



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103443621 B

(45) 授权公告日 2016.06.29

(21) 申请号 201280013364.2

(22) 申请日 2012.02.07

(30) 优先权数据

61/440,282 2011.02.07 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013.09.16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/024153 2012.02.07

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/109250 EN 2012.08.16

(73) 专利权人 美国控股实验室公司

地址 美国北卡罗来纳

(72) 发明人 R·P·格兰特 M·克劳福德

D·W·钱德勒 W·柯廷

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038

代理人 张琤

(51) Int. Cl.

G01N 30/02(2006.01)

(56) 对比文件

US 20060040256 A1, 2006.02.23,

US 20080128606 A1, 2008.06.05,

US 20080261312 A1, 2008.10.23,

US 20090215111 A1, 2009.08.27,

CN 101802606 A, 2010.08.11,

CN 101551362 A, 2009.10.07,

初阳 等. 高效液相色谱-串联质谱联用法测定人血清内源性睾酮含量.《医药导报》.2010, 第29卷(第4期), 第443-445页.

江洁 等. 水产品中多种激素残留测定的高效液相色谱法.《海洋水产研究》.2007, 第28卷(第6期), 第67-71页.

Shari Wu 等. Supported liquid extraction in combination with LC-MS/MS for high-throughput quantitative analysis of hydrocortisone in mouse serum.《Biomed. Chromatogr.》.2009, 第24卷(第6期), 第632-638页.

Ravinder J. Singh. Validation of a high throughput method for serum/plasma testosterone using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).《steroids》.2008, 第73卷(第13期), 第1339-1344页.

Jiongwei Pan 等. Automatic Supported Liquid Extraction (SLE) Coupled with HILIC-MS/MS: An Application to Method Development and Validation of Erlotinib in Human Plasma.《Pharmaceutics》.2010, 第2卷(第2期), 第105-118页.

审查员 潘迪

权利要求书2页 说明书13页

(54) 发明名称

用于测定睾酮在样品中的存在或量的方法和系统

(57) 摘要

公开了用于使用支撑液萃取和液相色谱-质谱法分析样品中的睾酮的方法和系统。

1. 一种用于测定甾酮在生物学样品中的存在或量的方法,所述方法包括:
 - (a)提供包含甾酮的生物学样品;
 - (b)使用支撑液萃取部分纯化所述生物学样品,从而提供部分纯化的包含甾酮的生物学样品;
 - (c)使用液相色谱法将甾酮与所述部分纯化的生物学样品中的其它组分色谱分离;和
 - (d)通过质谱法分析所述色谱分离的甾酮以测定甾酮在所述生物学样品中的存在或量。
2. 权利要求1的方法,其中所述部分纯化步骤(b)包括除去干扰通过质谱来分析甾酮的组分。
3. 权利要求2的方法,其中所述干扰通过质谱法来分析甾酮的组分包括如下的一种或多种:可的松、皮质醇、21-去氧皮质醇、皮质酮、11-去氧皮质醇、曲安奈德、四氢皮质醇、四氢-可的松、DHEA、17 α -羟孕酮、表甾酮、二氢雄酮、5 α -雄烷-3 α -醇-17-酮、5b-孕烷-3 α -17 α -20 α -三醇、etiocolan-3 α -二醇或孕二醇。
4. 权利要求1的方法,其中所述部分纯化步骤(b)包括使用利用硅藻土和与水不混溶的有机溶剂系统的支撑液萃取。
5. 权利要求4的方法,其中所述与水不混溶的有机溶剂系统包括:乙酸乙酯、己烷、甲苯、辛醇、氯仿、二氯甲烷、二乙醚、环己烷、戊烷、N-庚烷、苯、正-丁基氯、丁醇、亚甲基氯或上述的任意两种或更多种的混合物。
6. 权利要求5的方法,其中所述与水不混溶的有机溶剂系统还包括一定量的极性溶剂,其中所述极性溶剂是甲醇、丙酮、乙腈、异丙醇、二乙醚或甲基-叔-丁醚。
7. 权利要求1的方法,其中以自动化方式进行所述部分纯化步骤(b)。
8. 权利要求1的方法,其中手动地进行所述部分纯化步骤(b)。
9. 权利要求1的方法,其中使用液相色谱包括使用分析液相色谱。
10. 权利要求9的方法,其中使用分析液相色谱包括使用反相柱。
11. 权利要求9的方法,其中使用液相色谱包括使用至少一个柱子。
12. 权利要求11的方法,其中使用液相色谱包括平行使用两个或更多个液相色谱柱,其中所述两个或更多个液相色谱柱被内联至单个质谱仪。
13. 权利要求12的方法,其中平行使用两个或更多个液相色谱柱包括将部分纯化的生物学样品在交错的时间引入所述两个或更多个液相色谱柱。
14. 权利要求1的方法,其中所述分析步骤(d)包括使用电离技术电离甾酮,所述电离技术选自:电喷雾电离、大气压化学电离和大气压光电离。
15. 权利要求1的方法,其中所述分析步骤(d)包括使用四极质谱仪检测甾酮。
16. 权利要求15的方法,其中所述四极质谱仪是三重四极质谱仪。
17. 权利要求16的方法,其中所述分析步骤(d)包括:
 - 在第一四极中检测完整的甾酮离子;
 - 在第二四极中片段化完整的甾酮离子以产生一个或多个甾酮片段离子;和
 - 在第三四极中检测一个或多个甾酮片段离子。
18. 权利要求1的方法,其中所述分析步骤(d)包括测定生物学样品中甾酮的量。
19. 权利要求1的方法,其中所述生物学样品包含内部标准。

