



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104040332 A

(43) 申请公布日 2014. 09. 10

(21) 申请号 201380005066. 3

(22) 申请日 2013. 01. 16

(30) 优先权数据

61/588, 902 2012. 01. 20 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 07. 09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2013/000055 2013. 01. 16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/108113 EN 2013. 07. 25

(71) 申请人 DH 科技发展私人贸易有限公司

地址 新加坡新加坡

(72) 发明人 萨巴卡·戴伊

萨巴辛·普卡雅斯特哈

(74) 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限公司
11287

代理人 曹晓斐

(51) Int. Cl.

G01N 30/72(2006. 01)

G01N 33/50(2006. 01)

G01N 33/487(2006. 01)

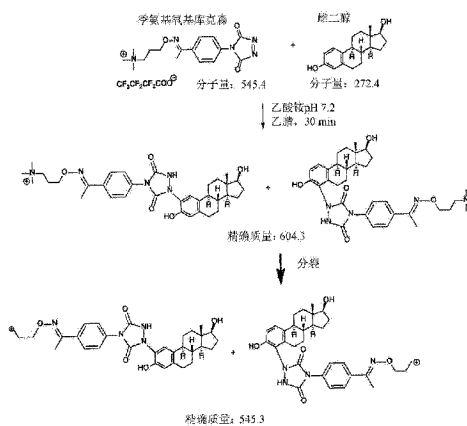
权利要求书4页 说明书22页 附图6页

(54) 发明名称

使用标记化学和 LC-MSMS workflow 分析具有酚系 OH 的雌二醇和分析物

(57) 摘要

本发明描述一种使用季氨氧基库克森 QAOC 试剂对包含酚系 OH 的样品, 如包含酚系 OH 的类固醇进行质谱分析的方法。所述 QAOC 试剂可以改进酚系 OH 样品的电离和分裂特性, 其进而可以改进定量和鉴别。所述方法可以包括用所述 QAOC 试剂衍生化所述酚系 OH 样品以产生加合物和使用质谱法来分析所述加合物。所述样品的衍生化可以为单步反应, 其中所述 QAOC 试剂包含氨氧基 MS 标记, 或可以为多步反应, 其中通过使基于羰基取代的 PTAD 的试剂与所述样品反应, 接着与氨氧基 MS 标记组合来形成所述加合物。也可以在使样品与所述试剂反应之前对所述样品进行富集。所述方法也可以允许多路复用。

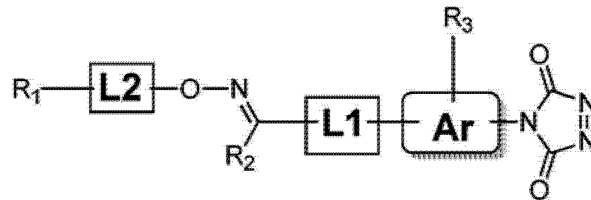


1. 一种用于样品的质谱分析的方法,其包含以下步骤:

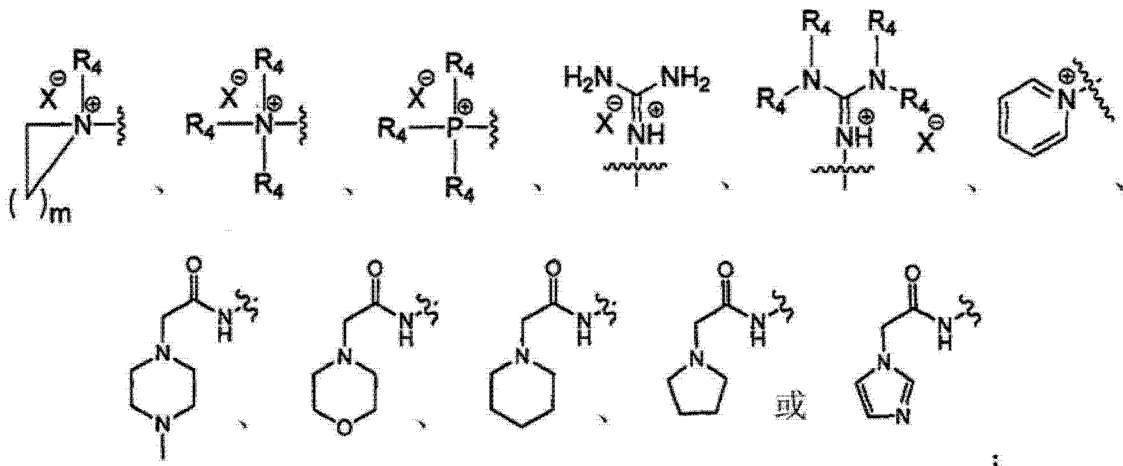
用 QAOC 试剂处理所述样品以标记所述样品中的至少一种酚系 OH 分析物以产生酚系 QAOC 加合物;和

使用质谱仪分析所述酚系 QAOC 加合物。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述 QAOC 试剂具有下式:



其中 R_1 为



R_2 为环状、分支链或直链、经取代或未经取代的 C_1 - C_{18} 烷基、 C_1 - C_{18} 烯炔或 C_1 - C_{18} 炔炔或经取代或未经取代的芳族基;

R_3 不存在或为一或多个相同或不同的取代基,其为环状、分支链或直链 C_1 - C_{18} 烷基、 C_1 - C_{18} 烯炔或 C_1 - C_{18} 炔炔;卤素; $-NO_2$;经取代或未经取代的芳族基;经保护或未经保护的氨基、酰基、羧酸或硫醇基; $-SO_3H$ 、 $-PO_4^-$ 、硫醚、醚、环氧化物、硫代环氧化物、叠氮化物或氮丙啶;

每一 R_4 独立地为 H 或环状、分支链或直链 C_1 - C_{18} 烷基、 C_1 - C_{18} 烯炔或 C_1 - C_{18} 炔炔;

m 为 1 与 20 之间的整数;

