

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102753964 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 24

(21) 申请号 201080063540. 4

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 12. 09

G01N 24/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/285, 943 2009. 12. 11 US

61/285, 938 2009. 12. 11 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 08. 10

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/059765 2010. 12. 09

(87) PCT申请的公布数据

W02011/072163 EN 2011. 06. 16

(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 B·霍尔奎斯特 N·J·克拉克

(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

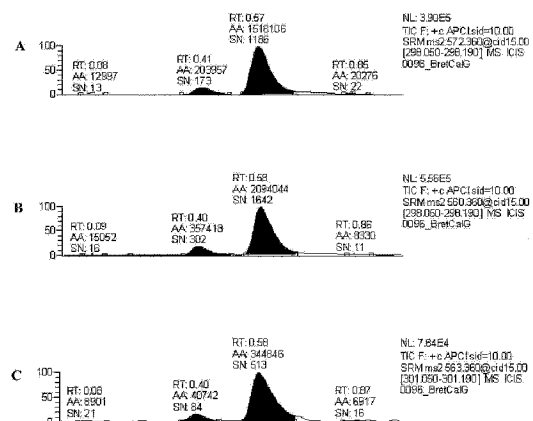
权利要求书 3 页 说明书 37 页 附图 35 页

(54) 发明名称

非衍生的、非代谢的维生素 D 的质谱测定

(57) 摘要

本发明涉及非代谢的维生素 D 的检测。在具体方面,本发明涉及通过质谱法检测未衍生的非代谢的维生素 D 的方法。



1. 通过串联质谱法测定样品中维生素 D₂ 的量的方法,所述方法包括步骤:

(i) 使来自样品的维生素 D₂ 在适于产生一种或多种通过质谱法可检测的先驱离子的条件下经历电离源,所述先驱离子选自具有 397.2±0.5 或 379.2±0.5 的质荷比 (m/z) 的离子;

(ii) 破碎至少一种所述先驱离子以产生一种或多种通过质谱法可检测的碎片离子;

(iii) 通过质谱法测定步骤 (i) 和 (ii) 中产生的一种或多种所述离子的量;和

(iv) 使步骤 (iii) 中测定的维生素 D₂ 离子的存在与所述样品中维生素 D₂ 的存在相关联,

其中如果所述破碎的先驱离子包括具有 397.2±0.5 的 m/z 的离子,所述碎片离子包括一种或多种选自具有 159.0±0.5、146.9±0.5、133.1±0.5 和 121.0±0.5 的 m/z 的离子的离子,并且如果所述破碎的先驱离子包括具有 379.2±0.5 的 m/z 的离子,所述碎片离子包括一种或多种选自具有 283.2±0.5、187.3±0.5、175.2±0.5 和 159.0±0.5 的 m/z 的离子的离子。

2. 权利要求 1 所述的方法,其中所述破碎的先驱离子是具有 397.2±0.5 的 m/z 的离子。

3. 权利要求 1 所述的方法,其中所述破碎的先驱离子是具有 379.2±0.5 的 m/z 的离子。

4. 权利要求 1-3 中任一项所述的方法,其中使所述样品在电离之前经历萃取柱。

5. 权利要求 4 所述的方法,其中所述萃取柱是固相萃取 (SPE) 柱。

6. 权利要求 4 所述的方法,其中所述萃取柱是湍流液相色谱 (TFLC) 柱。

7. 权利要求 4-6 中任一项所述的方法,其中使所述样品在电离之前另外经历分析柱。

8. 权利要求 7 所述的方法,其中所述分析柱是高效液相色谱 (HPLC) 柱。

9. 权利要求 7 所述的方法,其中所述萃取柱和分析柱和步骤 (i) 的所述电离源以联机方式连接。

10. 权利要求 1-9 中任一项所述的方法,其中所述电离源是大气压化学电离 (APCI) 源。

11. 权利要求 1-10 中任一项所述的方法,其中所述串联质谱法作为多重反应监测、先驱离子扫描或产物离子扫描而进行。

12. 权利要求 1-11 中任一项所述的方法,进一步包括检测所述样品中的维生素 D₃。

13. 权利要求 12 所述的方法,其中所述维生素 D₂ 和维生素 D₃ 被同时电离。

14. 权利要求 1-14 中任一项所述的方法,其中所述样品包括生物样品。

15. 权利要求 14 所述的方法,其中所述生物样品来自人类,当取自所述人类时,所述样品中测定的所述维生素 D₂ 的量是所述样品中存在的量。

16. 权利要求 14-15 中任一项所述的方法,其中所述样品包括血清或血浆。

17. 通过串联质谱法测定样品中维生素 D₃ 的量的方法,所述方法包括步骤:

(i) 使来自样品的维生素 D₃ 在适于产生一种或多种通过质谱法可检测的先驱离子的条件下经历电离源,所述先驱离子选自具有 385.2±0.5 或 367.2±0.5 的质荷比 (m/z) 的离子;

(ii) 破碎至少一种所述先驱离子以产生一种或多种通过质谱法可检测的碎片离子;

(iii) 通过质谱法测定步骤 (i) 和 (ii) 中产生的一种或多种所述离子的量;和

(iv) 使步骤 (iii) 中测定的维生素 D₂ 离子的存在与所述样品中维生素 D₃ 的存在相关联,

其中如果所述破碎的先驱离子包括具有 385.2 ± 0.5 的 m/z 的离子,所述碎片离子包括一种或多种选自具有 159.0 ± 0.5 、 147.0 ± 0.5 、 133.1 ± 0.5 和 107.1 ± 0.5 的 m/z 的离子的离子,并且如果所述破碎的先驱离子包括具有 367.2 ± 0.5 的 m/z 的离子,所述碎片离子包括一种或多种选自具有 172.2 ± 0.5 、 145.0 ± 0.5 和 119.1 ± 0.5 的 m/z 的离子的离子。

18. 权利要求 17 所述的方法,其中所述破碎的先驱离子是具有 385.2 ± 0.5 的 m/z 的离子。

19. 权利要求 17 所述的方法,其中所述破碎的先驱离子是具有 367.2 ± 0.5 的 m/z 的离子。

20. 权利要求 17-19 中任一项所述的方法,其中使所述样品在电离之前经历萃取柱。

21. 权利要求 20 所述的方法,其中所述萃取柱是固相萃取 (SPE) 柱。

22. 权利要求 20 所述的方法,其中所述萃取柱是湍流液相色谱 (TFLC) 柱。

23. 权利要求 20-22 中任一项所述的方法,其中使所述样品在电离之前另外经历分析柱。

24. 权利要求 23 所述的方法,其中所述分析柱是高效液相色谱 (HPLC) 柱。

25. 权利要求 23-24 中任一项所述的方法,其中所述萃取柱和分析柱和步骤 (i) 的所述电离源以联机方式连接。

26. 权利要求 17-25 中任一项所述的方法,其中所述电离源是大气压化学电离 (APCI) 源。

27. 权利要求 17-26 中任一项所述的方法,其中所述串联质谱法作为多重反应监测、先驱离子扫描或产物离子扫描而进行。

28. 权利要求 17-27 中任一项所述的方法,进一步包括检测所述样品中的维生素 D₂。

29. 权利要求 28 所述的方法,其中所述维生素 D₂ 和维生素 D₃ 被同时电离。

30. 权利要求 17-29 中任一项所述的方法,其中所述样品包括生物样品。

31. 权利要求 30 所述的方法,其中所述生物样品来自人类,当取自所述人类时,所述样品中测定的所述维生素 D₃ 的量是所述样品中存在的量。

32. 权利要求 30-31 中任一项所述的方法,其中所述样品包括血清或血浆。

33. 通过串联质谱法测定样品中维生素 D₂ 和维生素 D₃ 的量的方法,所述方法包括步骤:

(i) 使样品中的维生素 D₂ 和维生素 D₃ 在适于产生一种或多种通过质谱法可检测的维生素 D₂ 先驱离子和一种或多种通过质谱法可检测的维生素 D₃ 先驱离子的条件下经历电离源,所述维生素 D₂ 先驱离子选自具有 397.2 ± 0.5 和 379.2 ± 0.5 的质荷比 (m/z) 的离子,所述维生素 D₃ 先驱离子选自具有 385.2 ± 0.5 和 367.2 ± 0.5 的质荷比 (m/z) 的离子;

(ii) 破碎至少一种所述维生素 D₂ 先驱离子以产生一种或多种通过质谱法可检测的维生素 D₂ 碎片离子;

其中如果所述破碎的维生素 D₂ 先驱离子包括具有 397.2 ± 0.5 的 m/z 的离子,那么所述维生素 D₂ 碎片离子包括一种或多种选自具有 159.0 ± 0.5 、 146.9 ± 0.5 、 133.1 ± 0.5 和 121.0 ± 0.5 的 m/z 的离子的离子,并且如果所述破碎的维生素 D₂ 先驱离子包括具

有 379.2 ± 0.5 的 m/z 的离子,那么所述维生素 D_2 碎片离子包括一种或多种选自具有 283.2 ± 0.5 , 187.3 ± 0.5 、 175.2 ± 0.5 和 159.0 ± 0.5 的 m/z 的离子的离子;

(iii) 破碎至少一种所述维生素 D_3 先驱离子以产生一种或多种通过质谱法可检测的维生素 D_3 碎片离子;和

其中如果所述破碎的维生素 D_3 先驱离子包括具有 385.2 ± 0.5 的 m/z 的离子,那么所述维生素 D_3 碎片离子包括一种或多种选自具有 159.0 ± 0.5 、 147.0 ± 0.5 、 133.1 ± 0.5 和 107.1 ± 0.5 的 m/z 的离子的离子,并且如果所述破碎的维生素 D_3 先驱离子包括具有 367.2 ± 0.5 的 m/z 的离子,那么所述维生素 D_3 碎片离子包括一种或多种选自具有 172.2 ± 0.5 、 145.0 ± 0.5 和 119.1 ± 0.5 的 m/z 的离子的离子;

(iv) 通过质谱法测定步骤 (i)、(ii) 和 (iii) 中产生的一种或多种所述维生素 D_2 和维生素 D_3 离子的量;和

(v) 使步骤 (iv) 中测定的所述维生素 D_2 和维生素 D_3 离子的量与所述样品中维生素 D_2 和维生素 D_3 的量相关联。

34. 权利要求 33 所述的方法,其中所述破碎的维生素 D_2 先驱离子是具有 397.2 ± 0.5 的 m/z 的离子。

35. 权利要求 33 所述的方法,其中所述破碎的维生素 D_2 先驱离子是具有 379.2 ± 0.5 的 m/z 的离子。

36. 权利要求 33-35 中任一项所述的方法,其中所述破碎的维生素 D_3 先驱离子是具有 385.2 ± 0.5 的 m/z 的离子。

37. 权利要求 33-35 中任一项所述的方法,其中所述破碎的维生素 D_3 先驱离子是具有 367.2 ± 0.5 的 m/z 的离子。

38. 权利要求 33-37 中任一项所述的方法,其中使所述样品在电离之前经历萃取柱。

39. 权利要求 38 所述的方法,其中所述萃取柱是固相萃取 (SPE) 柱。

40. 权利要求 38 所述的方法,其中所述萃取柱是湍流液相色谱 (TFLC) 柱。

41. 权利要求 40-41 中任一项所述的方法,其中使所述样品在电离之前另外经历分析柱。

42. 权利要求 41 所述的方法,其中所述分析柱是高效液相色谱 (HPLC) 柱。

43. 权利要求 40-41 中任一项所述的方法,其中所述萃取柱和分析柱和步骤 (i) 的所述电离源以联机方式连接。

44. 权利要求 33-43 中任一项所述的方法,其中所述电离源是大气压化学电离 (APCI) 源。

45. 权利要求 33-44 中任一项所述的方法,其中所述串联质谱法作为多重反应监测、先驱离子扫描或产物离子扫描而进行。

46. 权利要求 33-45 中任一项所述的方法,其中所述样品包括生物样品。

47. 权利要求 46 所述的方法,其中所述生物样品来自人类,当取自所述人类时,所述样品中测定的所述维生素 D_2 和维生素 D_3 的量是所述样品中存在的量。

48. 权利要求 46-47 中任一项所述的方法,其中所述样品包括血清或血浆。

非衍生的、非代谢的维生素 D 的质谱测定

发明领域

[0001] 本发明涉及非代谢的维生素 D 的定量测量。在具体方面,本发明涉及通过串联质谱法定量测量非代谢的维生素 D 的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 维生素 D 是在钙 (Ca^{2+}) 稳态的正调节中具有重要生理作用的必需营养素。维生素 D 可通过暴露于日光而在皮肤中从头形成或它可从饮食吸收。存在两种形式维生素 D: 维生素 D_2 (麦角钙化醇) 和维生素 D_3 (胆钙化醇)。维生素 D_3 是由动物从头合成的形式。它还是加入到在美国生产的乳制品和某些食品中的常见补充物。饮食和内在合成的维生素 D_3 必须经历代谢激活以产生生物活性的代谢物。在人类中,维生素 D_3 激活的最初步骤主要发生在肝中并包括羟基化作用以形成中间体代谢物 25- 羟基胆钙化醇 (骨化二醇; $25\text{OH}\text{D}_3$)。骨化二醇是循环中维生素 D_3 的主要形式。然后循环的 $25\text{OH}\text{D}_3$ 由肾转化,形成 1, 25- 二羟基维生素 D_3 (骨化三醇; $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$), 其通常被认为是具有最高生物活性的维生素 D_3 的代谢物。

[0004] 维生素 D_2 来自真菌和植物来源。许多非处方膳食补充物 (dietary supplements) 含有麦角钙化醇 (维生素 D_2) 而不是胆钙化醇 (维生素 D_3)。麦角骨化醇 (Drisdol)——在美国可获得的唯一的维生素 D 的高效处方形式——是用麦角钙化醇配制的。维生素 D_2 在人类中经历与维生素 D_3 相似的代谢激活途径, 形成代谢物 $25\text{OH}\text{D}_2$ 和 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_2$ 。维生素 D_2 和维生素 D_3 已长期被假定在人类中在生物学上相等, 然而最近的报道提出这两种形式的维生素 D 在生物活性和生物利用率上可存在差异 (Armas et. al., (2004) J. Clin. Endocrinol. Metab. 89:5387-5391)。

[0005] 维生素 D——无活性维生素 D 先驱体——的测量在临床情况中不常发生。相反, 25- 羟基维生素 D_3 、25- 羟基维生素 D_2 和总 25- 羟基维生素 D (“ $25\text{OH}\text{D}$ ”) 的血清水平是维生素 D 营养状况和某些维生素 D 类似物的效力的有用指示物。 $25\text{OH}\text{D}$ 的测量通常用于钙代谢病症的诊断和处理。在这方面, 低水平 $25\text{OH}\text{D}$ 指示与疾病如低钙血症、低磷血症、继发性甲状旁腺功能亢进症、升高的碱性磷酸酶、成人中骨软化症和儿童中佝偻病有关的维生素 D 缺乏。在疑似维生素 D 中毒的患者中, 升高水平的 $25\text{OH}\text{D}$ 使该病症区别于引起高钙血症的其它病症。

[0006] $1, 25(\text{OH})_2\text{D}$ 的测量还用于临床情况。某些疾病状态可通过循环水平的 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}$ 反映, 例如肾疾病和肾功能衰竭常常导致低水平的 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}$ 。升高水平的 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}$ 可指示过量的甲状旁腺素或可指示某些疾病如结节病或某些类型的淋巴瘤。

[0007] 维生素 D 代谢物的检测已通过用对 $25\text{OH}\text{D}_2$ 和 $25\text{OH}\text{D}_3$ 共同特异的抗体的放射免疫测定完成。因为目前的基于免疫学的测定不分别分辨 $25\text{OH}\text{D}_2$ 和 $25\text{OH}\text{D}_3$, 所以不求助于其它试验, 维生素 D 的任何营养缺乏的来源不能被确定。已发表了公开利用质谱法检测特定维生素 D 代谢物的方法的报道。在一些报道中, 维生素 D 代谢物在质谱法之前被衍生, 但是在其它的报道中, 它们不是这样。例如 Holmquist, et al. 2007 年 12 月 28 日提交的美国专利申请系列号 11/946765; Yeung B, et al., J Chromatogr. 1993, 645(1):115-23;

Higashi T, et al., Steroids. 2000, 65(5):281-94; Higashi T, et al., Biol Pharm Bull. 2001, 24(7):738-43; Higashi T, et al., J Pharm Biomed Anal. 2002, 29(5):947-55; Higashi T, et al., Anal. Biochem. 2008, 391:229-38; 和 Aronov, et al., Anal Bioanal Chem, 2008, 391:1917-30 公开通过在质谱法之前衍生代谢物而检测各种维生素 D 代谢物的方法。检测未衍生的维生素 D 代谢物的方法在 Clarke, et al., 2005 年 4 月 6 日提交的美国专利申请系列号 11/101, 166 和 2006 年 3 月 21 日提交的 11/386, 215 中, 和 Singh, et al., 2004 年 10 月 24 日提交的美国专利申请系列号 10/977, 121 中被报道。还已公开了报道, 其公开用 Cookson 型试剂, 特别是 4- 苯基 -1, 2, 4- 三唑啉 -3, 5- 二酮 (PTAD) 和 4-[2-(6, 7- 二甲氧基 -4- 甲基 -3- 氧代 -3, 4- 二氢喹啉基 (dihydroquinoxalyl)) 乙基]-1, 2, 4- 三唑啉 -3, 5- 二酮 (DMEQ-TAD) 进行的维生素 D₃ 的衍生。参见 Aberhart, J, et al., J. Org. Chem. 1976, 41(12):2098-2102 和 Kamao, M, et al., J Chromatogr. B2007, 859:192-200。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明提供通过包括串联质谱法在内的质谱法检测样品中一种或多种 (非代谢) 形式的维生素 D 的量的方法。一方面, 来自样品的维生素 D 在通过质谱法分析之前被衍生。第二方面, 来自样品的维生素 D 在通过质谱法分析之前不被衍生。

[0010] 在第一方面的一些实施方式中, 该方法包括以下步骤: (i) 使样品中的 Cookson 型衍生的维生素 D 在适合产生一种或多种通过质谱法可检测的先驱离子的条件下经历电离源; (ii) 破碎至少一种所述先驱离子以产生一种或多种通过质谱法可检测的碎片离子; (iii) 通过质谱法测定先驱离子和碎片离子中的一种或多种的量; 和 (iv) 使在步骤 (iii) 中测定的离子的量与样品中维生素 D 的量相关联。在这些方法中, 在步骤 (i) 之前将样品在足以产生 Cookson 型衍生的维生素 D 的条件下经历 Cookson 型衍生试剂。在一些实施方式中, 将 Cookson 型衍生的维生素 D 在电离之前经历萃取柱和分析柱。在相关实施方式中, 分析柱可以是高效液相色谱 (HPLC) 柱。

[0011] 在第一方面的一些实施方式中, 该方法包括以下步骤: (i) 使样品经历湍流液相色谱 (TFLC); (ii) 使来自样品的 Cookson 型衍生的维生素 D 在适合产生一种或多种通过质谱法可检测的离子的条件下经历电离源; (iii) 通过质谱法测定一种或多种 Cookson 型衍生的维生素 D 离子的量; 和 (iv) 使在步骤 (iii) 中测定的 Cookson 型衍生的维生素 D 离子的量与样品中维生素 D 的量相关联。在这些方法中, 在步骤 (i) 之前将样品在样品中足以产生 Cookson 型衍生的维生素 D 的条件下经历 Cookson 型衍生试剂。在一些实施方式中, 在步骤 (i) 之后但步骤 (ii) 之前使样品经历高效液相色谱法 (HPLC)。

[0012] 在一些实施方式中, Cookson 型衍生试剂是 4- 苯基 -1, 2, 4- 三唑啉 -3, 5- 二酮 (PTAD)。在这些实施方式中的一些实施方式中, 一种或多种先驱离子包括一种或多种选自质荷比 (m/z) 为 572.4 ± 0.5 和 560.4 ± 0.5 的离子。在这些实施方式中的一些实施方式中, 一种或多种碎片离子包括质荷比 (m/z) 为 298.1 ± 0.5 的离子。

[0013] 在维生素 D 包括维生素 D₂ 的实施方式中, 一种或多种 Cookson 型衍生的维生素 D 离子可包括质荷比 (m/z) 为 572.3 ± 0.5 的先驱离子和质荷比 (m/z) 为 298.1 ± 0.5 的碎片离子。在维生素 D 包括维生素 D₃ 的实施方式中, 一种或多种 Cookson 型衍生的维生素 D 离子可包括质荷比 (m/z) 为 560.3 ± 0.5 的先驱离子和质荷比 (m/z) 为 298.1 ± 0.5 的碎片离

子。在维生素 D 包括维生素 D₂ 和 D₃ 的实施方式中,一种或多种先驱离子可包括质荷比 (m/z) 为 572.4±0.5 的维生素 D₂ 先驱离子和 m/z 为 560.4±0.5 的维生素 D₃ 先驱离子;一种或多种碎片离子可包括 m/z 为 298.1±0.5 的维生素 D₂ 碎片离子和 m/z 为 298.1±0.5 的维生素 D₃ 碎片离子。

[0014] 在第二方面的一些实施方式中,本发明提供无需电离和检测衍生的维生素 D,通过串联质谱法测定样品中维生素 D 的量的方法。在一些实施方式中,维生素 D 包括维生素 D₂;这些方法包括以下步骤:使来自样品的维生素 D₂ 在适合产生一种或多种通过质谱法可检测的选自质荷比 (m/z) 为 397.2±0.5 或 379.2±0.5 的离子的先驱离子的条件下经历电离源;破碎至少一种所述先驱离子以产生一种或多种通过质谱法可检测的碎片离子;(iii) 通过质谱法测定步骤 (i) 和 (ii) 中产生的一种或多种离子的量;和 (iv) 使步骤 (iii) 中测定的维生素 D₂ 离子的存在与样品中维生素 D₂ 的存在相关联。在这些方法中,如果破碎的先驱离子包括 m/z 为 397.2±0.5 的离子,那么碎片离子包括一种或多种选自 m/z 为 159.0±0.5、146.9±0.5、133.1±0.5 和 121.0±0.5 的离子的离子。在这些方法中,如果破碎的先驱离子包括 m/z 为 379.2±0.5 的离子,那么碎片离子包括一种或多种选自 m/z 为 283.2±0.5、187.3±0.5、175.2±0.5 和 159.0±0.5 的离子的离子。在一些实施方式中,在电离之前可将来自样品的维生素 D₂ 经历萃取柱,如固相萃取 (SPE) 柱或湍流液相色谱 (THLC) 柱。在一些实施方式中,在电离之前将来自样品的维生素 D₂ 另外经历分析柱,如高效液相色谱 (HPLC) 柱。

[0015] 在第二方面的其它实施方式中,维生素 D 包括维生素 D₃;这些方法包括以下步骤:(i) 使来自样品的维生素 D₃ 在适合产生一种或多种通过质谱法可检测的选自质荷比 (m/z) 为 385.2±0.5 或 367.2±0.5 的离子的先驱离子的条件下经历电离源;(ii) 破碎至少一种所述先驱离子以产生一种或多种通过质谱法可检测的碎片离子;(iii) 通过质谱法测定步骤 (i) 和 (ii) 中产生的一种或多种离子的量;和 (iv) 使步骤 (iii) 中测定的维生素 D₃ 离子的存在与样品中维生素 D₃ 的存在相关联。在这些方法中,如果破碎的先驱离子包括 m/z 为 385.2±0.5 的离子,那么碎片离子包括一种或多种选自 m/z 为 159.0±0.5、147.0±0.5、133.1±0.5 和 107.1±0.5 的离子的离子。如果破碎的先驱离子包括 m/z 为 367.2±0.5 的离子,那么碎片离子包括一种或多种选自 m/z 为 172.2±0.5、145.0±0.5 和 119.1±0.5 的离子。在一些实施方式中,在电离之前可将来自样品的维生素 D₃ 经历萃取柱,如固相萃取 (SPE) 柱或湍流液相色谱 (THLC) 柱。在一些实施方式中,在电离之前将来自样品的维生素 D₃ 另外经历分析柱,如高效液相色谱 (HPLC) 柱。

[0016] 在本文描述的方法中,质谱法可以是串联质谱法。在利用串联质谱法的实施方式中,串联质谱法可通过本领域已知的任何方法——包括例如,多重反应监测、先驱离子扫描或产物离子扫描——来进行。

[0017] 在利用萃取柱的实施方式中,萃取柱可以是固相萃取 (SPE) 柱;如湍流液相色谱 (TFLC) 柱。在一些实施方式中,其利用萃取柱、分析柱和电离源中的两个或多个,利用的组合可以以联机方式连接以允许自动化的样品处理和分析。

[0018] 用于某些实施方式的 Cookson 型衍生试剂可选自 4-苯基-1,2,4-三唑啉-3,5-二酮 (PTAD)、4-甲基-1,2,4-三唑啉-3,5-二酮 (MTAD)、4-[2-(6,7-二甲氧基-4-甲基-3-氧代-3,4-二氢喹啉基)乙基]-1,2,4-三唑啉-3,5-二酮 (DMEQTAD)、4-(4-硝

基苯基)-1, 2, 4-三唑啉-3, 5-二酮 (NPTAD) 和 4-二茂铁基甲基-1, 2, 4-三唑啉-3, 5-二酮 (FMTAD) 以及其同位素标记的变体。在优选实施方式中, Cookson 型衍生试剂是 4-苯基-1, 2, 4-三唑啉-3, 5-二酮 (PTAD) 或其同位素标记的变体。在某些优选实施方式中, Cookson 型衍生试剂是 4-苯基-1, 2, 4-三唑啉-3, 5-二酮 (PTAD) 或其同位素标记的变体。

[0019] 如本文所用, 术语“维生素 D”指任何一种或多种天然存在的非代谢的维生素 D 或合成的非代谢的维生素 D 的类似物。这与通过代谢过程中发生的特定化学修饰而鉴定的维生素 D 代谢物 (例如, 25-羟基维生素 D 和 $1\alpha, 25$ -二羟基维生素 D) 相对。非代谢的维生素 D 还可被称作“营养性”维生素 D 以区别于代谢的形式。提到没有指定代谢形式的维生素 D 是指非代谢的形式。

[0020] 如本文所用, “衍生”指使两个分子反应以形成新的分子。因此, 衍生剂是与另一个物质反应以衍生物质的剂。例如, 4-苯基-1, 2, 4-三唑啉-3, 5-二酮 (PTAD) 是可与维生素 D 反应以形成 PTAD-衍生的维生素 D 的衍生试剂。

[0021] 如本文所用, 衍生形式维生素 D 的名称包括关于衍生的性质的表示。例如, 维生素 D₂ 的 PTAD 衍生物被表示为 PTAD-维生素 D₂ (或 PTAD-衍生的维生素 D₂)。

[0022] 如本文所用, “Cookson 型衍生剂”是 4-取代的 1, 2, 4-三唑啉-3, 5-二酮化合物。示例性的 Cookson 型衍生剂包括 4-苯基-1, 2, 4-三唑啉-3, 5-二酮 (PTAD)、4-甲基-1, 2, 4-三唑啉-3, 5-二酮 (MTAD)、4-[2-(6, 7-二甲氧基-4-甲基-3-氧代-3, 4-二氢喹啉基) 乙基]-1, 2, 4-三唑啉-3, 5-二酮 (DMEQTAD)、4-(4-硝基苯基)-1, 2, 4-三唑啉-3, 5-二酮 (NPTAD) 和 4-二茂铁基甲基-1, 2, 4-三唑啉-3, 5-二酮 (FMTAD)。另外, 在一些实施方式中可利用 Cookson 型衍生剂的同位素标记的变体。例如, ¹³C₆-PTAD 同位素变体比正常 PTAD 重 6 个质量单位并可用于一些实施方式。通过 Cookson 型试剂进行的维生素 D 代谢物的衍生可通过任何适当的方法进行。参见, 例如, Holmquist, et al., 2007 年 12 月 28 日提交的美国专利申请系列号 11/946765; Yeung B, et al., J Chromatogr. 1993, 645(1):115-23; Higashi T, et al., Steroids. 2000, 65(5):281-94; Higashi T, et al., Biol Pharm Bull. 2001, 24(7):738-43; Higashi T, et al., J Pharm Biomed Anal. 2002, 29(5):947-55; Higashi T, et al., Anal. Bioanal Chem, 2008, 391:229-38; 和 Aronov, et al., Anal Bioanal Chem, 2008, 391:19 17-30。

[0023] 维生素 D 可指一种或多种形式的维生素 D, 如维生素 D₂ 和 / 或维生素 D₃。在样品包括多种维生素 D 形式的实施方式中, 多种维生素 D 形式可被同时电离。例如, 在一些实施方式中, 在相同的样品中测定维生素 D₂ 和维生素 D₃ 的量。在这些实施方式中, (衍生的或未衍生的) 维生素 D₂ 和维生素 D₃ 可被同时电离。

[0024] 如用于同时检测两种或多种来自样品的分析物的量, 术语“同时”指从相同的样品注射中获得反映样品中两种或多种分析物的量的数据。每个分析物的数据可依次或平行获得, 这取决于利用的仪器技术。例如, 可将包含两种分析物的单个样品注射进 HPLC 柱, 然后 HPLC 柱可一个接一个地洗脱每种分析物, 导致依次将分析物引入质谱仪。为了本文的目的同时测定这两种分析物中每种的量, 因为两种分析物都由注射进入 HPLC 的相同的样品产生。

[0025] 维生素 D 可在动物的循环中找到和 / 或可由生物体, 如动物产生。像这样, 样品可, 例如, 从患者; 即, 男性或女性的活人获得, 在临床环境中呈现自身用于疾病或状况的诊断、

预后或治疗。优选的样品可以是生物样品；特别是生物流体样品如血清或血浆。当样品来自人类时，本文呈现的方法可用于测定存在于样品中的维生素 D 的量。

[0026] 在本文公开的方法的某些优选实施方式中，质谱法以阳离子方式进行。可选地，质谱法以阴离子方式进行。各种电离源，包括例如大气压化学电离 (APCI)、激光二极管热解吸 (LDTD) 或电雾化电离 (ESI)，可用于本发明的实施方式。在某些实施方式中，以阳离子方式利用 APCI 或 LDTD 测量维生素 D 代谢物。

[0027] 在优选实施方式中，样品中提供了一种或多种单独可检测的内标，还在样品中测定了该内标的量。在这些实施方式中，将样品中存在的所有或部分感兴趣的分析物（一种或多种）和内标（一种或多种）离子化以产生多种在质谱仪中可检测的离子，并通过质谱法检测从每种产生的一种或多种离子。优选地，内标（一种或多种）是维生素 D₂-[6, 19, 19]⁻²H₃、维生素 D₂-[26, 26, 26, 27, 27, 27]⁻²H₆、维生素 D₃-[6, 19, 19]⁻²H₃ 和维生素 D₃-[26, 26, 26, 27, 27, 27]⁻²H₆ 中的一种或多种。

[0028] 在用 Cookson 型衍生试剂（如果可适用）的处理或来自样品的分析物（一种或多种）的任何纯化之前，可在样品中提供一种或多种单独可检测的内标。在这些实施方式中，一种或多种内标可连同内源性维生素 D 一起进行衍生和 / 或纯化，在该情况下，衍生的和 / 或纯化的内标的离子通过质谱法来检测。在这些实施方式中，从感兴趣的分析物产生的离子的存在或量可与样品中感兴趣分析物的存在或量相关。在一些实施方式中，内标可以是维生素 D 的同位素标记的形式，如维生素 D₂-[6, 19, 19]⁻²H₃、维生素 D₂-[26, 26, 26, 27, 27, 27]⁻²H₆、维生素 D₃-[6, 19, 19]⁻²H₃ 和维生素 D₃-[26, 26, 26, 27, 27, 27]⁻²H₆。