20. 权利要求19的方法,其中所述内部标准是稳定的同位素标记的睾酮。
21. 权利要求20的方法,其中所述内部标准是 ^{13}C -标记的睾酮。
22. 权利要求21的方法,其中所述内部标准是2,3,4- ^{13}C -标记的睾酮。
23. 一种用于测定生物学样品中睾酮的量的方法,所述方法包括:
- (a) 提供生物学样品,所述生物学样品包括含有睾酮的生物学样品;
 - (b) 使用支撑液萃取来部分纯化所述生物学样品,从而提供含有睾酮的部分纯化的生物学样品;
 - (c) 使用反相液相色谱来将睾酮与部分纯化的生物学样品中的其它组分色谱分离;和
 - (d) 通过质谱法分析所述色谱分离的睾酮以测定生物学样品中睾酮的量。
24. 一种产生用于诊断与异常睾酮水平相关的疾病或病况的报告的方法,所述方法包括:
- (a) 提供生物学样品,所述生物学样品包括含有睾酮的生物学样品;
 - (b) 使用支撑液萃取部分纯化所述生物学样品以提供含有睾酮的部分纯化的生物学样品;
 - (c) 使用液相色谱将睾酮与所述部分纯化的生物学样品中的其它组分色谱分离;
 - (d) 通过质谱法分析所述色谱分离的睾酮以测定生物学样品中睾酮的量;和
 - (e) 产生陈述所述生物学样品中睾酮的浓度的报告。
25. 一种用于测定睾酮在生物学样品中的存在或量的系统,所述系统包括:
- (a) 用于使用支撑液萃取部分纯化生物学样品的工作站,所述生物学样品包含睾酮;
 - (b) 用于使用液相色谱将睾酮与所述部分纯化的生物学样品中的其它组分色谱分离的工作站;和
 - (c) 用于通过质谱法分析所述色谱分离的睾酮以确定睾酮在生物学样品中的存在或量的工作站。

用于测定睾酮在样品中的存在或量的方法和系统

[0001] 与相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求保护2011年2月7日提交的美国临时专利申请号61/440,282的优先权的权益,如同在本文中完全显示一样将所述临时专利申请通过引用并入。

发明领域

[0003] 本申请提供了用于测定生物标志物在样品中的存在或量的方法和系统。具体地,本发明提供了使用液相色谱和质谱法分析样品中的睾酮的方法和系统。

[0004] 背景

[0005] 生物标志物例如激素、维生素和/或代谢物可被用于多种病症的临床诊断和在内分泌学中用作内源性生物标志物。类固醇激素例如睾酮是一类重要的激素。睾酮产生并且维持男性第二性征,以及促进精子的生长和发育。

[0006] 肾上腺和性腺合成睾酮。水平可因酶阻断而在先天性肾上腺增生患者中升高,这减少了皮质醇的产生并且增加了导向产雄激素途径的前体水平。睾酮还可在具有多毛症的女性中升高。卵巢可以是这类患者中该激素的重要来源。由于在睾丸中产生,睾酮在成年男性中通常比其在女性和儿童中高得多。在男性中的水平在性腺机能减退状态中可下降。

[0007] 内分泌学中内源性生物标志物的临床诊断测试的需要可包括高度灵敏性和特异性测定,分析小的样品容积(例如,儿科样品容积可被限定为小于约200 μ L)的能力和筛选多个分析物以精确诊断疾病状态例如内分泌病症的能力。在历史上,放射性免疫测定(RIA)和酶联免疫测定(ELISA)法已被用于这样的临床诊断测试。然而,免疫测定法(IA)例如RIA和EIA可遭受低通量、抗体交叉反应性的困扰,这可需要针对特异性和不良可扩展性(poor scalability)的额外准备。同样地,通过RIA分析内源性生物标志物可需要多个系列稀释来分析每一种个体标志物,这可引起对进行多次调整来使样品容积标准化的需要和/或对多个单独的测试的需要。同样地,免疫测定测试对于分析每一个样品中的多个生物标志物也不是特别有帮助的。单个测定中多个分析物的分析可允许使用减少的尺寸的样品,这产生具有增加的灵敏性和效率/样品的测定。

[0008] 因此,存在对开发可用于测量内源性生物标志物的分析技术和提供比RIA更强的灵敏性和更高的通量的方法的需要。然而,直至最近,仅有伴有衍生化的GC-MS或LC-MS/MS对于小的样品容积是成功的。因此,本领域中存在对用于分析内分泌学中的临床诊断的内源性生物标志物的LC-MS/MS技术的需要,该技术能够提供可接受水平的检测限,而无需繁复的衍生过程。

[0009] 发明概述

[0010] 在至少一个方面,本发明提供了用于测定睾酮在样品中的存在或量的方法,所述方法包括:(a)提供包含睾酮的样品;(b)使用支撑液萃取(supported liquid extraction)部分纯化样品,从而提供经部分纯化的包含睾酮的样品;(c)使用液相色谱法将睾酮与部分纯化的样品中的其它组分色谱分离;和(d)通过质谱法分析色谱分离的睾酮以测定睾酮在样品中的存在或量。在下文中对这类方法的其它实施方案进行详细描述。

[0011] 在另一个方面,本发明提供了用于测定睾酮在生物学样品的量的方法,所述方法包括:(a)提供样品,所述样品包括含有睾酮的生物学样品;(b)使用支撑液萃取部分地纯化样品,从而提供部分纯化的包含睾酮的样品;(c)使用反相液相色谱法色谱地将睾酮与部分纯化的样品中的其它组分分离;和(d)通过质谱法分析色谱分离的睾酮,以测定睾酮在生物学样品中的量。在下文中对这类方法的其它实施方案进行了详细描述。

[0012] 在另一个方面,本发明提供了产生用于诊断与异常睾酮水平相关的疾病或病况的报告的方法,所述方法包括:(a)提供样品,所述样品包括含有睾酮的生物学样品;(b)使用支撑液萃取部分纯化样品以提供含有睾酮的经部分纯化的样品;(c)使用液相色谱法将睾酮色谱地与部分纯化的样品中的其它组分分离;(d)通过质谱法分析色谱分离的睾酮以测定睾酮在生物样中的量;和(e)产生引述生物学样品中的睾酮的浓度的报告。在下文中对这类方法的其它实施方案进行了详细描述。

[0013] 在另一个方面,本发明提供了用于测定睾酮在样品中的存在或量的系统,所述系统包括:(a)用于使用支撑液萃取部分纯化样品的工作站(station),样品包含睾酮;(b)用于使用液体相色谱法将睾酮与部分纯化的样品中的其它组分色谱分离的工作站;和(c)用于通过质谱法分析色谱分离的睾酮以测定睾酮在样品中的存在或量的工作站。在下文中对这类方法的其它实施方案进行了详细描述。

[0014] 下文中对本发明的其它方面进行了详细描述。

[0015] 附图概述

[0016] 不适用。

[0017] 详述

[0018] 下面的描述陈述了本发明的不同方面和实施方案。具体的实施方案无意界定本发明的范围。相反地,实施方案仅提供至少包括在本发明的范围内的不同方法和系统的非限定性实例。要从本领域技术人员的角度来阅读所述描述;因此,本领域技术人员公知的信息不必然包括在内。