X 为阴离子;

$L1$ 和 $L2$ 独立地为键或连接基团;并且

Ar 为键、芳基或杂芳基。

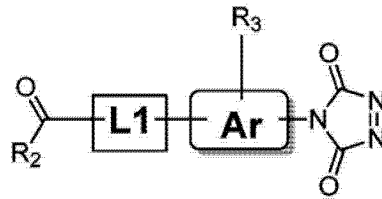
3. 根据权利要求 2 所述的方法,其中 R_2 为甲基或乙基并且 R_3 不存在;

和 / 或 $L1$ 和 $L2$ 独立地为键、肽、寡聚物、PEG 或 C_1 - C_{20} 亚烷基链。

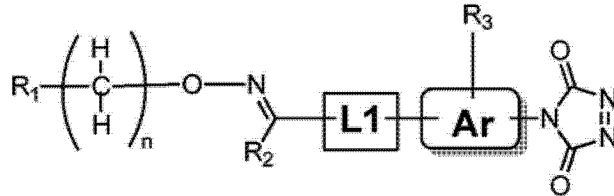
4. 根据权利要求 2 所述的方法,其中所述至少一种酚系 OH 分析物为类固醇并且任选地其中所述类固醇为选自由以下组成的群组的雌激素化合物:雌三醇、16 β -表雌三醇、17 β -表雌三醇和 16,17 β -表雌三醇、雌酮 (E1)、雌酮硫酸盐 (E1s)、17 α -雌二醇 (E2a)、17 β -雌二醇 (E2b)、雌二醇硫酸盐 (E2s)、马烯雌酮 (EQ)、17 α -二氢马烯雌酮 (EQa)、17 β -二氢马烯雌酮 (EQb)、马萘雌酮 (EN)、17 α -二氢马萘雌酮 (ENa)、17 β -二氢马萘雌酮 (ENb)、 $\Delta 8$,

9-脱氢雌酮 (dE1)、 Δ 8,9-脱氢雌酮硫酸盐 (dE1s)。

5. 根据权利要求 2 所述的方法,其中所述 QAOC 试剂是通过使具有以下结构的化合物:



与氨基标记反应来产生,以形成具有以下结构的标记的 QAOC 试剂:

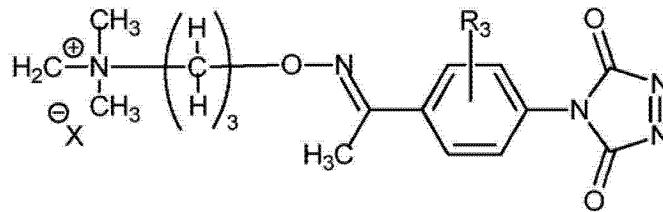


其中 n 为 1 与 20 之间的整数。

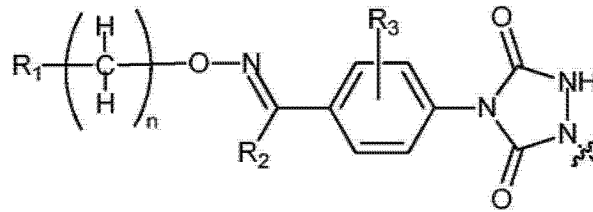
6. 根据权利要求 5 所述的方法,其中 R₂ 为甲基或乙基, R₃ 不存在, R₄ 为甲基, m 为 1 与 5 之间的整数,并且 X 为全氟羧酸盐;和/或

其中 L1 为键, Ar 为苯基,并且 n 为 1 与 8 之间的整数。

7. 根据权利要求 5 所述的方法,其中所述标记的 QAOC 试剂具有以下结构:



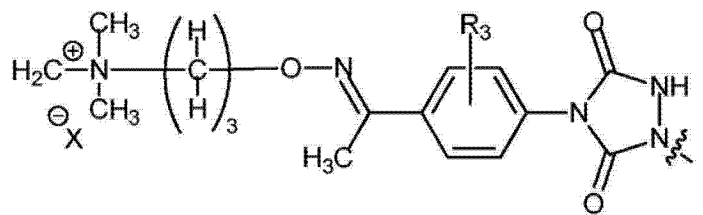
8. 根据权利要求 2 所述的方法,其中所述方法进一步包含使所述酚系 QAOC 加合物与氨基标记反应以形成具有以下子结构的标记的加合物的步骤:



9. 根据权利要求 8 所述的方法,其中 R₂ 为甲基或乙基, R₃ 不存在, R₄ 为甲基, n 为 2 与 4 之间的整数,并且 X 为全氟羧酸盐。

10. 根据权利要求 2 或 8 所述的方法,其中 X 为 CF₃COO⁻、CF₃CF₂COO⁻、CF₃CF₂CF₂COO⁻、CF₃SO₃COO⁻、(C₆H₅)₄B⁻。

11. 根据权利要求 8 所述的方法,其中所述标记的加合物具有以下子结构



12. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述样品为生物样品并且其中所述生物样品任性地选自血液、血浆、血清、尿液或唾液、脑脊液、组织、毛发、体液。

13. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述至少一种酚系 OH 分析物为类固醇,并且其中所述方法进一步包含:

(a) 通过用已知量的一或多种酚系 OH 内标和一或多种具有已知增量浓度的酚系 OH 分析物对已知体积的一或多种酚系 OH 分析物耗尽的生物样品进行加标来产生一组校准基质;

(b) 用 QAOC 试剂处理从步骤 (a) 获得的所述样品以标记至少一种酚系 OH 分析物 and 对应内标;

(c) 使用 LC-MSMS 分析步骤 (b) 的所述校准基质;

(d) 使用从步骤 (c) 的所述分析获得的数据产生校准曲线;

(e) 用已知量的一或多种酚系 OH 内标对所述样品中的所述酚系 OH 分析物进行加标;