[0029] 可针对上面列出的示例性内标中的每个产生质谱仪中可检测的离子。针对几个示例性内标产生的示例性光谱在实施例 8 和 9 中描述，并显示在图 6-7、9-10、12-13 和 15-16 中。

[0030] 如本文所用，当用质谱技术分析时，相对于未标记的分子，“同位素标记”在标记的分子中产生质量漂移。适合的标记的例子包括氘 (²H)、¹³C 和 ¹⁵N。例如，维生素 D₂-[6, 19, 19]⁻²H₃ 和维生素 D₃-[6, 19, 19]⁻²H₃ 分别具有比维生素 D₂ 和维生素 D₃ 高约 3 个质量单位的质量。同位素标记可在分子中的一个或多个位置处掺入，并且一种或多种同位素标记可用于相同同位素标记的分子上。

[0031] 在其它实施方式中，维生素 D 离子（一种或多种）的量可通过与一种或多种外参考标准比较而测定。示例性的外参考标准包括掺有维生素 D₂-[6, 19, 19]⁻²H₃、维生素 D₂-[26, 26, 26, 27, 27, 27]⁻²H₆、维生素 D₃-[6, 19, 19]⁻²H₃ 和维生素 D₃-[26, 26, 26, 27, 27, 27]⁻²H₆ 中的一种或多种的空白血浆或血清。在衍生的维生素 D 被检测的实施方式中，外标通常将经历与将被分析的任何其它样品相同的处理和分析，包括在质谱法之前用一种或多种 Cookson 型试剂的处理。

[0032] 在某些实施方式中，维生素 D₂ 和维生素 D₃ 的定量的下限 (LLOQ) 小于 10ng/mL；优选小于 5ng/mL；优选小于 2ng/mL。

[0033] 如本文所用，除非另外说明，单数形式“一 (a)”、“一 (an)”、“所述 (the)”包括复数参考。因此，例如，提及“一蛋白 (a protein)”包括多个蛋白分子。

[0034] 如本文所用，术语“纯化 (purification)”或“纯化 (purifying)”不是指从样品中

去除了感兴趣的分析物（一种或多种）外的所有物质。相反，纯化指相对于样品中可能干扰感兴趣的分析物检测的其它组分，富集一种或多种感兴趣的分析物的量的过程。通过各种手段的样品纯化可允许一种或多种干扰物质——例如，可能或可能不干扰通过质谱法的选择的母离子或子离子检测的一种或多种物质——的相对减少。当该术语使用时，相对减少不要求将被纯化的材料中与感兴趣的分析物一起存在的任何物质通过纯化被完全去除。

[0035] 如本文所用，术语“固相萃取法”或“SPE”指由于溶解或悬浮于溶液（即，流动相）中的组分对溶液通过或流经的固体（即，固相）的亲合力而将化学混合物分成各组分的过程。在一些实例中，当流动相通过或流经固相时，流动相的不期望的组分可保留在固相中，导致流动相中分析物的纯化。在其它实例中，分析物可保留在固相中，允许流动相的不期望的组分通过或流经固相。在这些实例中，然后将第二流动相用于将保留的分析物从固相洗脱下来用于进一步的处理或分析。SPE——包括 TFLC——可通过单一模式或混合模式机制运行。混合模式机制在同一柱中利用离子交换和疏水保留；例如，混合模式 SPE 柱的固相可显示强阴离子交换和疏水保留；或可显示强阳离子交换和疏水保留。

[0036] 如本文所用，术语“色谱法”指由于流过固定的液相或固相时化学实体的差别分布而将液体或气体携带的化学混合物分成各组分的过程。

[0037] 如本文所用，术语“液相色谱”或“LC”指当流体通过精细分开的物质的柱或通过毛细管通道均匀地滤过时流体溶液的一种或多种组分的选择性阻滞的过程。阻滞由当流体相对于固定相（或多个）运动时，一个或多个固定相和大量流体（即，流动相）之间的混合物的各组分分布产生。“液相色谱”的实例包括反相液相色谱法（RPLC）、高效液相色谱法（HPLC）和湍流液相色谱（TFLC）（有时被称作湍流液相色谱（HTLC）或高通量液相色谱）。

[0038] 如本文所用，术语“高效液相色谱法”或“HPLC”（有时被称作“高压液相色谱”）指这样的液相色谱，其中通过在压力下迫使流动相通过固定相，通常是紧密填充的柱，而增加分离的程度。

[0039] 如本文所用，术语“湍流液相色谱”或“TFLC”（有时被称作湍流液相色谱或高通量液相色谱）指一种形式的色谱，其利用通过柱填充而正被测定的物质的湍流作为进行分离的基础。在通过质谱法分析之前，TFLC 已应用于制备包含两种未命名的药物的样品。参见，例如，Zimmer et al., J Chromatogr A 854:23-35(1999)；还参见，美国专利号 5,968,367、5,919,368、5,795,469 和 5,772,874，其进一步解释 TFLC。本领域普通技术人员了解“湍流”。当流体慢慢地并流畅地流动时，该流动被称作“层流”。例如，以低流速通过 HPLC 柱的流体是层状的。在层流中流体的颗粒运动是有秩序的，具有通常以直线运动的颗粒。在较快的速度，水的惯性克服流体摩擦力并产生湍流。不与不规则边界接触的流体“超过”被摩擦减慢或被粗糙表面偏离的流体。当流体以湍流流动时，它以漩涡和涡动（或旋涡）流动，较流动是层状时具有更多的“阻力(drag)”。可获得许多参考资料用于辅助确定什么时候流体流动是层状的或湍流（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)）。

[0040] 如本文所用，术语“气相色谱”或“GC”指这样的色谱，其中将样品混合物蒸发并注射进通过包含固定相——由液体或颗粒固体组成——的柱运动的载气（如氮气或氦）流，

并根据化合物对固定相的亲合力分成其各组成化合物。

[0041] 如本文所用,术语“大颗粒柱”或“萃取柱”指包含大于约 50 μm 的平均粒径的色谱柱。

[0042] 如本文所用,术语“分析柱”指具有足够色谱板以引起样品中物质分离的色谱柱,该物质从柱洗脱足以允许测定分析物的存在或量。在优选实施方式中,分析柱含有直径约 5 μm 的颗粒。这样的柱常常区别于“萃取柱”,萃取柱具有从非保留的物质中分离或萃取保留的物质的以获得纯化的样品用于进一步分析的目的。

[0043] 如本文所用,术语“联机(on-line)”和“在线(inline)”,例如如“联机自动方式”或“联机萃取”中所用,指不需要操作员干预而进行的程序。相比之下,如本文所用,术语“脱机(off-line)”指需要操作员的人工干预的程序。因此,如果将样品进行沉淀,然后将上清液手动装载到自动进样器中,沉淀和装载步骤与随后的步骤是脱机的。在方法的各种实施方式中,一个或多个步骤可以以联机自动方式进行。

[0044] 如本文所用,术语“质谱法”或“MS”指通过化合物的质量鉴定化合物的分析技术。MS 指基于离子的质荷比或“ m/z ”,过滤、检测和测量离子的方法。MS 技术通常包括 (1) 电离化合物以形成带电荷的化合物;和 (2) 检测带电荷的化合物的分子量和计算质荷比。化合物可被电离和通过任何适合的方法检测。“质谱仪”通常包括电离源和离子检测器。一般而言,将一种或多种感兴趣的分子电离,并随后将离子引入质谱仪器,在质谱仪器中由于磁场和电场的联合,离子顺着空间中取决于质量 (“ m ”) 和电荷 (“ z ”) 的路径走。参见,例如,名称为“Mass Spectrometry From Surfaces”的美国专利号 6,204,500;名称为“Methods and Apparatus for Tandem Mass Spectrometry”的 6,107,623;名称为“DNA Diagnostics Based On Mass Spectrometry”的 6,268,144;名称为“Surface-Enhanced Photolabile Attachment And Release For Desorption And Detection Of Analytes”的 6,124,137;Wright et al., Prostate Cancer and Prostatic Diseases 1999, 2:264-76;和 Merchant and Weinberger, Electrophoresis 2000, 21:1164-67。

[0045] 如本文所用,术语“以阴离子方式运转”指产生和检测阴离子的那些质谱法方法。如本文所用,术语“以阳离子方式运转”指产生和检测阳离子的那些质谱法方法。

[0046] 如本文所用,术语“电离(ionization)”或“电离(ionizing)”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。阴离子是具有一个或多个电子单位的净负电荷的那些离子,而阳离子是具有一个或多个电子单位的净正电荷的那些离子。

[0047] 如本文所用,术语“电子电离”或“EI”指这样的方法,其中气相或汽相的感兴趣的分析物与电子流相互作用。电子与分析物的撞击产生分析物离子,然后可将该分析物离子经历质谱法技术。

[0048] 如本文所用,术语“化学电离”或“CI”指这样的方法,其中将试剂气体(例如铵)进行电子碰撞,通过试剂气体离子和分析物分子的相互作用形成分析物离子。

[0049] 如本文所用,术语“快速原子轰击”或“FAB”指这样的方法,其中高能原子束(通常 Xe 或 Ar)撞击不挥发的样品,解吸和电离样品中包含的分子。将试验样品溶解于粘稠的液体基体如甘油、硫甘油、间位硝基苄醇、18-冠-6 冠醚、2-硝基苯辛醚、环丁砜、二乙醇胺和三乙醇胺。化合物或样品的合适基体的选择是经验过程。

[0050] 如本文所用,术语“基体辅助激光解吸电离”或“MALDI”指这样的方法,其中将不

挥发的样品暴露于激光辐射,其通过各种电离途径——包括光电离、质子化作用、脱质子化作用和簇衰变(cluster decay)——解吸和电离样品中的分析物。为了 MALDI,将样品与吸收能量的基体混合,该基体促进分析物分子的解吸。

[0051] 如本文所用,术语“表面增强激光解吸电离”或“SELDI”指另一种方法,其中将不挥发的样品暴露于激光辐射,其通过各种电离途径——包括光电离、质子化作用、脱质子化作用和簇衰变(cluster decay)——解吸和电离样品中的分析物。为了 SELDI,通常将样品结合到优先保留一种或多种感兴趣的分析物的表面。如在 MALDI 中,该过程还可利用吸收能量的物质以促进电离。

[0052] 如本文所用,术语“电雾化电离”或“ESI”指这样的方法,其中将溶液沿着小段毛细管传送,将高的正或负的电势施加到毛细管末端。使到达管末端的溶液汽化(雾化)成溶剂蒸汽中溶液的非常小滴的射流或喷雾。该滴的雾流过蒸发室,其被轻微加热以防止凝结和使溶剂蒸发。随着滴变小,电表面电荷密度增加直到这样的时间——同样的电荷之间的天然排斥引起离子以及中性分子释放。

[0053] 如本文所用,术语“大气压化学电离”或“APCI”指与 ESI 相似的质谱法方法;然而,通过在大气压发生在等离子体内的离子-分子相互作用,APCI 产生离子。等离子体通过喷雾毛细管和对电极之间的放电来保持。然后通常利用一组差示泵出的撇乳器阶段(skimmer stages)将离子通常提取到质量分析器。干燥和预热的 N_2 气的逆流可用于提高溶剂的去除。APCI 中的气相电离可较 ESI 更有效地用于分析极性较低的种类。

[0054] 如本文所用,术语“大气压光电离”或“APPI”指一种形式的电离,其中分子 M 的电离机制是光子吸收和电子喷射以形成分子离子 M^+ 。因为吸收的光子能量通常刚好高于电离电势,所以分子离子比较不易离解。在许多情况下,可能分析样品而无需色谱,因此节省大量时间和花费。在存在水蒸汽或质子溶剂的情况下,分子离子可吸取 H 以形成 MH^+ 。如果 M 具有高的质子亲合力,这趋于发生。这不影响定量准确度,因为 M^+ 和 MH^+ 之和是恒定的。通常将质子溶剂中的药物化合物观察为 MH^+ ,而非极性化合物如萘或睾酮通常形成 M^+ 。参见,例如,Robb et al., Anal. Chem. 2000, 72(15):3653-3659。

[0055] 如本文所用,术语“电感耦合等离子体”或“ICP”指这样的方法,其中样品与部分电离的气体在充分高的温度相互作用以便使大部分元素原子化和电离。

[0056] 如本文所用,术语“解吸”指从表面去除分析物和/或分析物进入气相。激光二极管热解吸(LDTD)是这样的技术,其中包含分析物的样品通过激光脉冲热解吸到气相。激光撞击用金属基托特别制备的 96 孔板的背面。激光脉冲加热基托,热使样品转换成气相。然后可将气相样品吸进电离源,在那里将气相样品在制备中电离,用于在质谱仪中分析。当利用 LDTD 时,气相样品的电离可通过本领域已知的任何合适的技术完成,如通过用电晕放电的电离(例如通过 APCI)。

[0057] 如本文所用,术语“场致解吸”指这样的方法,其中将不挥发的试验样品放到电离表面上,强电场用于以产生分析物离子。

[0058] 如本文所用,术语“选择性离子监测”是质谱仪器的检测方式,其中只有相对窄的质量范围的离子——通常约一个质量单位——被检测到。

[0059] 如本文所用,“多反应方式”有时被称作“选择的反应监测”,是质谱仪器的检测方式,其中先驱离子和一种或多种碎片离子被选择性地检测。

[0060] 如本文所用,术语“定量的下限(lower limit of quantification)”、“定量的下限(lower limit of quantitation)”或“LLOQ”指测量变得在数量上有意义的点。在该LOQ的分析物响应是可识别的、离散的和可再现的,具有小于20%的相对标准偏差(RSD%)和80%至120%的准确度。

[0061] 如本文所用,术语“检测限值”或“LOD”是这样的点,在该点测量值较与其相关的不确定度大。LOD是这样的点,在该点,值超过与其测量相关的不确定度并被定义为在零浓度平均值的RSD的三倍。

[0062] 如本文所用,体液样品中分析物的“量”通常指反映样品体积中可检测的分析物质量的绝对值。然而,量还考虑与另一个分析物量相比的相对量。例如,样品中分析物的量可以是大于通常存在于样品中的分析物的对照或正常水平的量。

[0063] 如本文所用,提到不包括离子质量测量的定量测量,术语“约”指加或减10%的指示值。质谱法仪器在测定给定分析物的质量时可轻微变化。术语“约”在离子的质量或离子的质荷比的上下文中指 ± 0.50 原子质量单位。

[0064] 上面描述的发明概述是非限制的,根据以下本发明的详细描述和根据权利要求,本发明的其它特征和优势将是明显的。

[0065] 附图简述

[0066] 图1A-C分别显示PTAD-维生素D₂、PTAD-维生素D₃和PTAD-维生素D₃-[6, 19, 19]-²H₃(内标)的示例性色谱图。详情在实施例3中讨论。

[0067] 图2A和2B显示通过实施例3中描述的方法测定的血清样品中的维生素D₂和维生素D₃的示例性校正曲线。

[0068] 图3显示维生素D₂和维生素D₃的变异系数对浓度的图。详情在实施例5中描述。

[0069] 图4显示不同的样品基体中维生素D₃分析的比较研究的结果。详情在实施例11中描述。

[0070] 图5A显示维生素D₂电离的示例性Q1扫描谱(覆盖约300至450的m/z范围)。图5B显示具有约397.2的m/z的维生素D₂先驱离子碎裂的示例性产物离子谱(覆盖约100至400的m/z范围)。图5C显示具有约379.2的m/z的维生素D₂先驱离子碎裂的示例性产物离子谱(覆盖约100至400的m/z范围)。详情在实施例14中描述。

[0071] 图6A显示维生素D₂-[6, 19, 19]-²H₃离子的示例性Q1扫描谱(覆盖约300至450的m/z范围)。图6B显示具有约400.2的m/z的维生素D₂-[6, 19, 19]-²H₃先驱离子碎裂的示例性产物离子谱(覆盖约100至400的m/z范围)。图6C显示具有约382.2的m/z的维生素D₂-[6, 19, 19]-²H₃先驱离子碎裂的示例性产物离子谱(覆盖约100至400的m/z范围)。详情在实施例14中描述。

[0072] 图7A显示维生素D₂-[26, 26, 26, 27, 27, 27]-²H₆离子的示例性Q1扫描谱(覆盖约300至450的m/z范围)。图7B显示具有约403.2的m/z的维生素D₂-[26, 26, 26, 27, 27, 27]-²H₆先驱离子碎裂的示例性产物离子谱(覆盖约100至400的m/z范围)。图7C显示具有约385.2的m/z的维生素D₂-[26, 26, 26, 27, 27, 27]-²H₆先驱离子碎裂的示例性产物离子谱(覆盖约100至400的m/z范围)。详情在实施例14中描述。

[0073] 图8A显示维生素D₃电离的示例性Q1扫描谱(覆盖约300至450的m/z范围)。图8B显示具有约385.2的m/z的维生素D₃先驱离子碎裂的示例性产物离子谱(覆盖约100

至 400 的 m/z 范围)。图 8C 显示具有约 367.2 的 m/z 的维生素 D_3 先驱离子碎裂的示例性产物离子谱 (覆盖约 100 至 400 的 m/z 范围)。详情在实施例 14 中描述。

[0074] 图 9A 显示维生素 D_3 - [6, 19, 19] $^{-2}H_3$ 离子的示例性 Q1 扫描谱 (覆盖约 300 至 450 的 m/z 范围)。图 9B 显示具有约 388.2 的 m/z 的维生素 D_3 - [6, 19, 19] $^{-2}H_3$ 先驱离子碎裂的示例性产物离子谱 (覆盖约 100 至 400 的 m/z 范围)。图 9C 显示具有约 370.2 的 m/z 的维生素 D_3 - [6, 19, 19] $^{-2}H_3$ 先驱离子碎裂的示例性产物离子谱 (覆盖约 100 至 400 的 m/z 范围)。详情在实施例 14 中描述。

[0075] 图 10A 显示维生素 D_3 - [26, 26, 26, 27, 27, 27] $^{-2}H_6$ 离子的示例性 Q1 扫描谱 (覆盖约 300 至 450 的 m/z 范围)。图 10B 显示具有约 391.2 的 m/z 的维生素 D_3 - [26, 26, 26, 27, 27, 27] $^{-2}H_6$ 先驱离子碎裂的示例性产物离子谱 (覆盖约 100 至 400 的 m/z 范围)。图 10C 显示具有约 373.2 的 m/z 的维生素 D_3 - [26, 26, 26, 27, 27, 27] $^{-2}H_6$ 先驱离子碎裂的示例性产物离子谱 (覆盖约 100 至 400 的 m/z 范围)。详情在实施例 14 中描述。

[0076] 图 11A 显示 PTAD- 维生素 D_2 离子的示例性 Q1 扫描谱 (覆盖约 500 至 620 的 m/z 范围)。图 11B 显示具有约 572.2 的 m/z 的 PTAD- 维生素 D_2 先驱离子碎裂的示例性产物离子谱 (覆盖约 250 至 350 的 m/z 范围)。详情在实施例 15 中描述。

[0077] 图 12A 显示 PTAD- 维生素 D_2 - [6, 19, 19] $^{-2}H_3$ 离子的示例性 Q1 扫描谱 (覆盖约 500 至 620 的 m/z 范围)。图 12B 显示具有约 575.2 的 m/z 的 PTAD- 维生素 D_2 - [6, 19, 19] $^{-2}H_3$ 先驱离子碎裂的示例性产物离子谱 (覆盖约 250 至 350 的 m/z 范围)。详情在实施例 15 中描述。

[0078] 图 13A 显示 PTAD- 维生素 D_2 - [26, 26, 26, 27, 27, 27] $^{-2}H_6$ 离子的示例性 Q1 扫描谱 (覆盖约 500 至 620 的 m/z 范围)。图 13B 显示具有约 578.2 的 m/z 的 PTAD- 维生素 D_2 - [26, 26, 26, 27, 27, 27] $^{-2}H_6$ 先驱离子碎裂的示例性产物离子谱 (覆盖约 250 至 350 的 m/z 范围)。详情在实施例 15 中描述。

[0079] 图 14A 显示 PTAD- 维生素 D_3 离子的示例性 Q1 扫描谱 (覆盖约 500 至 620 的 m/z 范围)。图 14B 显示具有约 560.2 的 m/z 的 PTAD- 维生素 D_3 先驱离子碎裂的示例性产物离子谱 (覆盖约 250 至 350 的 m/z 范围)。详情在实施例 15 中描述。

[0080] 图 15A 显示 PTAD- 维生素 D_3 - [6, 19, 19] $^{-2}H_3$ 离子的示例性 Q1 扫描谱 (覆盖约 500 至 620 的 m/z 范围)。图 15B 显示具有约 563.2 的 m/z 的 PTAD- 维生素 D_3 - [6, 19, 19] $^{-2}H_3$ 先驱离子碎裂的示例性产物离子谱 (覆盖约 250 至 350 的 m/z 范围)。详情在实施例 15 中描述。

[0081] 图 16A 显示 PTAD- 维生素 D_3 - [26, 26, 26, 27, 27, 27] $^{-2}H_6$ 离子的示例性 Q1 扫描谱 (覆盖约 500 至 620 的 m/z 范围)。图 16B 显示具有约 566.2 的 m/z 的 PTAD- 维生素 D_3 - [26, 26, 26, 27, 27, 27] $^{-2}H_6$ 先驱离子碎裂的示例性产物离子谱 (覆盖约 250 至 350 的 m/z 范围)。详情在实施例 15 中描述。

[0082] 发明详述

[0083] 描述测量样品中维生素 D 的方法。更具体地, 描述检测和定量样品中维生素 D 的质谱方法。该方法可利用 Cookson 型试剂, 如 PTAD, 产生衍生的维生素 D。然而, 在一些方法中, 不使用衍生剂, 通过质谱法检测未衍生的维生素 D_2 和 / 或维生素 D_3 。

[0084] 该方法可利用提取色谱技术, 如湍流液相色谱 (TFLC), 结合质谱法 (MS) 方法来进

行未衍生的或衍生的维生素 D₂ 和 / 或维生素 D₃ 纯化, 由此提供检测和定量样品中维生素 D₂ 和 / 或维生素 D₃ 的高通量测定系统。可选地, 在一些方法中, 色谱——包括提取色谱——对样品分析不是必需的。在这些方法中, 用 LDTD 使未衍生的或衍生的维生素 D₂/ 或维生素 D₃ 电离。优选实施方式特别适合自动化维生素 D 定量的大的临床实验室中的应用。

[0085] 用于本发明方法的合适的试验样品包括可含有感兴趣的分析物的任何试验样品。在一些优选实施方式中, 样品是生物样品; 即, 从任何生物来源, 如动物、细胞培养物、器官培养物等获得的样品。在某些优选实施方式中, 样品从哺乳动物, 如狗、猫、马等获得。特别优选的哺乳动物是灵长类, 最优选男性或女性人类。优选的样品包括体液如血液、血浆、血清、唾液、脑脊液或组织样品; 优选血浆 (包括 EDTA 和肝素血浆) 和血清; 最优选血清。这样的样品可, 例如, 从患者; 即, 活人, 男性或女性获得, 在临床环境中呈现自身用于疾病或状况的诊断、预后或治疗。

[0086] 本发明还考虑维生素 D 定量测定试剂盒。维生素 D 定量测定的试剂盒可包括包含本文提供的组合物的试剂盒。例如, 试剂盒可包括包装材料和测量过的量的 Cookson 型试剂和同位素标记的内标——以足够至少一个测定的量。通常, 试剂盒还将包括以有形形式记录的说明书 (例如, 包含在纸或电子媒介上) 用于使用维生素 D 定量测定中使用的包装的试剂。

[0087] 用于本发明的实施方式的校准和 QC 库优选利用与期望的样品基体相似的基体来制备。

[0088] 用于质谱分析的样品制备

[0089] 在用于质谱分析的制备中, 维生素 D 可通过本领域已知的任何方法, 包括例如, 液相色谱、过滤、离心、薄层色谱 (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、包括乙酸乙酯或甲醇提取在内的提取法, 和利用离液剂或以上或类似方法的任何组合相对于样品中的一种或多种其它组分 (例如蛋白质) 进行富集。

[0090] 蛋白质沉淀是一种制备试验样品, 特别是生物试验样品, 如血清或血浆的方法。蛋白质纯化方法是本领域熟知的, 例如, Polson et al., Journal of Chromatography B2003, 785:263-275, 描述了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中去除大部分蛋白质, 留下维生素 D 在上清液中。可将样品离心以从沉淀的蛋白质中分离液体上清液; 可选地可将样品过滤以去除沉淀的蛋白质。然后可将得到的上清液或滤液直接应用于质谱法分析; 或可选地应用于液相色谱和随后的质谱法分析。在某些实施方式中, 样品, 如血浆或血清, 可通过杂化蛋白质沉淀 / 液 - 液提取法而被纯化。在这些实施方式中, 将样品与甲醇、乙酸乙酯和水混合, 并将产生的混合物涡旋和离心。将产生的上清液移去、完全干燥和在乙腈中重构 (reconstituted)。然后可将纯化的维生素 D 用任何 Cookson 型试剂, 优选 PTAD 或其同位素标记的变体衍生。

[0091] 可在质谱法之前使用的样品纯化的另一个方法是液相色谱 (LC)。包括 HPLC 在内的液相色谱的某些方法依赖相对慢的层流技术。传统的 HPLC 分析依赖柱填充, 其中通过柱的样品的层流是从样品中分离感兴趣的分析物的基础。熟练的技术人员将理解, 这样的柱中的分离是扩散过程并可选择适合衍生的维生素 D 使用的包括 HPLC 在内的 LC、仪器和柱。色谱柱通常包括介质 (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, 或可包括具有孔道的整体材料。介质的表面通常包括键合表面, 其与各种化学部

分相互作用以促进化学部分的分离。一个合适的键合表面是疏水键合表面如烷基键合、氰基键合表面或高纯的二氧化硅表面。烷基键合表面可包括 C-4、C-8、C-12 或 C-18 键合的烷基。在优选实施方式中，柱是高纯的二氧化硅柱（如 Thermo Hypersil Gold Aq 柱）。色谱柱包括用于接收样品的入口和用于排出包括分级的样品的流出液的出口。可将样品直接提供到入口，或从萃取柱，如联机 SPE 柱体或 TFLC 萃取柱。

[0092] 在一个实施方式中，可将样品在入口施加到 LC 柱，用溶剂或溶剂混合物洗脱，并在出口排出。可选择不同的溶剂方式用于洗脱感兴趣的分析物（或多个）。例如，液相色谱可利用梯度方式、等度方式或多变（即混合）方式进行。在色谱期间，物质的分离通过变量如洗脱液（也被称作“流动相”）、洗脱方式、梯度条件、温度等的选择来完成。

[0093] 在某些实施方式中，通过将样品在感兴趣的分析物被柱填充材料可逆地保留，而一种或多种其它物质不被保留的条件下施加到柱可将分析物纯化。在这些实施方式中，感兴趣的分析物被柱保留时可利用第一流动相条件，一旦非保留的物质被洗过，随后可利用第二流动相条件以从柱去除保留的物质。可选地，通过在感兴趣的分析物相比一种或多种其它物质以有差别的速度洗脱的流动相条件下将样品施加到柱可纯化分析物。这样的操作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的分析物的量。

[0094] 在一个优选实施方式中，用烷基键合的分析柱色谱系统进行 HPLC。在某些优选实施方式中，使用高纯二氧化硅柱（如 Thermo Hypersil Gold Aq 柱）。在某些优选实施方式中，利用 HPLC 级水作为流动相 A 和 HPLC 级乙醇作为流动相 B 进行 HPLC 和 / 或 TFLC。

[0095] 通过仔细地选择阀和连接管道，需要时可将两个或多个色谱柱连接以便物质从一个通过到下一个无需任何手动步骤。在优选实施方式中，阀和管道的选择由预编程序的计算机控制以进行必需的步骤。最优选，色谱系统还以这样的联机方式连接到检测器系统，例如，MS 系统。因此，操作员可将样品的托盘放到自动进样器中，剩余的操作在计算机控制下进行，导致所有选择的样品得到纯化和分析。

[0096] 在一些实施方式中，在质谱法之前萃取柱可用于维生素 D 代谢物的纯化。在这样的实施方式中，在电离之前利用捕获分析物的萃取柱，样品可被提取，然后在第二萃取柱上或在分析 HPLC 柱上洗脱和层析。例如，用 TFLC 萃取柱的样品提取可用大粒度（50 μ m）的填充柱实现。然后可将该柱的洗脱出的样品转移到 HPLC 分析柱用于质谱法之前的进一步纯化。因为这些色谱程序中包括的步骤可以以自动化方式连接，所以可将分析物纯化过程中操作员参与的需要减到最小。该特点可导致节省时间和成本，并消除操作员错误的可能。

[0097] 在一些实施方式中，蛋白质沉淀通过杂化蛋白质沉淀 / 液 - 液提取法——包括从血清的甲醇蛋白质沉淀和乙酸乙酯 / 水萃取——实现。在经历萃取柱之前产生的维生素 D 代谢物可被衍生。优选地，杂化蛋白质沉淀 / 液 - 液提取法和萃取柱以联机方式连接。在优选实施方式中，萃取柱是 C-8 萃取柱，如 Cohesive Technologies C8XL 联机萃取柱（50 μ m 粒度，0.5 \times 50mm）或同等物。然后在质谱分析之前可将来自萃取柱的洗脱液施加到分析型 LC 柱，如以联机方式的 HPLC 柱。因为这些色谱程序中包括的步骤可以以自动化方式连接，所以可将分析物纯化过程中对操作员参与的需要减到最小。该特点可导致节省时间和成本，并消除操作员错误的可能。

[0098] 通过质谱法的检测和定量

[0099] 在各种实施方式中，衍生的维生素 D 可通过熟练的技术人员已知的任何方法而被

电离。利用质谱仪进行质谱法,质谱仪包括用于电离分级的样品和产生用于进一步分析的带电荷分子的离子源。例如样品的电离可通过电子电离、化学电离、电雾化电离 (ESI)、光电离、大气压化学电离 (APCI)、光电离、大气压光电离 (APPI)、激光二极管热解吸 (LDTD)、快原子轰击 (FAB)、液体二次电离 (LSI)、基体辅助激光解吸电离 (MALDI)、场致电离、场致解吸、热喷射 / 等离子体喷射电离、表面增强激光解吸电离 (SELDI)、电感耦合等离子体 (ICP) 和颗粒束电离进行。熟练的技术人员将理解,可基于将被测量的分析物、样品类型、检测器类型、阳性对阴性方式的选择等确定电离方法的选择。

[0100] 衍生的维生素 D 可以以阳性或阴性方式电离。在优选实施方式中,衍生的维生素 D 以阳离子方式通过 APCI 或 LDTD 而被电离。

[0101] 在质谱法技术中,通常在样品已被电离之后,可分析由此产生的带正电荷或带负电荷的离子以测定质荷比。测定质荷比的合适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。示例性的离子阱方法在 Bartolucci, et al., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2000, 14:967-73 中被描述。