[0019] 各种缩写可用于本申请。在大多数(如果不是全部的话)情况下,此类缩写的含义对于本领域技术人员来说是已知的。这些缩写包括提供了其含义的下列缩写。

[0020]	APCI	=大气压化学电离
[0021]	CBP	=竞争性结合蛋白
[0022]	HTLC	=高湍流(通量)液相色谱
[0023]	HPLC	=高效液相色谱
[0024]	LLE	=液-液提取
[0025]	LOQ	=定量限
[0026]	LLOQ	=定量下限
[0027]	IA	=免疫测定
[0028]	ELISA	=酶联免疫测定
[0029]	RIA	=放射免疫测定
[0030]	SST	=系统适用性测试
[0031]	ULOQ	=定量上限
[0032]	2D-LC-MS/MS	=接合至串联质谱的二维液相色谱

[0033] (LC)-LC-MS/MS =接合至质谱的二维液相色谱串联

[0034] (LC)-MS/MS =接合至串联质谱的液相色谱

[0035] SLE =支撑液萃取

[0036] 定义

[0037] 下列术语,除非另有所指,应被理解为具有下列含义:

[0038] 如本文中所用,术语“一个/一种(a)”、“一个/一种(an)”和“所指物(the)”,除非另外指出,可指一个或多个。

[0039] 如本文中所用,术语“生物标志物”是可提供关于生物体的生理状态的生物学信息的任何生物分子。在某些实施方案中,生物标志物的存在或不存在是可提供信息的。在其它实施方案中,生物标志物的水平是可提供信息的。生物标志物可以是激素例如睾酮或激素的代谢物。

[0040] 在整个本申请中,术语“约”用于表示值,其包括装置、用于测定值的方法的固有误差变化,或研究受试者之间存在的变化。

[0041] 如本文中所用,术语“受试者”、“个体”和“患者”可互换地使用。这些术语的使用不表示与医学专业人员例如医生的任何类型的关系。

[0042] 如本文中所用的,用语“液相色谱”或“LC”用于指用于将样品中的一种或多种分子或分析物与样品中其它分析物分离的方法。LC包括当流体均匀地运动通过细碎物质的柱子时对流体溶液的一种或多种分析物的减缓。减缓产生自混合物的组分在一个或多个固定相与流动相之间的分配。LC包括例如反相液相色谱(RPLC)和高压液相色谱(HPLC)。

[0043] 如本文中所用的,术语“分离”或“纯化”等不一定用于指从样品基质去除目标分析物外的所有材料。相反地,在一些实施方案中,此术语用于指相对于存在于样品基质中的一种或多种其它组分而富集一种或多种目标分析物的量的方法。在一些实施方案中,“分离”或“纯化”可用于从样品中除去或减少可干扰分析物的检测(例如,通过质谱法)的一种或多种组分的量。

[0044] 如本文中所用的,术语“质谱法”或“MS”分析是指用于鉴定和/或定量样品中的分子的技术。MS包括电离样品中的分子,形成带电荷的分子;按照它们的质荷比分离带电荷的分子;和检测带电荷的分子。MS允许定性和定量检测样品中的分子。分子可通过本领域技术人员已知的任何适当的方法来电离和检测。用语“串联质谱法”或“MS/MS”在本文中用于指用于鉴定和/或定量样品中的分子的技术,其中使用超过一个质量分析器同时地、或使用单个质量分析器相继地进行多轮质谱法。如本文中所用的,“质谱仪”是包括用于电离分子和检测带电荷的分子的工具的装置。

[0045] 如本文中所用的,“电喷雾电离”或“ESI”是指在质谱法中用于电离样品中的分子同时避免分子片段化的技术。使样品通过电喷雾分散成为细微的气雾。通常将样品与溶剂(通常为与水混合的挥发性有机化合物(例如,甲醇或乙腈))混合。随后将气雾剂通过毛细管转移至质谱仪,所述毛细管可被加热以帮助溶剂从带电荷的微滴进一步蒸发。

[0046] 如本文中所用的,“四极质量分析器(quadrupole analyzer)”是MS中使用的一种类型的质谱分析仪。其由彼此高度平行放置的4个圆杆体(两对)组成。四极质量分析器是基于其质荷比组织样品的带电荷的颗粒的仪器组件。本领域技术人员将理解使用四极质量分析器可引起增加的结果特异性。将一对杆体设置在正电位,另一组杆体设置在负电位。为了

被检测,离子必须通过与对齐的杆体邻接和平行的轨道路径的中央。当在给定的直流电波幅和射频电压下操作四极杆时,只有具有给定的质荷比的离子才将共振,并具有稳定的通过四极杆的轨道,且被检测到。如本文中所用的,“正离子模式(positive ion mode)”是指其中带正电荷的离子被质谱分析仪检测到的模式,“负离子模式(negative ion mode)”是指其中带负电荷的离子被质谱分析仪检测到的模式。对于“选择的离子监测”或“SIM”,直流电荷的波幅和射频电压被设置至仅观察特定的质量。

[0047] 如本文中所用的,术语“分析柱(analytical column)”是指具有实现测试样品基质的组分的分离的充足的色谱板(chromatographic plates)的色谱柱。优选地,以下述方式分离从分析柱洗脱的组分以允许测定目标分析物的存在或量。在一些实施方案中,所述分析柱包含具有约5 μ m的平均直径的颗粒。在一些实施方案中,所述分析柱是官能化的二氧化硅或聚合物-二氧化硅混合体,或聚合物颗粒或硅胶整体固定相,例如苯基-己基官能化分析柱。

[0048] 分析柱可与“萃取柱(extraction column)”不同,所述萃取柱通常用于从非保留的材料中分离或提取保留的材料,以获得“纯化的”样品以用于进一步纯化或分析。在一些实施方案中,萃取柱是官能化的二氧化硅或聚合物-二氧化硅混合体或聚合物颗粒或硅胶整体固定相例如Poroshell SBC-18柱。

[0049] 术语“中心切割(heart-cutting)”是指在色谱图中选择目标区域,使在该目标区域内洗脱的分析物经历第二分离例如第二维度中的分离。

[0050] 如本文中所用的,术语“溶血的(hemolysed)”是指红细胞膜的破裂,这导致血红蛋白和其它细胞内容物释放至血浆或血清中,术语“脂血的(lipemic)”是指血液中脂肪或脂质的过量。

