血酸,而在一些实施方式中,各斑点不包含抗坏血酸的类似物。

[0022] 可通过本发明的方法和组合物改进的质谱的例子包括但不限于：核酸测序、基因分型或甲基化分析。该分析可以通过质谱进行的定性或定量分析。

[0023] 附图简要说明

[0024] 图1显示使用直接点样于标准未改性基质上的17聚体合成寡核苷酸 (GTG GTG GTG GTG GTG GT) 产生的质谱。在该图中, 氨加合物的存在得到鉴定 (峰高度约为在5335Da处的母峰高度的12%)。

[0025] 图2显示使用直接点样于抗坏血酸改性的基体上的相同17聚体合成寡核苷酸 (GTG GTG GTG GTG GTG GT) 产生的质谱。如图中所示, 不再存在氨加合物。

[0026] 图3显示由点样于标准未改性基质上的RhD基因延伸产品产生的质谱, 得到在7571Da的延伸峰和在7626Da的+55Da加合物峰 (NH_3+K)。加合物峰导致假阳性插入呼叫 (false positive insertion call) (SNR:2; 概率:88%)。

[0027] 图4显示由点样于抗坏血酸改性的基体上的RhD基因延伸产品产生的质谱, 得到在7571Da的延伸产品峰, 但是没有+55Da加合物峰。假阳性插入呼叫消除 (SNR:0; 概率:0%)。

[0028] 发明详述

[0029] 质谱提供了一种高度精确和灵敏的方法用于测量核酸和肽之类的分析物的分子量。因此, 质谱提供了一种对原本难以测量的分子进行分析的非常有效的工具。但是, 存在不利的加合产物会导致难以精确地检测和分析分析物, 特别是低丰度或低质量的分析物。当作为多重反应的一部分在单个质谱中检测多种分析物时, 问题更加复杂。

[0030] 当离子 (通常是阳离子) 与生物分子在质谱分析条件下缔合时形成加合物, 由此产生不利的质量峰。样品处理 (例如生物化学、样品操作、样品分配等)、样品清洁 (例如, 添加树脂)、样品离子化或样品检测的任何部分都可能促进加合物的形成。

[0031] 在基体辅助激光解吸/电离 (MALDI) 质谱的情况中, 基体材料本身可作为形成加合物的源头。例如, 3-羟基吡啶甲酸 (3-HPA) 和柠檬酸二铵 (DAC) 的混合物常用作MALDI基核酸分析的有效紫外基质。向基质 (特别是3-HPA) 中加入铵盐 (例如DAC), 原因在于人们已经知道对单链DNA (ssDNA) 而言, 这些铵盐能进一步减少阳离子加合物的形成 (Wu, J.K. 等, 质谱快讯 (Rapid Comm.Mass Spectrom.) 1993, 7, 191; Pieleles等, 核酸研究 (Nucleic Acid Research), 1993, 21, 14, 3191)。但是, 本文给出的结果显示, DAC是形成氨 (NH_3) 加合物的主要源头。例如, 图1显示在质谱的+17Da处存在 NH_3 加合物质量峰。

[0032] 另一种促进氨加合物形成的物质是氨化阳离子交换树脂, 该树脂可用于在MALDI分析之前使分析物脱盐 (Nordhoff, E. 等, 质谱快讯 (Rapid Comm.Mass Spectrom.) 1992, 6, 771)。如下文实施例中所述的, 氨加合物主要是与鸟嘌呤和胸腺嘧啶碱形成的。因此, 在核酸分析物富含这些碱时, 分析中这些加合物的问题更突出。

[0033] 另外, 氨化阳离子交换树脂不能完全除去DNA主链中的全部钠离子。这种去除的不充分导致在+22Da处出现钠离子加合物质量峰。其它加合物可由基质材料形成, 在存在胸腺嘧啶碱时更普遍。例如, 当使用3-羟基吡啶甲酸作为基质时, 在94、138和188Da处发现加合物质量峰。所有这些加合物峰会整体导致对质谱结果的错误解释。因此, 极大地减少加合物 (特别是碱性加合物和氨加合物) 的量和频率的组合物和方法可用于提高质谱分析的精确度、灵敏度和分析通量。存在减少加合物的添加剂可减少或消除不使用减少加合物的添加剂时分析的样品中存在的加合物峰。如文中所述的, 在延伸产品强度相当时, 与树脂处理的

标准基质相比,加入抗坏血酸能将平均加合物形成分数(formation score)(文中所定义的)最多减少40%(参见实施例1-3)。另外,用抗坏血酸添加剂改性的基质经证实在长达6个月的时间内保持物理和化学稳定(参见实施例4),这就使得在制造的过程中可以用抗坏血酸预处理基材。

[0034] 分析物

[0035] 本发明可以改善以下分析物的质谱分析:例如,核酸(如寡核苷酸和多核苷酸)、蛋白质、肽和脂质,包括它们的特定类似物和结合物,例如糖蛋白或脂蛋白。适用于本发明所述MALDI分析的其它物质是小分子、代谢物、天然产品和药物。本发明的方法和组合物特别适用于主要包含鸟嘌呤和胸腺嘧啶的多核苷酸,因为这些多核苷酸更容易形成氨加合物。

[0036] 文中所用的术语“核酸”指单链和/或双链多核苷酸,例如脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA),以及RNA或DNA的类似物或衍生物。术语“核酸”还包括核酸的类似物,例如肽核酸(PNA)、硫代磷酸酯DNA、无环核苷和其它这种类似物和衍生物或它们的组合。

[0037] 多核苷酸中包含的核苷酸类似物可以是例如质量改变的核苷酸,从而使多核苷酸的质量有差异;含有可检测标记的核苷酸,所述标记例如是荧光标记、放射性标记、发光标记或化学发光标记,从而可检测多核苷酸;或含有活性基团的核苷酸,所述活性基团例如是生物素或硫醇基团,有助于将多核苷酸固定在固体载体上。多核苷酸还可包含一个或多个可选择性裂解的主链键,例如,化学裂解、酶裂解或光裂解。例如,多核苷酸可包括一个或多个脱氧核糖核苷酸,随后是一个或多个核糖核苷酸,再接着是一个或多个脱氧核糖核苷酸,这种序列可以通过碱水解在核糖核苷酸序列处裂解。多核苷酸还可包括一个或多个比较耐裂解的键,例如,嵌合寡核苷酸引物,该嵌合寡核苷酸引物可包括通过肽核酸键连接的核苷酸和至少一个在3'端的通过磷酸二酯键或类似的键连接的核苷酸,它能通过聚合酶延伸。

[0038] 样品

[0039] 文中使用的“样品”指含有待分析的分析物的组合物。在一些实施方式中,样品来自“生物样品”。生物材料通常被认为是由活体源(例如,人、动物、植物、细菌、真菌、原生生物、病毒)得到的任何材料。生物样品可以为任何形式,包括固体材料(例如组织、细胞团粒和活组织)和生物液体[例如尿、血液、唾液、羊水和漱口水(含有口腔细胞)]。优选的是固体材料与液体混合。

[0040] 基质

[0041] 基质材料用在某些形式的质谱分析中,例如MALDI质谱。基质材料用于将分析物分子相互分离开来,吸收激光光子给予的能量,以及将能量转移给分析物分子,从而使它们解吸和电离。一旦分析物被电离,可使用飞行时间(TOF)分析仪之类的质谱仪来测量离子质量。

[0042] 用于质谱分析的基质材料的选择通常取决于分析的生物分子的类型。例如,用质谱分析核酸时,常用的基质材料是3-羟基吡啶甲酸(3-HPA)和柠檬酸二铵(DAC)的混合物。用于促进样品分析物电离的另一种基质材料是2,5-二羟基苯甲酸(DHB)。DHB也遇到形成加合物以及产生干扰样品分析的化学噪声的问题。 α -氰基-4-羟基肉桂酸(α -CHCA)是在基质辅助激光飞行时间质谱分析中广泛用于电离蛋白质和肽分析物的基质的例子。但是,常常产生 α -CHCA加合物,会干扰精确检测低丰度、低质量分析物的能力。可与文中所述的自由基清除剂一起用于改善的质谱分析的其它基质参见Li等(Rapid Comm.Mass Spectrom.12:

993-998(1998), M.C.Fitzgerald and L.M.Smith (Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struc.1995 .24:117-40), 和Nordhoff等 (Mass Spectrometry Reviews, 1996, 15, 67-138; 所有文献都通过引用结合于此), 基质的例子包括但不限于: 2,4,6-三羟基苯乙酮 (THAP)、邻氨基苯甲酸、烟酸、水杨酰胺、1-异喹啉醇、T-2-(3-(4-叔丁基苯基)-2-甲基-2-亚丙烯基) 丙二腈 (DCTB)、芥子酸 (SA)、地蒽酚 (DIT)、3-氨基喹啉、反式-3-吡啶丙烯酸 (IAA)、2-(4-羟基苯基偶氮) 苯甲酸 (HABA)、琥珀酸、2,6-二羟基苯乙酮、阿魏酸、咖啡酸、丙三醇和硝基苯胺。