[0102] 可利用几种检测方式来检测离子。例如,选择的离子可被检测,即利用选择性离子监测方式 (SIM),或可选地,由碰撞诱导解离产生的质量变迁或中性丧失可被监测,例如,多重反应监测 (MRM) 或选择性反应监测 (SRM)。优选,利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,振荡射频场中的离子经历与在电极之间施加的 DC 电势、RF 信号的振幅和质荷比成比例的力。可选择电压和振幅以便只有具有特定质荷比的离子经历四极的长度,而所有其它离子偏离。因此,四极仪器可充当注射进仪器的离子的“质量过滤器”和“质量检测器”。

[0103] 人们可通过利用“串联质谱法”或“MS/MS”提高 MS 技术的分辨率。在该技术中,可将感兴趣的分子产生的先驱离子(也称作母离子)在 MS 仪器中过滤,随后破碎先驱离子以产生一种或多种碎片离子(也称作子离子或产物离子),然后将其在第二 MS 程序中分析。通过仔细地选择先驱离子,只将某些分析物产生的离子送到碎裂室,在那里与惰性气体的原子碰撞产生碎片离子。因为先驱离子和碎片离子都在给定的电离 / 碎裂条件下以可再现的方式产生,所以 MS/MS 技术可提供非常强大的分析工具。例如,过滤 / 碎裂的组合可用于消除干扰物质,并可在复杂样品,如生物样品中特别有用。

[0104] 操作串联质谱仪器的替换方式包括产物离子扫描和先驱离子扫描。对于这些操作方式的描述,参见,例如, E. Michael Thurman, et al., *Chromatographic-Mass Spectrometric Food Analysis for Trace Determination of Pesticide Residues*, 第 8 章 (Amadeo R. Fernandez-Alba 编, Elsevier 2005) (387)。

[0105] 可通过本领域已知的为数众多的方法将分析物测定的结果与最初样品中分析物的量关联。例如,假定仔细控制采样和分析参数,可将给定离子的相对丰度与将该相对丰度转化成原始分子的绝对量的表比较。可选地,外标可与样品一起进行,基于从那些标准产生的离子作标准曲线。利用这样的标准曲线,可将给定离子的相对丰度转化成原始分子的绝对量。在某些优选实施方式中,内标用于产生计算维生素 D 的量的标准曲线。产生和利用这样的标准曲线的方法在本领域是众所周知的,普通技术人员能选择适当的内标。例如,在优选实施方式中,一种或多种同位素标记的维生素 D (例如,维生素 D₂-[6, 19, 19]-²H₃ 和维生素 D₃-[6, 19, 19]-²H₃) 可用作内标。将离子的量与原始分子的量相关联的为数众多的其

它方法对本领域的普通技术人员来说将是熟知的。

[0106] 方法的一个或多个步骤可利用自动化机器进行。在某些实施方式中,一个或多个纯化步骤联机进行,更优选所有的纯化和质谱法步骤可以以联机方式进行。

[0107] 在某些实施方式中,如 MS/MS,其中将先驱离子分离用于进一步碎裂,碰撞活化解离 (CAD) 常常用于产生碎片离子用于进一步检测。在 CAD 中,先驱离子通过与惰性气体碰撞而获得能量,并随后通过称作“单分子分解”的过程被破碎。足够的能量必须沉积在先驱离子中以便由于增加的振动能,离子内的某些键可被断裂。

[0108] 在一些优选实施方式中,可如下利用 MS/MS 检测和 / 或定量样品中的维生素 D。样品可首先通过蛋白质沉淀或杂化蛋白质沉淀 / 液 - 液提取来纯化。然后,任选地将纯化的样品中的维生素 D 用 Cookson 型试剂,如 PTAD 衍生。然后将纯化的样品进行液相色谱,优选在萃取柱 (如 TFLC 柱) 上,该萃取柱之后是分析柱 (如 HPLC 柱);来自色谱柱的液体溶剂流进入 MS/MS 分析器的雾化器接口;溶剂 / 分析物混合物在接口的加热的带电荷的管道中被转化成蒸汽。通过将大的电压施加到溶剂 / 分析物混合物而将溶剂中含有的分析物 (一种或多种) (例如,衍生的或未衍生的维生素 D) 电离。当分析物退出接口的带电荷的管道时,溶剂 / 分析物混合物雾化,溶剂蒸发,留下分析物离子。分析物离子,例如先驱离子,通过仪器的孔口并进入第一四极。四极 1 和 3 (Q1 和 Q3) 是质量过滤器,允许基于它们的质荷比 (m/z) 选择离子 (即,分别选择 Q1 和 Q3 中的“先驱”离子和“碎片”离子)。四极 2 (Q2) 是碰撞小室,离子在那里被破碎。质谱仪的第一四极 (Q1) 选择具有感兴趣的质荷比的离子。允许具有正确质 / 荷比的先驱离子进入碰撞室 (Q2),而具有任何其它质荷比的不需要的离子与四极的侧面撞击并被消除。进入 Q2 的先驱离子与中性氦气分子撞击并破碎。产生的碎片离子进入四极 3 (Q3),在那里衍生的或未衍生的维生素 D 碎片离子被选择,而其它离子被排除。

[0109] 方法可包括以阳离子方式或阴离子方式,优选阳离子方式进行的 MS/MS。利用本领域熟知的标准方法,本领域的技术人员能鉴定可用于四极 3 (Q3) 中选择的衍生的维生素 D 的特定先驱离子的一种或多种碎片离子。

[0110] 当离子与检测器碰撞时,它们产生电子脉冲,其被转换成数字信号。将获得的数据传递给计算机,计算机绘制收集的离子计数对时间的图。产生的质谱图与传统的 HPLC-MS 方法产生的色谱图相似。可测量对应于特定离子的峰下面积或这样的峰的振幅并使之与感兴趣的分析物的量相关联。在某些实施方式中,测量碎片离子 (一种或多种) 和 / 或先驱离子的曲线下面积或峰的振幅,以测定维生素 D 的量。如上所述,基于内部分子标准的一种或多种离子的峰,可利用校正标准曲线将给定离子的相对丰度转换成原始分析物的绝对量。

实施例

[0111] 实施例 1:杂化蛋白质沉淀 / 液 - 液提取和 Cookson 型衍生

[0112] 对患者血清样品进行以下自动化的杂化蛋白质沉淀 / 液 - 液提取技术。已将凝胶屏障血清 (Gel Barrier Serum) (即,在血清分离管中采集的血清) 以及 EDTA 血浆和肝素血浆建立为该测定所接受的。

[0113] Perkin-Elmer Janus 机器人和 TomTec Quadra Tower 机器人用于使以下程序自动化。对于每个样品,将 50 μ L 血清加到 96 孔板的孔中。然后向每个孔中加入 25 μ L 内标混

合物（包含同位素标记的维生素 D₃-[6, 19, 19]-²H₃），并将板涡旋。然后加入 75 μL 甲醇，之后进行另外的涡旋。然后加入 300 μL 乙酸乙酯和 75 μL 水，之后进行另外的涡旋、离心，并将得到的上清液转移到新的 96 孔板。

[0114] 将第二 96 孔板中的转移的液体在流动的氮气歧管下干燥完全。通过向每个孔加入 100 μL 的乙腈中的 Cookson 型衍生剂 PTAD 的 0.1mg/mL 溶液来实现衍生。允许衍生反应进行大约一个小时，并通过向反应混合物中加入 100 μL 水而使之淬灭。

[0115] 实施例 2：用液相色谱提取维生素 D

[0116] 利用 Aria OS V 1.5.1 或更新的软件用 Cohesive Technologies Aria TX-4 TFLC 系统进行样品注射。

[0117] TFLC 系统自动化地将上述制备的样品的等分试样注射进填充有大颗粒的 Cohesive Technologies C8XL 联机萃取柱（50 μm 粒度，005×50mm，来自 Cohesive Technologies, Inc.）。在高流速下装载样品以在萃取柱内部产生湍流。该湍流确保柱中衍生的维生素 D 与大颗粒优化的结合，和过量衍生试剂和碎片到废物的通道。

[0118] 装载之后，用水 / 乙醇洗脱梯度将样品洗脱到分析柱——Thermo Hypersil Gold Aq 分析柱（5 μm 粒度，50×2.1mm）。将 HPLC 梯度施加到分析柱以将维生素 D 与样品中含有的其它分析物分离。流动相 A 是水，流动相 B 是乙醇。HPLC 梯度从 35% 有机梯度开始，其在大约 65 秒中上升到 99%。

[0119] 实施例 3：通过 MS/MS 检测和定量衍生的维生素 D

[0120] 利用 Finnigan TSQ Quantum Ultra MS/MS 系统 (Thermo Electron Corporation) 对上面产生的样品进行 MS/MS。以下软件程序——所有都来自 Thermo Electron——在本文描述的实施例中使用：Quantum Tune Master V 1.5 或更新的、Xcalibur V 2.07 或更新的、LCQuan V 2.56 (Thermo Finnigan) 或更新的和 ARIA OS v1.5.1 (Cohesive Technologies) 或更新的。退出分析柱的液体溶剂 / 分析物流到 MS/MS 分析器的雾化器接口。在接口的管道中溶剂 / 分析物混合物被转化成蒸汽。雾化的溶剂中的分析物通过 APCI 被电离。

[0121] 离子经过第一四极 (Q1)，其选择分别具有质荷比 $572.3 \pm 0.5m/z$ 和 $560.3 \pm 0.5m/z$ 的维生素 D₂ 和维生素 D₃ 先驱离子。进入四极 2 (Q2) 的离子与氦气碰撞，产生离子碎片，其被送到四极 3 (Q3) 用于进一步选择。质谱仪设置显示在表 1。同时，用内标，维生素 D₃-[6, 19, 19]-²H₃ 进行利用同位素稀释质谱法的相同的过程。在正极性和指示的碰撞能量下验证的过程中用于检测和质量变迁显示在表 2。

[0122] 表 1. 用于 PTAD- 维生素 D₂、PTAD- 维生素 D₃ 和维生素 D₃-[6, 19, 19]-²H₃ (内标) (正极性) 检测的质谱仪设置

[0123]

质谱仪器设置	
放电电流	4.0 μ A
蒸发器温度	300 $^{\circ}$ C
护套气压 (Shear Gas Pressure)	15
离子扫除气压 (Ion Sweep Gas Pressure)	0.0
辅助气压	5
毛细管温度	300 $^{\circ}$ C
撇乳器补偿 (Skimmer Offset)	-10 V
碰撞压力	1.5 毫托
碰撞小室能量	15 V

[0124] 表 2. PTAD 衍生的维生素 D₂、维生素 D₃ 和维生素 D₃-[6, 19, 19]-²H₃ (内标) (正极性) 的质量变迁

[0125]

分析物	先驱离子(m/z)	产物离子(m/z)
PTAD-维生素 D ₂	572.3 \pm 0.5	298.1 \pm 0.5
PTAD-维生素 D ₃	560.3 \pm 0.5	298.1 \pm 0.5
PTAD-维生素 D ₃ - [6, 19, 19]- ² H ₃	563.3 \pm 0.5	301.1 \pm 0.5

[0126]

[0127] PTAD- 维生素 D₂、PTAD- 维生素 D₃、PTAD- 维生素 D₃-[6, 19, 19]-²H₃ (内标) 的示例性色谱图分别显示在图 1A、1B 和 1C 中。

[0128] 血清样本中的维生素 D₂ 和维生素 D₃ 的测定的示例性校正曲线分别显示在图 2A 和 2B 中。

[0129] 实施例 4: 衍生的维生素 D MS/MS 检测响应的线性

[0130] 根据实施例 1-3 的方法, 通过用高内源性浓度的维生素 D₂ 或维生素 D₃ 稀释四个血清集合 (pool) 和分析 75%、50% 和 25% 的稀释液 (一式两份) 来测定线性。样本可以以 1:4 稀释, 具有 102% 的平均回收率, 允许在 85%-115%CV 的精确度限值内 2-240ng/mL 的临床可报告范围 (CRR)。这些研究的测量值和回收率百分比显示在表 3 中。

[0131] 表 3. 显示稀释范围内响应的线性的数据

营养性维生素 D ₂ (ng/mL (回收率百分比 %))						
浓度	集合 1	集合 2	集合 3	集合 4	集合 5	集合 6
100%	25.0 (100)	24.5 (100)	28.1 (100)	24.4 (100)	28.1 (100)	26.7 (100)
75%	17.8 (95.3)	17.5 (95.4)	21.9 (103.7)	17.3 (94.5)	21.2 (100.4)	20.1 (100.5)
50%	12.8 (102.3)	13.0 (106.2)	14.0 (99.4)	13.8 (112.8)	14.8 (105.7)	11.8 (88.9)
25%	6.7 (107.9)	6.2 (101.4)	7.7 (109.6)	6.7 (109.6)	7.3 (104.1)	7.4 (110.7)
营养性维生素 D ₃ (ng/mL (回收率百分比%))						
样品浓度	集合 1	集合 2	集合 3	集合 4	集合 5	集合 6
100%	31.2 (100)	33.5 (100)	33.4 (100)	29.1 (100)	29.6 (100)	30.6 (100)
75%	22.1 (94.2)	23.6 (93.8)	25.8 (102.8)	22.0 (100.8)	24.8 (111.9)	24.1 (104.8)
50%	15.9 (101.9)	16.1 (96.1)	16.5 (98.5)	15.7 (107.8)	15.9 (107.8)	15.0 (98.0)
25%	7.6 (97.6)	7.9 (94.3)	8.5 (101.8)	7.3 (100.4)	8.0 (108.4)	8.0 (105.0)

[0134] 实施例 5 :分析灵敏度 :定量下限 (LLOQ) 和检测限值 (LOD)

[0135] 定量下限 (LLOQ) 是测量变得在数量上有意义的点。在该 LLOQ 的分析物响应是可识别的、离散的和可再现的,具有大于 20% 的精确度 (即,变异系数 (CV)) 和 80% 至 120% 的准确度。根据实施例 1-3 的方法,通过测定具有已知的分析物浓度 (2ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、15ng/mL、20ng/mL、40ng/mL 和 60ng/mL) 的样品一式四份五次,然后评价再现性来测定 LLOQ。对收集的数据的分析表明,对于两种分析物,具有小于 2ng/mL 浓度的样品都产生小于 20% 的 CVs。因此,每种分析物的 LLOQ 被确定为小于 2ng/mL。PTAD- 维生素 D₂ 和 PTAD- 维生素 D₃ 的 LLOQ 测定产生的数据分别显示在表 4 和 5 中。两种分析物的 CV 对浓度的图形表示显示在图 3 中。

[0136] 表 4. 维生素 D₂ 的定量下限的测定

[0137]

维生素 D ₂ 浓 度 (ng/mL)	测 定 1	测 定 2	测 定 3	测 定 4	测 定 5		
2	2.1	1.9	2.1	1.9	2.0	平均值	2.04
	1.7	2.0	2.1	1.9	2.0	标准偏差	0.2
	1.9	2.0	2.2	2.2	2.3	CV (%)	8.5
	1.9	1.9	2.1	2.5	2.2	准确度 (%)	101.8
5	4.0	6.2	4.3	4.7	4.0	平均值	4.7
	NC	4.6	4.6	4.6	4.6	标准偏差	0.6
	4.6	5.6	5.1	4.7	4.3	CV (%)	12.8
	5.7	4.1	4.6	4.6	5.3	准确度 (%)	94.8
10	9.8	11.2	10.8	11.3	10.3	平均值	10.3
	11.3	9.6	8.6	10.0	10.9	标准偏差	0.7
	10.9	10.6	9.9	9.6	10.1	CV (%)	6.9
	10.0	9.7	9.6	10.2	10.9	准确度 (%)	102.6
15	13.6	14.7	15.6	15.0	14.5	平均值	14.6
	13.0	16.2	15.6	12.7	17.4	标准偏差	1.2
	13.6	13.4	13.6	14.1	13.4	CV (%)	8.2
	14.8	14.6	16.0	14.8	14.6	准确度 (%)	97.1
20	19.4	19.1	20.3	19.9	19.1	平均值	20.2
	22.0	18.6	20.7	21.6	19.4	标准偏差	1.0
	19.0	21.1	21.9	20.8	20.1	CV (%)	4.9
	20.0	19.6	19.3	20.7	20.4	准确度 (%)	100.8
40	42.2	41.5	39.1	42.5	41.8	平均值	40.3
	39.2	40.6	39.8	39.0	37.8	标准偏差	1.6
	40.2	40.0	41.3	40.4	37.6	CV (%)	3.9
	41.1	39.6	38.9	39.6	43.6	准确度 (%)	100.7
60	64.4	57.8	59.1	59.3	57.0	平均值	59.8
	57.4	61.4	62.3	60.8	65.2	标准偏差	2.5
	58.9	59.2	56.8	59.0	62.0	CV (%)	4.2
	58.1	61.1	61.8	59.7	55.6	准确度 (%)	99.7

[0138]

[0139] 表 5. 维生素 D₃ 的定量下限的测定

维生素 D ₃ 浓 度 (ng/mL)	测 定	测 定	测 定	测 定	测 定		
	1	2	3	4	5		
2	2.1	1.6	2.2	2.0	1.8	平均值	2.03
	2.1	1.8	2.2	1.8	1.8	标准偏差	0.3
	1.6	2.3	2.0	2.3	1.7	CV (%)	14.3
	2.0	2.5	2.0	2.0	2.7	准确度 (%)	101.4
5	4.7	5.6	4.6	5.0	4.9	平均值	5.0
	7.1	4.9	4.7	5.3	4.4	标准偏差	0.6
	4.6	5.0	5.4	5.5	5.0	CV (%)	12.2
	4.6	4.7	4.3	4.7	5.1	准确度 (%)	99.7
10	9.4	10.2	10.1	9.9	11.0	平均值	10.0
	11.6	9.6	9.3	10.3	10.0	标准偏差	0.7
	10.1	10.2	9.2	9.0	11.3	CV (%)	7.5
	9.5	8.6	10.0	9.5	10.2	准确度 (%)	99.5
15	14.5	14.9	14.4	15.7	15.8	平均值	15.0
	14.2	16.6	15.7	12.8	15.5	标准偏差	0.9
	15.3	13.8	14.2	15.1	14.4	CV (%)	6.3
	15.7	15.1	16.1	16.0	14.2	准确度 (%)	100.0
20	19.8	18.4	18.2	22.2	17.5	平均值	19.5
	19.0	19.1	25.0	19.9	20.9	标准偏差	1.7
	17.8	20.1	20.0	20.1	18.3	CV (%)	8.9
	17.8	19.7	19.7	18.6	18.6	准确度 (%)	97.7
40	44.3	41.7	40.6	39.1	42.0	平均值	41.0
	39.3	40.3	38.5	40.2	38.6	标准偏差	1.8
	42.6	42.6	42.0	41.7	40.1	CV (%)	4.4
	42.2	42.1	37.8	40.3	44.0	准确度 (%)	102.5
60	65.0	57.0	60.3	60.6	55.7	平均值	59.5
	57.6	61.5	61.1	59.3	62.6	标准偏差	2.7
	55.4	55.6	56.9	60.0	61.6	CV (%)	4.5
	58.2	62.4	61.7	59.3	58.1	准确度 (%)	99.2

[0142] 检测限值 (LOD) 是这样的点, 在该点, 测量值大于与其相关的不确定度并被任意地定义为零浓度时的 4 倍标准偏差 (SD)。选择性是在样品中存在其它组分的情况下分析方法区分和定量分析物的能力。根据实施例 1-3 的方法, 在 20 个平行测定 (replicate) 中分析空白, 并在统计学上分析产生的面积比, 测得维生素 D₂ 和维生素 D₃ 的 LOD 都是 0.4ng/

mL。所收集的用于测定每种分析物的 LOD 的数据显示在表 6 中。

[0143] 表 6. 维生素 D₂ 和维生素 D₃ 的检测限值的测定

[0144]

平行测定编号	NVD ₂ (响应比)	NVD ₃ (响应比)
1	0.012	0.014
2	0.004	0.005
3	0.008	0.011
4	0.005	0.004
5	0.018	0.03
6	0.004	0.001
7	0.007	0.006
8	0.006	0.002
9	0.014	0.006
10	0.015	0.006
11	0.003	0.008
12	0.005	0.004
13	0.009	0.002
14	0.017	0.016
15	0.007	0.005
16	0.006	0.012
17	0.003	0.001
18	0.002	0.001
19	0.011	0.001
20	0.023	0.009
平均值	0.009	0.007

SD	0.0058	0.0070
CV	65.1	97.0
平均值 +4SD	0.032	0.035
LOD	0.4ng/mL	0.4ng/mL

[0145]

[0146] 实施例 7 :检测的特异性

[0147] 根据实施例 1-3 的方法用维生素 D₂、维生素 D₃ 和掺入量的潜在的干扰物种（包括维生素 D 代谢物和相关化合物）制备几个样品并进行分析。将测试了潜在干扰的化合物列在表 7 中。根据实施例 1-3 的方法，测试的化合物都没有显示与维生素 D₂ 或维生素 D₃ 检测的交叉反应性。

[0148] 表 7. 测试可能干扰维生素 D₂ 或维生素 D₃ 检测的化合物

[0149]

测试的化合物
1, 25(OH) ₂ D ₃
1, 25(OH) ₂ D ₂
1, 25(OH) ₂ D ₃ -[6, 19, 19']- ² H
1, 25(OH) ₂ D ₃ -[26, 26, 26, 27, 27, 27]- ² H
1, 25(OH) ₂ D ₂ -[26, 26, 26, 27, 27, 27]- ² H
25OHD ₃
25OHD ₂
25OHD ₃ -IS-[6, 19, 19']- ² H
25OHD ₂ -IS-[6, 19, 19']- ² H
25OHD ₃ -IS-[26, 26, 26, 27, 27, 27]- ² H
25OHD ₂ -IS-[26, 26, 26, 27, 27, 27]- ² H
维生素 D ₃ -[6, 19, 19']- ² H
维生素 D ₂ -[6, 19, 19']- ² H

维生素 D ₃ -[26, 26, 26, 27, 27, 27] ⁻² H
维生素 D ₂ -[26, 26, 26, 27, 27, 27] ⁻² H
1-OH-D ₃ (阿法骨化醇)
1-OH-D ₂ (Hectoral)
24, 25(OH) 2D3
25, 26(OH) 2D3
3-表-25OHD3
3-表-1, 25(OH) 2D3
二氢速甾醇
1, 25(OH) 2D3-26, 23-内酯
旁卡西醇 (Paracalcitol) (Zemplar)
卡泊三烯 (Calcipotriene) (Dovonex)
7-脱氢胆甾醇

[0150]

[0151] 实施例 8: 维生素 D₂ 和维生素 D₃ 定量的再现性

[0152] 批内 (测定内, intra-assay) 变异被定义为测定内样品的再现性, 并根据实施例 1-3 的方法通过测定来自三个 QC 集合中每个的样品的 20 个平行样品来测定。分别针对维生素 D₂ 和维生素 D₃, 从这些分析中收集的数据显示在表 8 和 9 中。QC 集合中的分析物浓度对于维生素 D₂ 被测定为 6.6ng/mL、20.6ng/mL 和 52.6ng/mL, 对于维生素 D₃ 被测定为 4.9ng/mL、20.5ng/mL 和 48.6ng/mL。对结果进行的统计学产生对于维生素 D₂ 在 5.1%、4.6% 和 3.9% 的三个 QC 集合的再现性, 对于维生素 D₃ 在 6.4%、4.0% 和 4.5% 的三个 QC 集合的再现性。

[0153] 表 8. 维生素 D₂ 的批内变异测定

[0154]

	低 QC 集合(ng/mL)	中 QC 集合(ng/mL)	高 QC 集合(ng/mL)
	批 号 120709-L	批 号 120709-M	批号 120709-H
1	6.7	20.3	52.5
2	6.6	21.0	54.7
3	7.0	21.1	51.5
4	6.2	19.5	52.1
5	6.4	20.0	52.0
6	6.2	22.4	53.3
7	7.0	20.4	48.9
8	6.7	21.5	54.6
9	6.7	21.5	52.4
10	6.9	20.9	52.5
11	7.0	19.2	50.2
12	6.2	20.8	52.3
13	7.0	19.6	57.5
14	6.6	20.6	54.7
15	6.2	19.8	53.0
16	6.2	20.6	49.2
17	6.2	22.9	52.5
18	6.2	20.9	51.4
19	7.0	19.6	52.2
20	6.5	20.3	55.2
平均值	6.6	20.6	52.6
SD	0.3	1.0	2.0
CV %	5.1	4.6	3.9

[0155]

[0156] 表 9. 维生素 D₃ 的批内变异测定

[0157]

	低 QC 集合(ng/mL)	中 QC 集合(ng/mL)	高 QC 集合(ng/mL)
	批 号	批 号	
	120709-L	120709-M	批号 120709-H
1	4.3	20.0	48.3
2	5.1	21.8	47.2
3	4.8	21.7	45.4
4	4.5	21.3	49.9
5	5.0	20.5	49.8
6	4.7	21.0	48.2
7	5.8	20.4	46.3
8	4.9	21.2	50.8
9	4.7	22.0	49.1
10	4.7	20.1	48.9
11	4.8	19.1	47.3
12	4.7	19.9	49.1
13	4.9	19.5	52.9
14	5.4	20.3	52.7
15	4.7	19.6	51.3
16	4.8	19.9	46.7
17	4.8	21.0	47.5
18	4.7	21.1	46.9
19	5.0	19.7	45.3
20	5.1	20.4	48.8
平均值	4.9	20.5	48.6
SD	0.3	0.8	2.2
CV %	6.4	4.0	4.5

[0158]

[0159] 将批间（测定间，inter-assay）变异定义为测定之间样品的再现性（CV）。根据实施例 1-3 的方法，利用三个覆盖测定的可报告范围的 QC 集合——在 5 个测定中评价的，针对维生素 D₂ 和维生素 D₃ 测定集合的批间变异（CV）。对于维生素 D₂，CV 分别被测定为 6.7%、5.6% 和 4.0%，具有 6.5ng/mL、21.1ng/mL 和 50.5ng/mL 的平均浓度。对于维生素 D₃，CV 分别被测定为 6.5%、5.9% 和 4.2%，具有 4.7ng/mL、20.8ng/mL 和 46.8ng/mL 的平均浓度。针对维生素 D₂ 和维生素 D₃，从这些分析收集的数据分别显示在表 10 和 11 中。所有的集合满足 ≤ 15%CV 的可接受的再现性要求。

[0160] 表 10. 维生素 D₂ 的批间变异测定

[0161]

测定	低 QC 集合(ng/mL)	中 QC 集合(ng/mL)	高 QC 集合(ng/mL)
	批号 120709-L	批号 120709-M	批号 120709-H
1	6.7	20.3	52.5
	6.6	21.0	54.7
	7.0	21.1	51.5
	6.2	19.5	52.1
	6.4	20.0	52.0
2	7.3	23.3	49.4
	6.8	22.1	51.6
	6.7	20.6	48.6
	6.7	20.6	47.2
	7.0	21.1	50.4
3	6.3	22.3	49.7
	6.1	23.0	52.2
	6.6	24.0	49.5
	5.6	22.1	49.6
	6.1	19.1	51.7
4	6.1	20.5	47.5
	7.0	21.1	50.1
	6.9	22.2	50.2
	7.3	22.1	48.3
	6.6	20.2	46.8
5	5.8	21.1	52.4
	6.9	19.6	49.6
	6.0	20.8	49.1
	6.4	20.6	56.1
	6.3	20.1	50.8
6	6.3	21.8	50.0
	7.0	22.5	49.8
	6.2	21.6	51.2
	5.9	20.1	50.3
	6.9	20.1	50.9
平均值	6.5	21.1	50.5
SD	0.4	1.2	2.0
CV %	6.7	5.6	4.0

[0162]

[0163] 表 11. 维生素 D₃ 的批间变异测定

[0164]

测定	低 QC 集合(ng/mL)	中 QC 集合(ng/mL)	高 QC 集合(ng/mL)
	批号 120709-L	批号 120709-M	批号 120709-H
1	4.3	20.0	48.3
	5.1	21.8	47.2
	4.8	21.7	45.4
	4.5	21.3	49.9
	5.0	20.5	49.8
2	4.5	23.0	46.3
	4.2	22.8	47.8
	4.5	19.8	45.1
	4.4	20.1	44.4
	4.7	21.1	48.7
3	4.9	21.8	44.9
	5.1	20.9	46.8
	5.2	23.9	45.5
	4.4	22.1	45.7
	4.6	19.3	47.1
4	4.5	20.1	43.7
	4.8	21.2	44.6
	5.2	21.9	46.1
	4.7	21.3	44.1
	4.7	20.5	42.8
5	4.5	20.5	49.1
	5.1	20.8	46.9
	4.5	21.3	47.3
	4.8	20.6	45.8
	4.2	19.7	46.1
6	4.7	19.9	49.6
	4.7	18.9	47.6
	4.4	20.2	48.9
	4.4	18.6	48.5
	5.2	19.4	49.4
平均值	4.7	20.8	46.8
SD	0.3	1.2	2.0
CV %	6.5	5.9	4.2

[0165]

[0166] 实施例 9 :维生素 D₂ 定量的方法相关研究

[0167] 通过用广泛的脱机提取——之后是带UV检测的HPLC——比较20个根据本文描述的串联质谱方法分析的单独的样品,对根据实施例1-3方法的维生素D₂的定量进行方法相关研究。对于每个方法,对样本单独进行分析。数据通过线性回归和Deming回归来分析。相关分析概括在表12中。

[0168] 表12. 方法比较的相关分析

[0169]

维生素 D ₂ (n=20)	
L 线性回归	$y = 1.26x - 0.55$ $R_2 = 0.96$
Deming 回归	$y = 1.29x - 1.31$

[0170] 实施例10:干扰研究

[0171] 溶血干扰:通过将血红蛋白掺入包含提高的维生素D₂和维生素D₃的血清集合来评价溶血在实施例1-3中描述的测定中的影响。将新鲜血液样品离心以产生浓集红血细胞(packed red blood cells)。将细胞在去离子水中重构并冷冻以获得细胞溶解。然后将该粗制的血红蛋白溶液掺入到集合以产生轻度(100mg/dL)和中度(500mg/dL)的溶血样品。根据实施例1-3中的方法将样本一式两份进行分析,并将结果与对照集合结果比较和计算差异百分比。数据显示,对于任一个分析物,与对照相比,血红蛋白掺入都没有>15%不同)。因此,轻至中度溶血的样本是可接受的。对于原始数据,参见表13(%差异=(掺入的 - 未掺入的)/未掺入的×100%)。

[0172] 表13. 溶血干扰研究

		维生素 D ₂		维生素 D ₃	
		ng/mL	%差异	ng/mL	%差异
集合 1	对照	22.1		31.2	
	轻度溶血	24.3	9.7	33.8	8.5
	中度溶血	23.8	7.6	34.3	10.0
集合 2	对照	22.3		34.8	
	轻度溶血	21.3	-4.8	32.6	-6.4
	中度溶血	20.7	-7.2	33.3	-4.5
集合 3	对照	27.3		34.6	
	轻度溶血	26.7	-2.2	34.7	0.2
	中度溶血	24.6	-9.8	33.4	-3.5
集合 4	对照	23.7		30.4	
	轻度溶血	22.8	-3.8	31.5	3.6
	中度溶血	21.2	-10.6	29.8	-2.0
集合 5	对照	27.7		33.9	
	轻度溶血	26.7	-3.4	33.7	-0.4
	中度溶血	25.6	-7.5	33.2	-1.9
集合 6	对照	24.2		33.6	
	轻度溶血	24.3	0.3	33.5	-0.4
	中度溶血	24.1	0.5	34.1	1.3