[0051] 用于测定睾酮的存在或量的方法

[0052] 在至少一个方面,本发明提供了用于测定样品中睾酮的存在或量的方法,所述方法包括:(a)提供含有睾酮的样品;(b)使用支撑液萃取(supported liquid extraction)部分纯化所述样品,从而提供含有睾酮的经部分纯化的样品;(c)使用液相色谱将睾酮与部分纯化的样品中的其它组分色谱分离;和(d)通过质谱分析色谱分离的睾酮以测定睾酮在样品中的存在或量。

[0053] 这些方法包括提供含有睾酮的样品。在本说明书中,术语“提供”将在广义上进行解释。此术语无意专门指提供生物学样品的受试者。例如,非现场临床实验室(off-site clinical laboratory)中的技术人员可被认为“提供”样品,例如,当制备样品以用于通过提取和/或色谱法进行纯化时。

[0054] 样品不限于任何特定的样品类型。样品包含睾酮,但通常还包括其它组分。在一些实施方案中,样品是已被加工并且被制备用于通过提取和/或色谱法进行纯化的样品。这样的加工可用于最优化随后的纯化步骤的效率。这样的加工法对于本领域技术人员来说是熟知的。

[0055] 本发明不限于样品处理的任何具体方法。在一些实施方案中,在通过提取和/或色谱法进行纯化之前将样品分成两个或更多个级分可以是有用的。在一些这样的实施方案中,可以不同地制备两个或更多个这样的级分,例如以帮助提高对于特定柱化学(column chemistry)的分离的灵敏性或选择性。在一些实施方案中,所述方法包括制备用于跨多个

液相色谱系统的重复注射的单一样品。

[0056] 本发明不限于任何具体的样品尺寸。在一些实施方案中,样品包括生物学样品。在这样的实施方案中,样品还可包括其它组分例如溶剂、缓冲剂、抗凝剂等。在其中样品包括生物学样品的实施方案中,生物学样品可以是全血、血浆、血清、尿、脑脊髓液、组织匀浆、唾液、羊水、胆汁、粘液、腹膜液或淋巴液中的一种或多种。

[0057] 此外,样品中的甾酮不限于甾酮的任何特定形式。例如,甾酮包括碳、氧和氢原子。这些原子的每一种都具有天然存在的同位素。因此,样品中一定量的甾酮可具有这类天然存在的同位素的一种或多种。此术语还包括阳离子和阴离子形式(例如,盐形式),如果存在的话。相反,本说明书在通过质谱法分析甾酮的讨论中特别是指甾酮离子(或电离的甾酮)。在下文中描述的这类情况下,仅涉及电离的甾酮。

[0058] 所述方法还包括使用支撑液萃取(SLE)部分纯化样品。如上文中所指出的,样品(除甾酮和一种或多种溶剂外)可包含各种其它组分。因此,样品的部分纯化提供了含有甾酮的部分纯化的样品。在一些实施方案中,各种其它组分的一种或多种的浓度已被除去,意指它们的浓度相对于部分纯化的样品中的甾酮的浓度已被减小。因此,术语“除去”或“去除”不一定意指组分的完全去除。一定量的除去的组分仍可存在于部分纯化的样品中,虽然其相对于甾酮的浓度的浓度将比在提取前的样品中低。在一些实施方案中,除去的组分相对于部分纯化的样品中的甾酮的浓度的相对浓度不超过90%,或不超过75%,或不超过50%,或不超过33%,或不超过25%,或不超过10%,或不超过5%,或不超过1%的其相对于提取前的样品中的甾酮的相对浓度。

[0059] 本发明不限于任何特定类型的除去的组分。在一些实施方案中,所述除去的组分的一种或多种是可干扰通过质谱法对甾酮进行的分析的化合物,例如,因为所述化合物可具有与甾酮相似的质量,或因为,在片段化后,其产生具有与通过片段化甾酮产生的一个或多个片段相同的质量的一个或多个片段离子。这样的化合物包括但不限于可的松、皮质醇、21-去氧皮质醇、皮质酮、11-去氧皮质醇、曲安奈德、四氢皮质醇、四氢-可的松、DHEA、17 α -羟孕酮、表甾酮(epitesterone)、二氢雄酮、5 α -雄烷-3 α -醇-17-酮(5 α -androstan-3 α -ol-17-one)、5 β -孕烷-3 α -17 α -20 α -三醇、etiocolan-3 α -二醇和孕二醇。

[0060] 本发明不限于进行SLE的任何特定方式。在一些实施方案中,样品被吸附至惰性固相材料上。可使用各种这样的材料。在一些实施方案中,将样品吸附至硅藻土上。随后使样品和与水不混溶的有机溶剂系统接触。此类溶剂系统在本领域是公知的。所述与水混溶的有机溶剂系统包括但不限于乙酸乙酯、己烷、甲苯、辛醇、氯仿、二氯甲烷、二乙醚、环己烷、戊烷、N-庚烷、苯、正-丁基氯、丁醇、亚甲基氯及上述中任意两种或更多种的混合物。在一些实施方案中,所述与水混溶的有机溶剂系统还可包括定量的一种或多种极性溶剂。在这样的实施方案中,所述极性溶剂的量必须足够低以确保溶剂系统一般保持与水不混溶。用于这样的实施方案中的适当的极性溶剂包括但不限于甲醇、丙酮、乙腈、异丙醇、二乙醚或甲基-叔-丁基醚。在一些实施方案中,SLE中使用的与水不混溶的有机溶剂包括二氯甲烷与己烷的混合物。

[0061] 可使用针对其设计的任何适当的装置进行SLE。适当的装置包括但不限于板和柱子。在一些实施方案中,所述SLE采用一个或多个板。在一些这样的实施方案中,SLE采用具有多个孔的板,例如96孔板。这样的板是商购可得的。此外,可人工地或以自动化方式进行

SLE。此外,在一些实施方案中,部分纯化步骤可通过对SLE装置施加机械作用以促进提取来实现。这样的机械作用可包括搅拌、震动等。

[0062] 在本发明的一些实施方案中,部分纯化的样品可在色谱分离之前经历一个或多个处理步骤。例如,在一些实施方案中,蒸发所述经部分纯化的样品。随后,在溶剂系统中重构所得的残留物。任何适当的溶剂系统均可用于重构含睾酮的残留物。在一些实施方案中,溶剂系统是与色谱分离相容的溶剂系统。在一些实施方案中,用于重构的溶剂系统包括但不限于水、甲醇或其混合物。