和

(f) 使用所述校准曲线来评估样品中为类固醇的所述至少一种酚系 OH 分析物的量;

并且任性地其中分析混合物包含在使用质谱法之前在分开的时间洗脱标准物加合物和酚系 QAOC 加合物,并且任性地

进一步包含进行样品制备以于所述校准基质中富集或清理所述酚系 OH 分析物和所述一或多种酚系 OH 内标的步骤。

14. 根据权利要求 13 所述的方法,其中分析所述混合物进一步包含使用三重四极 MS 平台对所述酚系 QAOC 加合物进行母离子-子离子跃迁监测 PDITM。

15. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述至少一种酚系 OH 分析物为类固醇,并且其中所述方法进一步包含:

(a) 提供包含已知浓度的类固醇分析物的内标或外标,所述分析物包含酚系 OH;

(b) 用所述 QAOC 试剂处理所述标准物以形成标准物加合物;

(c) 使用质谱来分析所述标准物加合物;

(d) 估计所述样品中为类固醇的所述至少一种酚系 OH 分析物的量,并且任性地其中分析所述酚系 QAOC 加合物和分析所述标准物加合物包含使用三重四极 MS 平台对所述酚系 AOC 加合物和所述标准物加合物进行母离子-子离子跃迁监测 PDITM。

16. 根据权利要求 1 所述的方法,其中同时测量至少两种酚系 OH 分析物和任性地四种酚系 OH 分析物。

17. 根据权利要求 1 所述的方法,其进一步包含使所述酚系 OH 分析物与所述 QAOC 试剂的一或多种同位素变体反应以形成至少一种酚系 OH 内标的步骤。

18. 根据权利要求 1 所述的方法,其进一步包含同时定量一或多种维生素 D-QAOC 和酚系 QAOC 加合物。

19. 一种用于样品的质谱分析的试剂盒,其包含

在包装中的 QAOC 试剂和包含已知浓度的类固醇分析物的标准物,所述分析物包含酚系 OH,并且任性地其中所述 QAOC 试剂包含氨氧基质谱标记剂。

20. 一种用于样品的质谱分析的试剂盒,其包含

在包装中的基于羰基取代的 PTAD 的试剂、氨氧基质谱标记剂和包含已知浓度的类固

醇分析物的标准物,所述分析物包含酚系 OH。

使用标记化学和LC-MSMS workflow分析具有酚系OH的雌二醇 和分析物

[0001] 相关美国申请

[0002] 本申请要求美国临时申请序列号 61/588902 的优先权,其全部传授内容以引用的方式并入本文中。

技术领域

[0003] 本发明传授内容涉及质谱和适用于质谱的标记试剂的领域。

背景技术

[0004] 标记化学大体上用于改进质谱信号。

[0005] 使用水性烯型反应以使用试剂 4- 苯基 -3H-1,2,4- 三唑 -3,5(4H)- 二酮 (通常被称为 PTAD 或库克森试剂 (Cookson Reagent)) 衍生酪氨酸的共轭可以提供对于合成双特异性抗体尤其适用的共轭物 (Hitoshi Ban, 吉里亚加夫里柳克 (Jilia Gavriilyuk), 卡洛斯 F. 巴巴斯 (Carlos F. Barbas), 美国化学协会期刊 (J. Am. Chem. Soc.) 2010, 132, 1523-1525)。PTAD 也已用于与化合物的维生素 D 类共轭以用于质谱分析 (岛田一兵 (Kazutake Shimada), 大江友之 (Tomoyuki Oe), 水口辰人 (Tatsuhito Mizuguchi), 分析家 (Analyst), 1991, 116, 1393-1397)。

[0006] 开发季氨基氧基库克森 (Cookson) (“QAOC”), 一种与 PTAD 具有相同反应核心的试剂以用于分析如美国公开专利申请 2011/0212534 (其以全文引用的方式并入本文中) 中所述的维生素 D3 代谢物。发现此试剂与维生素 D3 的共轭二烯官能团反应以对于维生素 D3 的质谱 (MS) 分析提供改进的电离和分裂特性。

[0007] 精确分析和定量激素和其它含有酚系 OH 的化合物变得越来越重要。举例来说,雌激素和雌激素类化合物经由激素取代疗法在现今的社会中正发挥越来越多的作用。并且,分析和定量雌激素和雌激素类化合物帮助处理雌激素相关的疾病,如乳癌。

[0008] 但是,仍需要对于含有酚系 OH 的化合物,如类固醇或雌激素进行改进质谱分析的标记。通常难以通过质谱来分析这些化合物,所述化合物可以包括激素,如雌二醇。举例来说,这些化合物中的许多不含可电离基团。因此,可能难以定量生物基质中的这些分子,例如雌二醇,尤其在低浓度下。

[0009] 尽管如五氟苄基溴和丹磺酰氯的试剂常用于使用质谱以进行雌二醇分析的衍生化策略中,但包含利用含有酚系 OH 的分析物的所述衍生作用的 LC/MSMS 的当前策略未能达到临床分析所需的检测限 (岛田 (Shimada) 等人,分析家 (Analyst), 116, 1393-1397(1991); 东彦 (Higashi) 等人,化学与药学公报 (Chem. Pharm. Bull.) 54(11), 1479-1485(2006))。需要一种克服这些缺点的定量这些分析物的方法。

发明内容

[0010] 根据各种实施例,本发明传授内容提供定量具有一个或一个以上酚系 OH 部分和

其代谢物的化合物（在本文中统称为酚系 OH 分析物）的方法。

[0011] 根据各种实施例，公开一种用于对酚系 OH 分析物进行质谱分析的方法，其可包含用 QAOC 试剂标记分析物以产生加合物和使用质谱 (MS) 来分析加合物。在一些实施例中，可以使用 LC-MSMS 来鉴别和定量加合物。在一些实施例中，可以使用 LC-MSMS 和多重反应监测 (MRM) workflow 来分析加合物。在一些实施例中，加合物可以在反相管柱上具有相异保留时间和相异质量。在一些实施例中，在 高能碰撞下，可以产生报告子基团。在一些实施例中，对于各报告子基团检测的强度或峰面积不仅可以用于鉴别，而且可以用于定量。根据各种实施例，所述方法也可以包含样品富集，例如在用 QAOC 试剂标记分析物之前。