[0174] 黄疸干扰: 通过将胆红素掺入包含提高的维生素 D₂ 和维生素 D₃ 的血清集合来评价黄疸在实施例 1-3 中描述的测定中的影响。将浓缩的胆红素溶液掺入到集合以产生轻度 (10mg/dL) 和中度 (50mg/dL) 的黄疸样品。根据实施例 1-3 中的方法将样本一式两份进行分析, 并将结果与无黄疸集合结果比较和计算准确度。数据显示, 两个分析物都未受黄疸影响 (所有的值都在 85-115% 的可接受的准确度范围内)。因此, 黄疸样本是可接受的。对于原始数据, 参见表 14 (% 差异 = (掺入的 - 未掺入的) / 未掺入的 × 100%)。

[0175] 表 14. 黄疸干扰研究

		维生素 D ₂		维生素 D ₃	
		ng/mL	%差异	ng/mL	%差异
集合 1	对照	22.1		31.2	
	轻度黄疸	22.2	0.3	32.6	4.8
	中度黄疸	21.5	-2.6	30.7	-1.6
集合 2	对照	22.3		34.8	
	轻度黄疸	22.0	-1.3	33.4	-4.0
	中度黄疸	20.5	-8.2	32.4	-6.9
集合 3	对照	27.3		34.6	
	轻度黄疸	28.3	3.8	35.2	1.8
	中度黄疸	27.1	-0.7	35.0	1.0
集合 4	对照	23.7		30.4	
	轻度黄疸	22.2	-6.3	31.7	4.0
	中度黄疸	21.7	-8.7	30.7	1.0
集合 5	对照	27.7		33.9	
	轻度黄疸	26.7	-3.7	32.9	-2.8
	中度黄疸	27.1	-2.0	32.4	-4.4
集合 6	对照	24.2		33.6	
	轻度黄疸	22.8	-5.8	31.8	-5.5
	中度黄疸	22.6	-6.4	30.5	-9.4

[0177] 脂血症干扰: 通过将猪脑提取物掺入包含提高的维生素 D₂ 和维生素 D₃ 的血清集合来评价脂血症在实施例 1-3 中描述的测定中的影响。将粉末状脂质样品 (Avanti Polar Lipids) 溶解到每个集合中以产生轻度 (400mg/dL) 和 中度 (2000mg/dL) 的脂血样品。根据实施例 1-3 中的方法将样本一式两份进行分析, 并将结果与对照集合结果比较和计算准确度。数据显示, 两个分析物都未受脂血症影响 (所有的值都在 85-115% 的可接受的准确度范围内)。对于原始数据, 参见表 15 (% 差异 = (掺入的 - 未掺入的) / 未掺入的 × 100%)。

[0178] 表 15. 脂血症干扰 (猪脑提取物) 研究

		维生素 D ₂		维生素 D ₃	
		ng/mL	%差异	ng/mL	%差异
集合 1	对照	22.1		31.2	

	轻度脂血症	22.0	-0.6	32.7	4.8
	中度脂血症	23.0	3.8	32.7	5.0
集合 2	对照	22.3		34.8	
	轻度脂血症	23.0	3.2	35.4	1.6
	中度脂血症	24.2	8.3	34.7	-0.2
集合 3	对照	27.3		34.6	
	轻度脂血症	28.7	5.4	35.7	2.9
	中度脂血症	28.1	3.3	36.5	5.3
集合 4	对照	23.7		30.4	
	轻度脂血症	25.5	7.4	33.2	9.0
	中度脂血症	23.2	-2.5	32.7	7.3
集合 5	对照	27.7		33.9	
	轻度脂血症	27.1	-2.2	34.4	1.5
	中度脂血症	26.7	-3.4	33.9	0.1
集合 6	对照	24.2		33.6	
	轻度脂血症	26.1	8.0	34.5	2.5
	中度脂血症	24.0	-0.7	33.6	-0.2

[0181] 还通过将英脱利匹特 (Intralipid) 乳剂掺入包含评价的维生素 D₂ 和维生素 D₃ 的血清集合来评价脂血症在实施例 1-3 中描述的测定中的影响。向血清集合中加入英脱利匹特 (20% 乳剂) 以产生轻度 (400mg/dL) 和中度 (2000mg/dL) 的脂血样品。根据实施例 1-3 中的方法将样本一式两份进行分析, 并将结果与对照集合结果比较和计算准确度。数据显示, 两个分析物都未受脂血症影响 (所有的值都在 85-115% 的可接受的准确度范围内)。对于原始数据, 参见表 16。

[0182] 表 16. 脂血症干扰 (英脱利匹特) 研究

		维生素 D ₂		维生素 D ₃	
		ng/mL	%差异	ng/mL	%差异
集合 1	对照	22.1		31.2	
	轻度脂血症	22.5	1.6	33.3	6.8
	中度脂血症	19.8	-10.4	28.8	-7.6
集合 2	对照	22.3		34.8	
	轻度脂血症	22.4	0.4	33.5	-3.6
	中度脂血症	19.2	-13.8	30.5	-12.3

[0184]	集合 3	对照	27.3		34.6	
		轻度脂血症	27.4	0.6	34.5	-0.3
		中度脂血症	24.9	-8.6	32.5	-6.1
	集合 4	对照	23.7		30.4	
		轻度脂血症	23.6	-0.6	31.3	3.0
		中度脂血症	19.9	-16.0	29.8	-2.0
	集合 5	对照	27.7		33.9	
		轻度脂血症	27.4	-1.1	32.0	-5.6
		中度脂血症	25.8	-6.9	31.9	-5.9
	集合 6	对照	24.2		33.6	
		轻度脂血症	24.5	1.2	33.8	0.6
		中度脂血症	22.8	-5.9	30.0	-10.7

[0185] 基于利用猪脑提取物和英脱利匹特的两个脂血症实验,脂血样本是可接受的。

[0186] 实施例 11:样本类型研究

[0187] 将样本从 10 个来源收集到四个不同的 Vacutainer® 容器中。使用的 Vacutainers 是 Red-Top (涂布硅的血清管)、SST (血清分离管,其导致凝胶屏障血清)、EDTA 管和肝素钠管。

[0188] 根据实施例 1-3 中的方法分析这 40 个样品的营养性维生素 D₃。比较的结果呈现在图 4 中。数据显示,所有四个样品类型都适合分析。

[0189] 实施例 12:维生素 D₃ 的常规范围的证明

[0190] 根据实施例 1-3 中描述的方法分析来自 140 个患者的血清样本以定量维生素 D₃。结果是范围为 <2ng/mL 至约 63ng/mL 的维生素 D₃,95% 的结果落进 <2ng/mL 至约 20ng/mL 的范围。这些分析的结果呈现在表 17 中。

[0191] 表 17. 维生素 D₃ 的常规范围研究 (以递减次序)

[0192]

患者	维生素 D ₃ (ng/mL)	患者	维生素 D ₃ (ng/mL)	患者	维生素 D ₃ (ng/mL)	患者	维生素 D ₃ (ng/mL)
1	62.8	36	4.3	71	<2	106	<2
2	35.8	37	4.2	72	<2	107	<2
3	24.3	38	4.2	73	<2	108	<2
4	20.2	39	4.0	74	<2	109	<2
5	15.6	40	3.9	75	<2	110	<2

[0193]

6	15.6	41	3.9	76	<2	111	<2
7	15.5	42	3.9	77	<2	112	<2
8	14.6	43	3.7	78	<2	113	<2
9	14.3	44	3.6	79	<2	114	<2
10	12.7	45	3.4	80	<2	115	<2
11	12.7	46	3.3	81	<2	116	<2
12	12.5	47	3.2	82	<2	117	<2
13	10.5	48	3.2	83	<2	118	<2
14	10.3	49	3.2	84	<2	119	<2
15	9.8	50	3.2	85	<2	120	<2
16	9.6	51	3.2	86	<2	121	<2
17	9.6	52	3.1	87	<2	122	<2
18	7.9	53	2.8	88	<2	123	<2
19	7.4	54	2.8	89	<2	124	<2
20	6.6	55	2.7	90	<2	125	<2
21	6.5	56	2.6	91	<2	126	<2
22	6.4	57	2.6	92	<2	127	<2
23	5.9	58	2.5	93	<2	128	<2
24	5.8	59	2.3	94	<2	129	<2
25	5.5	60	2.2	95	<2	130	<2
26	5.4	61	2.2	96	<2	131	<2
27	5.3	62	2.2	97	<2	132	<2
28	5.1	63	2.2	98	<2	133	<2
29	5.1	64	2.1	99	<2	134	<2
30	5.0	65	2.0	100	<2	135	<2
31	4.9	66	2.0	101	<2	136	<2
32	4.8	67	2.0	102	<2	137	<2
33	4.6	68	2.0	103	<2	138	<2
34	4.6	69	<2	104	<2	139	<2
35	4.4	70	<2	105	<2	140	<2

[0194] 实施例 13 :回收研究

[0195] 通过具有天然地升高水平的 25-羟基维生素 D₂ 或 25-羟基维生素 D₃ 的样本的分析来进行混合回收研究,因此还具有有一些内源性循环维生素 D₂ 或维生素 D₃。选择六对样本用于研究。根据实施例 1-3 中的方法从每对样本(在属类上被称作样本 A 和样本 B)制备五个样品并一式四份进行分析。样品对应于 100%A、80%A-20%B、50%A-50%B、20%A-80%B 和 100%B。回收研究的结果呈现在表 18 和 19 中。

[0196] 表 18. 混合样本回收研究

[0197]

集合	掺料水平	维生素 D ₂			维生素 D ₃		
		测量的 (ng/mL)	预期的 (ng/mL)	回收 (%)	测量的 (ng/mL)	预期的 (ng/mL)	回收 (%)
1	100% A	49.0			2.1		
	80/20 A/B	37.8	39.3	103.8	3.3	3.5	106.1
	50/50 A/B	26.0	24.7	94.8	5.6	5.5	96.9
	20/80 A/B	10.5	10.1	96.5	7.6	7.5	98.5
	100% B	0.4			8.8		
2	100% A	5.0			2.6		
	80/20 A/B	4.9	4.2	85.5	6.6	6.6	99.4
	50/50 A/B	2.9	2.9	101.7	11.8	12.5	106.2
	20/80 A/B	1.6	1.7	106.2	17.7	18.5	104.3
	100% B	0.9			22.4		
3	100% A	8.8			3.0		
	80/20 A/B	7.6	7.4	96.7	6.6	6.6	101.2
	50/50 A/B	5.4	5.2	95.8	11.3	12.1	106.7
	20/80 A/B	3.1	3.0	99.1	16.3	17.5	107.6
	100% B	1.6			21.2		

[0198] * 测量的值是四个等分试样分析的平均值。

[0199] 表 19. 混合样本回收研究结果概述

集合	维生素 D ₂	维生素 D ₃
1	103.8%	106.1%
	94.8%	96.9%
	96.5%	98.5%
2	85.5%	99.4%
	101.7%	106.2%
	106.2%	104.3%
3	96.7%	101.2%
	95.8%	106.7%
	99.1%	107.6%
平均值	97.8%	103.0%
平均值	100.4%	

[0201] 实施例 14 : 维生素 D₂ 和维生素 D₃ 的 MS/MS 分析的示例性光谱

[0202] 来自维生素 D₂、维生素 D₂ - [6, 19, 19]⁻²H₃ 和维生素 D₂ - [26, 26, 26, 27, 27, 27]⁻²H₆ 的串联质谱分析的示例性 Q1 扫描谱分别显示在图 5A、6A 和 7A 中。通过直接将含有感兴趣的分析物的标准溶液注射进 Finnigan TSQ Quantum Ultra MS/MS 系统 (Thermo Electron Corporation) 来进行这些分析。通过将 800 μ L/min 的 80% 乙腈、具有 0.1% 甲酸的 20% 水

通过 HPLC 柱,分析物导入的上游,来模拟液相色谱流动相。如上所描述的分析物通过 APCI 被电离。通过在约 300 至 450 的整个 m/z 范围扫描 Q1 来收集光谱。

[0203] 从维生素 D₂、维生素 D₂ - [6, 19, 19]⁻²H₃ 和维生素 D₂ - [26, 26, 26, 27, 27, 27]⁻²H₆ 中每个的两个不同的先驱离子产生的示例性产物离子扫描分别呈现在图 5B-C、6B-C 和 7B-C 中。Q1 中选择的先驱离子和用于产生这些产物离子谱的碰撞能量显示在表 20 中。

[0204] 对于维生素 D₂ 定量的示例性 MRM 转变包括将具有约 397.2 的 m/z 的先驱离子破碎成具有约 159.0 的 m/z 的产物离子;将具有约 379.2 的 m/z 的先驱离子破碎成具有约 158.9 的 m/z 的产物离子。对于维生素 D₂ - [6, 19, 19]⁻²H₃ 定量的示例性 MRM 转变包括将具有约 400.2 的 m/z 的先驱离子破碎成具有约 147.0 的 m/z 的产物离子;将具有约 382.2 的 m/z 的先驱离子破碎成具有约 312.2 的 m/z 的产物离子。对于维生素 D₂ - [26, 26, 26, 27, 27, 27]⁻²H₆ 定量的示例性 MRM 转变包括将具有约 403.2 的 m/z 的先驱离子破碎成具有约 159.1 的 m/z 的产物离子;将具有约 385.2 的 m/z 的先驱离子破碎成具有约 159.0 的 m/z 的产物离子。然而,如图 5B-C、6B-C 和 7B-C 中产物离子扫描中所见,几种其它的产物离子在先驱离子碎裂之后产生。可从图 5B-C、6B-C 和 7B-C 中显示的那些产物离子中选择另外的产物离子,以替换或增加示例性的碎片离子。例如,由具有约 397.2 的 m/z 的维生素 D₂ 先驱离子的碎裂产生的另外的产物离子包括具有约 146.9、133.1 和 121.0 的 m/z 的离子。由具有约 379.2 的 m/z 的维生素 D₂ 先驱离子的碎裂产生的示例性另外的产物离子包括具有约 283.2、187.3 和 175.2 的 m/z 的离子。

[0205] 表 20. 维生素 D₂、维生素 D₂ - [6, 19, 19]⁻²H₃ 和维生素 D₂ - [26, 26, 26, 27, 27, 27]⁻²H₆ 碎裂的先驱离子和碰撞小室能量

分析物	先驱离子(m/z)	碰撞小室能量 (V)
维生素 D ₂	397.2, 379.2	25
[0206] 维生素 D ₂ -[6, 19, 19] ⁻² H ₃	400.2, 382.2	25
维生素 D ₂ -[26, 26, 26, 27, 27, 27] ⁻² H ₆	403.2, 385.2	25

[0207] 来自维生素 D₃、维生素 D₃ - [6, 19, 19]⁻²H₃ 和维生素 D₃ - [26, 26, 26, 27, 27, 27]⁻²H₆ 的串联质谱分析的示例性 Q1 扫描谱分别显示在图 8A、9A 和 10A 中。通过直接将含有感兴趣的分析物的标准溶液注射进 Finnigan TSQ Quantum Ultra MS/MS 系统 (Thermo Electron Corporation) 来进行这些分析。通过将 800 μ L/min 的 80% 乙腈、具有 0.1% 甲酸的 20% 水通过 HPLC 柱,分析物导入的上游,来模拟液相色谱流动相。通过在整个约 300 至 450 的 m/z 范围扫描 Q1 来收集光谱。

[0208] 从维生素 D₃、维生素 D₃ - [6, 19, 19]⁻²H₃ 和维生素 D₃ - [26, 26, 26, 27, 27, 27]⁻²H₆ 中每个的两个不同的先驱离子产生的示例性产物离子扫描分别呈现在图 8B-C、9B-C 和 10B-C 中。Q1 中选择的先驱离子和用于产生这些产物离子谱的碰撞能量显示在表 21 中。

[0209] 对于维生素 D₃ 定量的示例性 MRM 转变包括将具有约 385.2 的 m/z 的先驱离子破碎成具有约 147.0 的 m/z 的产物离子;将具有约 367.2 的 m/z 的先驱离子破碎成具有约 159.0 的 m/z 的产物离子。对于维生素 D₃ - [6, 19, 19]⁻²H₃ 定量的示例性 MRM 转变包括将具有约 388.2 的 m/z 的先驱离子破碎成具有约 147.0 的 m/z 的产物离子;将具有

约 370.2 的 m/z 的先驱离子破碎成具有约 160.2 的 m/z 的产物离子。对于维生素 D_3 - [26, 26, 26, 27, 27, 27] $^{-2}H_6$ 定量的示例性 MRM 转变包括将具有约 391.2 的 m/z 的先驱离子破碎成具有约 159.1 的 m/z 的产物离子; 将具有约 373.2 的 m/z 的先驱离子破碎成具有约 159.0 的 m/z 的产物离子。然而, 如图 8B-C、9B-C 和 10B-C 中产物离子扫描中所见, 几种其它的产物离子在先驱离子碎裂之后产生。可从图 8B-C、9B-C 和 10B-C 中显示的那些产物离子中选择另外的产物离子, 以替换或增加示例性的碎片离子。例如, 由具有约 385.2 的 m/z 的维生素 D_3 先驱离子的碎裂产生的另外的产物离子包括具有约 159.0、133.1 和 107.1 的 m/z 的离子。由具有约 367.2 的 m/z 的维生素 D_3 先驱离子的碎裂产生的另外的示例性产物离子包括具有约 172.9、145.0 和 119.1 的 m/z 的离子。

[0210] 表 21. 维生素 D_3 、维生素 D_3 - [6, 19, 19] $^{-2}H_3$ 和维生素 D_3 - [26, 26, 26, 27, 27, 27] $^{-2}H_6$ 碎裂的先驱离子和碰撞小室能量

分析物	先驱离子(m/z)	碰撞小室能量 (V)
维生素 D_3	385.2, 367.2	25
[0211] 维生素 D_3 - [6, 19, 19] $^{-2}H_3$	388.2, 370.2	25
维生素 D_3 - [26, 26, 26, 27, 27, 27] $^{-2}H_6$	391.2, 373.2	25

[0212] 实施例 15 : PTAD 衍生的维生素 D_2 和维生素 D_3 的 MS/MS 分析的示例性光谱

[0213] 通过用乙腈中的 PTAD 处理每个分析物的储备溶液的等分试样来制备维生素 D_2 、维生素 D_2 - [6, 19, 19] $^{-2}H_3$ 、维生素 D_2 - [26, 26, 26, 27, 27, 27] $^{-2}H_6$ 、维生素 D_3 、维生素 D_3 - [6, 19, 19] $^{-2}H_3$ 和维生素 D_3 - [26, 26, 26, 27, 27, 27] $^{-2}H_6$ 的 PTAD 衍生物。允许衍生反应进行大约一个小时, 并通过向反应混合物中加入水而使之淬灭。然后根据上面实施例 2-3 中描述的程序分析衍生的分析物。

[0214] 来自包含 PTAD- 维生素 D_2 、PTAD- 维生素 D_2 - [6, 19, 19] $^{-2}H_3$ 和 PTAD- 维生素 D_2 - [26, 26, 26, 27, 27, 27] $^{-2}H_6$ 的样品分析的示例性 Q1 扫描谱分别显示在图 11A、12A 和 13A 中。通过直接将含有感兴趣的分析物的标准溶液注射进 Finnigan TSQ Quantum Ultra MS/MS 系统 (Thermo Electron Corporation) 来进行这些分析。通过将 800 μ L/min 的 80% 乙腈、具有 0.1% 甲酸的 20% 水通过 HPLC 柱, 分析物导入的上游, 来模拟液相色谱流动相。如上所描述地通过 APCI 电离分析物。光谱通过在约 500 至 620 的整个 m/z 范围扫描 Q1 来收集。

[0215] 从 PTAD- 维生素 D_2 、PTAD- 维生素 D_2 - [6, 19, 19] $^{-2}H_3$ 和 PTAD- 维生素 D_2 - [26, 26, 26, 27, 27, 27] $^{-2}H_6$ 中每个的先驱离子产生的示例性产物离子扫描分别呈现在图 11B、12B 和 13B 中。Q1 中选择的先驱离子和用于产生这些产物离子谱的碰撞能量显示在表 22 中。

[0216] 对于 PTAD- 维生素 D_2 定量的示例性 MRM 转变包括将具有约 572.2 的 m/z 的先驱离子破碎成具有约 297.9 的 m/z 的产物离子。对于 PTAD- 维生素 D_2 - [6, 19, 19] $^{-2}H_3$ 定量的示例性 MRM 转变包括将具有约 575.2 的 m/z 的先驱离子破碎成具有约 301.0 的 m/z 的产物离子。对于 PTAD- 维生素 D_2 - [26, 26, 26, 27, 27, 27] $^{-2}H_6$ 定量的示例性 MRM 转变包括将具有约 578.2 的 m/z 的先驱离子破碎成具有约 297.9 的 m/z 的产物离子。然而, 如图 11B、

12B 和 13B 中产物离子扫描中所见,几种其它的产物离子在先驱离子碎裂之后产生。可从图 11B、12B 和 13B 中显示的那些产物离子中选择另外的产物离子,以替换或增加示例性的碎片离子。例如,具有约 572.2 的 m/z 的 PTAD- 维生素 D₂ 先驱离子的碎裂产生的另外的产物离子包括具有约 280.1 的 m/z 的离子。

[0217] 表 22. PTAD- 维生素 D₂、PTAD- 维生素 D₂ - [6, 19, 19]⁻²H₃ 和 PTAD- 维生素 D₂ - [26, 26, 26, 27, 27, 27]⁻²H₆ 碎裂的先驱离子和碰撞小室能量

[0218]

分析物	先驱离子 (m/z)	碰撞小室能量 (V)
PTAD- 维生素 D ₂	572.2	15
PTAD- 维生素 D ₂ -[6, 19, 19] ⁻² H ₃	575.2	15
PTAD- 维生素 D ₂ -[26, 26, 26, 27, 27, 27] ⁻² H ₆	578.2	15

[0219]

[0220] 来自包含 PTAD- 维生素 D₃、PTAD- 维生素 D₃ - [6, 19, 19]⁻²H₃ 和 PTAD- 维生素 D₃ - [26, 26, 26, 27, 27, 27]⁻²H₆ 的样品分析的示例性 Q1 扫描谱分别显示在图 14A、15A 和 16A 中。通过直接将含有感兴趣的分析物的标准溶液注射进 Finnigan TSQ Quantum Ultra MS/MS 系统 (Thermo Electron Corporation) 来进行这些分析。通过将 800 μ L/min 的 80% 乙腈、具有 0.1% 甲酸的 20% 水通过 HPLC 柱,分析物导入的上游,来模拟液相色谱流动相。通过在约 500 至 620 的整个 m/z 范围扫描 Q1 来收集光谱。

[0221] 从 PTAD- 维生素 D₃、PTAD- 维生素 D₃ - [6, 19, 19]⁻²H₃ 和 PTAD- 维生素 D₃ - [26, 26, 26, 27, 27, 27]⁻²H₆ 中每个的先驱离子产生的示例性产物离子扫描分别呈现在图 14B、15B 和 16B 中。Q1 中选择的先驱离子和用于产生这些产物离子谱的碰撞能量显示在表 23 中。

[0222] 对于 PTAD- 维生素 D₃ 定量的示例性 MRM 转变包括将具有约 560.2 的 m/z 的先驱离子破碎成具有约 298.0 的 m/z 的产物离子。对于 PTAD- 维生素 D₃ - [6, 19, 19]⁻²H₃ 定量的示例性 MRM 转变包括将具有约 563.2 的 m/z 的先驱离子破碎成具有约 301.0 的 m/z 的产物离子。对于 PTAD- 维生素 D₃ - [26, 26, 26, 27, 27, 27]⁻²H₆ 定量的示例性 MRM 转变包括将具有约 566.2 的 m/z 的先驱离子破碎成具有约 298.0 的 m/z 的产物离子。然而,如图 14B、15B 和 16B 中产物离子扫描中所见,几种其它的产物离子在先驱离子碎裂之后产生。可从图 14B、15B 和 16B 中显示的那些产物离子中选择另外的产物离子,以替换或增加示例性的碎片离子。例如,具有约 560.2 的 m/z 的 PTAD- 维生素 D₃ 先驱离子的碎裂产生的另外的产物离子包括具有约 280.0 的 m/z 的离子。

[0223] 表 23. PTAD- 维生素 D₃、PTAD- 维生素 D₃ - [6, 19, 19]⁻²H₃ 和 PTAD- 维生素 D₃ - [26, 26, 26, 27, 27, 27]⁻²H₆ 碎裂的先驱离子和碰撞小室能量

	分析物	先驱离子(m/z)	碰撞小室能量(V)
	PTAD-维生素 D ₃	560.2	15
[0224]	PTAD-维生素 D ₃ -[6, 19, 19]- ² H ₃	563.2	15
	PTAD-维生素 D ₃ -[26, 26, 26, 27, 27, 27]- ² H ₆	566.2	15

[0225] 本文提到或引用的文章、专利和专利申请和所有其它文件和电子形式可得的信息的内容在此以其全部通过引用被并入,其程度与好像每个单独公开被具体地和个别地指明通过引用被并入相同。申请人保留将来自任何这样的文章、专利、专利申请或其它有形文件和电子文件的任何和所有材料和信息物理上并入该申请的权利。

[0226] 本文例证性地描述的方法在缺少本文未具体公开的任何成分或多个成分、限制或多个限制的情况下可被适当地实施。因此,例如,术语“包含(comprising)”、“包括(including)”、“含有”等应被扩大地理解并且没有限制。另外,本文使用的术语和表达已被用作描述而不是限制的术语,不期望在这样的术语和表达的使用中排除显示和描述的特征或其部分的任何等同物。应当认识到,各种修改在本发明要求保护的范围内是可能的。因此,应当理解,虽然本发明已通过优选实施方式和任选的特征被具体地公开,但是本文公开的其中体现的本发明的修改和改变可被本领域技术人员想到,这样的修改和改变被认为在该发明的范围内。

[0227] 本发明在这里已被宽泛地和一般性地描述。落入一般公开的较窄的种类和亚类分类中的每个也形成方法的一部分。这包括方法的一般描述,先决条件或否定性限制是从属中去除任何主题,不论删除的材料在这里是否被具体描述。

[0228] 其它实施方式在所附的权利要求内。另外,当方法的特征或方面以马库什组的形式被描述时,本领域技术人员将认识到本发明还因此以马库什组的任何单个成分或成分的亚组的形式被描述。