[0063] 所述方法包括使用液相色谱法来色谱分离睾酮。本发明不限于进行液相色谱的任何特定方式。一般而言,色谱分离步骤包括使用至少一个液相色谱(LC)柱。在一些实施方案中,使用多个LC柱,例如2个或更多个,或3个或更多个,或4个或更多个LC柱。在一些这样的实施方案中,使用2、3、4、5、6、8或10个LC柱。在一些这样的实施方案中,将两个或更多个此类LC柱彼此平行排列,并且内联至相同的质谱仪。

[0064] 本发明不限于柱子的任何特定类型。可使用适用于睾酮分离的任何柱子。在一些实施方案中,使用一个或多个分析柱。在一些此类实施方案中,使用一个或多个反相柱。在一些实施方案中,所述方法采用两个或更多个平行的反向柱子,所述柱子被内联至相同的质谱仪。

[0065] 此外,本发明不限于任何特定的流动相。可使用任何适当的流动相,只要流动相适合用于特定的LC柱和适用于在LC柱中色谱分离睾酮。在一些实施方案中,流动相是极性溶剂系统。极性溶剂系统可包括一种或多种极性溶剂,包括但不限于水、甲醇、乙腈或上述溶剂的两种或更多种的混合物。在一些这样的实施方案中,流动相采用梯度,以便使所述两种或更多种溶剂的相对比率随时间变化。

[0066] 如上文所指出的,可平行使用两个或更多个LC柱(例如,反相柱),并可将所述柱子内联至相同的质谱仪,例如以提高通量。在一些这样的实施方案中,将含有睾酮的样品(即,例如蒸发和重构后的经部分纯化的样品)在不同的时间引入所述两个或更多个LC柱。在一些实施方案中,交错将测试样品引入至所述两个或更多个LC柱,意思是在将样品引入至两个或更多个LC柱之间相隔预定的时间间隔。可基于各种因素来选择适当的时间间隔,包括洗脱时间、柱化学和避免干扰对从其它LC柱的一个或多个柱洗脱的睾酮的分析的潜在需要。

[0067] 在本发明的一些实施方案中,可将另一个LC柱与另一个柱系列放置。例如,在一些实施方案中,可采用合适的保护柱(guard column)。本领域技术人员能够选择适当的保护柱来用于本方法。在一些实施方案中,将保护柱与另一个LC柱平行放置,且保护柱和LC柱都是反相柱。还可平行地排列两个或更多个柱子的此类系列,从而有平行运行的两个或更多个柱子系列,其中每一个系列包含两个或更多个柱子。

[0068] 所述方法包括通过质谱法分析色谱分离的睾酮以测定睾酮的存在或量。在一些实施方案中,将两个或更多个LC柱子加至相同的质谱仪。在一些其它实施方案中,将3个或更多个LC柱加至相同的质谱仪。在一些实施方案中,所述质谱仪是组合的LC-MS系统的一部分。

[0069] 本发明不限于质谱仪的任何特定类型。可使用任何适当的质谱仪。在一些实施方案中,所述方法采用串联质谱仪。在一些这样的实施方案中,分析睾酮可包括电离睾酮,分

析电离的甾酮,将甾酮离子片段化为两个或更多个片段离子,以及分析所述片段离子。本发明不限于使用任何特定电离法的质谱仪。可使用任何适当的电离。适当的电离包括但不限于光电离、电喷雾电离、大气压化学电离和电子捕获电离。在采用片段化的实施方案中,可使用任何适当的片段化技术。适当的技术包括但不限于碰撞诱导的解离、电子捕获解离、电子传递解离(electron transfer dissociation)、红外多光子解离、辐射解离、电子-脱离解离(electron-detachment dissociation)和表面诱导解离(surface-induced dissociation)。

[0070] 在一些实施方案中,串联质谱仪是MDS-Sciex API5000三重四极质谱仪。在一些实施方案中,串联质谱仪具有大气压电离源,并且分析步骤包括选自光电离、电喷雾电离(ESI)、大气压化学电离(APCI)、电子俘获电离(electron capture ionization)、电子电离(electron ionization)、快原子轰击/液体次级电离(liquid secondary ionization)(FAB/LSI)、基质辅助激光解吸电离(matrix assisted laser desorption ionization)(MALDI)、场电离(field ionization)、场解吸附(field desorption)、热喷雾/等离子体喷雾电离(plasma spray ionization)和粒子束电离的电离法。所述电离法可以为正离子模式或负离子模式。分析步骤还可包括多反应监控或选择性离子监控(SIM),同时或相继地分析两种或更多种生物分子。在一些实施方案中,所述分析步骤使用四极质量分析器。在一些实施方案中,质谱仪是三重四极质谱仪。

[0071] 在一些实施方案中,所述方法包括使用内部标准。在这样的实施方案中,可在色谱分离步骤之前在任何适当的点引入内部标准。可使用任何适当的内部标准。在一些实施方案中,内部标准是稳定的同位素标记的甾酮。在一些这样的实施方案中,内部标准是通过碳-13和/或氘标记。在一些实施方案中,内部标准是2,3,4-¹³C-标记的甾酮。

[0072] 在一些实施方案中,不需要测定甾酮的量。在一些实施方案中,所述方法可用于确定甾酮在样品中的存在或不存在。在其它实施方案中,所述方法用于测定样品中甾酮的量。例如,在一些实施方案和/或方面中,本发明提供了用于测定生物学样品中甾酮的量的方法,所述方法包括:(a)提供样品,所述样品包括含有甾酮的生物学样品;(b)使用支撑液萃取来部分纯化样品,从而提供含有甾酮的部分纯化的样品;(c)使用反相液相色谱来将甾酮与部分纯化的样品中的其它组分色谱分离;和(d)通过质谱法分析色谱分离的甾酮以测定生物学样品中甾酮的量。

[0073] 在一些实施方案中,所述方法不限于检测的任何下限和/或上限。在一些实施方案中,所述方法可用于测量样品(例如,包括生物学样品的样品)中浓度在2.5ng/dL至5000ng/dL或5ng/dL至5000ng/dL或10ng/dL至5000ng/dL或2.5ng/dL至2000ng/dL的范围内变化的甾酮。