[0043] 在将基质沉积到基材上之前或之后, 可将基质材料与一种或多种添加剂或分析物组合。当分析物被嵌入吸光材料基质中时, 该基质通常以相对于分析物过量的量存在。对于MALDI方法而言, 分析物分子在结晶的过程中以某种形式结合到常用的晶体基质材料中, 或至少结合到小基质晶体之间的界面中是有利的。在一些实施方式中, 首先将添加剂与基质材料在溶液中混合, 将合并的基质材料/添加剂溶液沉积到基材上, 在该基材上结晶。

[0044] 在各种实施方式中, 通过以下步骤将基质沉积到基材上以形成离散斑点: 将基质溶解到包含抗坏血酸和合适的溶剂如水的溶液中。将所得溶液沉积在MALDI基材上, 将所得基材放在真空室中, 使基质/抗坏血酸溶液在真空下干燥。在一个实施方式中, 抗坏血酸单独或与其它基质组合用作基质材料。

[0045] 可使用各种方法将基质、添加剂或分析物沉积到基材上。在一个实施方式中, 在单独的步骤中施加各成分。例如, 可以将基质材料预负载在基材上, 然后使用合适的液体分配设备[例如压电、针式加样头 (pin tool) 分配装置]添加分析物。在一些实施方式中, 所述诸成分以组合的形式沉积。例如, 可首先将基质和添加剂组合(即溶解在溶剂中), 一起沉积到基材上, 然后添加分析物。在一些实施方式中, 基质或基质/添加剂沉积物可在基材上干燥, 随着溶剂蒸发形成基质晶体。然后在干燥的基质顶部沉积分析物溶液, 使干燥的基质沉积物部分溶解以及重新溶解的基质与分析物共结晶。

[0046] 在一些实施方式中, 减少加合物的添加剂直接用作基质材料, 而在一些实施方式中, 减少加合物的添加剂用作基质材料的组分。在一些实施方式中, 基质材料包括减少加合物的添加剂和一种或多种文中所述的质谱基质材料(例如3-HPA、DAC、DHB、CHCA、THAP、DCTB、DIT、SA、IAA、HABA中的一种或多种)。对于减少加合物的添加剂与一种或多种质谱基质材料一起使用的实施方式, 减少加合物的添加剂的含量范围为占基质材料总重量的99重量%至1重量%(例如, 占基质材料总重量的约5重量%、10重量%、15重量%、20重量%、25重量%、30重量%、35重量%、40重量%、45重量%、50重量%、55重量%、60重量%、65重量%、70重量%、75重量%、80重量%、85重量%、90重量%或95重量%), 有时减少加合物的添加剂的摩尔比(即添加剂的摩尔数与质谱基质的摩尔数的比值)例如约为1:20、1:19、1:18、1:17、1:16、1:15、1:14、1:13、1:12、1:11、1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3或1:2。

[0047] 添加剂

[0048] 文中所用的术语“减少加合物的添加剂”是加入到任何一种或多种质谱分析所需的组分或试剂中的物质。这些组分或试剂包括样品、分析物、基质材料、基材或它们的组合。在一些实施方式中, 减少加合物的添加剂是抗坏血酸, 或其具有基本相同的减少加合物效果的任何衍生物。

[0049] 在一些实施方式中, 减少加合物的添加剂是自由基清除剂。可以使用任何适用于质谱分析, 在一些情况中适用于核酸的质谱分析的自由基清除剂。自由基清除剂的例子包

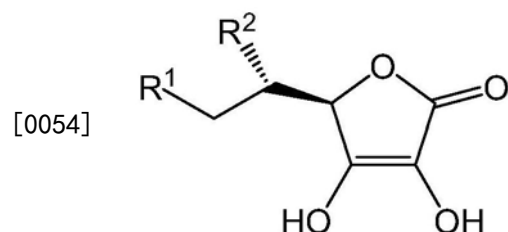
括但不限于：抗坏血酸、松香油、生育三烯酚、生育酚、辅酶Q10、褪黑激素、番茄红素、叶黄素、 α -胡萝卜素、 β -胡萝卜素、玉米黄质、虾青素、角黄素、黄酮（例如毛地黄黄酮、芹黄素、柑桔黄酮）、黄酮醇（flavonols）（例如槲皮素、山奈酚、杨梅黄酮、异鼠李黄素、原花色素）、黄烷酮（favanones）（例如橙皮素（hesperetin）、柚皮素、圣草酚）、异黄酮植物雌激素（例如染料木黄酮、大豆黄素、黄豆黄素）、芪类化合物（stilbenoids）（例如白藜芦醇、紫檀芪）、花色苷（例如氰化物（cyaniding）、翠雀素、二甲花翠素、花葵素、甲基花青素、矮牵牛素）、酚酸和酯（例如鞣花酸、没食子酸、水杨酸、迷迭香酸、肉桂酸、绿原酸、菊苣酸、没食子鞣质、鞣花鞣质）、非黄酮类酚类化合物（nonflavonoid phenolics）（例如姜黄素、咕吨酮、水飞蓟素、丁子香酚）和有机抗氧化剂（例如柠檬酸、草酸、植酸、木酚素、尿酸、N-乙酰半胱氨酸）。本领域普通技术人员很容易通过在如实施例中所描述的并行分析（side-by-side analyses）中对这些清除剂进行常规测试来识别适合作为质谱的添加剂或基质的自由基清除剂。

[0050] 在一些实施方式中，添加剂基本不含杂质，因此不需要进行纯化。如果减少加合物的添加剂的纯度不够，可以通过本领域中已知的方法纯化该添加剂，以除去杂质，例如，通过离子交换树脂纯化进行该纯化操作。

[0051] 添加剂可以液体形式溶解（例如，溶解在水中），然后沉积在预负载的基质上，或者在无预负载基质的情况下直接沉积在基材上。或者，可以将添加剂与基质混合，然后沉积在基材上。可将添加剂与基质混合，得到1到约20mg/ml的基质浓度和约5-50mM的添加剂浓度。添加剂的用量如果不足，将不能明显减少加合物的形成，而使用过多的添加剂可能抑制质谱的母信号。本领域技术人员无需过多的实验就能通过改变添加剂的量并判断其对谱图特征的影响来确定添加剂的合适量，以优化特定分析物的分析。

[0052] 在一些实施方式中，减少加合物的添加剂可单独使用，或与减少或避免不利的加合物存在的其它物质组合使用。抗坏血酸添加剂可与能减少质谱背景噪声的其它添加剂组合使用。其它已知的合适添加剂包括树脂、挥发性铵盐，特别是挥发性单碱式（monobasic）、二碱式（dibasic）或三碱式（tribasic）铵盐。盐添加剂的碱性不宜太高，以免干扰被分析的样品。添加剂可以是单碱式磷酸盐和硫酸盐（例如单碱式磷酸铵）和二碱式柠檬酸盐（例如二碱式柠檬酸铵）和三碱式柠檬酸盐（例如三碱式柠檬酸铵）。

[0053] 在一些实施方式中，减少加合物的添加剂是抗坏血酸、抗坏血酸酯、其盐、其互变异构体或具有下式结构的抗坏血酸类似物（包括类似物盐和互变异构体）：



[0055] 其中：

[0056] R^1 和 R^2 独立地是OH、卤素、 R^3 、 OR^3 、叠氮基、氰基、 CH_2R^3 、 CHR^3R^4 、 SR^3 、 NR^3R^4 ；

[0057] R^3 和 R^4 独立地是H、烷基、乙炔基或氰基，或任选取代的芳基碳环、芳基杂环、非芳基碳环或非芳基杂环。文中使用的抗坏血酸类似物通常是自由基清除剂，本领域普通技术人员可确定抗坏血酸的自由基清除活性（例如，用氧化剂如2,6-二氯苯酚-靛酚（DCPIP）、碘、碘酸盐和碘化合物混合物或N-溴代琥珀酰亚胺进行滴定）。

[0058] 文中使用的术语“任选取代的”表示所述的特定基团或基团组可以没有非氢取代基,或者所述的特定基团或基团组可具有一个或多个非氢取代基。除非另有说明,可存在的取代基的总数等于未取代形式的所述基团上存在的H原子数。如果任选的取代基通过双键连接,例如羰基氧(=O),则该基团占据两个可用的价位,这样根据可利用价位的数目,可包含的取代基的总数目减少。

[0059] 抗坏血酸及其类似物可具有能离子化的基团,这样能作为盐制得。在此情况中,无论何时提到化合物,在本领域中都应理解还可以使用药学上可接受的盐。这些盐可以是涉及无机或有机酸的酸加成盐,或者在本发明的化合物为酸形式时由无机或有机碱制备的盐。通常,将化合物制成或用作药学上可接受的盐,该药学上可接受的盐作为药学上可接受的酸或碱的加成产物制得。合适的药学上可接受的酸和碱在本领域中是众所周知的,例如用于形成酸加成盐的盐酸、硫酸、氢溴酸、乙酸、乳酸、柠檬酸或酒石酸,用于形成碱性盐的氢氧化钾、氢氧化钠、氢氧化铵、咖啡因、各种胺等。在本领域中已经充分建立了制备合适的盐的方法。在一些情况中,化合物可同时含有酸官能团和碱官能团,在此情况中它们可具有两个离子化基团,但是无净电荷。