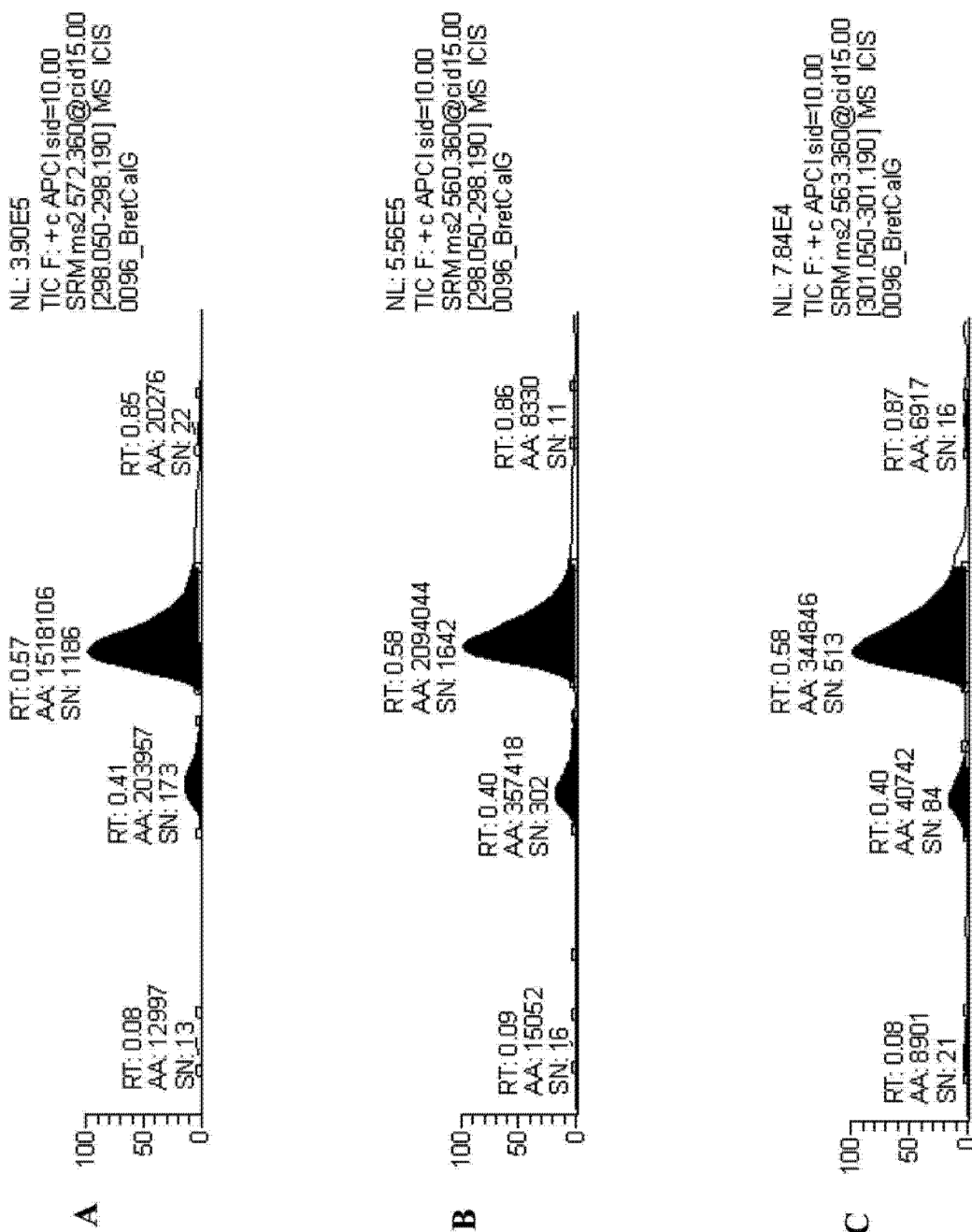


图 1

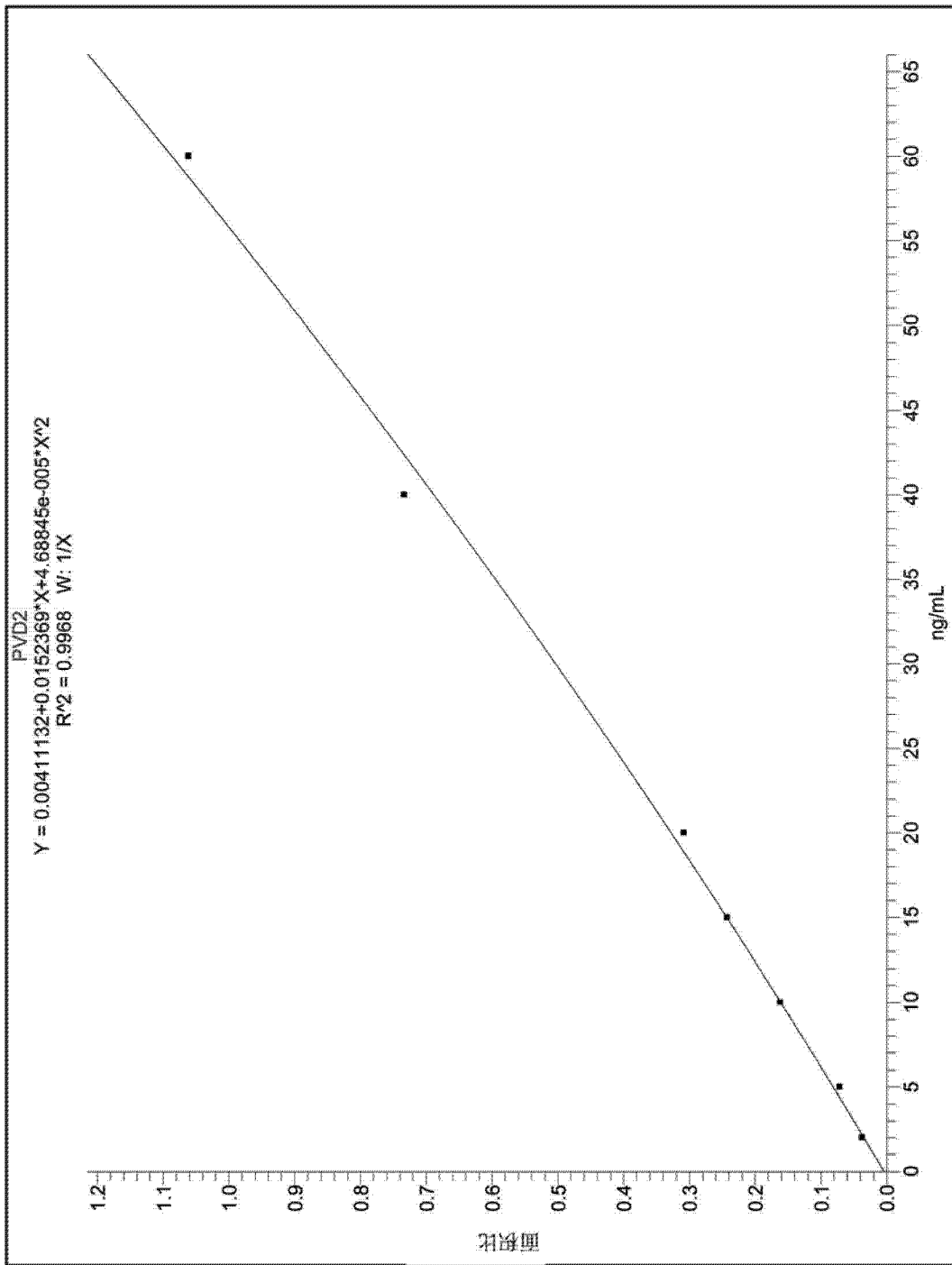


图 2A

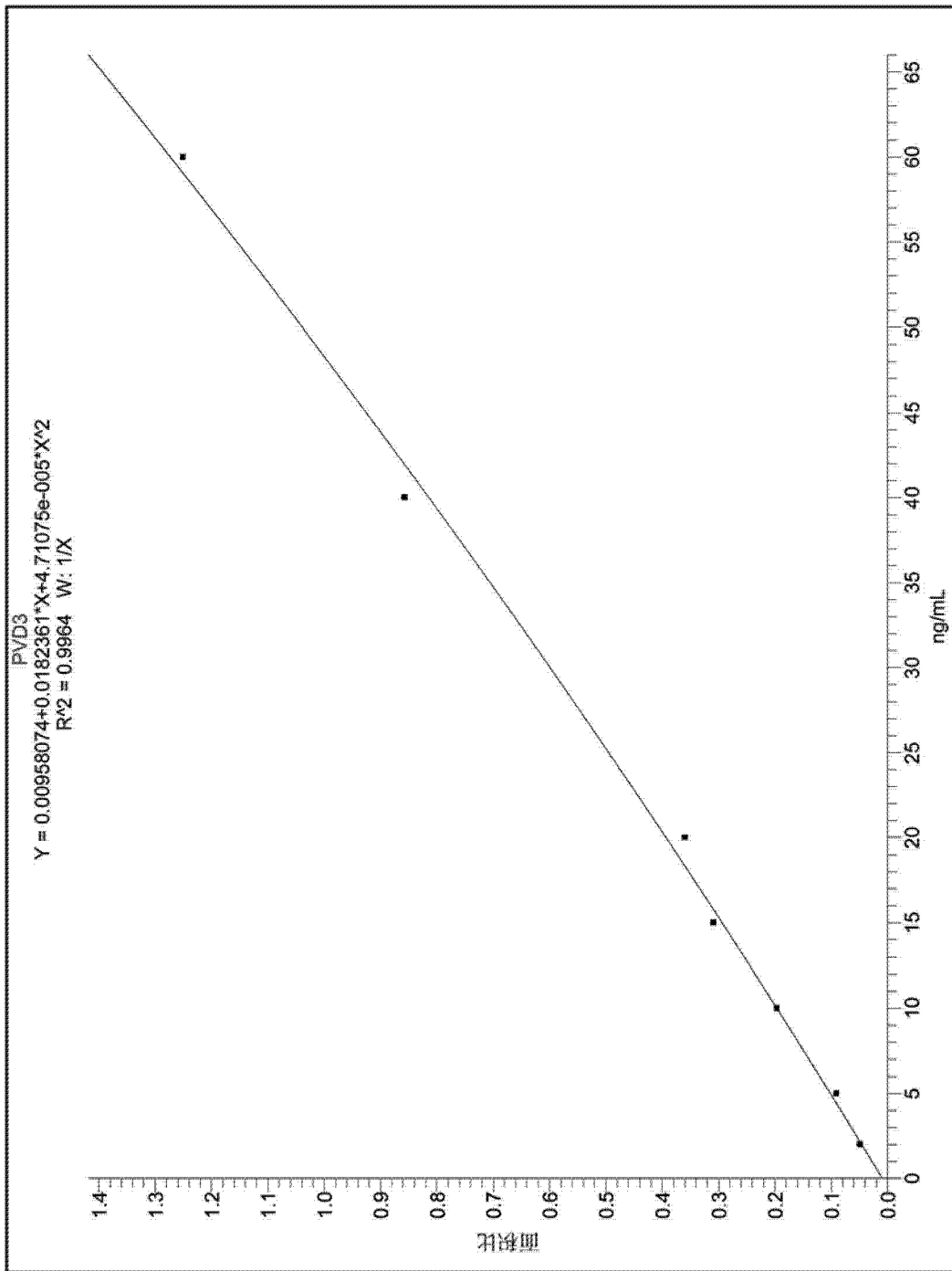


图 2B

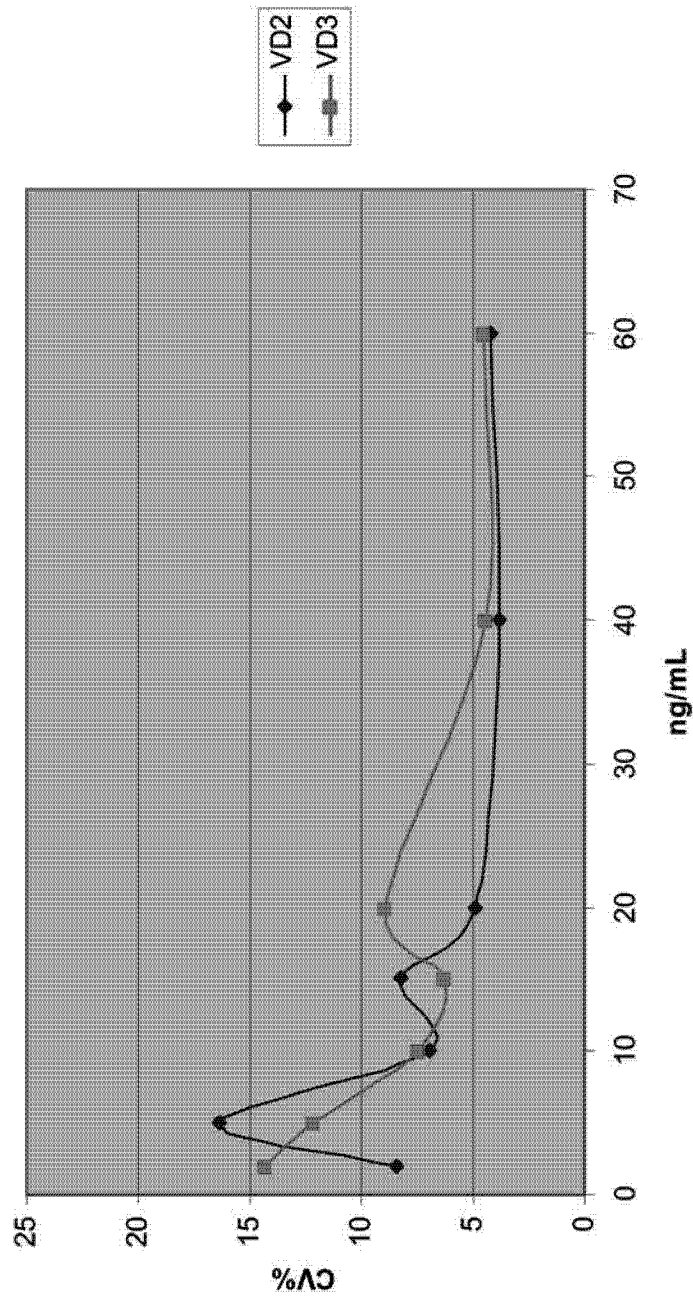


图 3

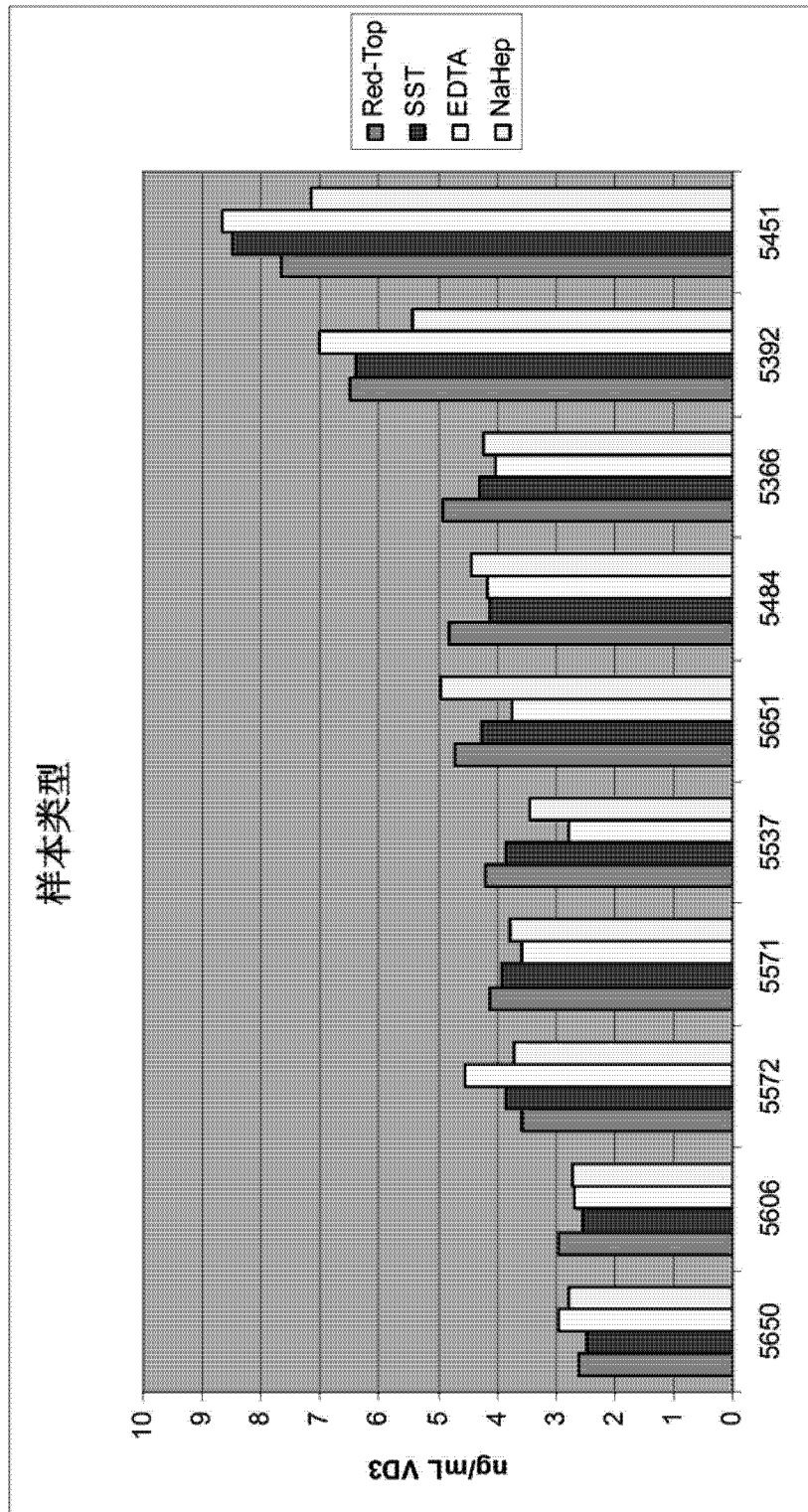


图 4

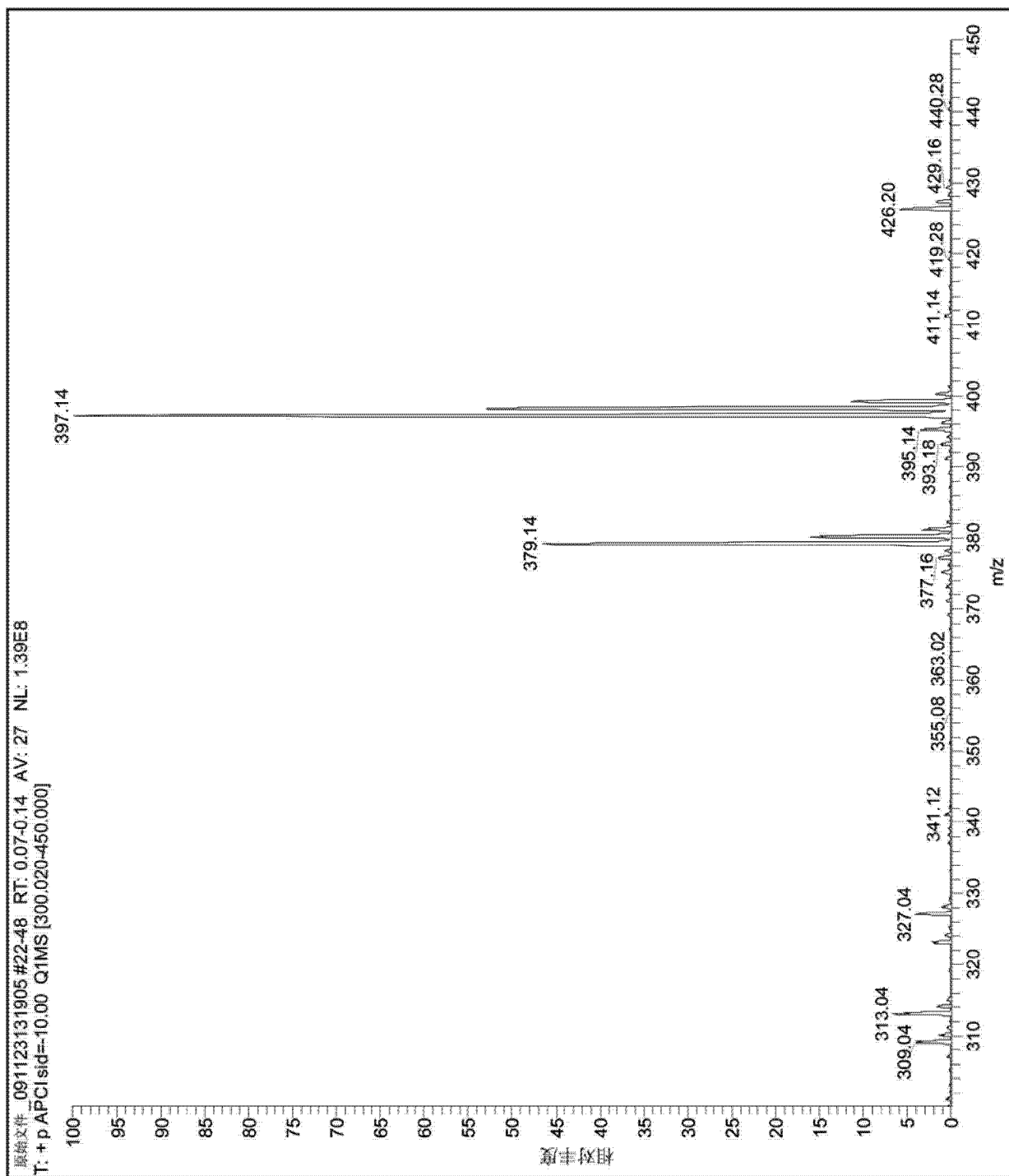


图 5A

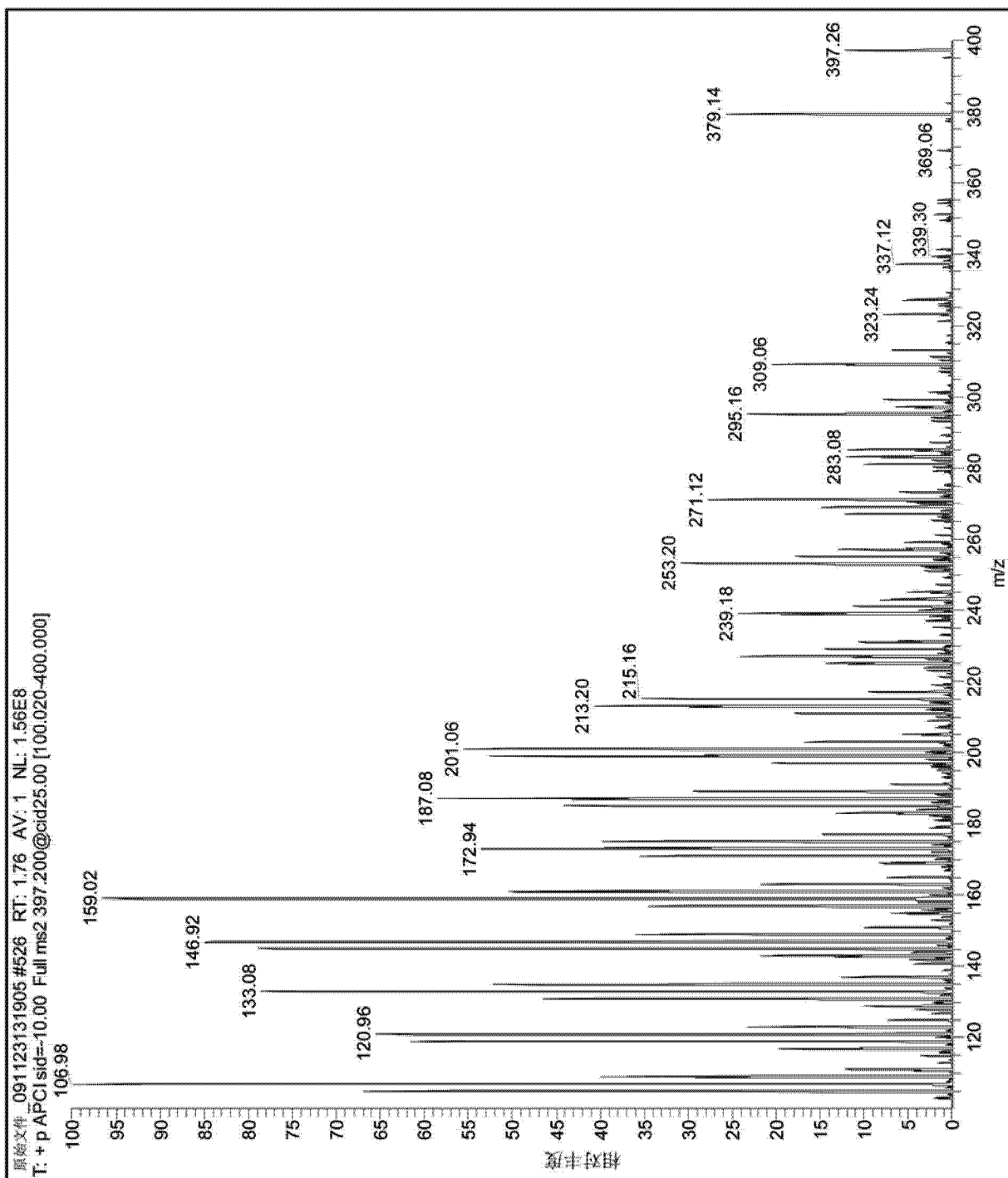


图 5B

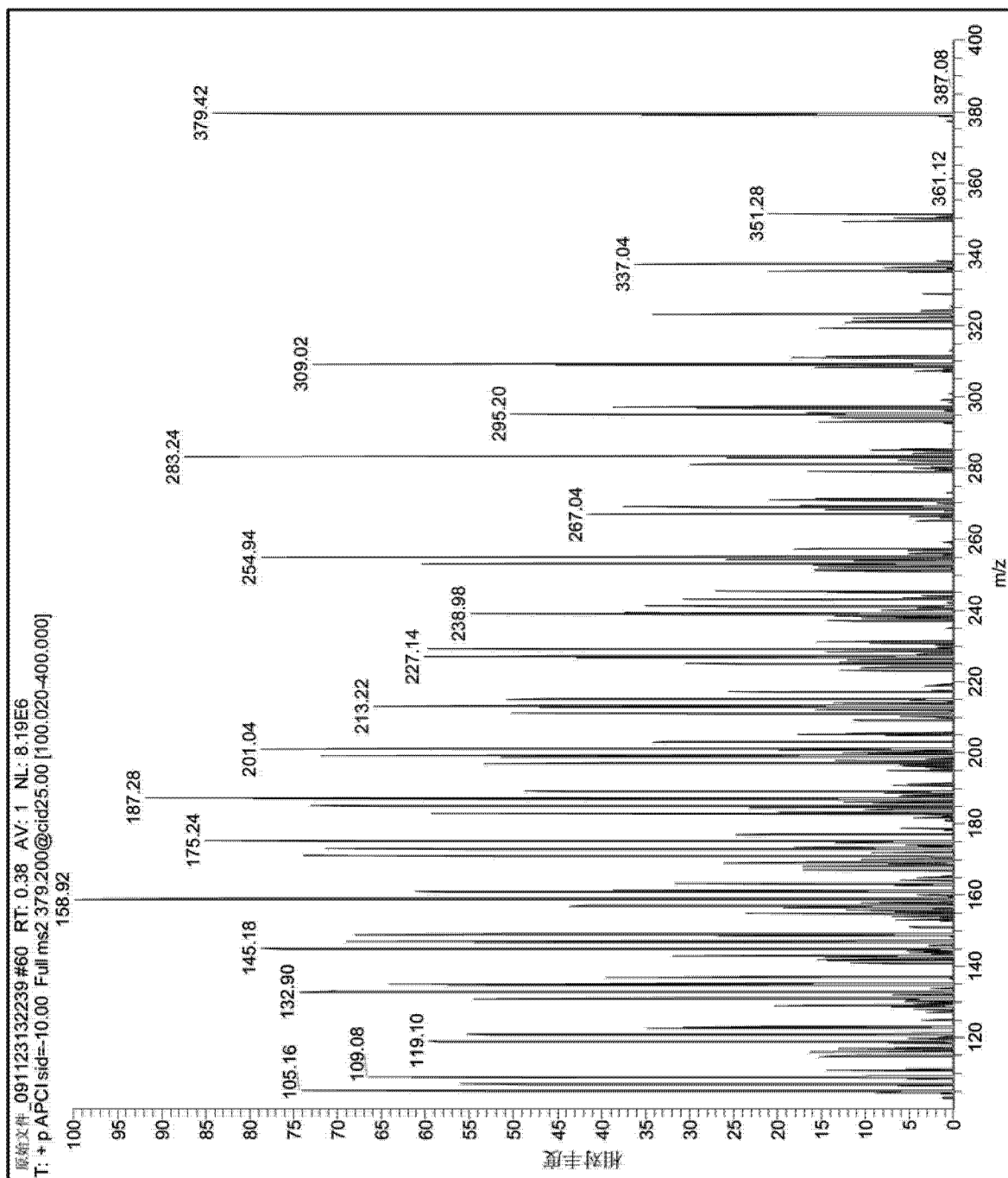


图 5C

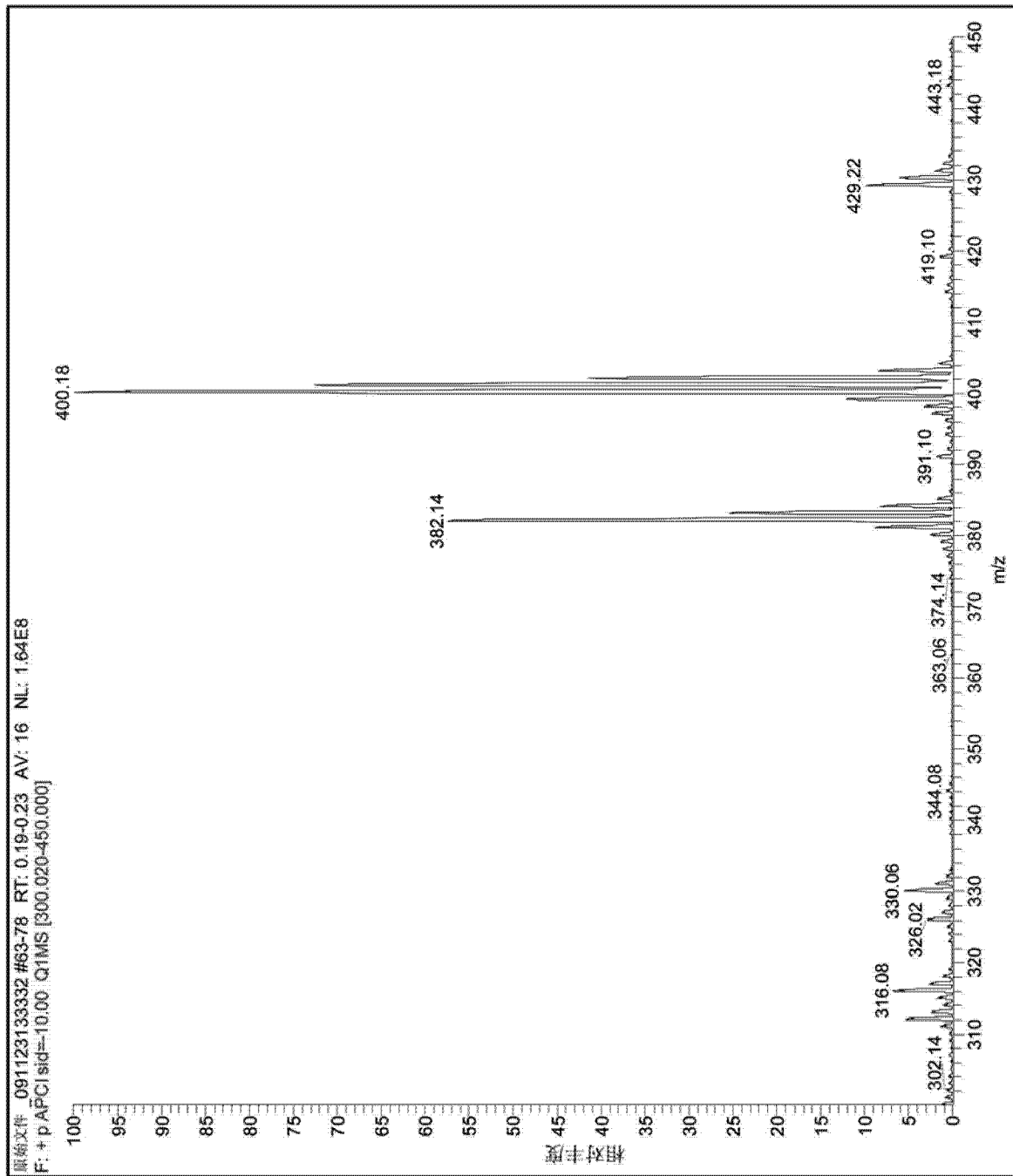