[0074] 产生报告的方法

[0075] 在至少一个方面,本发明提供了用于产生用于诊断受试者中与异常甾酮水平相关的疾病或病况的报告的方法,所述方法包括:(a)提供样品,样品包括含有甾酮的生物学样品;(b)使用支撑液萃取部分纯化样品以提供含有甾酮的部分纯化的样品;(c)使用液相色谱将甾酮与部分纯化的样品中的其它组分色谱分离;(d)通过质谱法分析色谱分离的甾酮以测定生物学样品中甾酮的量;和(e)产生陈述生物学样品中甾酮的浓度的报告。

[0076] 除步骤(e)外所有步骤的特征和实施方案刚才已在上文中进行了描述。如上文中

所指出的,所述方法可采用超过一个柱子,例如两个或更多个平行地内联至相同质谱仪的柱子。

[0077] 所述方法还包括产生陈述样品中至少一种睾酮的量的报告。在一些实施方案中,该信息可用于测定生物学样品中睾酮的浓度。由这样的信息,可评估受试者具有异常高还是异常低的睾酮量。

[0078] 这样的信息可被用于诊断受试者中的一种或多种可与睾酮的异常水平相关的疾病或病症。这类疾病或病况在本领域中是公知的。这类疾病或病况包括但不限于先天性肾上腺增生、多毛症和各种性腺机能减退状态(hypergonadal state)。

[0079] 用于分析生物分子的系统

[0080] 在另一个方面,本发明提供了用于测定样品中睾酮的存在或量的系统,所述系统包括:(a)用于使用支撑液萃取部分纯化样品的工作站,所述样品包含睾酮;(b)用于使用液相色谱将睾酮与部分纯化的样品中的其它组分色谱分离的工作站;和(c)用于通过质谱法分析色谱分离的睾酮以确定睾酮在样品中的存在或量的工作站。

[0081] 这样的系统可包括与上文中描述的分析睾酮的方法的实施方案类似的各种实施方案和亚实施方案(subembodiment)。

[0082] 这些系统包括各种工作站。如本文中所用的,术语“工作站”被广义地定义并且包括适用于进行所述方法的任何适当的装置或装置的集合。工作站无需以任何特定的方式相对于彼此整合连接或放置。本发明包括工作站相对于彼此的任何适当的排列。例如,所述工作站甚至无需在相同的房间中。但在一些实施方案中,所述工作站在整体装置中彼此连接。

实施例

[0083] 下列实施例被包括来给本领域技术人员提供指导来实施目前公开的主题的代表性实施方案。根据本公开的内容和本领域技术人员的一般水平,本领域技术人员可理解,下列实施方案意欲为仅仅说明性的并且可采用许多变化、修饰和改变而不背离目前公开的主题的范围。

[0084] 实施例1:睾酮的分析

[0085] 将¹³C-睾酮添加至血清等分以评价和修正睾酮从每一个样品的回收。用缓冲液以1:1稀释睾酮,随后将其添加至SLE+板。用己烷和二氯甲烷的混合物从血清和血浆样品中提取睾酮。蒸发样品,并用甲烷/水溶液重构样品。随后将样品注射至LC-MS/MS系统上。将以正离子大气压化学电离模式运行的MDS-Sciex API5000三重四极质谱仪用于检测。在所选的反应监控模式(SRM)中进行分析物和内部标准的定量。根据通过将已知量的2.5至5000ng/dL的纯化的分析物掺入活性炭处理血清产生的校准曲线测定每一个样品中单个分析物的反算(back-calculated)量。

[0086] 样本

[0087] 推荐的样品是0.3-0.8mL血清或血浆。使用含有分离胶的标准取样管收集了血清。应当在收集的1小时内使血清/血浆与细胞分离,将其转移至塑料转运管。血清和血浆应当被存储于-20°C下直至使用。

[0088] 设备和材料

[0089] 使用下列供给和设备。

[0090] 手动移液器w/尖头;A类容量移液管和烧瓶;各种玻璃试剂瓶;石蜡封口膜(Fisher Healthcare);Easy Pierce热封箔(Fisher Healthcare);多管涡旋器(Multi-Tube Vortex)(Fisher Scientific);Turbovap板蒸发器(Turbovap Plate Evaporator)(Biotage,LLC);Thermo手动热封机ALPS25或等同物(Thermo Scientific);96孔聚丙烯深孔板(SPEware Corp.);96孔SLE+400板(Biotage,LLC);Agilent Zorbax XDB C-182.1X50, 5um(Krackeler Scientific);和VacMaster-96样品加工歧管系统(Biotage,LLC)。

[0091] 96孔板5804R离心机或等同物(Eppendorf);API5000串联质谱仪和用APCI的Turbo V_{TM}离子源(Sciex,Toronto,Canada);由8个1200SL系列二元泵和4个1200系列真空脱气器组成的Aria Transcend TX4系统(Thermo-Fisher,MA,USA);HTS Twin PAL系统自动采样器(CTC Analytics AG,Switzerland);Analyst1.4版或更高版本(Applied Biosystems,CA, USA);Aria OS1.6版或更高版本(Thermo-Fisher,MA,USA)。

[0092] 试剂

[0093] 使用了下列试剂:

[0094] 睾酮(USP);[¹³C3]-睾酮(Isosciences);亚甲基氯(Fisher Healthcare);己烷(Fisher Healthcare);甲醇(Fisher Healthcare);活性炭处理的人血清(Golden West);混合血清(内部收集);乙醇(Sigma-Aldrich);甲酸(Sigma-Aldrich);乙腈(Fisher Healthcare)。

[0095] 将下列溶剂用作液相色谱的流动相:

[0096] 萃取溶剂(50:50己烷:亚甲基氯):在刻度量筒中称量500mL己烷,转移至1L的瓶中。单独地在刻度量筒中称量500mL亚甲基氯,将其添加至1L含有己烷的瓶中。充分混合。

[0097] 洗脱泵A流动相(Millipore H₂O中0.1%的甲酸):称量999mL的I型Millipore水,将其倾倒入1L试剂瓶中。在通风厨中,向MilliporeH₂O中缓慢地添加1mL甲酸。充分混合。