[0060] 抗坏血酸类似物常常含有一个或多个手性中心。本发明包括各种独立的立体异构形式以及不同手性纯度的立体异构体混合物,包括外消旋混合物。还包括可形成的各种非对映异构体和互变异构体。本发明的化合物还可以不止一种互变异构体的形式存在;本文中描述为一种互变异构体仅仅是为了简便起见,应理解为包括其它互变异构体形式。

[0061] 文中使用的术语“烷基”、“烯基”和“炔基”包括直链、支链和环状单价烃基以及它们的组合,当它们未被取代时仅仅含有C和H。例子包括甲基、乙基、异丁基、环己基、环戊基乙基、2-丙烯基、3-丁炔基等。文中有时描述了各基团的碳原子总数,例如当基团可最多含10个碳原子时,可表示为1-10C或C1-C10或C1-10。当允许杂原子(通常为N、O和S)代替碳原子时,例如在杂烷基中,描述基团的数目尽管仍然写为例如C1-C6,但它表示基团中碳原子数和代替所述环或链骨架中碳原子的杂原子的数目之和。

[0062] 通常,本发明的烷基、烯基和炔基取代基可含有一个10C(烷基)或两个10C(烯基或炔基)。较佳地,它们含有一个8C(烷基)或两个8C(烯基或炔基)。有时它们含有一个4C(烷基)或两个4C(烯基或炔基)。单独一个基团可包括不止一种类型的多重键,或不止一个多重键;当这些基团含有至少一个碳碳双键时,它们包括在术语“烯基”的定义中,当这些基团含有至少一个碳碳三键时,它们包括在术语“炔基”的定义中。

[0063] 烷基、烯基和炔基通常任选地被取代到一定程度,只要这些取代在化学上是有意义的。典型的取代基包括但不限于卤素、=O、=N-CN、=N-OR、=NR、OR、NR₂、SR、SO₂R、SO₂NR₂、NRSO₂R、NRCONR₂、NRCOOR、NRCOR、CN、COOR、CONR₂、OOCR、COR和NO₂,其中各R独立地是H、C1-C8烷基、C2-C8杂烷基、C1-C8酰基、C2-C8杂酰基、C2-C8烯基、C2-C8杂烯基、C2-C8炔基、C2-C8杂炔基、C6-C10芳基或C5-C10杂芳基,各R任选地被以下基团取代:卤素、=O、=N-CN、=N-OR'、=NR'、OR'、NR'₂、SR'、SO₂R'、SO₂NR'₂、NR'SO₂R'、NR'CONR'₂、NR'COOR'、NR'COR'、CN、COOR'、CONR'₂、OOCR'、COR'和NO₂,其中各R'独立地是H、C1-C8烷基、C2-C8杂烷基、C1-C8酰基、C2-C8杂酰基、C6-C10芳基或C5-C10杂芳基。烷基、烯基和炔基还可被C1-C8酰基、C2-C8杂酰基、C6-C10芳基或C5-C10杂芳基取代,这些取代基各自可以被适合具体基团的取代基取代。

[0064] “乙炔”取代基是任选被取代的2-10C炔基,通式为 $-C\equiv C-Ra$,其中 Ra 是H或C1-C8烷基、C2-C8杂烷基、C2-C8烯基、C2-C8杂烯基、C2-C8炔基、C2-C8杂炔基、C1-C8酰基、C2-C8杂酰基、C6-C10芳基、C5-C10杂芳基、C7-C12芳基烷基或C6-C12杂芳基烷基,各 Ra 基任选地被一个或多个选自下组的取代基取代:卤素、 $=O$ 、 $=N-CN$ 、 $=N-OR'$ 、 $=NR'$ 、 OR' 、 NR'_2 、 SR' 、 SO_2R' 、 $SO_2NR'_2$ 、 $NR'SO_2R'$ 、 $NR'CONR'_2$ 、 $NR'COOR'$ 、 $NR'COR'$ 、 CN 、 $COOR'$ 、 $CONR'_2$ 、 $OOCR'$ 、 COR' 和 NO_2 ,其中各 R' 独立地是H、C1-C6烷基、C2-C6杂烷基、C1-C6酰基、C2-C6杂酰基、C6-C10芳基、C5-C10杂芳基、C7-12芳基烷基或C6-12杂芳基烷基,这些取代基各自任选地被一个或多个选自下组的基团取代:卤素、C1-C4烷基、C1-C4杂烷基、C1-C6酰基、C1-C6杂酰基、羟基、氨基和 $=O$;其中两个 R' 可连接形成3-7元环,该环任选地最多含有三个选自N、O和S的杂原子。在一些实施方式中, $-C\equiv C-Ra$ 中的 Ra 是H或Me。

[0065] “杂烷基”、“杂烯基”和“杂炔基”等的定义与相应的烃基(烷基、烯基和炔基)类似,但是“杂”表示该基团在它们的主链残基中含有1-3个O、S或N杂原子或它们的组合;这样相应的烷基、烯基或炔基中的至少一个碳原子被指定的杂原子之一代替,形成杂烷基、杂烯基或杂炔基。烷基、烯基和炔基的杂化形式的典型和优选的尺寸通常与相应的烃基相同,存在于杂化形式上的取代基与烃基中所述的相同。出于化学稳定性的考虑,还应理解,除非另有说明,这些基团不包括两个以上相邻的杂原子,除非在N或S上存在氧代基,例如硝基或磺酰基。

[0066] 虽然文中所述的“烷基”包括环烷基和环烷基烷基,文中可使用术语“环烷基”描述通过环碳原子连接的碳环非芳族基,可使用“环烷基烷基”描述通过烷基连接基与分子连接的碳环非芳族基。类似地,可使用“杂环基”描述含有至少一个杂原子作为环原子且通过环原子(可以为C或N)与分子连接的非芳族环基;可使用“杂环基烷基”描述通过连接基与另一个分子连接的这种基团。适用于环烷基、环烷基烷基、杂环基和杂环基烷基的尺寸和取代基与烷基中所述的相同。文中使用的这些术语还包括含有一个或两个双键的环,只要该环是非芳族的。

[0067] 文中使用的“酰基”包括这样一类基团,该基团包含烷基、烯基、炔基、芳基或烷基芳基,它们连接在羰基碳原子的两个可利用价位的一个上,杂酰基指羰基碳之外的至少一个碳原子被选自N、O和S的杂原子代替的相应基团。因此,杂酰基包括例如 $-C(=O)OR$ 和 $-C(=O)NR_2$,以及 $-C(=O)$ -杂芳基。

[0068] 酰基和杂酰基通过羰基碳原子的开放价位与任何基团或分子连接。通常,它们是C1-C8酰基,包括甲酰基、乙酰基、新戊酰基和苯甲酰基,C2-C8杂酰基,包括甲氧基乙酰基、乙氧基羰基和4-吡啶酰基。可包含酰基或杂酰基的这类基团的烃基、芳基和杂原子可被上文中所述的通常适合作为酰基或杂酰基的各相应部分的取代基的取代基取代。

[0069] “芳族”部分或“芳基”部分指具有众所周知的芳香性的单环或稠合双环部分;例子包括苯基和萘基。类似地,“杂芳族”和“杂芳基”指含有一个或多个选自O、S和N的杂原子作为环原子的这类单环或稠合双环体系。包含杂原子可以保持5元环和6元环的芳香性。典型的杂芳族体系包括单环C5-C6芳族基,例如吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、噻吩基、呋喃基、吡咯基、吡唑基、噻唑基、噁唑基和咪唑基,通过这些单环基中的一个与苯环或任何杂芳族单环基稠合形成的稠合双环部分,形成C8-C10双环基,例如吲哚基、苯并咪唑基、吡唑基、苯并三唑基、异喹啉基、喹啉基、苯并噻唑基、苯并呋喃基、吡唑并吡啶基、喹唑啉基、喹喔啉基、噌

啉基等。从整个环体系的电子分布考虑具有芳香性的任何单环或稠合双环体系都包括在该定义中。该定义中还包括至少直接连接在分子残余部分上的环具有芳香性的双环基团。通常,环体系含有5-12个环原子。优选单环杂芳基含有5-6个环原子,双环杂芳基含有8-10个环原子。

[0070] 芳基和杂芳基部分可被各种取代基取代,这些取代基包括C1-C8烷基、C2-C8烯基、C2-C8炔基、C5-C12芳基、C1-C8酰基和它们的杂化形式,这些取代基本身可进一步被取代;用于芳基和杂芳基部分的其它取代基包括卤素、OR、NR₂、SR、SO₂R、SO₂NR₂、NRSO₂R、NRCONR₂、NRCOOR、NRCOR、CN、COOR、CONR₂、OOCR、COR和NO₂,其中各R独立地是H、C1-C8烷基、C2-C8杂烷基、C2-C8烯基、C2-C8杂烯基、C2-C8炔基、C2-C8杂炔基、C6-C10芳基、C5-C10杂芳基、C7-C12芳基烷基或C6-C12杂芳基烷基,各R任选地如上文在烷基中所述的方式被取代。芳基或杂芳基上的取代基当然可进一步被上文中所述的适合这些取代基中每种类型的取代基或适合取代基的每个组分的基团取代。因此,例如,芳基烷基取代基可以在芳基部分上被上文中所述的通常用于芳基的取代基取代,它可以进一步在烷基部分上被上文中所述的通常或适用于烷基的取代基取代。