图 6A

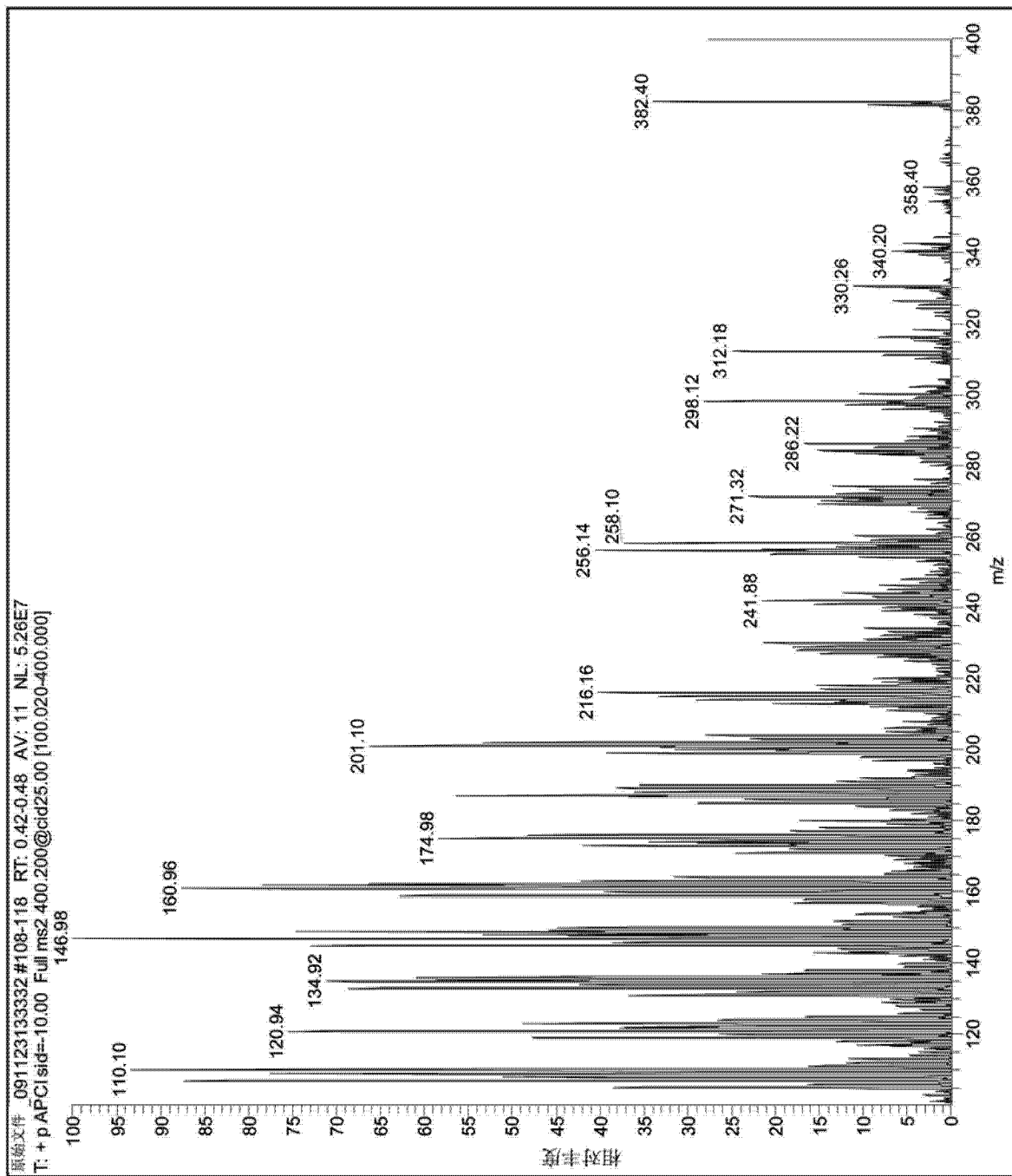


图 6B

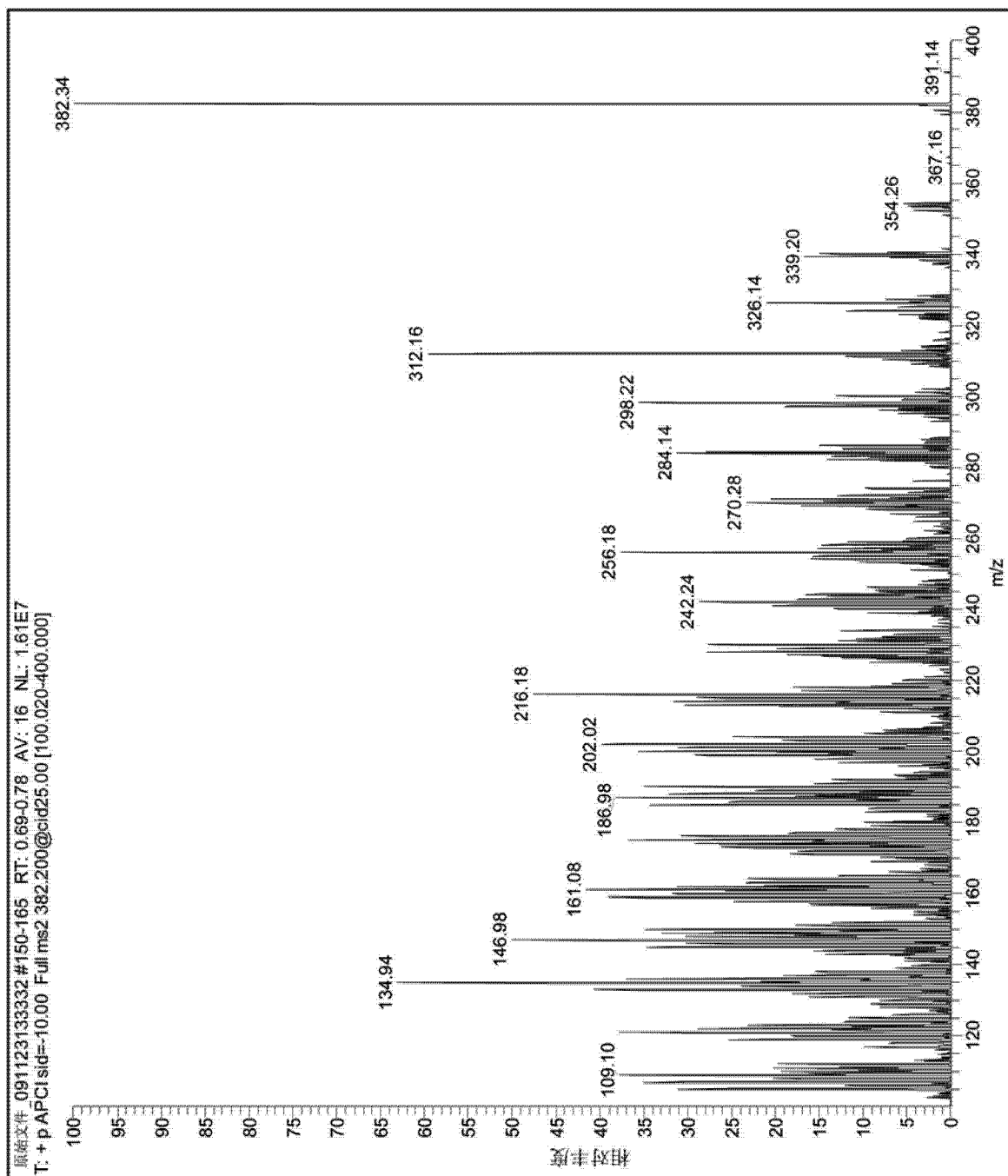


图 6C

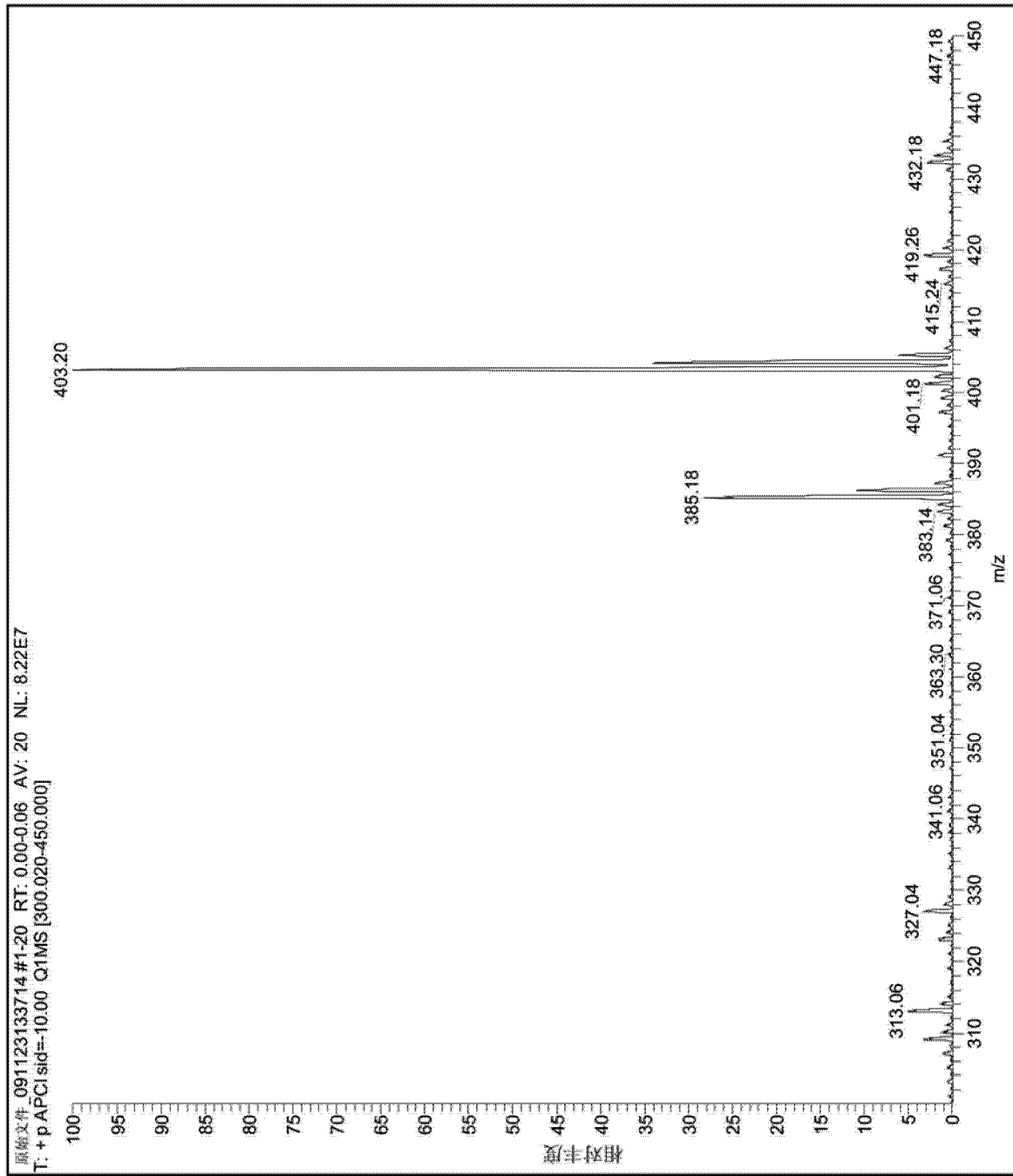


图 7A

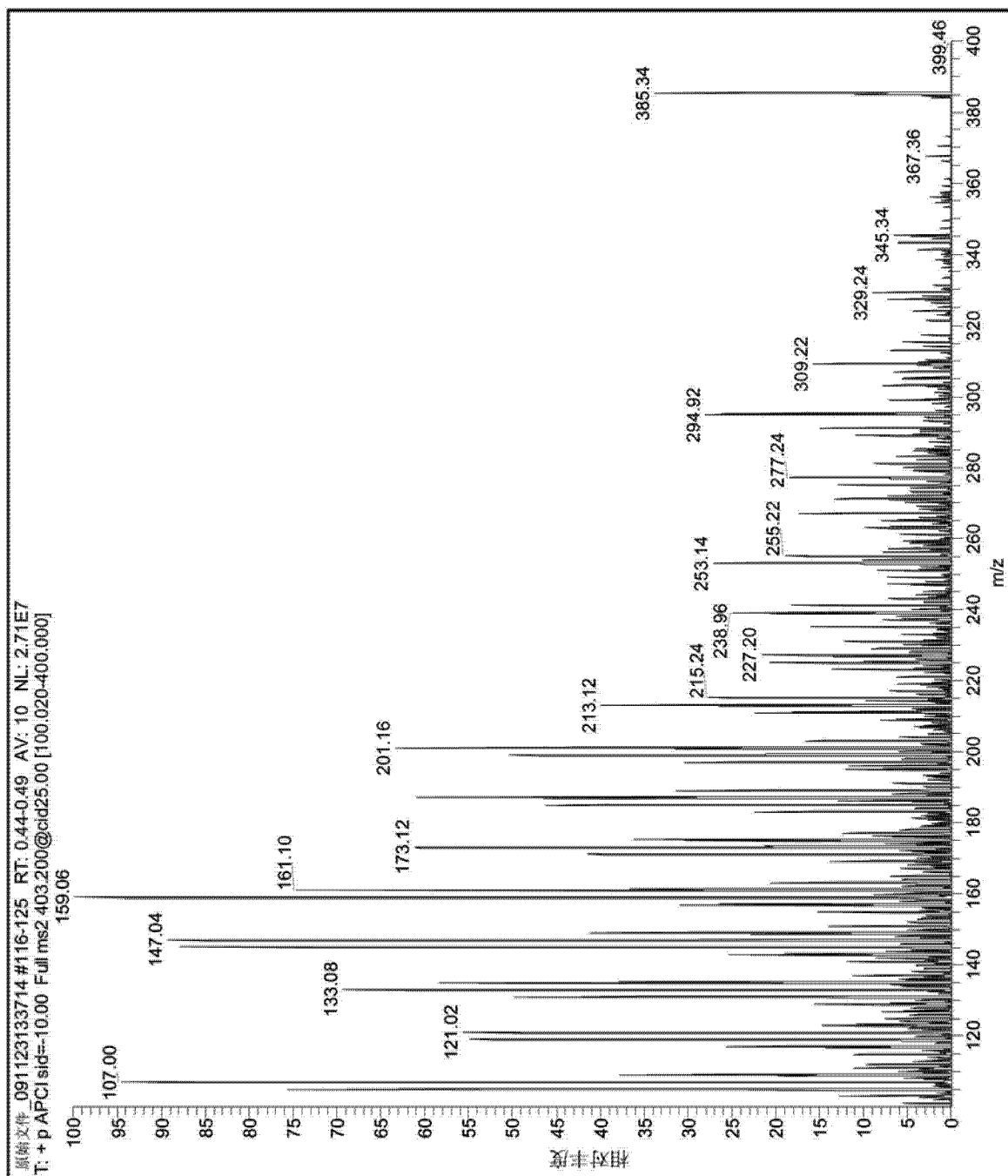


图 7B

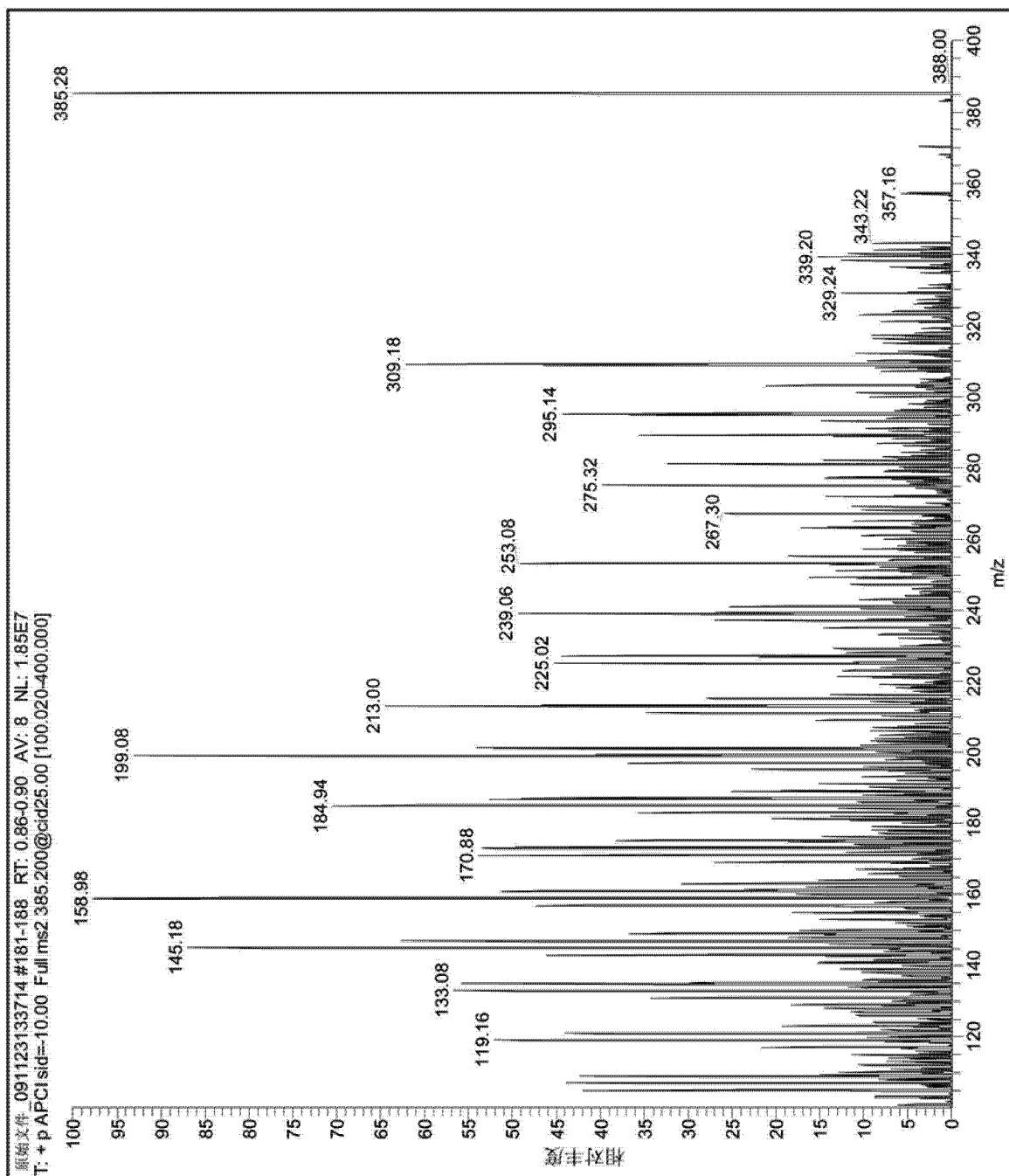


图 7C

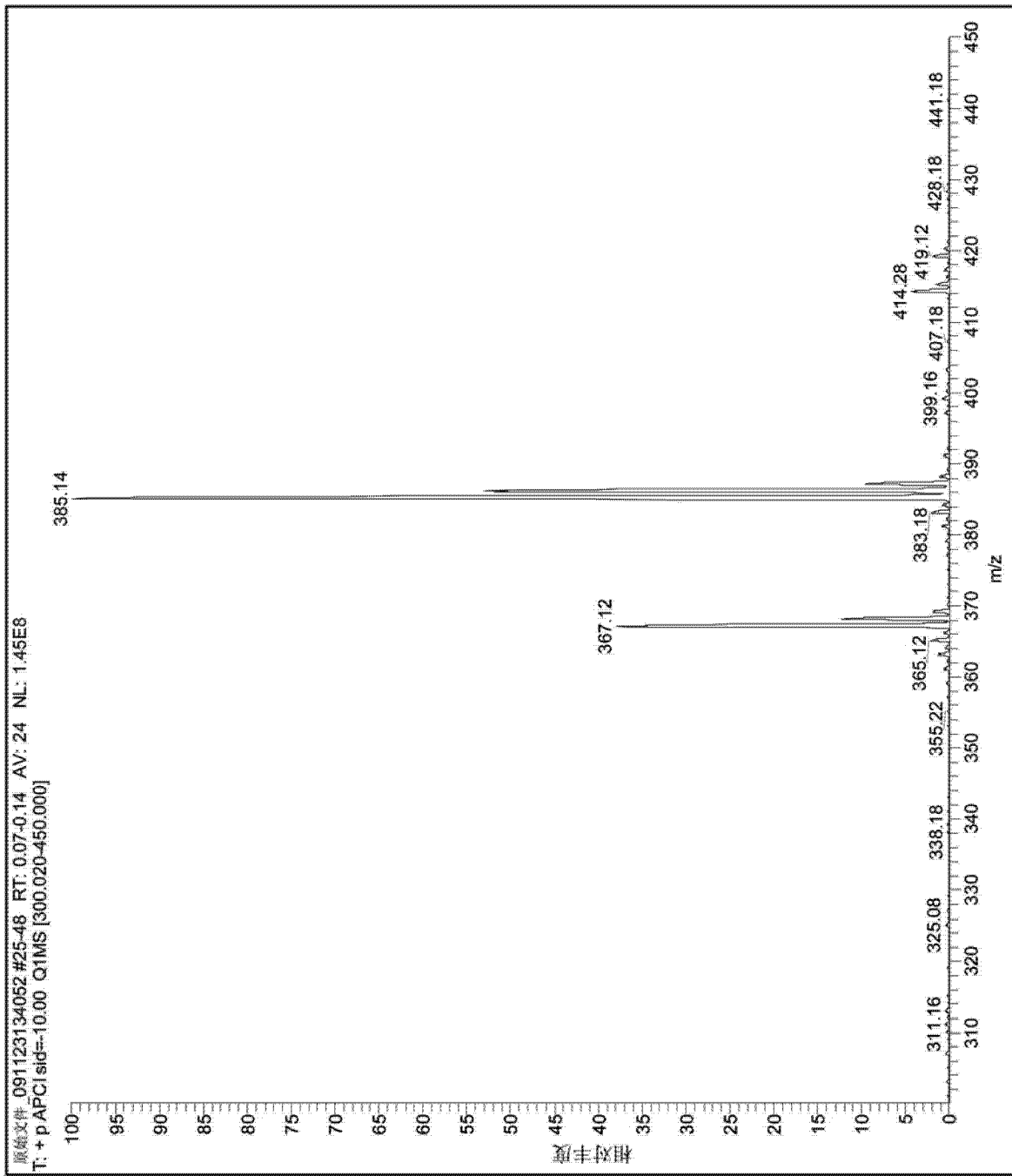


图 8A

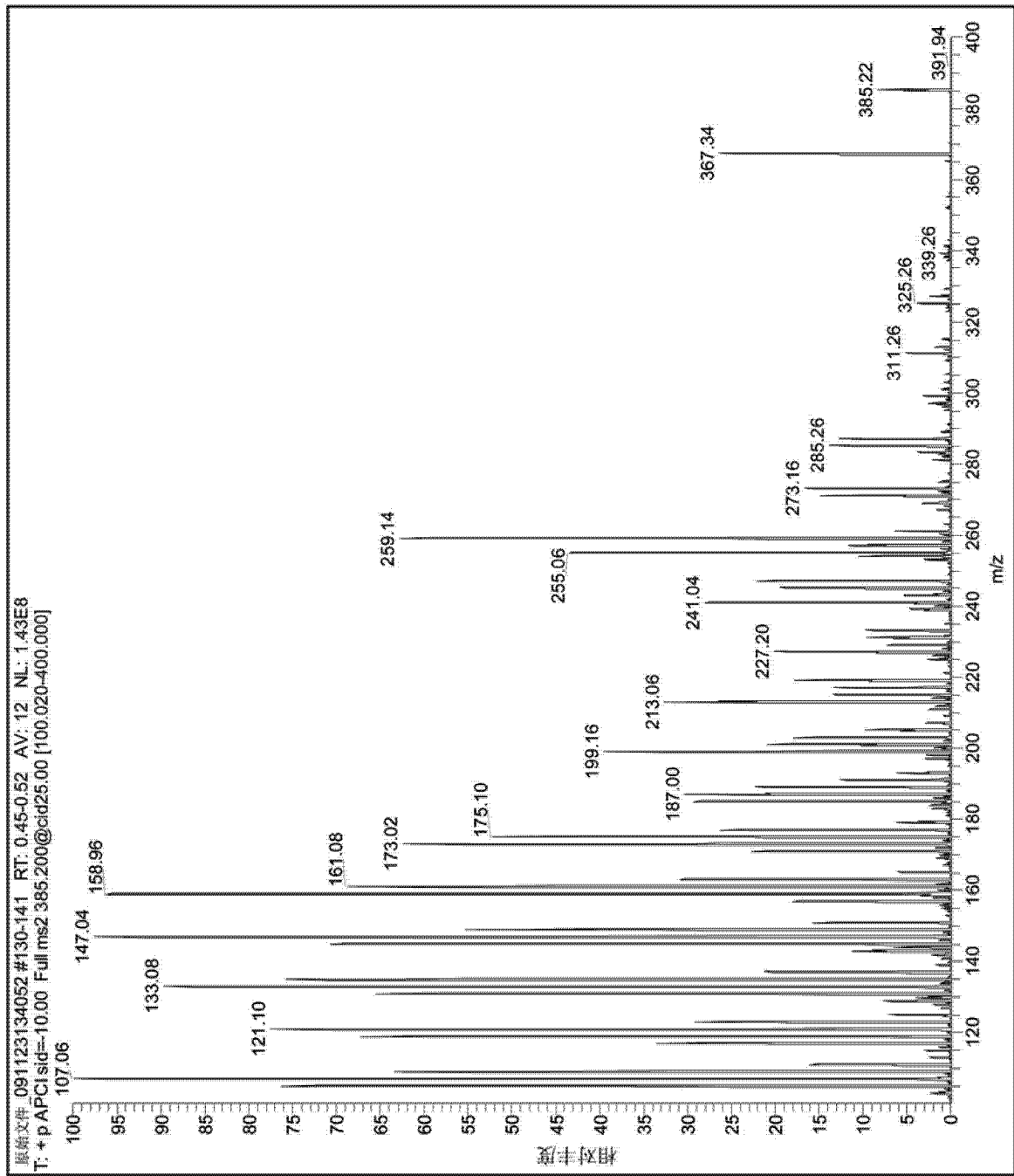


图 8B

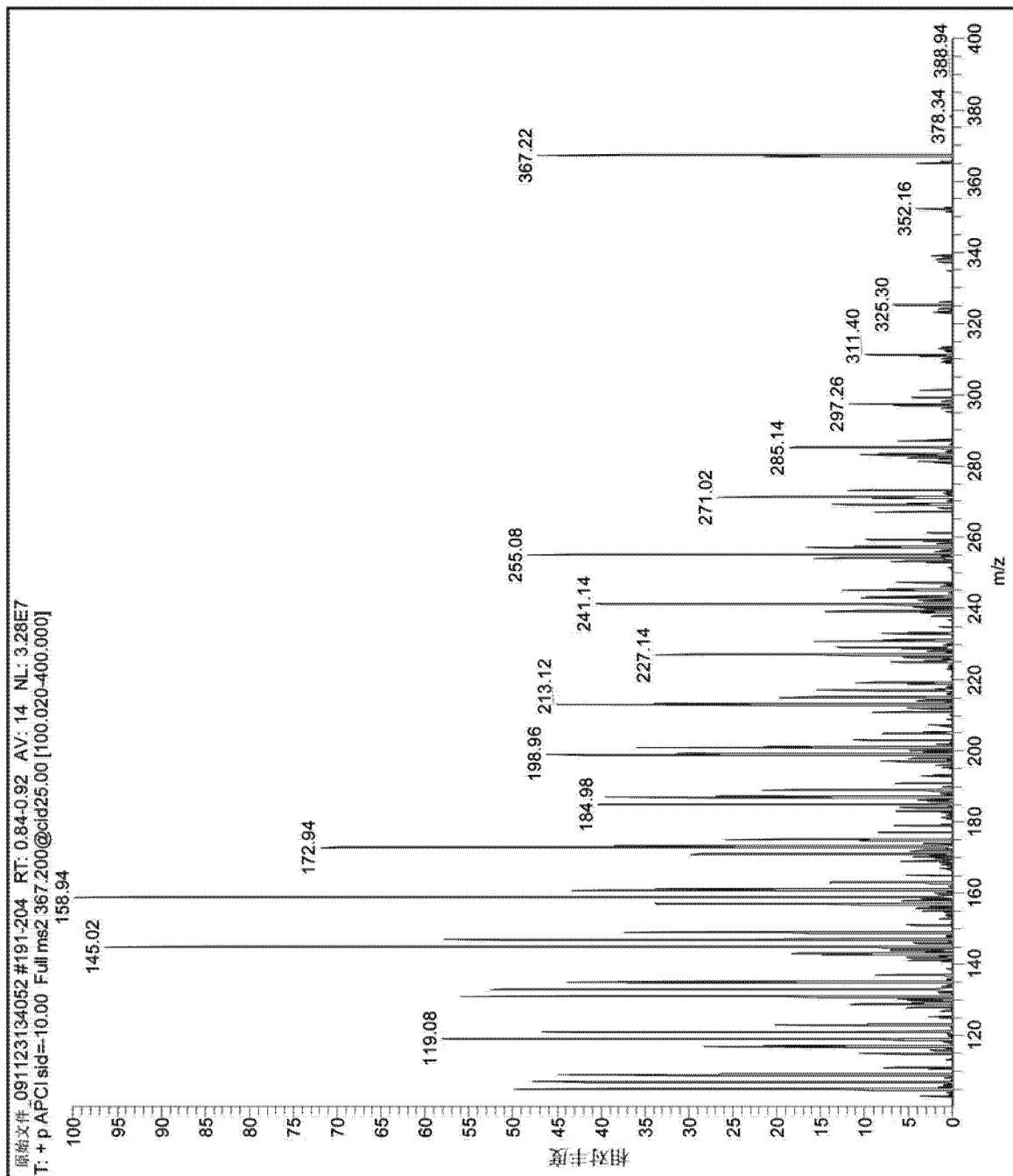


图 8C

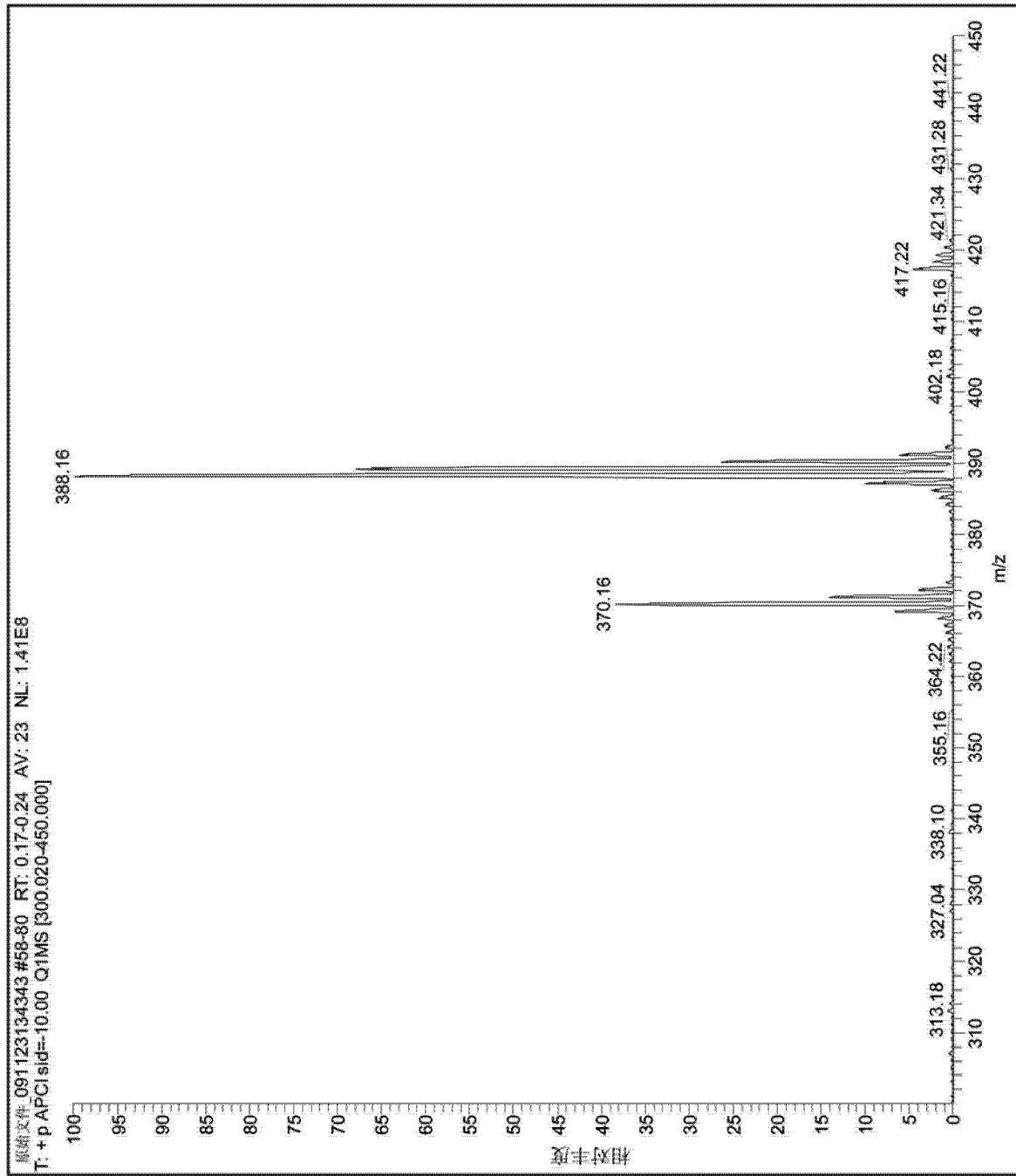