[0012] 在一些实施例中，可以使用母离子 - 子离子跃迁监测 (PDITM)，例如使用三重四极 MS 平台来分析加合物。

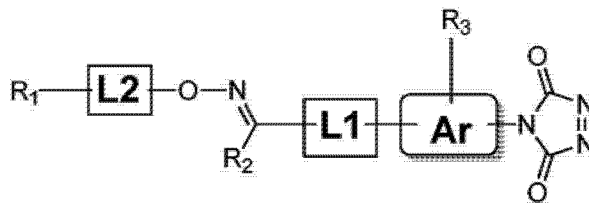
[0013] 在一些实施例中，可以使用质谱同时分析已经用 QAOC 试剂标记的具有酚系 OH 基团的多种不同分析物。举例来说，不同 QAOC 试剂可以用于标记不同分析物，并且可以使用质谱，例如 LC-MSMS 来分析标记的分析物。在一些实施例中，QAOC 试剂含有一个或一个以上同位素标记的原子。

[0014] 根据各种实施例，酚系 OH 分析物可以为类固醇和雌激素。举例来说，酚系 OH 分析物可以为雌激素化合物，如雌酮 (E1)、雌酮硫酸盐 (E1s)、17 α -雌二醇 (E2a)、17 β -雌二醇 (E2b)、雌二醇硫酸盐 (E2s)、马烯雌酮 (EQ)、17 α -二氢马烯雌酮 (EQa)、17 β -二氢马烯雌酮 (EQa)、马茶雌酮 (EN)、17 α -二氢马茶雌酮 (ENa)、17 β -二氢马茶雌酮 (ENb)、 Δ 8,9-脱氢雌酮 (dE1)、 Δ 8,9-脱氢雌酮硫酸盐 (dE1s) 雌三醇、16-表雌三醇、17-表雌三醇和 16, 17-表雌三醇。

[0015] 在一些实施例中，基于羰基取代的苯基 -3H-1,2,4-三唑 -3,5(4H)-二酮（羰基 -PTAD）的试剂可以在标记酚系 OH 分析物之前偶合于氨基标记剂（此方法在本文中被称作单步标记反应）。在其它实施例中，无氨基标记剂的基于羰基取代的 PTAD 的试剂可以与酚系 OH 分析物反应以标记分析物。标记的分析物可以随后经质量分析。或者，可以在质量分析之前在标记的分析物的羰基部分用氨基标记来标记所述分析物（此方法在本文中被称作两步标记反应）。

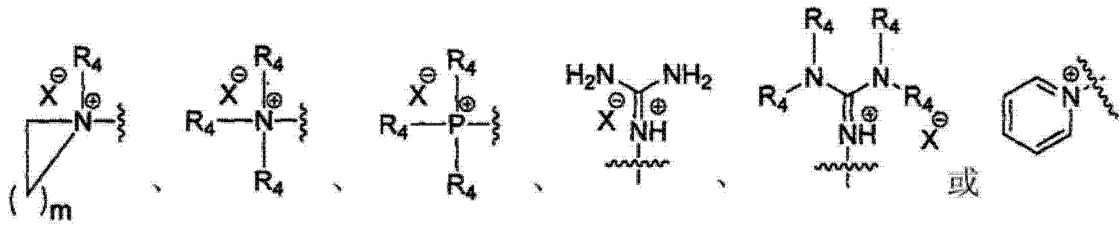
[0016] 可以通过下式描述 QAOC 试剂：

[0017]



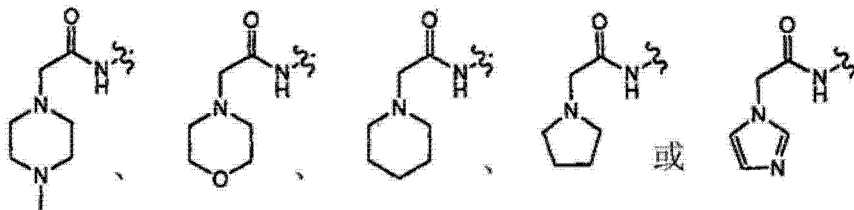
[0018] 其中 R₁ 为

[0019]



[0020] 或其中 R₁ 为：

[0021]



[0022] R₂ 为环状、分支链或直链、被取代或未被取代的 C₁-C₁₈ 烷基、C₁-C₁₈ 烯炔或 C₁-C₁₈ 炔炔或被取代或未被取代的芳族基；R₃ 不存在或为一个或一个以上相同或不同的取代基，其为环状、分支链或直链 C₁-C₁₈ 烷基、C₁-C₁₈ 烯炔或 C₁-C₁₈ 炔炔；卤素（例如 Cl、Br、I 或 F）；-NO₂；被取代或未被取代的芳族（芳基）基；受保护或未受保护的氨基、酰基、羧基或硫醇基；-SO₃H、-PO₄⁻、硫醚、醚、环氧化物、环硫化物、叠氮化物或氮丙啶；