[0071] 类似地,“芳基烷基”和“杂芳基烷基”指通过连接基与它们的连接点连接的芳族和杂芳族环体系,所述连接基例如是亚烷基,包括取代或未取代的、饱和或不饱和的、有环或无环的连接基。典型的连接基是C1-C8烷基或它们的杂化形式。这些连接基还可包括羰基,使得它们能提供作为酰基或杂酰基部分的取代基。芳基烷基或杂芳基烷基中的芳环或杂芳环可被上文中所述同样用于芳基的取代基取代。较佳地,芳基烷基包括任选地被上文定义的用于芳基的基团取代的苯环和未取代的或被一个或两个C1-C4烷基或杂烷基取代的C1-C4亚烷基,其中烷基或杂烷基可任选地环化形成环丙烷、二氧戊环或氧杂环戊烷之类的环。类似地,杂芳基烷基优选包括任选地被上文所述常作为芳基上的取代基的基团取代的C5-C6单环杂芳基和未取代的或被一个或两个C1-C4烷基或杂烷基取代的C1-C4亚烷基,或者杂芳基烷基包括任选取代的苯环或C5-C6单环杂芳基和未取代的或被一个或两个C1-C4烷基或杂烷基取代的C1-C4杂亚烷基,其中烷基或杂烷基可任选地环化形成环丙烷、二氧戊环或氧杂环戊烷之类的环。

[0072] 当描述芳基烷基或杂芳基烷基任选被取代时,取代基可以在基团的烷基或杂烷基部分上或者在芳基或杂芳基部分上。任选存在于烷基或杂烷基部分上的取代基与上文中所述常用于烷基的取代基相同;任选存在于芳基或杂芳基部分上的取代基与上文中所述常用于芳基的取代基相同。

[0073] 文中使用的“芳基烷基”如果未被取代,则是烃基,用环和亚烷基或类似连接基中的碳原子总数进行描述。因此,苺基是C7-芳基烷基,苯基乙基是C8-芳基烷基。

[0074] 上文所述的“杂芳基烷基”指包含通过连接基连接的芳基的部分,与“芳基烷基”的区别在于芳基部分的至少一个环原子或连接基的一个原子是选自N,O和S的杂原子。在本文中依据环和连接基的总原子数描述杂芳基烷基,它们包括通过杂烷基连接基连接的芳基;通过烃基连接基(例如亚烷基)连接的杂芳基;通过杂烷基连接基连接的杂芳基。因此,例如C7-杂芳基烷基包括吡啶基甲基、苯氧基和N-吡咯基甲氧基。

[0075] 文中使用的“亚烷基”指二价烃基;因为该基团是二价的,所以它可以将两个其它基团连接在一起。通常,亚烷基指-(CH₂)_n-,其中n是1-8,优选n是1-4,但是在特别指出的情

况中,亚烷基也可以被其它基团取代,可以为其它长度,开放的价位不一定需要在链的两端。因此, $-\text{CH}(\text{Me})-$ 和 $-\text{C}(\text{Me})_2-$ 也可以称为亚烷基,环基如环丙-1,1-二基也可以称为亚烷基。在亚烷基被取代时,取代基包括文中所述常存在于烷基上的取代基。

[0076] 通常,取代基中包含的任何烷基、烯基、炔基、酰基、芳基或芳基烷基、或这些基团之一的任何杂化形式本身可任选地被其它取代基取代。如果没有另外描述这些取代基,则这些取代基的性质与就初级取代基所述的性质相似。因此,在例如R7是烷基的实施方式中,该烷基可任选地被作为R7的实施方式所列的其余的取代基取代,只要这种取代在化学上是有意义的,并且这种取代不会破坏烷基本身的尺寸限制;例如,被烷基或烯基取代的烷基只是延长了这些实施方式的碳原子数上限,它不包括在内。但是,被芳基、氨基、烷氧基、 $=\text{O}$ 等取代的烷基包括在本发明的范围内,这些取代基的原子不计入用于描述所述烷基、烯基等基团的原子数。在不特别指定取代基数目时,依据这些烷基、烯基、炔基、酰基或芳基的可用价位,它们都可以被多个取代基取代;尤其是,例如,这些基团都可以在任何或全部可用价位被氟原子取代。

[0077] 文中使用的“杂化形式”是指烷基、芳基或酰基之类的基团的衍生物,其中所指定的碳环基的至少一个碳原子已经被选自N、O和S的杂原子代替。因此,烷基、烯基、炔基、酰基、芳基和芳基烷基的杂化形式分别是杂烷基、杂烯基、杂炔基、杂酰基、杂芳基和杂芳基烷基。应理解,通常不超过两个N、O或S是连续连接的,除非氧代基连接在N或S上形成硝基或磺酰基。

[0078] 文中使用的“卤素”包括氟、氯、溴和碘。通常优选的是氟和氯。文中使用的“氨基”指 NH_2 ,但是在将氨基描述为“取代的”或“任选取代的”时,该术语包括 $\text{NR}'\text{R}''$,其中 R' 和 R'' 各自独立地是H,或者是烷基、烯基、炔基、酰基、芳基或芳基烷基或这些基团之一的杂化形式,烷基、烯基、炔基、酰基、芳基或芳基烷基或这些基团之一的杂化形式都任选地被文中所述适合相应基团的取代基取代。该术语还包括其中 R' 和 R'' 连接在一起形成3-8元环的形式,所述3-8元环可以是饱和的、不饱和的或芳香性的,它包含1-3个独立地选自N、O和S的杂原子作为环原子,该环任选地被文中所述适合烷基的取代基取代,或者如果 $\text{NR}'\text{R}''$ 是芳基,则该环任选地被文中所述常用于杂芳基的取代基取代。

[0079] 文中使用的术语“碳环”指在环中只含有碳原子的环化合物,而“杂环”指包含杂原子的环化合物。碳环和杂环结构包括具有单环、双环或多环体系的化合物。文中使用的术语“杂原子”指碳或氢以外的任何原子,例如氮、氧或硫。杂环的说明性例子包括但不限于四氢呋喃、1,3-二氧戊环、2,3-二氢呋喃、吡喃、四氢吡喃、苯并呋喃、异苯并呋喃、1,3-二氢异苯并呋喃、异噁唑、4,5-二氢异噁唑、哌啶、吡咯烷、吡咯烷-2-酮、吡咯、吡啶、嘧啶、八氢吡咯并[3,4b]吡啶、哌嗪、吡嗪、吗啉、硫代吗啉、咪唑、咪唑烷-2,4-二酮、1,3-二氢苯并咪唑-2-酮、吲哚、噻唑、苯并噻唑、噻二唑、噻吩、四氢噻吩-1,1-二氧化物、二氮~~草~~、三唑、胍、二氮杂双环[2.2.1]庚烷、2,5-二氮杂双环[2.2.1]庚烷、2,3,4,4a,9,9a-六氢-1H-β-咔啉、环氧乙烷、环氧丙烷、四氢吡喃、二噁烷、内酯、氮丙啶、吡丁啶、哌啶、内酰胺,也可以包括杂芳基。其它杂芳基的说明性例子包括但不限于呋喃、吡咯、吡啶、嘧啶、咪唑、苯并咪唑和三唑。

[0080] 基材

[0081] 文中使用的“基材”指不溶性载体,在该载体上沉积分析物并且进行分析。基材可包括但不限于硅石、玻璃(例如玻璃、控孔玻璃(controlled-pore glass,CPG))、尼龙、王氏

树脂 (Wang resin)、梅里菲尔德树脂 (Merrifield resin)、葡聚糖凝胶 (Sephadex)、琼脂糖凝胶 (Sephacrose)、纤维素、磁珠、戴娜珠 (Dynabeads)、金属表面 (例如钢、金、银、铝、硅和铜)、塑性材料 (例如聚乙烯、聚丙烯、聚酰胺、聚酯、聚偏二氟乙烯 (PVDF))、或插针 (pin) (例如,适用于组合合成或分析的插针阵列,或平坦表面凹陷中的珠粒,平坦表面例如是具有或不具有板的晶片 (例如硅晶片)。固体载体可以为任何所需的形式,包括但不限于:珠粒、芯片、毛细管、板、隔膜、晶片、梳状物、插针、具有插针的晶片、基本平坦的表面、凹陷或纳升井 (nanoliter wells) 的阵列,和本领域技术人员已知的其它几何形状和形式。优选的载体是设计用于在不连续的位置接受或连接样品的平坦表面。最优选的是具有疏水区域的平坦表面,所述疏水区域包围用于接受、容纳或结合样品的亲水位置。基材对在处理中使用的装置或试剂的操作可以是惰性的,包括常用于MALDI质谱的基质材料和溶剂。

[0082] 在基材上,基质或基质/添加剂或基质/分析物/添加剂的斑点通常具有一定的特征。基材上各斑点的直径可以约为200 μm 到1mm。斑点直径通常是基本均匀的,斑点到斑点的直径变化通常应最小化 (例如,变化约为20 μm)。可用于质谱分析的基材上的斑点的中心与中心之间的距离可以为任何值,例如中心与中心之间的距离为2.25mm或1.125mm,例如,基材上斑点的中心与中心之间的距离通常是基本均匀的。基材上斑点的厚度约为10 μm 到100 μm 。基材上各斑点的厚度往往是基本均匀的,斑点到斑点的厚度之间的变化通常应最小化 (例如,约30 μm)。