图 9A

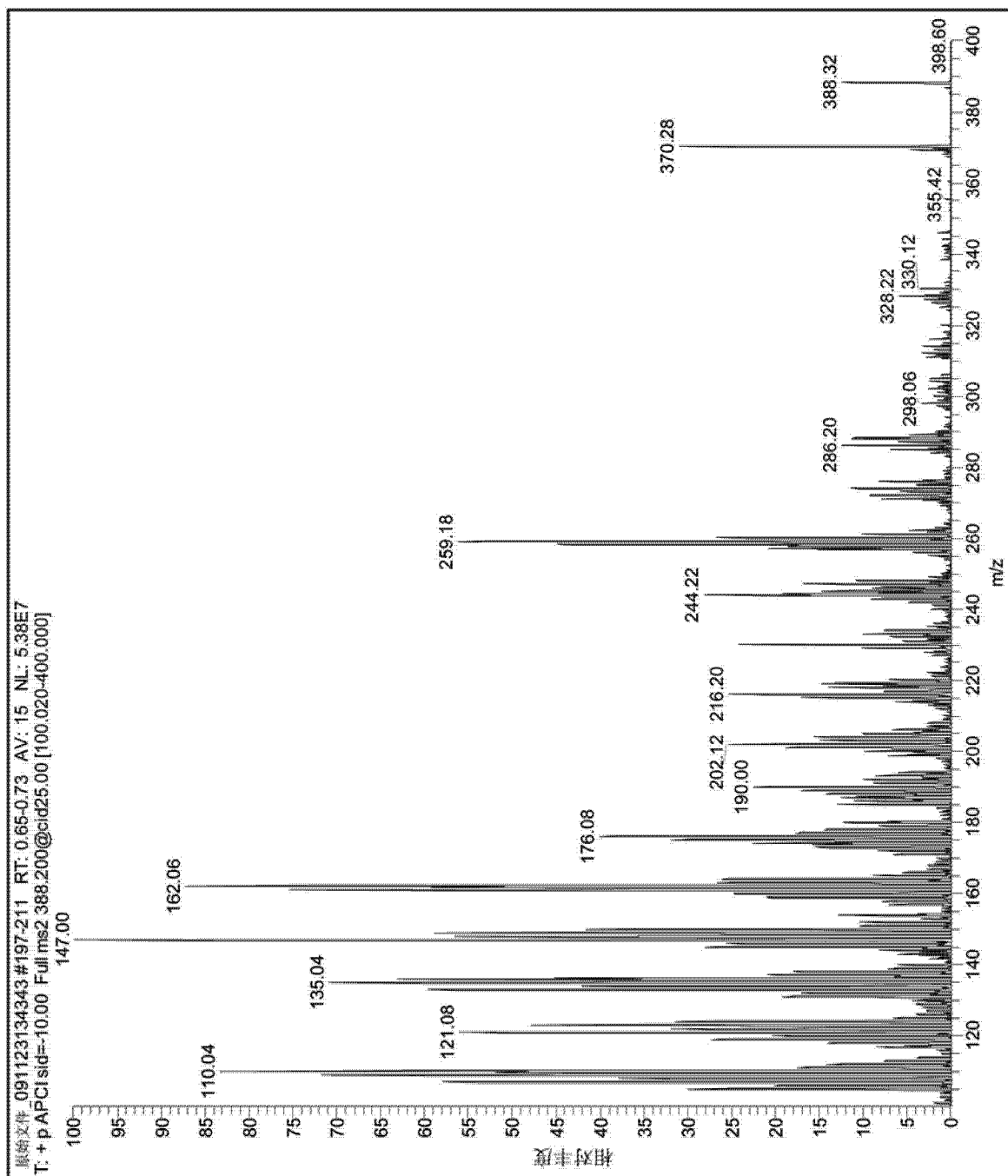


图 9B

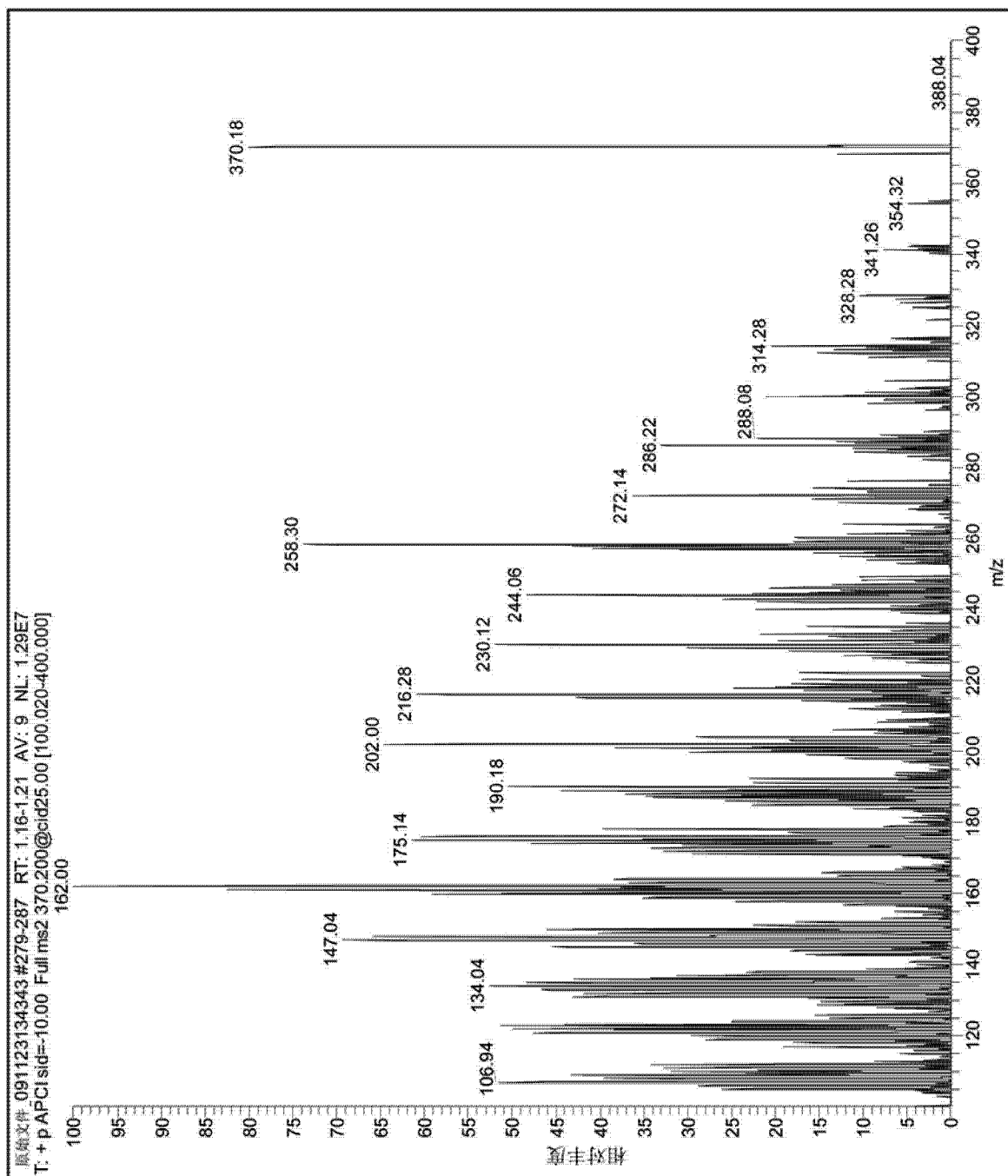


图 9C

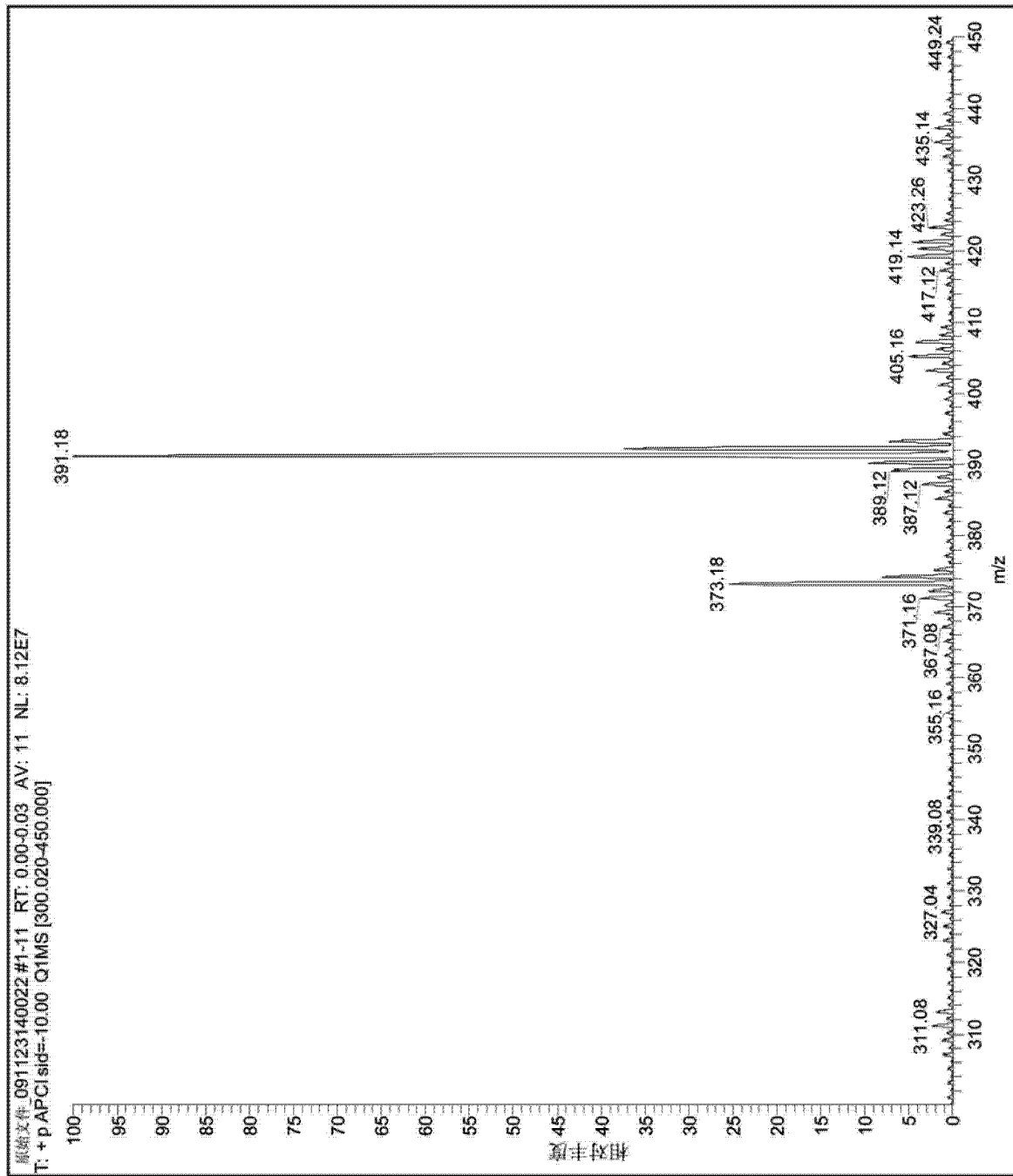


图 10A

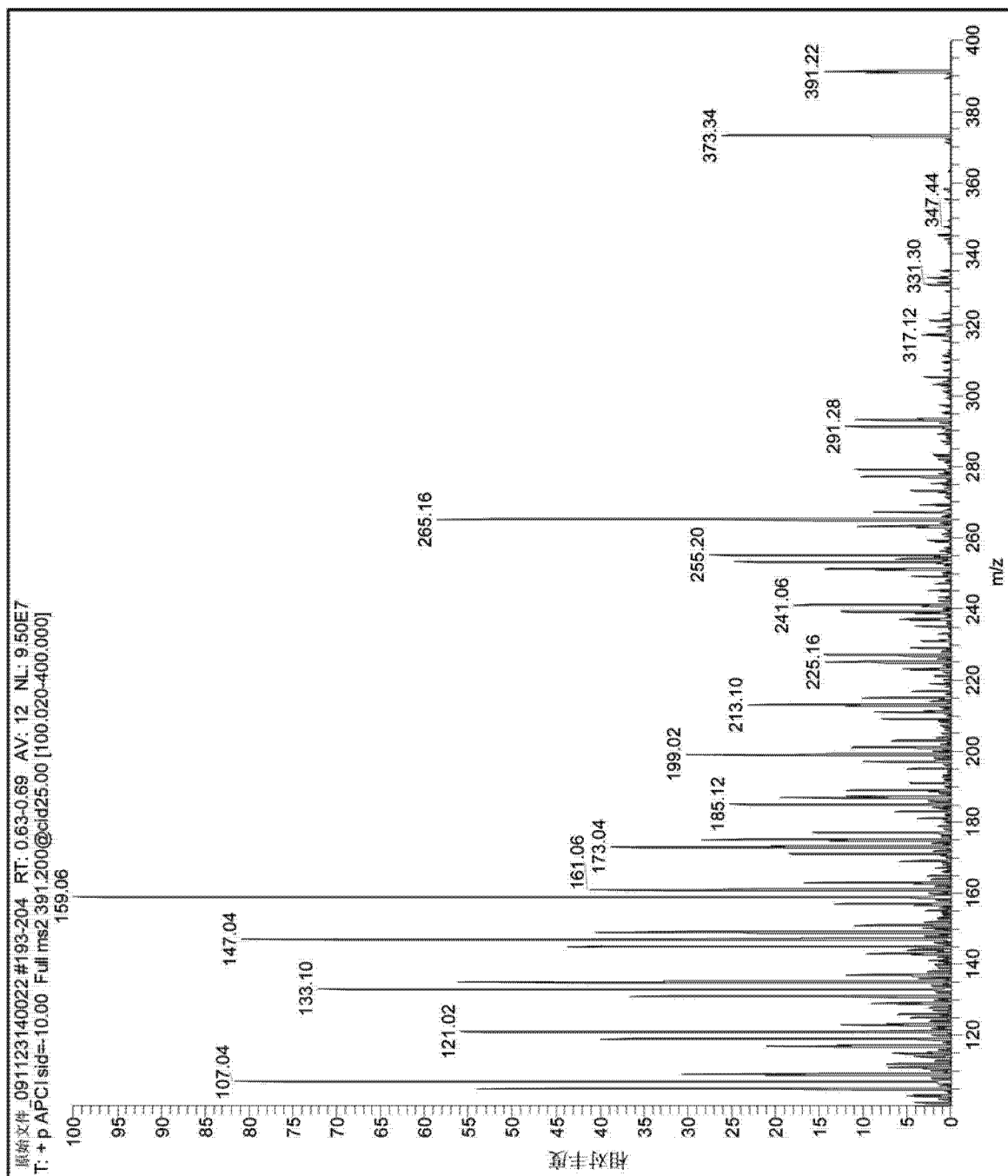


图 10B

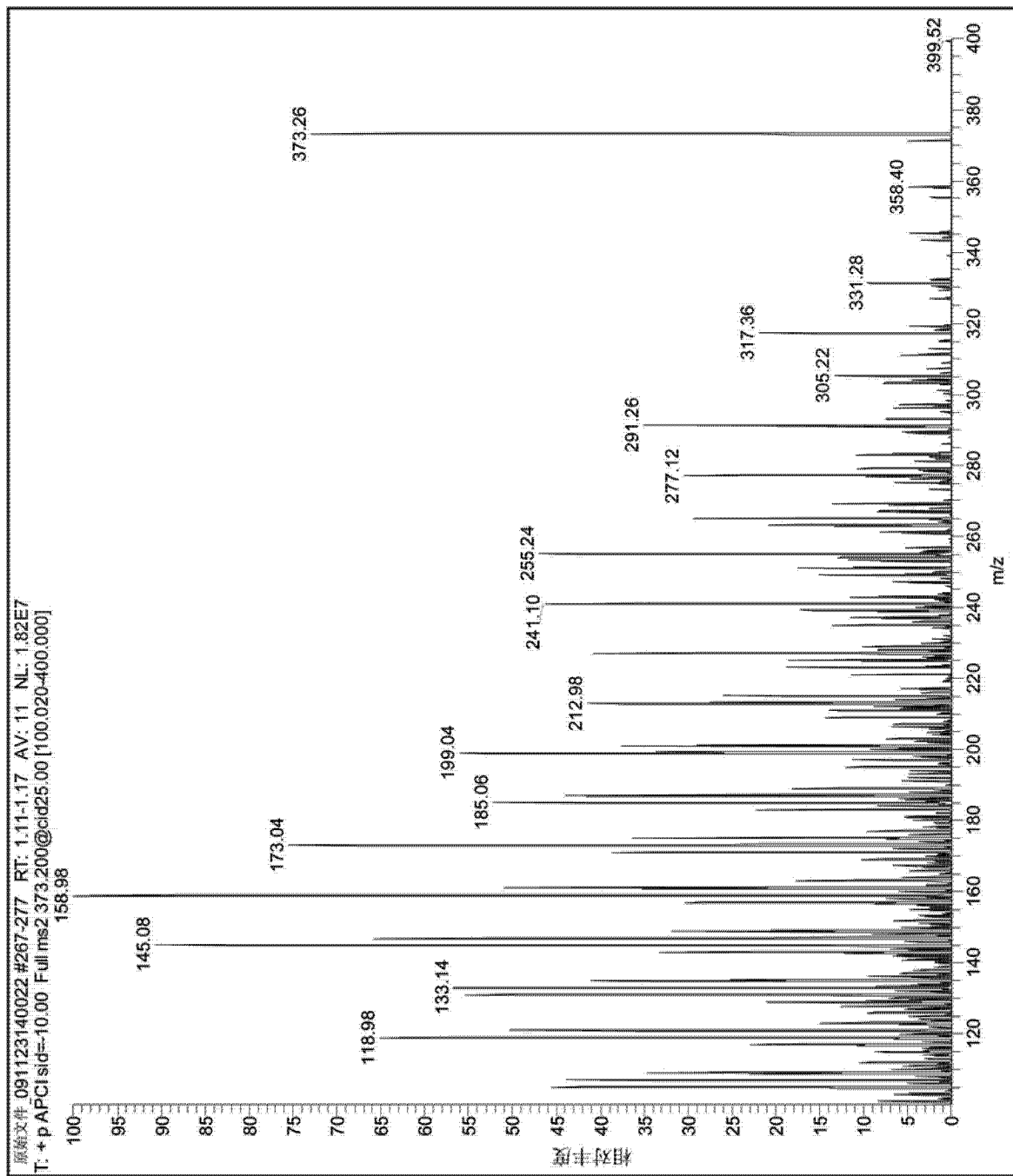


图 10C

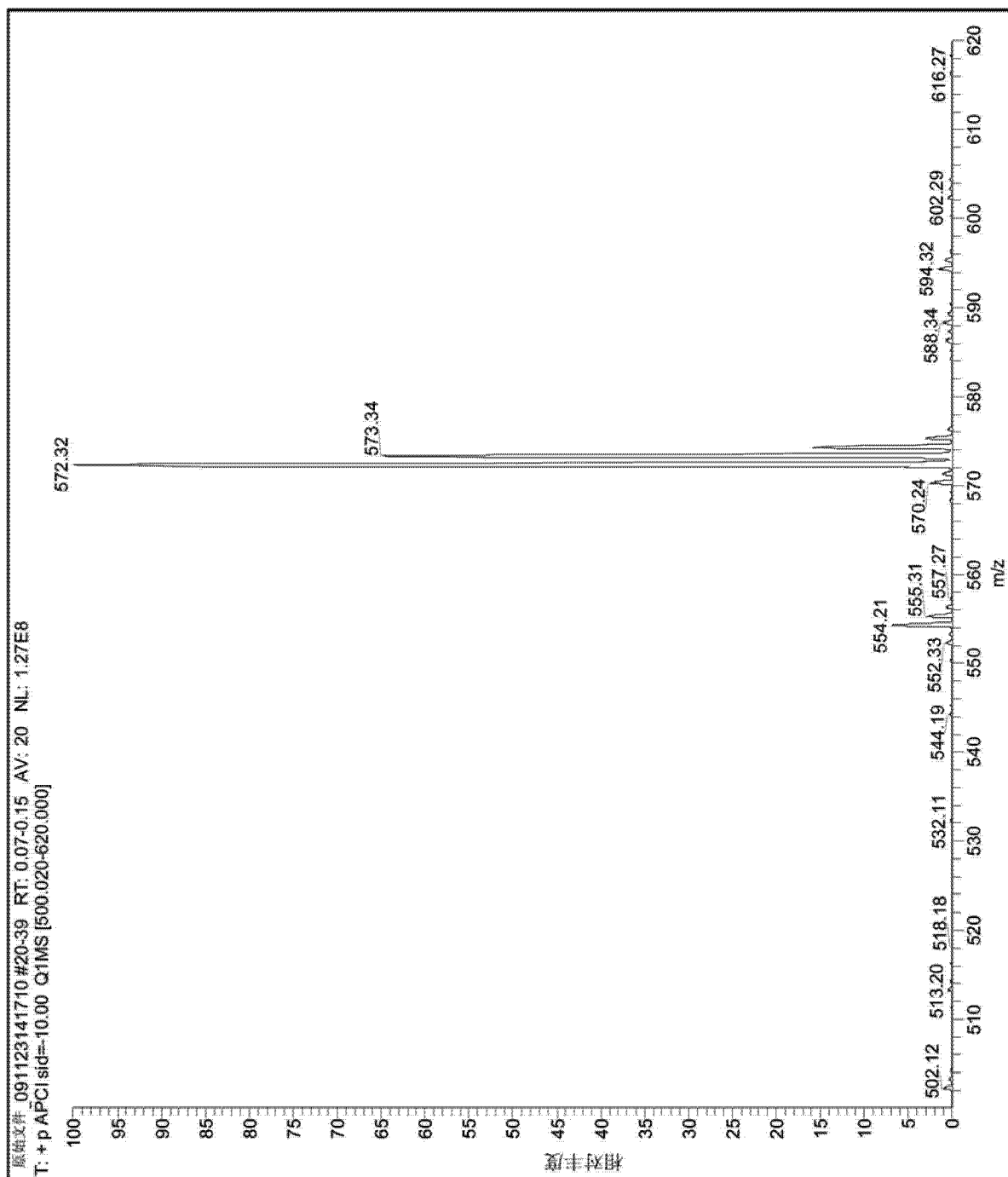


图 11A

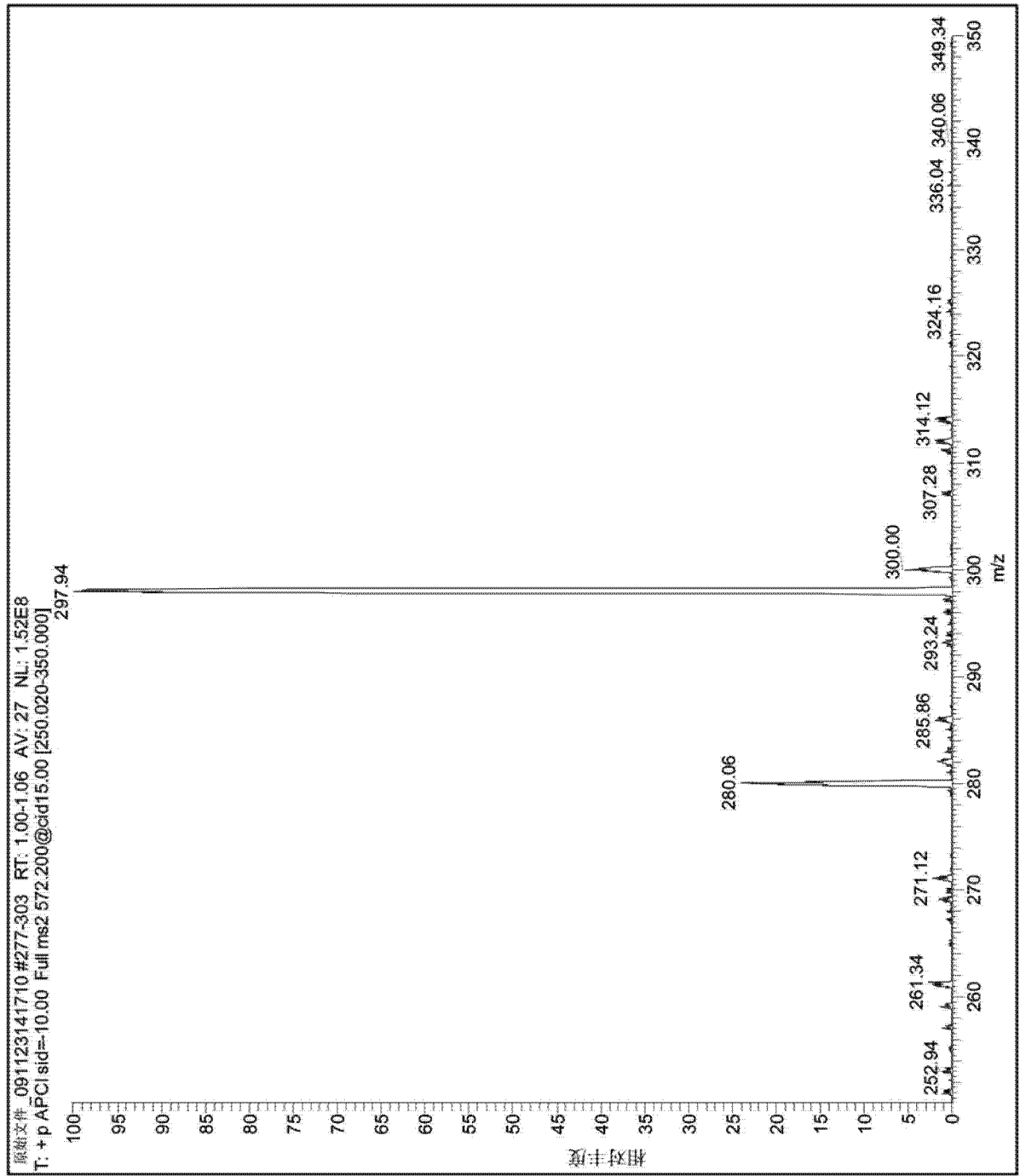


图 11B

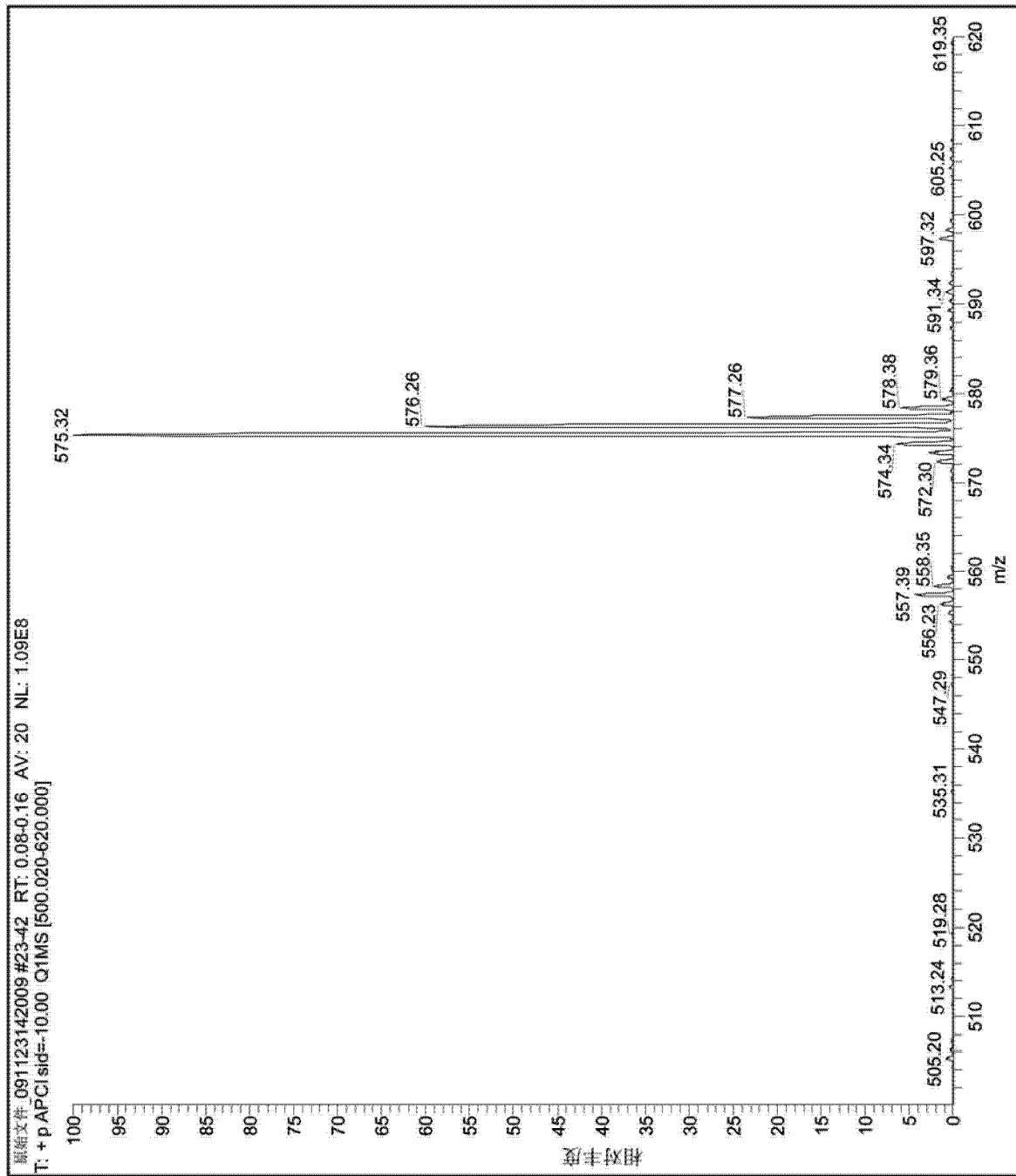


图 12A