[0023] 每一 R₄ 独立地为 H 或环状、分支链或直链 C₁-C₁₈ 烷基、C₁-C₁₈ 烯炔或 C₁-C₁₈ 炔炔；

[0024] m 为 1 与 20 之间的整数；

[0025] X 为阴离子；

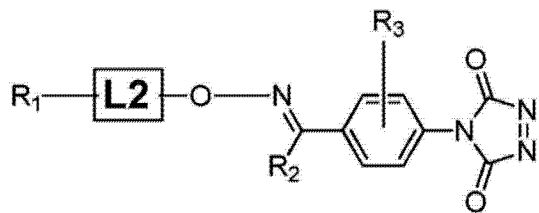
[0026] L1 和 L2 独立地为键或连接基团；并且

[0027] Ar 为键、芳基或杂芳基。

[0028] 在一些实施例中，Ar 为芳基。在一些实施例中，Ar 为苯基或萘基。在一些实施例中，L1 和 L2 独立地为键、肽、寡聚物、PEG、C₁-C₂₀ 亚烷基链、C₁-C₆ 亚烷基链或 C₂-C₄ 亚烷基链。在一些实施例中，X 为全氟羧酸盐。在一些实施例中，X 为 CF₃COO⁻、CF₃CF₂COO⁻、CF₃CF₂CF₂COO⁻、CF₃SO₃COO⁻ 或 (C₆H₅)₄B⁻。

[0029] 在一些实施例中，可以通过下式描述 QAOC 试剂：

[0030]



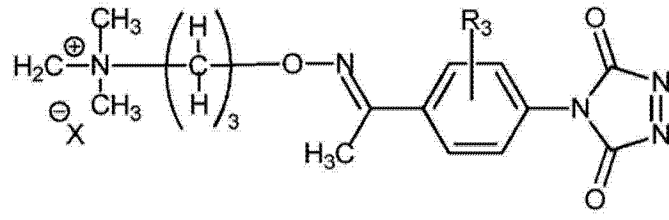
[0031] 在一些实施例中，QAOC 试剂可以包含氨氧基标记剂，举例来说，用于单步标记反应的 QAOC 试剂可以具有以上结构，其中 L2 为 C₁-C₂₀ 亚烷基。

[0032] 在一些实施例中，在任一以上结构中，R₂ 为甲基或乙基。在一些实施例中，R₃ 不存在。在一些实施例中，R₄ 为甲基。在一些实施例中，m 为 1 与 6 之间的整数或 1 与 3 之间的整数。在一些实施例中，n 为 1 与 10 之间的整数、1 与 5 之间的整数或 2 与 4 之间的整数。在一些实施例中，X 为全氟羧酸盐。在一些实施例中，X 为 CF₃COO⁻、CF₃CF₂COO⁻、CF₃CF₂CF₂COO⁻、

$\text{CF}_3\text{SO}_3\text{COO}$ 或 $(\text{C}_6\text{H}_5)_4\text{B}^-$ 。

[0033] 在一些实施例中, QAOC 试剂为以下化合物:

[0034]



[0035] 在其它方面中,公开一种用于鉴别和定量样品中的一或多种酚系 OH 分析物的方法,其包含用 QAOC 试剂处理样品以标记样品中的一个或一个以上酚系 OH 分析物(若存在)。随后可以通过质谱来分析处理的样品以鉴别和定量一或多种酚系 OH 分析物。举例来说,处理的样品可以经受 LC-MSMS 分析以鉴别和定量一或多种酚系 OH 分析物。

[0036] 在一些实施例中,样品为生物样品,如血液、血浆、血清、尿液或唾液。此外,在一些实施例中,酚系 OH 分析物为类固醇或雌激素,例如雌酮 (E1)、雌酮硫酸盐 (E1s)、17 α -雌二醇 (E2a)、17 β -雌二醇 (E2b)、雌二醇硫酸盐 (E2s)、马烯雌酮 (EQ)、17 α -二氢马烯雌酮 (EQa)、17 β -二氢马烯雌酮 (EQb)、马萘雌酮 (EN)、17 α -二氢马萘雌酮 (ENa)、17 β -二氢马萘雌酮 (ENb)、 Δ 8,9-脱氢雌酮 (dE1)、 Δ 8,9-脱氢雌酮硫酸盐 (dE1s) 雌三醇、16 β -表雌三醇、17 β -表雌三醇和 16,17 β -表雌三醇。

[0037] 在以上方法中的一些实施例中,酚系 OH 分析物为类固醇,并且所述方法进一步包含:通过用已知量的一或多种酚系 OH 内标和一或多种具有已知增量浓度的酚系 OH 分析物对已知量的酚系 OH 分析物耗尽的生物样品进行加标来产生一组校准基质;用 QAOC 试剂处理从步骤 (a) 获得的样品以标记至少一个酚系 OH 分析物 and 对应内标;使用 LC-MSMS 分析步骤 (b) 的校准基质;使用从步骤 (c) 的分析获得的数据产生校准曲线;用已知量的一或多种酚系 OH 内标对样品中的酚系 OH 分析物进行加标;和使用所述校准曲线来评估可以为样品中的类固醇的所述至少一种酚系 OH 分析物的量。在一些实施例中,所述方法可以进一步包含进行样品制备以富集或清理校准基质中的酚系 OH 分析物和一或多种酚系 OH 内标的步骤。

[0038] 在一些实施例中,在以上方法中,用 QAOC 试剂处理包含已知浓度的分析物(所述分析物包含酚系 OH,如包含酚系 OH 的类固醇分析物)的内标或外标以标记标准物中的至少一种酚系 OH 分析物从而产生酚系 QAOC 标准物。随后可以例如通过液相色谱 (LC)/质谱 (MS) 来分析标准物和分析物。其可以作为混合物来分析或分别进行分析。可以从获自分析酚系 QAOC 标准物的数据产生校准曲线并且可以估计所述至少一种酚系 OH 分析物(例如样品中的类固醇)的量。对于标准物和分析物的混合物,可以例如使混合物经受 LC 分离以在分开的时间洗脱标记的标准物加合物和标记的分析物(由于在 LC 柱上的不同保留时间)。随后可以通过质谱来分析每一洗脱液。举例来说,可以采用母离子-子离子跃迁监测 (PDITM)。从标记的标准物产生的报告子信号的峰面积的信号强度相对于标记样品的所述信号强度的比可以提供样品中的标记的分析物的相对浓度。由于已知标记的标准物加合物的浓度,可以确定样品中的标记的分析物的比浓度。