[0083] 靶位

[0084] 文中使用的术语“靶位”指基材上特定的位置,材料 (例如基质材料,基质材料与添加剂,或分析物) 可以沉积并保留在该位置。基材可包括一个或多个靶位,它们可以无规或以有序的阵列或其它图案排列。当用于质谱分析 (例如MALDI分析) 时,靶位或具有沉积材料的所得靶位的尺寸优选等于或小于将聚焦在基材上引起解吸的激光斑点的尺寸。因此,靶位可以是例如设置在固体载体表面上的井或凹陷,插针或珠粒,或物理障碍物,或者它们的组合,例如芯片上的珠粒,井中的芯片,等等。靶位可以通过物理方式放置在基材上,可以蚀刻到基材表面上,可以是在某个位置周围蚀刻后留下的“塔”,或者可以通过物理-化学参数例如相对亲水性、疏水性或任何其它表面化学性质限定的,将液体保留在其中或其上的位置。

[0085] 平台

[0086] 本发明的方法和和组合物可与任何电离源联合使用,这些电离源包括大气压化学电离 (APCI)、化学电离 (CI)、电子冲击 (EI)、电喷雾电离 (ESI或ES)、快速原子轰击 (FAB)、场解吸/场电离 (FD/FI)、基质辅助激光解吸电离 (MALDI) 和热喷雾电离 (TSP)。在一些实施方式中,电离源是MALDI或ES。

[0087] 本发明的方法和组合物可与任何质量分析仪联合使用。目前可用的质量分析仪有多种,其中比较常见的是四极飞行时间 (TOF) 分析仪,扇形磁场,以及傅立叶变换和四极离子阱。另外,该分析仪可以串联使用,成为串联 (tandem as tandem) (MS-MS) 质谱仪。在一些实施方式中,质量分析仪是TOF分析仪。

[0088] 在一些实施方式中,通过质谱分析对分析物进行分析,而不用光谱法分析分析物。在一些实施方式中,不通过红外光谱 (例如傅立叶变换红外光谱) 对分析物进行分析,该方法通常测量某些分子的振动频率,通常不包括分析物的电离和对电离的分析物质量的测

量。

实施例

[0089] 以下实施例是非限制性的,用来说明本发明的某些实施方式。

[0090] 实施例1:分析物的添加剂

[0091] 在以下实施例中,将来自Sequenom iPLEX™反应的分析物与纳米纯水或抗坏血酸添加剂混合,以确定添加剂对加合物形成的影响。依据以下文献所述的Sequenom iPLEX™规程平行地处理各块板:Jurinke,C.,Oeth,P.,van den Boom,D.,MALDI-TOF mass spectrometry:a versatile tool for high-performance DNA analysis (MALDI-TOF质谱:一种多功能高效DNA分析工具),Mol.Biotechnol.26,147-164 (2004);Oeth,P.等,iPLEX™Assay:Increased Plexing Efficiency and Flexibility for MassARRAY® System through single base primer extension with mass-modified Terminators (iPLEX™测试:通过单碱基引物延长和质量修饰终止子提高的MassARRAY®体系的丛效率和灵活性),SEQUENOM Application Note (2005),两篇文献都通过参考结合于此。在稀释/调理步骤中,按照标准规程所指示,将9口1分析物溶液与25口1纳米纯水混合,同时还将其其它的板与抗坏血酸混合,产生最终的抗坏血酸浓度为20mM。

[0092] 为了除去抗坏血酸中残余的阳离子,以及排除氨化的阳离子交换树脂可能带来的任何干扰,用1g/ml的质子化树脂对抗坏血酸储备溶液进行脱盐化处理。根据工作流程,添加剂可直接与分析物混合,或者进一步稀释,然后加入样品中。在此具体实施例中,稀释步骤在自动化液体处理器上完成,稀释溶液在加入到分析物溶液之前以1/25的体积比储备在50ml盘中。

[0093] 在各稀释/调理步骤后,使用Sequenom纳米分配器将两块板都以10纳升/区域分配到预基质化的标准SpectroChip™ (300mM 3-HPA/25mMDAC) 上,在Sequenom MassARRAY® Analyzer Compact上进行分析。

[0094] 结果:使用抗坏血酸导致对抗坏血酸处理过的样品的呼叫数增加8%。在抗坏血酸处理过的样品中,钠和氨加合物被抑制到检测下限。这样导致对抗坏血酸处理过的样品不存在由于氨和/或钠加合物导致的假阳性呼叫,而水调理的样品中的氨加合物导致一次测试反复指向异合子(假阳性呼叫)。

[0095] 实施例2:基质的添加剂

[0096] 在以下实施例中,显示包含抗坏血酸(AA)的新的基质组合物能减少加合物形成,从而改善谱图质量。

[0097] 基质溶液

[0098] 由以下储备溶液和纳米纯水制备基质组合(不同基质组分的储备溶液依据组分的官能团用阳离子交换树脂进行处理-H+形式的带有交换树脂的酸,NH4+形式的带有树脂的氨盐):

[0099] 3-HPA:350mM,在30%的乙腈水溶液中。

[0100] AA:1M的水溶液。

[0101] DAC:226mg 1Min水溶液。

[0102] 用300mM 3HPA和25mM DAC制备标准基质,而用300mM 3HPA、20mM NH4-草酸盐和

20mM抗坏血酸制备新基质。参见表1。使用Gesim Nanoplotter将最终的基质以15–20nl分配到SpectroChip上。

[0103] 表1

[0104]	基质类型	基质组合物 (浓度, [mM])
	标准, 无树脂	300 HPA / 25 DAC
	标准, 带有树脂	300 HPA / 25 DAC
	新基质	300 HPA / 20 AA / 20 NH ₄ -草酸盐

[0105] 合成寡核苷酸样品

[0106] 使用直接点样于表1基质上的合成寡核苷酸进行两次实验。在第一实验中,在“老的”树脂处理过的基质和“新的”抗坏血酸改性的基质上都测试了17聚体合成寡核苷酸(GTG GTG GTG GTG GT)。在图1(老基质)中,明显存在氨加合物(峰高度约为在5335Da处的母峰高度的12%),而图2中没有氨加合物。新基质也称为“基质63C”。

[0107] 在第二个实验中,测试了低质量17聚体合成寡核苷酸(5044Da)和高质量28聚体合成寡核苷酸(8436Da)的加合物形成和脱嘌呤作用。在两次实验中,使用Gesim Nanoplotter将合成寡核苷酸分析物以10nl/斑点分配到表1的基质上。低质量寡核苷酸和高质量寡核苷酸的结果分别显示在表2和表3中。

[0108] 表2A:17聚体加合物

[0109]	17 聚体的加合物, 5044Da 样品尺寸: 48	标准基质, 未用树脂处理的	标准基质, 树脂处理的	新基质
	NH ₃ (+17Da)	0.4*2.3=0.9 3%	0	0
	HPA (+138Da)	0.17*1.8=0.3 3%	0	0
	HPA 脱羧基化的 1 (+94Da)	0.48*2.4=1.2 4%	0	0.13*1.6=0.2 2%
	HPA 脱羧基化的 2 (+188Da)	0.98*5=4.9 7%	1*10.2=10.2 9%	1*8.9=8.9 11%
	钾(+38Da)	0.46*2.5=1.2 4%	0	0
	钠(+22Da)	0.52*3.4=1.8 5%	0	0
	碳酸(+62Da)	0.08*1.4=0.1 2%	0	0.06*1.3=0.08 2%
	平均加合物形成分数	1.5	1.5	1.3
	脱嘌呤作用	0	0	0

[0110] 表2B:17聚体探针高度和信噪比 (SNR)

[0111]	探针	标准基质, 未用树脂处理的	标准基质, 树脂处理的	新基质
	探针高度(平均值/标准偏差(avg. / stdev.))	69 / 19	110 / 24	79 / 26
	探针 SNR (平均值/标准偏差)	241 / 57	388 / 71	313 / 77

[0112] 表3A:28聚体加合物

28 聚体的加合物, 8436Da 样品尺寸: 48	标准基质, 未用树脂处理的	标准基质, 树脂处理的	新基质
NH3 (+17Da)	1*3.8=3.8 19%	1*3.9=3.9 14%	0.46*2.1=1 7%
HPA (+138Da)	0.35*1.2=0.42 6%	0.6*1.6=1 6%	0.67*1.1=0.74 4%
HPA 脱羧基化的 1 (+94Da)	0.35*1.3=0.46 7%	0.6*1.7=1 6%	0.46*1.7=0.78 6%
HPA 脱羧基化的 2 (+188Da)	0.35*1.3=0.46 7%	0.65*2.6=1.7 9%	1*3.5=3.5 11%
[0113] 钾(+38Da)	0.39*1.3=0.5 7%	0.58*1=0.58 4%	0.4*0.9=0.36 3%
钠(+22Da)	0.46*2.4=1.1 12%	0.6*1.8=1.1 6%	0.46*1.1=0.51 4%
碳酸(+62Da)	0.31*0.8=0.2 4%	0.31*0.8=0.2 3%	0.17*0.8=0.14 3%
平均加合物形成分数	1	1.4	1
脱嘌呤作用分数: 取代 G: -133Da 消去 G: -150Da 取代 A: -117Da	0.29*0.6=0.2 0 0	0.46*0.8=0.4 0 0	0.46*1.2=0.6 0 0