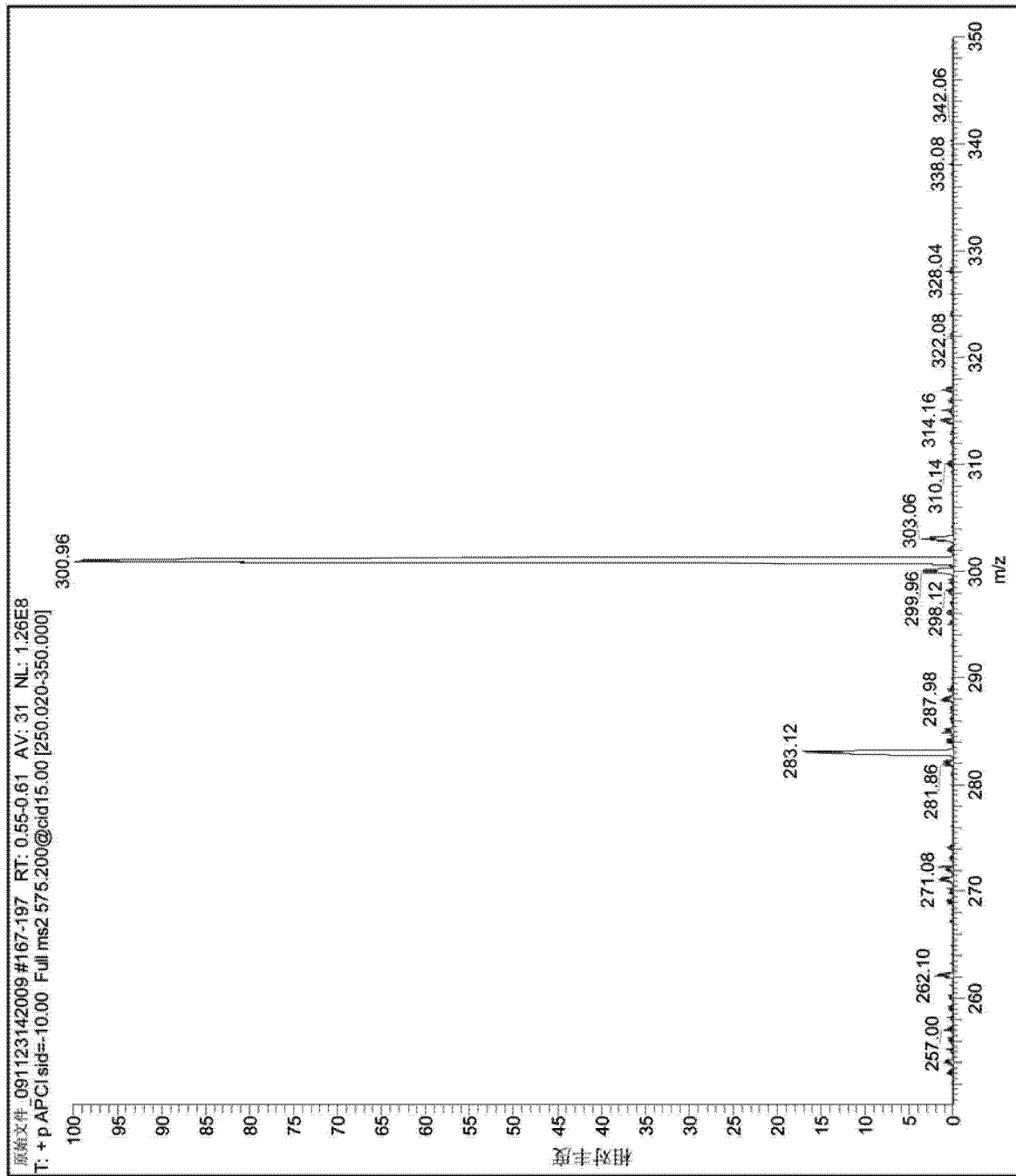


图 12B

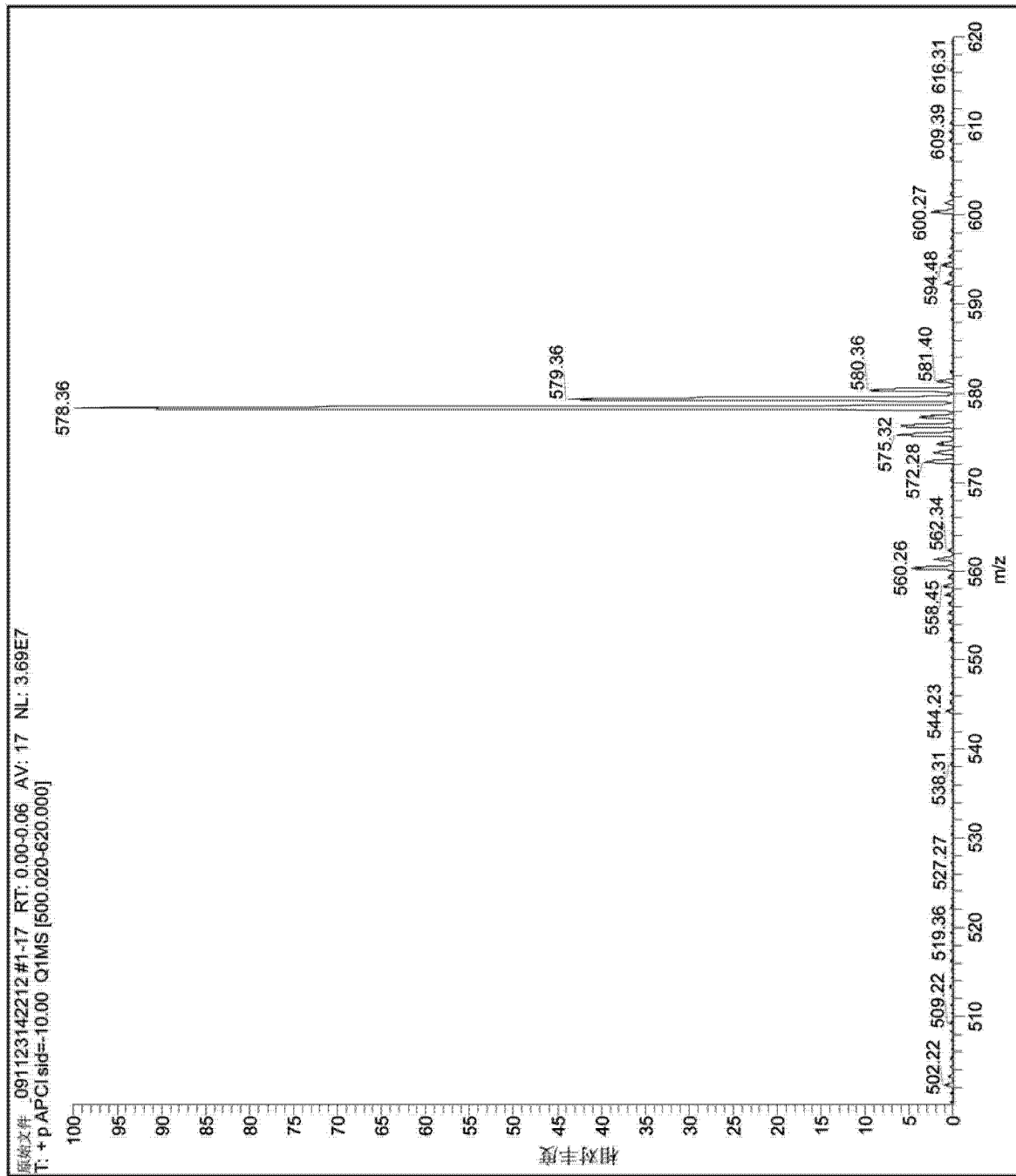


图 13A

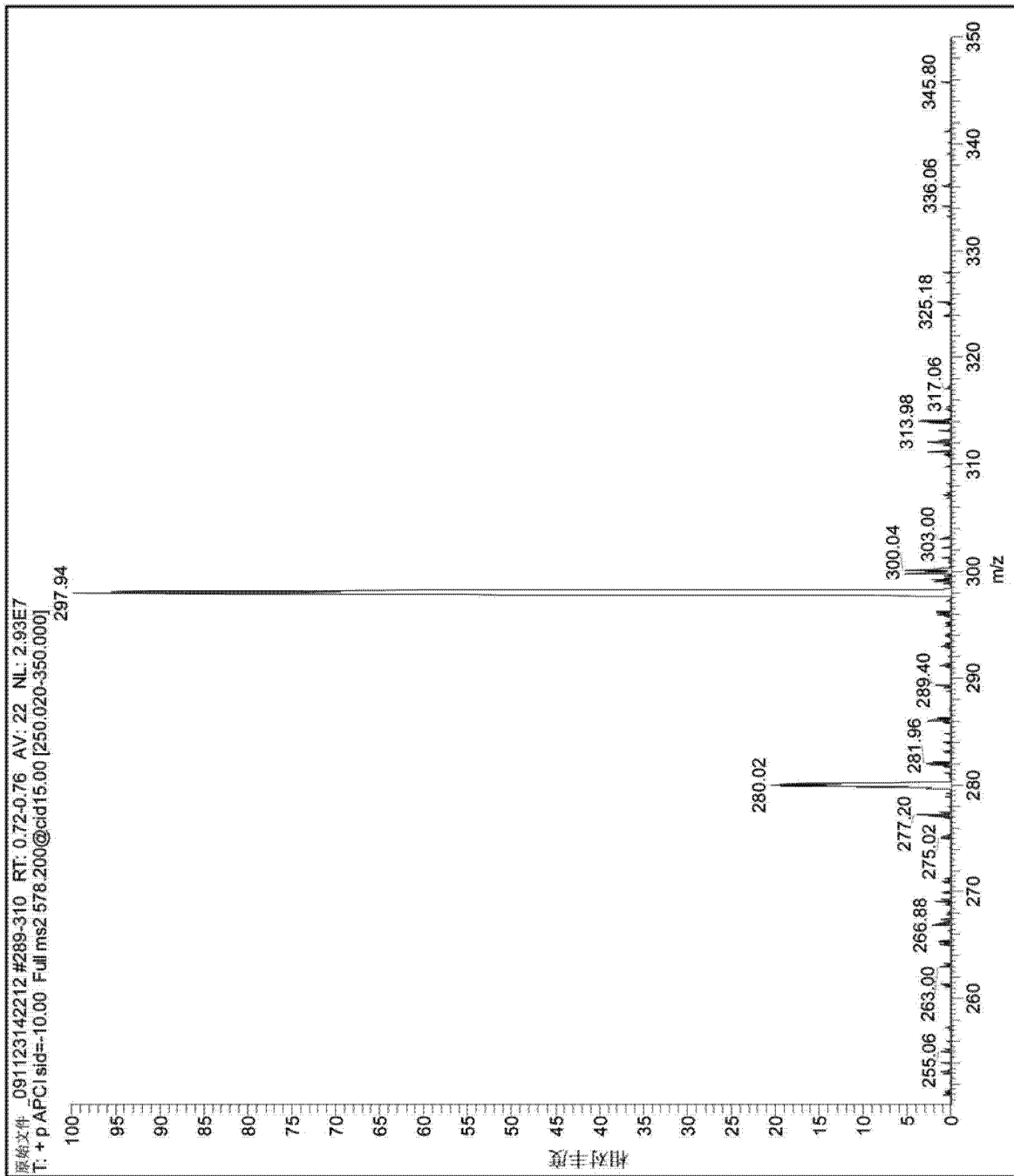


图 13B

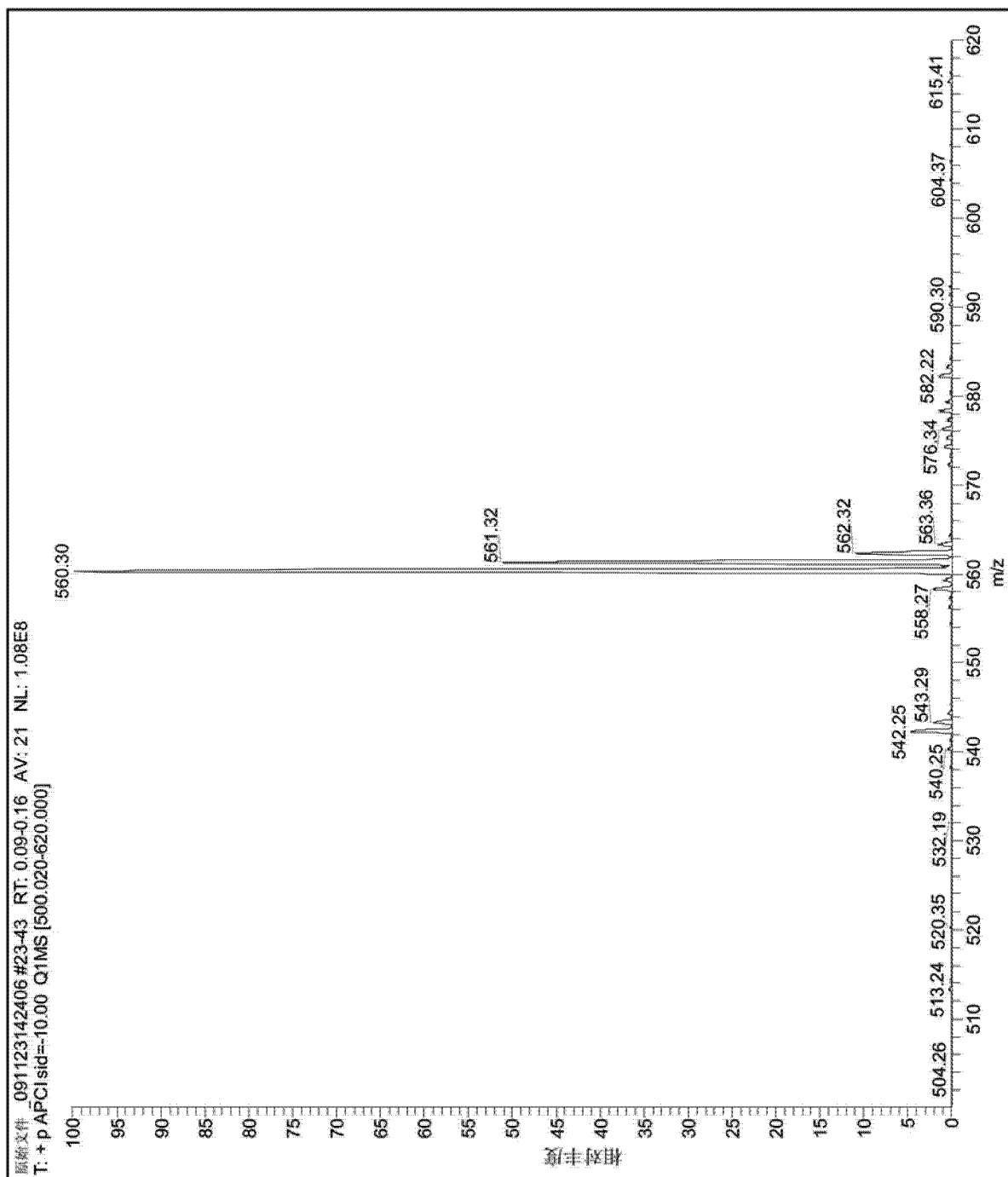


图 14A

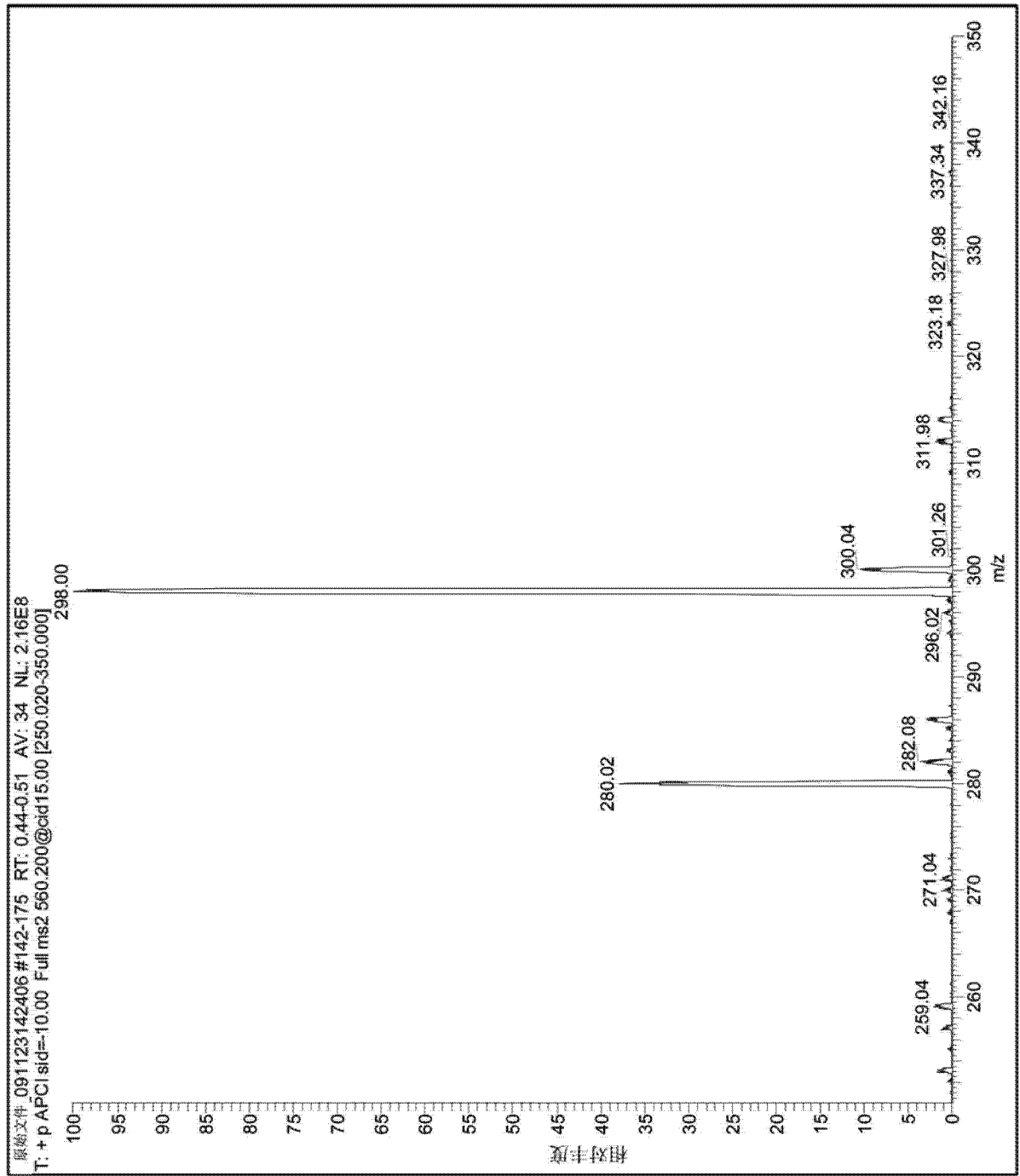


图 14B

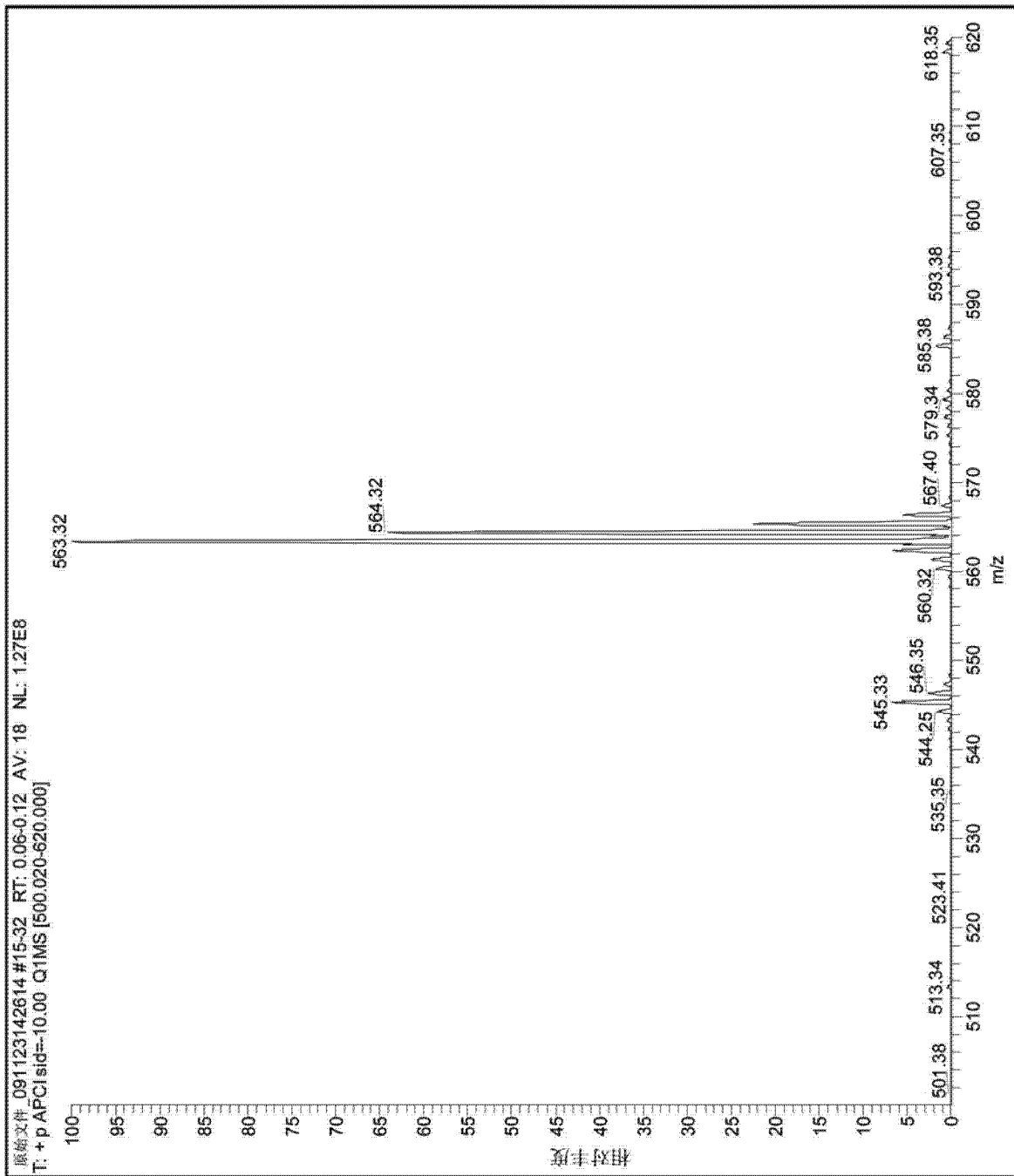


图 15A

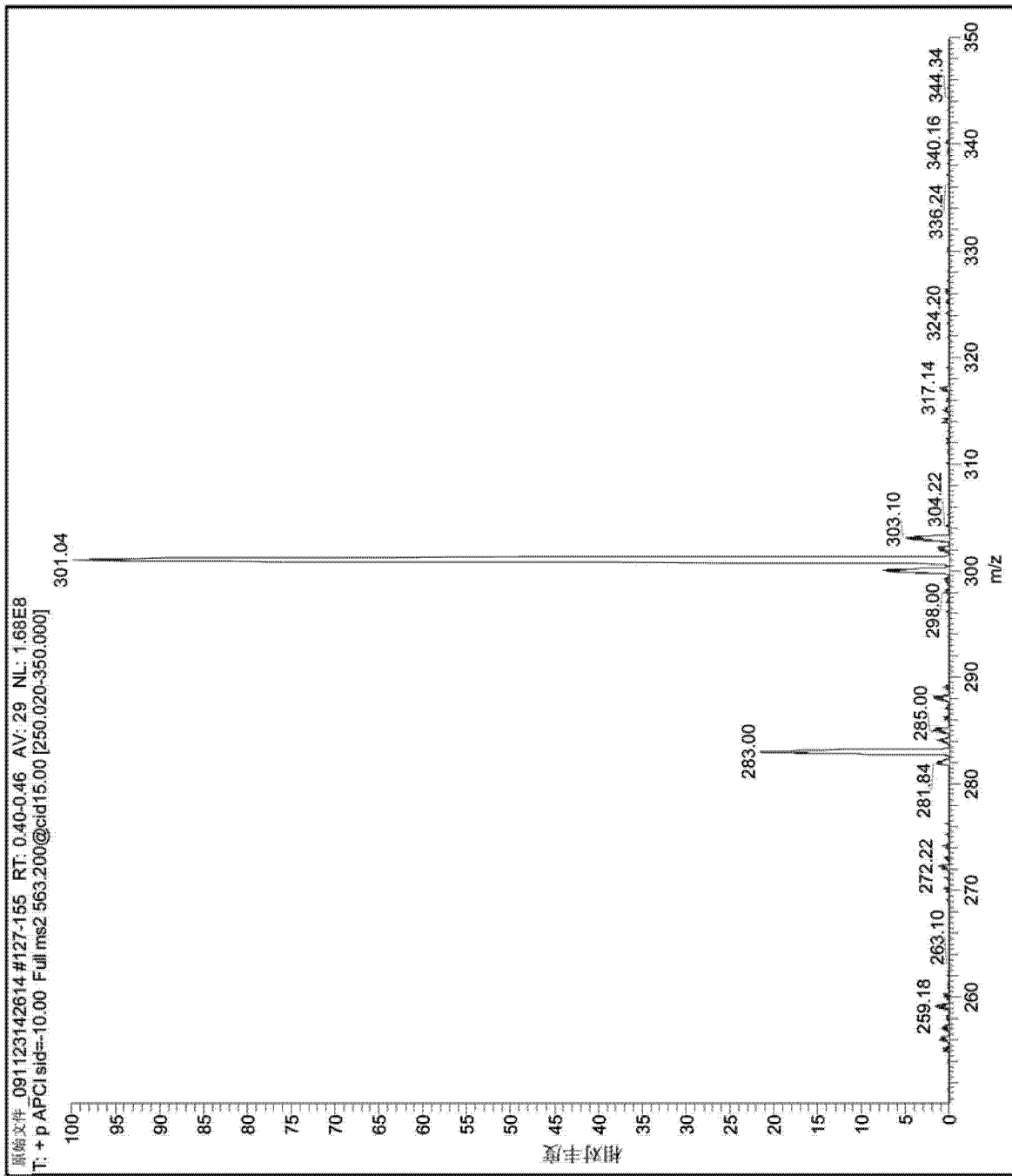


图 15B

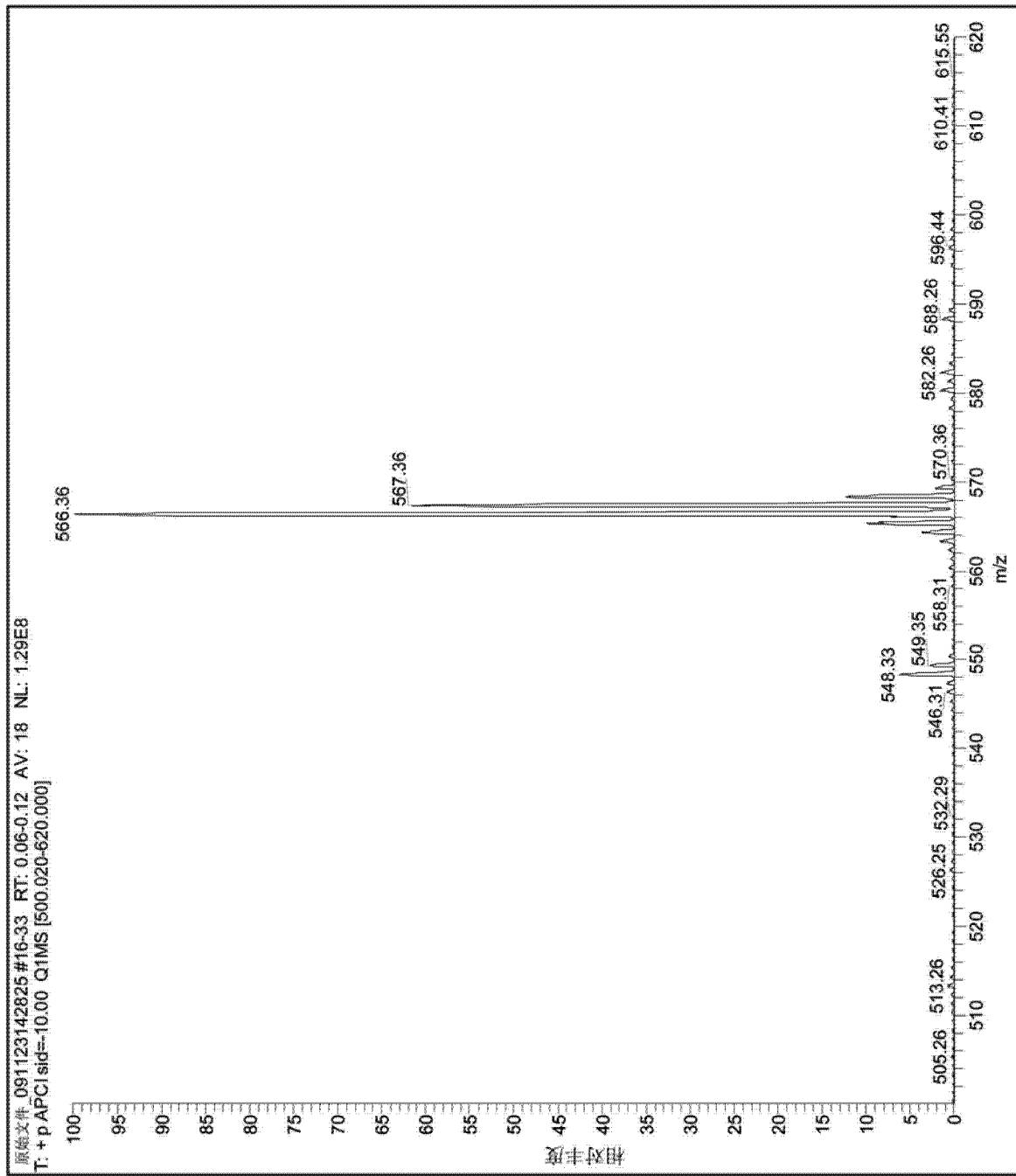


图 16A

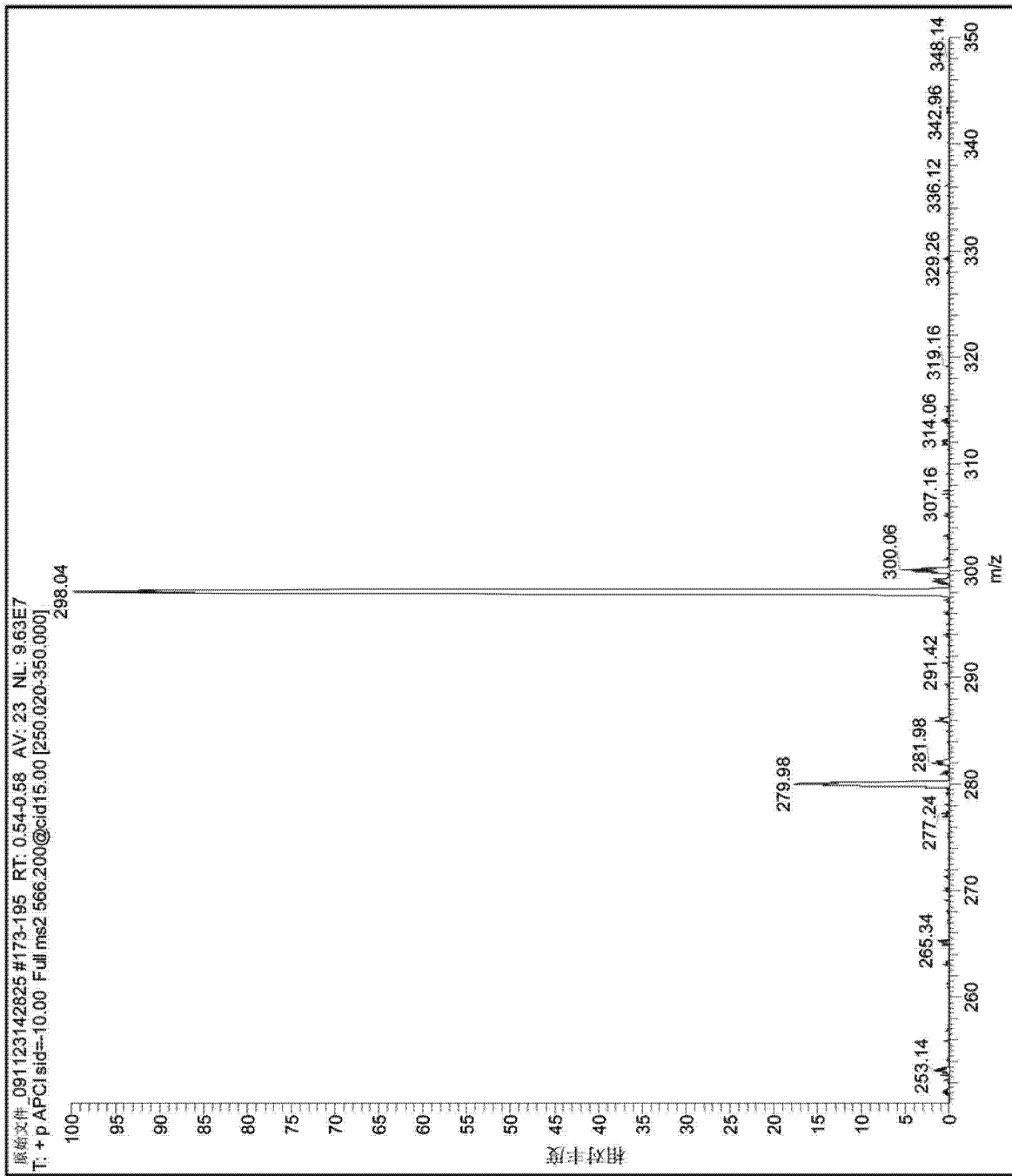


图 16B