[0039] 在一些实施例中,可以用 QAOC 试剂标记包含已知浓度的一或多种所选酚系 OH 分

析物的标准物以形成一或多种标准物加合物。举例来说,可以通过上文所论述的单步或两步标记反应来产生标准物加合物。可以使用质谱来分析标准物加合物并且随后可以将获自此分析的数据与获自分析样品(所述样品与 QAOC 试剂反应以标记其酚系 OH 分析物(若存在))的数据相比以确定样品的酚系 OH 分析物的比浓度。

[0040] 在其它方面中,提供一种包含 QAOC 试剂和一或多种包含用 QAOC 试剂标记的已知浓度的所选酚系 OH 分析物的标准物的试剂盒。

[0041] 在其它方面中,提供一种包含 QAOC 试剂和一或多种包含已知浓度的所选酚系 OH 分析物的标准物的试剂盒。

[0042] 在一些实施例中,可以同时分析酚系 OH 分析物和维生素 D。举例来说,可以用 QAOC 试剂处理含有酚系 OH 分析物和维生素 D 的样品以标记酚系 OH 分析物和维生素 D。随后可以例如在 LC/MSMS 光谱仪的单次操作中分析标记的样品以定量酚系 OH 分析物和维生素 D 二者。

[0043] 在一些实施例中,可以提供允许多路能力的两步标记反应。举例来说,在一些实施例中,可以用不同 QAOC 试剂标记不同酚系 OH 分析物。在其它实施例中,可以用单一 QAOC 试剂标记不同酚系 OH 分析物并且所得加合物可以与不同氨基标记反应。

附图说明

[0044] 参考附图,将更完全地理解本发明传授内容。所述图式预期说明而不是限制本发明传授内容。

[0045] 图 1 为根据本申请人的传授内容的一个实施例的 QAOC 试剂的一个实施例。

[0046] 图 2A 显示可以根据本发明传授内容的各种实施例用于四重分析的一例示性组的四种氨基标记剂。

[0047] 图 2B 显示可以根据本发明传授内容的各种实施例用于四重分析的一例示性组的四种氨基标记剂。

[0048] 图 3A 显示可以根据本发明传授内容的各种实施例用于四重分析的一例示性组的四种质量差示标记,其包含四种不同试剂。

[0049] 图 3B 显示可以根据本发明传授内容的各种实施例用于四重分析的一例示性组的四种质量差示标记,其包含四种不同试剂。

[0050] 图 4 为显示雌二醇与 QAOC 试剂的反应的反应流程,所述反应形成两种相同质量的异构物并且那两种异构物的分裂模式产生根据本发明传授内容的各种实施例的报告子离子。

[0051] 图 5A 为使用 API-5500QTRP™ 质谱仪的显示于图 3 中的反应混合物的 Q1-MS-Q1 扫描:预期 $M^+ = 604.35$, 实验值为 604.2。

[0052] 图 5B 显示雌二醇-QAOC 加合物的两种异构形式的化学结构。

[0053] 图 6A 显示图 5B 中显示的化合物在 $m/z = 604.3$ 处和包括中性丢失片段的一些 MRM 片段在 $m/z = 545.1$ 处的碰撞能量扫描。

[0054] 图 6B 显示图 5A 的加合物以及图 6A 的 MRM 片段的化学结构。

[0055] 图 7 显示图 4 的反应混合物的 LC-MRM 特征曲线,其通过虚线和实线显示两种 MRM 跃迁。

[0056] 图8提供包含用图1的QAOC试剂标记的雌酮(E1)、雌二醇(E2)和雌三醇(E3)的反应的LC-MRM特征曲线。

[0057] 参考例如以下图式,在下文中提供各种实施例的详细描述。应了解,所述图式仅是例示性的并且所有图式参考仅是出于说明的目的,并且并不打算以任何方式限制下文所述的实施例的范围。为方便起见,在整个图式中参考数字也可以重复(有或没有分支)来指示类似成分或特征。

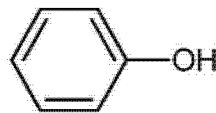
具体实施方式

[0058] 应了解,为了清楚起见,以下论述将阐明本申请人的教示的实施例的各种方面,但每当省略某些具体细节是适宜或恰当的时便省略某些具体细节。举例来说,在替代实施例中,相似或类似特征的论述可以略微简化。众所周知的想法或概念为简洁起见也可以不进行任何详细论述。所属领域的技术人员将认识到,一些实施例可以不需要在每个实施方式中具体描述的细节中的某些,这些细节在本文中仅是为了提供实施例的透彻理解而加以阐述。类似地,将显而易见可以根据公共常识,在不脱离本发明的范围的情况下,对所述实施例稍作更改或改变。可以根据以下实例和各种实施例的描述进一步理解本申请人的教示的各个方面,不应将所述实例和实施例理解为以任何方式限制本申请人的教示的范围。

[0059] 根据各种实施例,提供一种用QAOC试剂定量含有酚系OH的分析物(如雌激素)的方法。在一些实施例中,所述方法可以包含样品富集、衍生化和LC-MSMS分析。样品可以包含一或多种酚系OH分析物或其代谢物。根据各种实施例,样品可以包含多种不同酚系OH分析物,并且标记可以包含用不同QAOC试剂标记每一分析物。

[0060] 酚系OH分析物含有以下酚基:

[0061]



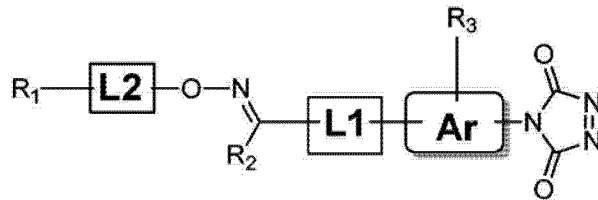
[0062] 在一些实施例中,酚系OH分析物可以为中性的。在一些实施例中,酚系OH分析物为离子。在某些实施例中,酚系OH分析物可以具有在大约50-1000g/mol范围内的分子量。在一些实施例中,酚系OH分析物可以具有在大约100-400g/mol范围内的分子量。在一些实施例中,酚系OH分析物具有2、3或3个以上的酚系OH部分。