[0114] 表3B:28聚体探针高度和信噪比 (SNR)

[0115] 探针			
探针高度 (平均值/标准偏差)	20/5	28/7	31/7
探针SNR (平均值/标准偏差)	93/19	134/27	164/31

[0116] 基质比较是基于相对加合物和脱嘌呤作用峰高度,以及探针高度和SNR。在分析中引入加合物形成分数来说明超过峰分数阈值的斑块 (pad) 的相对频率:

[0117] 加合物形成分数 =

[0118] = (超过阈值的斑块的相对频率) * (平均加合物峰高度)

[0119] 术语基材上的“斑块”和“斑点”可互换使用。平均加合物峰高度的标准偏差较低,对于所有基质都相当,并未报告在表中。

[0120] 与经过树脂处理的标准基质相比,对于合成17聚体,在新基质上的平均加合物形成分数小13% (表2A),对于合成28聚体,在新基质上的平均加合物形成分数小29% (表3A)。

[0121] 引物延伸样品

[0122] 使用指向RhD和AMG基因的多态性的有效Sequenom基因型试验来进行额外的实验。这些试验使用iPLEX™试验和MassARRAY®技术进行 (Jurinke, C., Oeth, P., van den Boom, D., MALDI-TOF mass spectrometry: a versatile tool for high-performance DNA analysis (MALDI-TOF质谱: 一种万能的高性能DNA分析工具), Mol. Biotechnol. 26, 147-164 (2004); Oeth, P. 等, iPLEX™ Assay: Increased Plexing Efficiency and Flexibility for MassARRAY® System through single base primer extension with mass-modified Terminators (iPLEX™测试: 通过单碱基引物延长和质量修饰终止子提高的质谱分析®体系的从效率和灵活性), SEQUENOM Application Note (2005), 这两篇文献都通过参考结合于此)。简而言之, 围绕SNP的靶区域首先用PCR扩增。随后, 将寡核苷酸引物与PCR产物退火, 并用4种终止子核苷酸和DNA聚合酶的混合物通过单个核苷酸等位基因特异性延伸。将延伸产

物转移到小型化的芯片阵列上,用MALDI-TOF质谱进行分析。延伸产物的分子量的确定可以明确地识别样品中存在的SNP等位基因。由质量信号的峰面积比可以预测给定样品中等位基因的相对丰度。

[0123] 在此实验中,对点样于表1所示的基质上的7316Da AMG引物延伸产物使用高20%的激光能量(与上述合成寡核苷酸实验相比)。如表4和5所示,与标准基质相比,分配在新基质上的延伸产物的平均加合物形成分数减小(减小40-50%),增加的激光能量对加合物形成无负面影响。

[0124] 表4A:AMG试验(7316Da)加合物-标准激光能量

[0125]	胎儿定量检测仪(Fetal Quantifier) 探针的加合物, 7316Da 样品尺寸: 96	标准基质, 未用树脂处理的	标准基质, 用树脂处理的	新基质
	NH3 (+17Da)	1*2.5=2.5 16%	1*2.1=2.1 11%	0.94*1=0.94 6%
	钠(+22Da)	0.91*1.7=1.5 11%	0.98*0.9=0.9 5%	0.25*0.5=0.13 3%
	钾(+38Da)	0.9*1.2=1.1 8%	0.96*1.1=1.1 6%	0.89*0.8=0.7 4%
	碳酸(+62Da)	0.9*1.2=1.1 8%	0.98*1.3=1.3 7%	0.98*1.4=1.4 8%
	平均加合物形成分数	1.6	1.4	0.8

[0126] 表4B:AMG试验(7316Da)高度和信噪比(SNR)

[0127]	探针			
	探针高度 (平均值/标准偏差)	16 / 4	19 / 5	18 / 6
	探针 SNR (平均值/标准偏差)	54 / 11	65 / 14	66 / 19

[0128] 表5:AMG试验(7316Da)加合物-增加的激光能量

[0129]

胎儿定量检测仪 探针的加合物, 7316Da 样品尺寸: 96	标准基质, 经树脂处 理的 增加 20%的激光能量	新基质 增加 20%的激光能 量
NH3 (+17Da)	$1 \times 1.7 = 1.7$ 11%	$0.55 \times 0.85 = 0.47$ 5%
钠(+22Da)	$0.98 \times 1.1 = 1.1$ 7%	$0.06 \times 0.51 = 0.03$ 3%
钾(+38Da)	$0.1 \times 0.4 = 0.04$ 0.3%	$0.41 \times 0.75 = 0.31$ 3%
碳酸(+62Da)	$0.98 \times 1.5 = 1.5$ 9%	$0.97 \times 1.6 = 1.6$ 8%
平均加合物形成分数	1.1	0.6
探针		
探针高度(平均值/标准偏 差)	16 / 4	19 / 4
探针 SNR (平均值/标准偏 差)	65 / 14	69 / 13

[0130] 为了测试在较多分析物存在下新基质的有效性,在表1的基质上分析量增加的(10,15和20nl) 7528Da AMG引物延伸产物。参见下表6。在分析物体积为10和15nl时新基质的平均加合物形成分数较低;而在20nl时,对两种基质观察到相同的分数(0.6)。

[0131] 表6:AMG试验(7528Da)加合物-基质上分析物样品增多

[0132]

胎儿定量检测仪 探针的加合物, 7528Da 样品尺寸: 24	标准基质, 经树脂处理的			新基质		
探针体积[nl]	10	15	20	10	15	20
NH3 (+17Da)	$0.92 \times 1.3 = 1.2$ 8%	$0.92 \times 0.8 = 0.73$ 8%	$0.92 \times 0.6 = 0.55$ 10%	$0.96 \times 0.9 = 0.86$ 4%	$0.88 \times 0.6 = 0.53$ 4%	$0.88 \times 0.3 = 0.26$ 4%
钠(+22Da)	$0.92 \times 1 = 0.92$ 6%	$0.92 \times 0.7 = 0.64$ 7%	$0.92 \times 0.6 = 0.55$ 10%	0	$0.21 \times 0.3 = 0.06$ 2%	$0.5 \times 0.3 = 0.15$ 4%
钾(+38Da)	$0.67 \times 0.8 = 0.54$ 5%	$0.92 \times 0.7 = 0.64$ 7%	$0.92 \times 0.7 = 0.64$ 12%	$0.83 \times 1.2 = 1.0$ 6%	$1 \times 1.1 = 1.1$ 7%	$1 \times 1.2 = 1.2$ 15%
碳酸(+62Da)	$1 \times 1.6 = 1.6$ 10%	$1 \times 1.2 = 1.2$ 12%	$0.92 \times 0.7 = 0.64$ 12%	$1 \times 1.9 = 1.9$ 9%	$0.96 \times 1.3 = 1.25$ 9%	$1 \times 0.8 = 0.8$ 10%
平均加合物形成分数	1.1	0.8	0.6	0.9	0.7	0.6
探针						
探针高度(平均值/标准偏差)	16 / 4	10 / 3	6 / 3	21 / 5	15 / 5	8 / 3
探针 SNR (平均值/标准偏差)	85 / 19	56 / 17	30 / 14	103 / 21	68 / 22	37 / 10
相对 SNR 减小	34%	46%		34%	46%	

[0133] 改进的质谱

[0134] 图3和图4显示了HD-4-psi 3-i基因型试验的结果,由此清楚地表明减少加合物形成对消除假阳性呼叫的重要性。在7626Da的峰不是对标准基质所报道的插入峰(insertion)(图3),而是距离7571Da处的延伸产物峰55Da的(NH₃+K)加合物峰。在新基质中该加合物峰已经清楚地消除(图4)。

[0135] 实施例3:基质和分析物的添加剂

[0136] 还测试了新的抗坏血酸改性的基质与加入到分析物溶液的抗坏血酸的组合(位于8289Da的AMG引物延伸产物)。如实施例1和实施例2的表2-6所示,添加到分析物中或与标准基质组合的抗坏血酸明显减少了氨和钠加合物。参见下表7。对标准基质上用抗坏血酸处理过的分析物而言,减少率达到43%,对分配在新基质上的用抗坏血酸处理过的分析物而言,减少率达到57%(与分配在未经处理的基质上的未经处理的分析物相比)。