[0098] 洗脱泵B流动相(乙腈中0.1%的甲酸):称量999mL的乙腈,将其倾倒入1L的试剂瓶中。在通风厨中,向乙腈中缓慢地添加1mL甲酸。充分混合。

[0099] 内部标准储液(1mg/mL):称取约10mg[¹³C3]-睾酮至分析天平上的玻璃闪烁瓶中。在就纯度进行调整后,添加适当量的甲醇以使溶液达到1mg/mL的终浓度。充分混合以溶解。存储在-20°C;在玻璃闪烁瓶中稳定至少1年。

[0100] 内部标准储液(10000ng/mL):将1mL[¹³C3]-睾酮内部标准储液(1mg/mL)添加至100mL A类容量瓶中,用MeOH补足体积。充分混合。终浓度为10000ng/dL。冷冻贮存(-20°C);稳定至少一年。

[0101] 工作内部标准溶液(120ng/dL):将0.12mL[¹³C3]-睾酮内部标准储液(10000ng/mL)添加至1000mL A类容量瓶,利用50:50MeOH:Millipore H₂O补足体积。充分混合。终浓度为120ng/dL。可以以相同的浓度和组成制备备选的体积。冷藏贮存(2-8°C)。

[0102] 重构溶液(1:1甲醇:水):将500mL的HPLC级甲醇添加至1升玻璃试剂瓶。将500mL的I型水添加至相同的瓶中。充分混合并存储于室温。

[0103] 睾酮系统适用性测试溶液(SST):注射35μL的工作内部标准溶液(120ng/dL)以使批次经受分析之前建立系统适用性。系统适用性注射采用35μL的、50:50甲醇:水中的120ng/dL[¹³C3]-睾酮的注射;接受标准:所有分析物0.05-0.30分钟;对于292/100转换(transition)峰强度≥12000cps。

[0104] 针洗涤液1(Millipore H₂O中0.1%的甲酸):称量999mL的I型Millipore水,将其倾倒入1L试剂瓶中。在通风厨中,将1mL甲酸缓慢地添加至Millipore H₂O中。充分混合。

[0105] 针洗涤液2(甲醇):将1000mL甲醇转移至玻璃瓶。于室温下贮存。

[0106] 校准

[0107] 制备校准器,在Esoterix Endocrinology, Calabasas, CA, USA测试准确性。将散装材料(bulk material)在干冰上运送至CET,随后在CET中将其亚等分和贮存。将亚等分于-20℃贮存5.58年。

[0108] 在每一个分析批次开始时包括全套校准器。添加额外的空白+IS、LLOQ和ULOQ作为每一个批次的最后3个样品。

[0109] 质量控制

[0110] 制备质量控制样品,在Esoterix Endocrinology, Calabasas CA, USA进行测试其以建立范围。将散装材料在干冰上运送至CET,随后在CET中将其亚等分和贮存。将亚等分于-20℃贮存5.58年。

[0111] 手动方法

[0112] 准备批次:解冻及混合标准、样品和对照。对于每一种样品、对照和标准标记一套12x75mm的玻璃测试管。

[0113] 移取样品:将200μL的空白、标准、对照和样品移液至适当标记的管内。将200μL工作内部标准溶液移液至除双空白之外的每一个管内。双空白接受400μL Millipore水。在多管涡旋器上将架上的管混合1分钟。

[0114] 转移至96孔板:将96孔深孔板置于VacMaster-96样品处理歧管的下半部分。替换深孔板上方的歧管的顶部,将SLE+400板置于歧管的顶部以便所述孔与下方的深孔收集板对齐。使用多通道移液器或等同物将所有样品转移至SLE+40096-孔板。

[0115] SLE萃取:将歧管(含有板)置于通风厨下,并将管道连接至真空源。应用轻微真空(5mmHg)将样品抽入SLE+板,随后等待5-10分钟。使用12-通道移液器(或等同物)抽吸,将50:50己烷:亚甲基氯分配3次。随后在每一行中添加900μL的萃取溶剂。应用轻微真空15-20秒,随后等待10分钟以允许萃取溶剂通过深孔板。10分钟后,应用高真空压力30秒以将剩余的萃取溶剂排入96孔收集板中。

[0116] 蒸发/重构:将96孔收集板置于Turbovap板蒸发器内。在约40psi和40℃下蒸发板约20分钟或直至干燥。用100μL的重构溶液(1:1MeOH:Millipore H₂O)重构每一个孔。密封板,短暂混合1分钟。离心5分钟。

[0117] LC:填充所有LC系统试剂。准备好LC泵以从流动相管道除去任何气泡或从先前的测定/批次除去流动相(如果产生了新的流动相)。当所有系统和自动采样器都准备好时,点击“起动”。注射35μL的样品。

[0118] 自动化程序

[0119] 准备批次(Prepare batch):解冻及混合标准、样品和对照。如标准运行程序NOQS-SOP-13,第10部分-程序中所建议的,初始化TECAN Freedom EVO仪。

[0120] 移取样品:将计算机/实验室产生的条形码标签置于相应的空白、标准和QC管上。在空的来源架中,以下列顺序放置条形码标记的试管:双空白、空白+IS、标准1-8和双空白。从来源架1的位置12开始直至来源架12添加患者样品。在整个测定中随机放置两(2)组质量

控制样品。注意：只有大小为12x75mm的管才可被用作患者样品的来源管。必需将除该尺寸外的转移管倒出至正确的管尺寸中并且相应地标上条形码。将来源架加载至TECAN Freedom EVO平台上。

[0121] 转移至96孔板：将96深孔板置于平台上。将8个16x100mm玻璃试管置于空来源架的位置1-8中，用工作内部标准溶液填充每一个试管。将一个16x100mm测试玻璃试管置于相同来源架的位置16作为内部标准试管，用I型水填充。将含有内部标准和I型水的来源架置于平台上的适当位置中。确保1000µL DiTi尖头被加载在TECAN Freedom EVO平台上。

[0122] 在应用软件中，选择睾酮脚本(Testosterone script)。点击运行以开始编写(script)。TECAN将首先扫描所有的试管，产生scan.csv文件。当提示时，检查所产生的文件并且修正任何条形码相关问题。随后点击OK以继续编写。TECAN现将向96深孔板中添加200µL空白、标准、患者样品和质量控制样品。当提示时，目测确认所有样品已被正确地移液。如果未添加样品，可利用适当的移液器手动添加样品。应当在批次封面上进行注释。如果任何样品体积表现出不与其它样品一致，则应当在分批封面上进行注释。点击OK以继续进行。