[0063] 在一些实施例中,分析的样品可以含有一或多种酚系OH分析物或其代谢物。举例来说,根据各种实施例,样品可以包含一或多种类固醇、类固醇类化合物、雌激素、雌激素类化合物、雌酮(E1)、雌二醇(E2)、17 α -雌二醇、17 β -雌二醇、雌三醇(E3)、16-表雌三醇、17-表雌三醇、和16,17-表雌三醇和/或其代谢物。在各种实施例中,代谢物可以例如为雌三醇、16-表雌三醇(16-epiE3)、17-表雌三醇(17-epiE3)、16,17-表雌三醇(16,17-epiE3)、16-酮雌二醇(16-ketoE2)、16 α -羟雌酮(16 α -OHE1)、2-甲氧雌酮(2-MeOE1)、4-甲氧雌酮(4-MeOE1)、2-羟雌酮-3-甲醚(3-MeOE1)、2-甲氧雌二醇(2-MeOE2)、4-甲氧雌二醇(4-MeOE2)、2-羟雌酮(2OHE1)、4-羟雌酮(4-OHE1)、2-羟雌二醇(2-OHE2)、雌酮(E1)、雌酮硫酸盐(E1s)、17 α -雌二醇(E2a)、17 β -雌二醇(E2b)、雌二醇硫酸盐(E2s)、马烯雌酮(EQ)、17 α -二氢马烯雌酮(EQa)、17 β -二氢马烯雌酮(EQb)、马茶

雌酮 (EN)、17 α -二氢马萘雌酮 (ENa)、17 β -二氢马萘雌酮 (ENb)、 Δ 8,9-脱氢雌酮 (dE1)、 Δ 8,9-脱氢雌酮硫酸盐 (dE1s)。在一些实施例中,酚系 OH 分析物可以为类固醇或类固醇类化合物,其具有经 sp^2 杂化的 A-环和在 A-环的 3-位的 OH 基团。

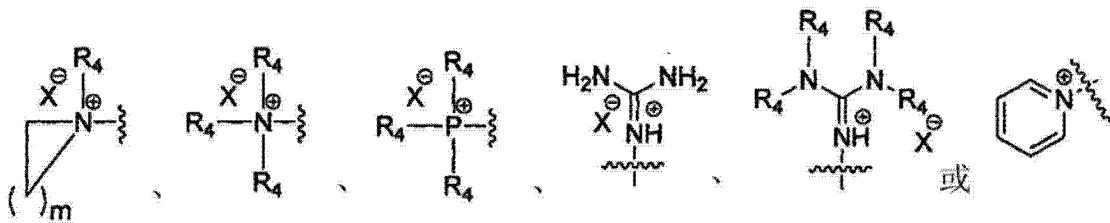
[0064] 根据各种实施例,单步标记反应可以用于标记酚系 OH 分析物。举例来说,所述方法可以包含将具有以下结构中的一种的 QAOC 试剂与分析物的酚系 OH 基团反应,其中通过下式描述 QAOC 试剂:

[0065]



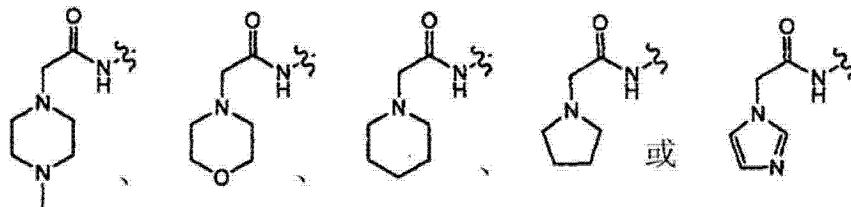
[0066] 其中 R_1 为

[0067]



[0068] 或其中 R_1 为:

[0069]



[0070] R_2 为环状、分支链或直链、被取代或未被取代的 C_1 - C_{18} 烷基、 C_1 - C_{18} 烯烃或 C_1 - C_{18} 炔烃或被取代或未被取代的芳族基;

[0071] R_3 不存在或为一或多种相同或不同的取代基,其为环状、分支链或直链 C_1 - C_{18} 烷基、 C_1 - C_{18} 烯烃或 C_1 - C_{18} 炔烃;卤素(例如 Cl、Br、I 或 F); $-NO_2$;被取代或未被取代的芳族(芳基)基;受保护或未受保护的氨基、酰基、羧基或硫醇基; $-SO_3H$ 、 $-PO_4^-$ 、硫醚、醚、环氧化物、环硫化物、叠氮化物或氮丙啶;

[0072] 每一 R_4 独立地为 H 或环状、分支链或直链 C_1 - C_{18} 烷基、 C_1 - C_{18} 烯烃或 C_1 - C_{18} 炔烃;

[0073] m 为 1 与 20 之间的整数;

[0074] X 为阴离子;

[0075] $L1$ 和 $L2$ 独立地为键或连接基团;并且

[0076] Ar 为键、芳基或杂芳基。

[0077] 除非另行说明,否则术语“芳基”意味着被取代或未被取代的多元不饱和芳族烃取代基,其可以为单环或共同耦合或共价连接的多个环(优选地 1 到 3 个环)。术语“杂芳基”是指含有 1 到 4 个选自 N、O 和 S 的杂原子的芳基(或环),其中氮、碳和硫原子任选地经氧