[0137] 表7:添加给分析物和基质的抗坏血酸

胎儿定量检测仪 探针的加合物, 8289Da 样品尺寸: 24	标准基质, 用树脂处理 过的	标准基质, 未用树脂处理 的	新基质	新基质
分析物中最终抑制 剂浓度	0	20mM	0	20mM
NH ₃ (+17Da)	1*1.4=1.4 18%	1*0.6=0.6 10%	1*0.6=0.6 8%	0.92*0.5=0.4 6 8%
钠(+22Da)	0.96*0.7=0.6 7 9%	0.63*0.3=0.19 5%	0.17*0.3=0. 05 4%	0.29*0.1=0.0 3 2%
钾(+38Da)	0.21*0.3=0.0 6 4%	0.13*0.1=0.01 2%	0.17*0.2=0. 03 3%	0.17*0.2=0.0 3 3%
碳酸(+62Da)	0.96*0.8=0.7 7 10%	1*0.7=0.7 12%	1*0.9=0.9 11%	0.96*0.8=0.7 7 13%
平均加合物形成分 数	0.7	0.4 (43%)	0.4	0.3 (25%)
探针				
探针高度 (平均值/标准偏差)	8 / 2.3	6 / 3	8 / 3	6 / 2
探针 SNR (平均值/标准偏差)	35 / 8	32 / 11	36 / 12	30 / 7

[0139] 实施例4:稳定性测试

[0140] 在6个月的时间内,进行了四组稳定性测试,以确定抗坏血酸减少加合物的性质随时间的变化。没有迹象表明所测试的基质在该段时间内表现出性能下降。相反,所得到的SNR以及对氨和碱性加合物稳定的加合物形成分数证实了3-HPA及其添加剂DAC、NH₄-草酸盐与抗坏血酸的组合的稳定性。

[0141] 在本文中引用的各专利、专利申请、出版物和文献的全部内容都通过引用结合于此。上述专利、专利申请、出版物和文献的引用并不表示申请人承认上述任何内容是相关的现有技术,也并不表示承认这些出版物或文献的内容或日期。

[0142] 在不背离本发明基本方面的情况下,可以对上述内容进行改变。尽管参考一个或多个具体实施方式详细描述了本发明,但是本领域普通技术人员将认识到可对本申请中具体揭示的实施方式进行改变,只要这些改变和改进在本发明的范围和精神内。

[0143] 在本文中适当描述的本发明可以在无本文中具体揭示的任何元素存在下实施。因此,例如,在本文的各个例子中,术语“包含”、“基本由……组成”和“由……组成”中的任何

一个都可以用其它两个中的任何一个代替。已经使用的术语和表达用作说明而非限制性的术语,这些术语和表达的使用并不排除所显示和所描述的特征或其部分的任何等同特征或其部分,以及在要求专利权的本发明范围内的各种可行的改变。术语“一个”或“一种”修饰某个元素时,表示一个或一种该元素或者多个或多种该元素(例如“一个装置”可表示一个或多个装置),除非由上下文可以清楚地知道所描述的是一种元素还是不止一种元素。文中所使用的术语“约”表示在基础参数的10%范围内的值(即 $\pm 10\%$),在一列值的开头处使用术语“约”表示该术语修饰该列值中的每个值(即,“约1、2和3”是约1,约2和约3)。例如,“约100克”的重量可包括在90克到110克之间的重量。因此,应理解尽管本发明通过代表性实施方式和任选的特征进行了具体描述,但是本领域技术人员能够想到本文所揭示的内容的改变和变体,这些改变和变体应认为落在本发明的范围内。