[0123] TECAN将把200µL I型水添加至第一96深孔板的小瓶位置A1，将200µL的工作内部标准溶液添加至其余的小瓶位置。当将内部标准添加至96深孔板中时，初始化BIOMEK FX液体处理器。从TECAN Freedom EVO自动化移液器取出96深孔板，将其置于BIOMEK FX自动化液体处理器上。

[0124] SLE萃取：将SLE+板置于96深孔板的顶部，将其置于BIOMEK FX平台上。确保AP200移液器尖头被加载在适当的位置中。在应用软件中，取决于测定中样品的数目而选择1板SLE转移或2板SLE转移脚本。点击顶部工具条中的绿色开始按钮。BIOMEK FX将首先混合样品与内部标准，然后在两步骤过程中将96深孔板的内容物转移至SLE+板。如果样品未被BIOMEK转移，则可允许手动进行该转移，同时小心地将样品转移至适当的孔。

[0125] 将96孔深孔板置于VacMaster-96样品处理歧管的下半部分中。替换深孔板上方的歧管的顶部部分，将SLE+400板置于歧管的顶部以便孔与下面的深孔收集板对齐。将歧管(含有板)置于通风厨下，并将管连接至真空源。应用轻微真空(5mm Hg)将样品抽入SLE+板，随后等待5-10分钟。

[0126] 使用12-通道移液器(或等同物)抽吸，将50:50己烷:亚甲基氯分配3次。随后在每一行中添加900µL的萃取溶剂。应用轻微真空15-20秒，随后等待10分钟以允许萃取溶剂通过至深孔板。10分钟后，应用高真空压力30秒以将剩余的萃取溶剂排入深孔收集板中。

[0127] 蒸发/重构：将96孔收集板置于Turbovap板蒸发器内。在约40psi和40°C下蒸发板约20分钟或直至干燥。用100µL的重构溶液(1:1MeOH:Millipore H₂O)重构每一个孔。密封板，短暂混合1分钟。离心5分钟。

[0128] LC：填充所有的LC系统试剂。准备LC泵以从流动相管道除去任何气泡或从先前的测定/批次除去流动相(如果产生了新的流动相)。当所有系统和自动采样器都准备好时，点击“开始”。注射35µL的样品。

[0129] 报告结果

[0130] 用于血清和血浆中的该测定的单位为纳克/分升(ng/dL)。

[0131] 对于血清和血浆样品，将结果报告为一个小数位。

[0132] 该测定的定量下限是2.5ng/dL。低于2.5ng/dL的值将被报告为<2.5ng/dL。检测上

限是5000ng/dL。高于5000ng/dL的值将用I型水稀释直至50倍。包括稀释在内,定量的上限可为250000ng/dL。如果不可获得足够的样品来重复稀释,则将输入>10000并伴以缩写“QNSR”。该缩写指出没有充足的样本来验证结果的说明。

[0133] 临时参照间隔

[0134]

	男性范围(ng/dL)	女性范围(ng/dL)
<u>早产儿</u>		
26-28周,第4天	59-125	5-16
31-35周,第4天	37-198	5-22
<u>足月儿</u>		
新生儿	75-400	20-64

[0135] 男性1-7个月:水平在第一周迅速降低至20-50ng/dL,随后在20-60天之间增加至60-400ng/dL(平均值=190)。水平随后在7个月内降低至<2.5-10的青春前期范围。

[0136] 女性1-7个月:水平在第一个月中降低至<10ng/dL,并保持该水平直至青春期。

[0137] 青春期儿童

[0138] 1-10岁 <2.5-10

[0139] 青春期

[0140]

唐纳分 期	年龄(岁)	范 围 (ng/dL)	平 均 值 (ng/dL)	唐纳分 期	年龄(岁)	范 围 (ng/dL)	平 均 值 (ng/dL)
男性				女性			
1	<9.8	<2.5-10	4.9	1	<9.2	<2.5-10	4.9
2	9.8-14.5	18-150	42	2	9.2-13.7	7-28	18
3	10.7-15.4	100-320	190	3	10.0-14.4	15-35	25
4	11.8-16.2	200-620	372	4	10.7-15.6	13-32	22
5	12.8-17.3	350-970	546	5	11.8-18.6	20-38	28

成人 20-50 岁 范围 (ng/dL)

男性: 350-1030

[0141] 女性:

绝经前 10-55

停经后 7-40

[0142] 实施例2 疾病控制中心(CDC)的测试结果的数据

[0143] 使用实施例1中描述的分析方法测定了获自CDC的具有标准化的睾酮水平的样品(称为“CDC挑战组(CDC challenge set)”)的睾酮水平。测试了两个不同的CDC挑战组。对于两个组中10个样品的每一个样品,在两天的过程中进行了4个重复。因此,所报告的平均值、

标准偏差和CV是对于n为4的。

[0144] 挑战组1

[0145]

<u>样品</u>	<u>平 均 值</u> <u>(ng/dL)</u>	<u>标 准 偏 差</u> <u>(ng/dL)</u>	<u>CV (%)</u>	<u>与 CDC 参照值</u> <u>的差异百分比</u>
1	316.328	4.999	1.58	3.0
2	482.422	9.267	1.92	3.7
3	453.931	4.650	1.02	3.4
4	646.568	13.141	2.03	2.1
5	433.878	7.760	1.79	2.9
6	20.043	0.703	3.51	-4.6
7	465.605	7.426	1.59	3.9
8	18.940	1.207	6.37	-0.8
9	8.221	0.531	6.46	-3.2
10	460.537	5.867	1.27	2.1

[0146] 挑战组2

[0147]

<u>样品</u>	<u>平 均 值</u> <u>(ng/dL)</u>	<u>标 准 偏 差</u> <u>(ng/dL)</u>	<u>CV (%)</u>	<u>与 CDC 参照值</u> <u>的差异百分比</u>
1	5.584	0.176	3.15	-2.9
2	291.020	1.788	0.61	5.2
3	758.221	13.382	1.79	3.9
4	22.118	0.141	0.64	-0.4
5	3.406	0.099	2.91	-6.9
6	12.261	0.388	3.17	-0.3
7	165.671	0.940	0.57	3.5
8	640.736	5.973	0.93	4.4
9	24.684	0.371	1.50	0.8
10	7.472	0.081	1.09	-3.1