[0144] 在所附权利要求书中陈述了本发明的实施方式。

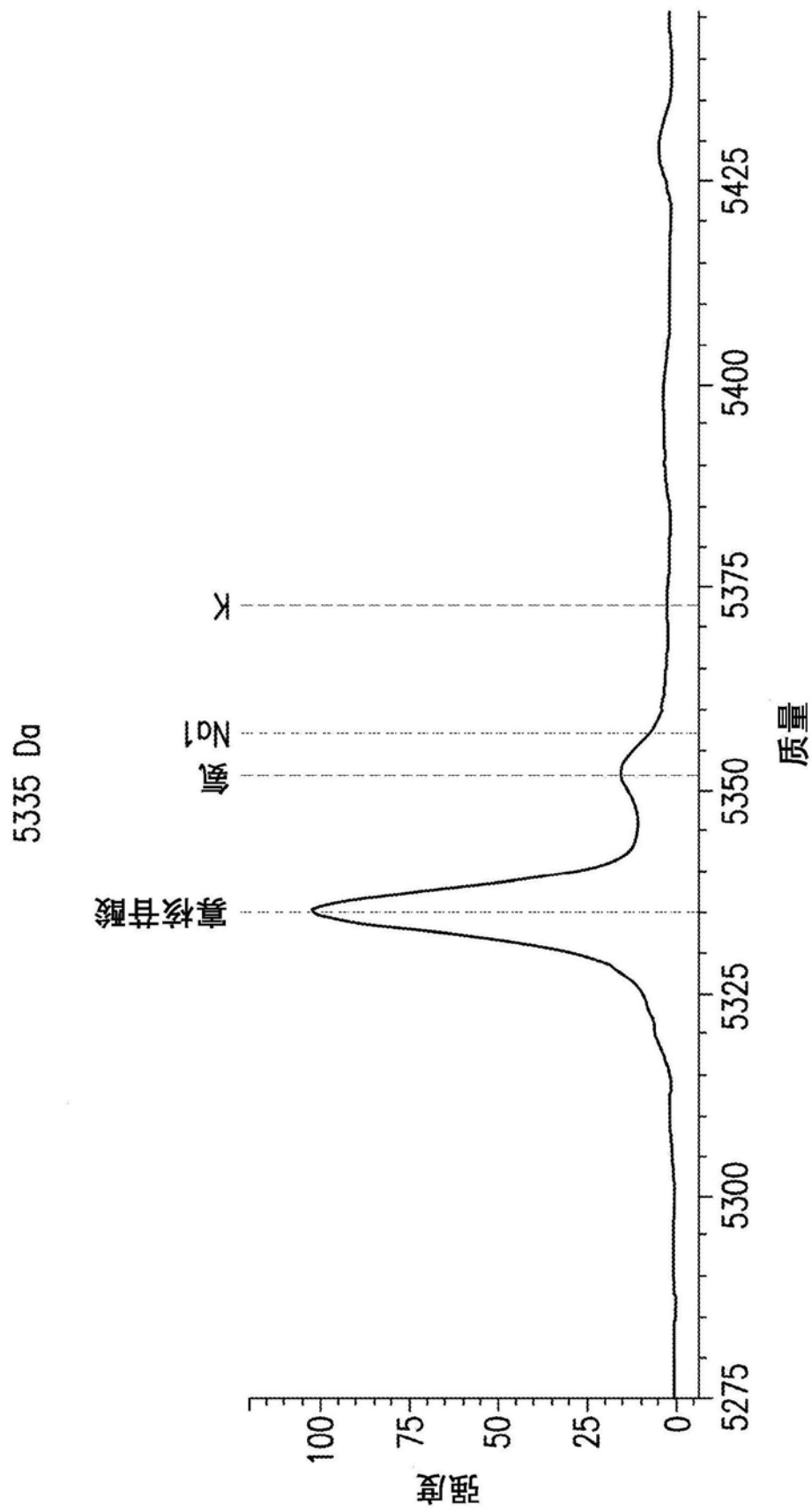


图1

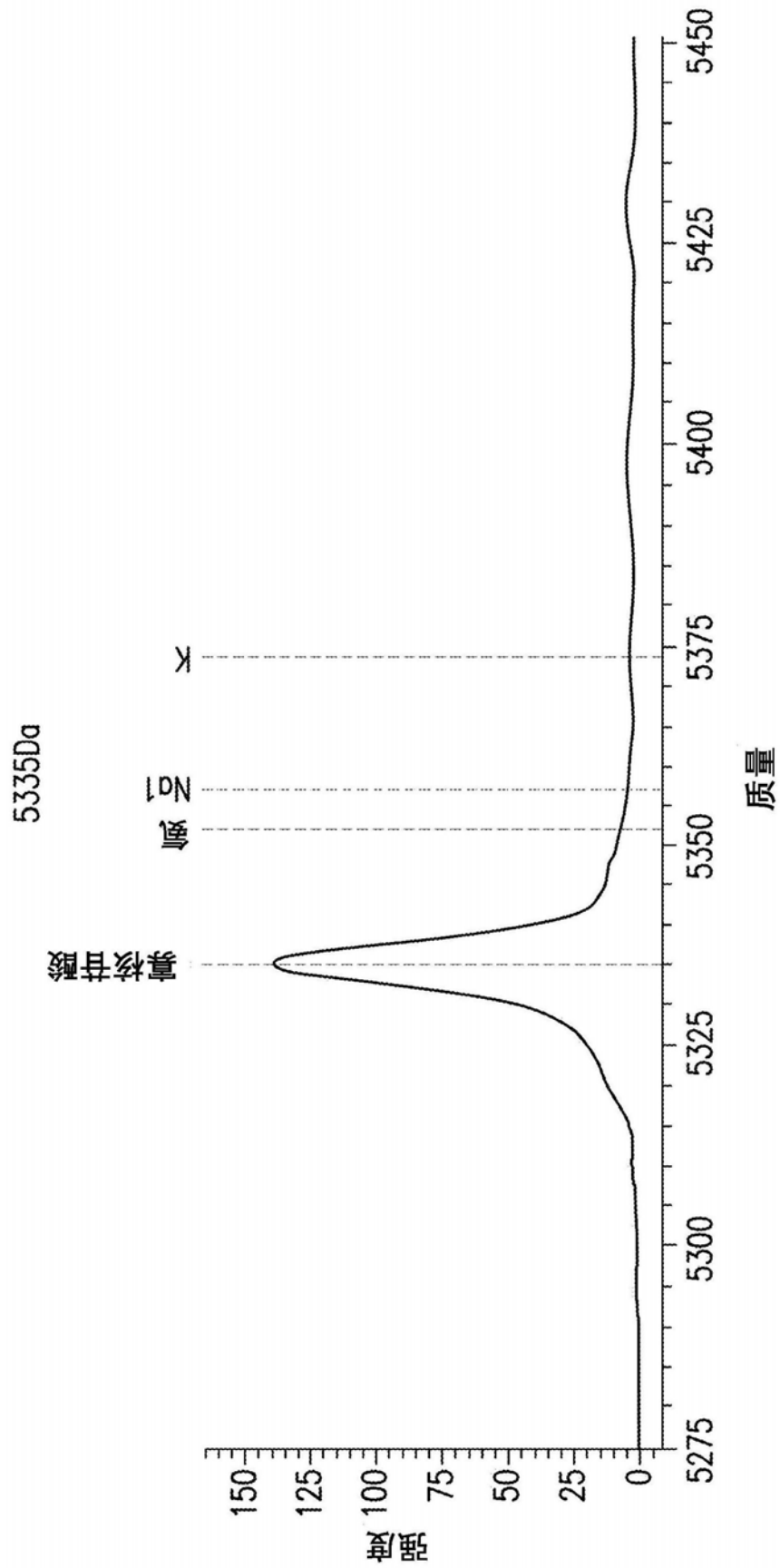


图2

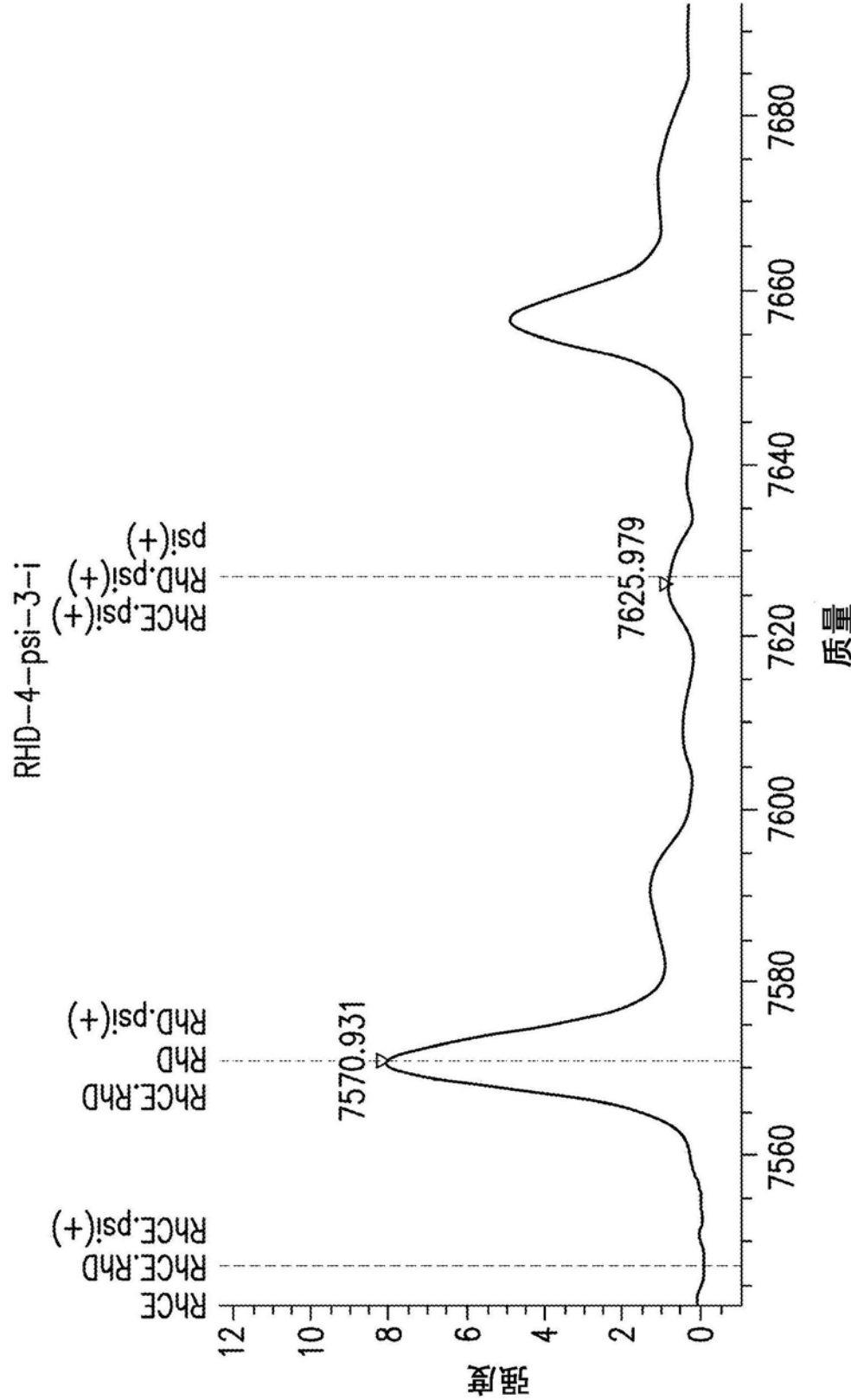


图3

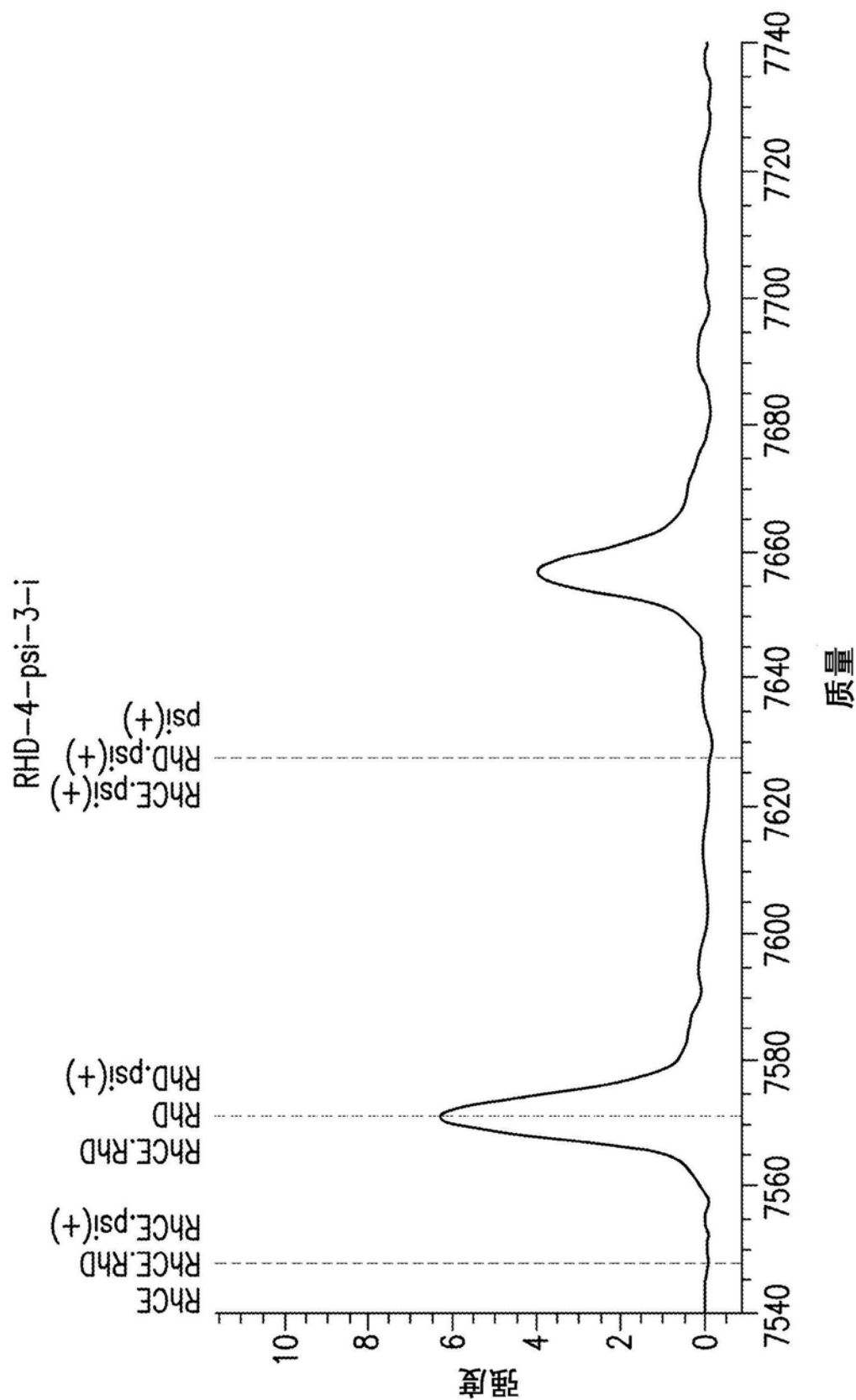


图4