化,并且氮原子任选地经季铵化。杂芳基可以经由杂原子附接到分子的剩余部分。芳基和杂芳基的非限制性实例包括苯基、1-萘基、2-萘基、4-联苯基、1-吡咯基、2-吡咯基、3-吡咯基、3-吡唑基、2-咪唑基、4-咪唑基、吡嗪基、2-恶唑基、4-恶唑基、2-苯基-4-恶唑基、5-恶唑基、3-异恶唑基、4-异恶唑基、5-异恶唑基、2-噁唑基、4-噁唑基、5-噁唑基、2-呋喃基、3-呋喃基、2-噻吩基、3-噻吩基、2-吡啶基、3-吡啶基、4-吡啶基、2-嘧啶基、4-嘧啶基、5-苯并噁唑基、嘌呤基、2-苯并咪唑基、5-咪唑基、1-异喹啉基、5-异喹啉基、2-喹啉基、5-喹啉基、3-喹啉基和6-喹啉基。以上所指出的芳基和杂芳基环系统中的每一者的取代基选自下文所述的可接受取代基的群组。“芳基”和“杂芳基”也包涵环系统,其中一个或一个以上非芳环系统稠合或另外结合到芳基或杂芳基系统。

[0078] 术语“连接基团”或“连接剂”是指连接两个分子的双功能部分(如亚烷基链、肽、单体、寡聚物或聚合物)。连接基团的非限制性实例为烷基链、聚乙二醇(PEG)和肽或拟肽链。

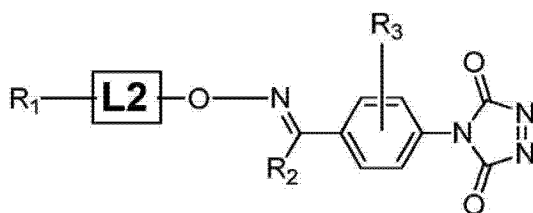
[0079] 在一些实施例中,Ar为芳基。在一些实施例中,Ar为苯基或萘基。

[0080] 在一些实施例中,L1和L2独立地为键、肽、寡聚物、PEG、C₁-C₂₀亚烷基链、C₁-C₆亚烷基链或C₂-C₄亚烷基链。在一些实施例中,L1和L2独立地为键、肽、C₁-C₆亚烷基链或C₂-C₄亚烷基链。

[0081] 在一些实施例中,R₂为甲基或乙基。在一些实施例中,R₃不存在或为C₁-C₈烷基(分支链或直链)、卤基、NO₂、氨基、酰基或羧基。在一些实施例中,R₃不存在。在一些实施例中,每个R₄独立地为H或分支链或直链C₁-C₁₀烷基,或每个R₄独立地为H或分支链或直链C₁-C₆烷基。在一些实施例中,每个R₄是相同的。在一些实施例中,R₄为甲基。在一些实施例中,m为在1与6之间的整数或1与3之间的整数。在一些实施例中,X为全氟羧酸盐。在一些实施例中,X为CF₃COO⁻、CF₃CF₂COO⁻、CF₃CF₂CF₂COO⁻、CF₃SO₃COO⁻或(C₆H₅)₄B⁻。

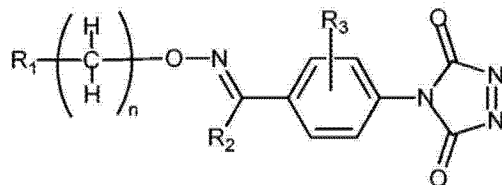
[0082] 在一些实施例中,可以通过下式描述QAOC试剂:

[0083]



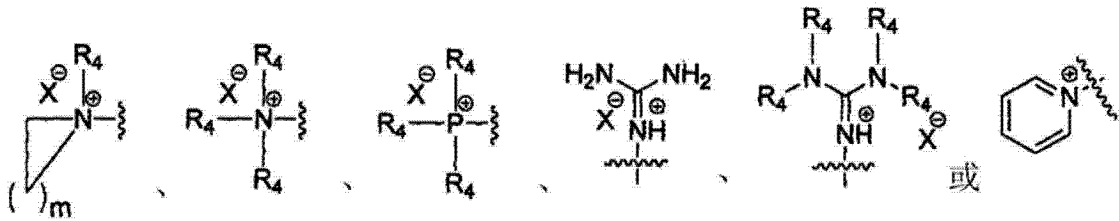
[0084] 或通过下式:

[0085]



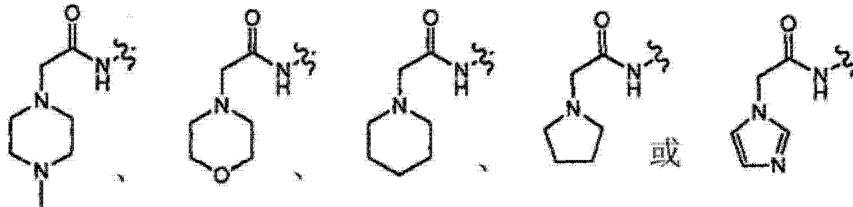
[0086] 其中R₁为:

[0087]



[0088] 或其中 R_1 为：

[0089]



[0090] R_2 为环状、分支链或直链、被取代或未被取代的 C_1-C_{18} 烷基、 C_1-C_{18} 烯炔或 C_1-C_{18} 炔烃或被取代或未被取代的芳族基；

[0091] R_3 不存在或为一或多种相同或不同的取代基，其为环状、分支链或直链 C_1-C_{18} 烷基、 C_1-C_{18} 烯炔或 C_1-C_{18} 炔烃；卤素（例如 Cl、Br、I 或 F）； $-NO_2$ ；被取代或未被取代的芳族（芳基）基；受保护或未受保护的氨基、酰基、羧基或硫醇基； $-SO_3H$ 、 $-PO_4^-$ 、硫醚、醚、环氧化物、环硫化物、叠氮化物或氮丙啶；

[0092] 每一 R_4 独立地为 H 或环状、分支链或直链 C_1-C_{18} 烷基、 C_1-C_{18} 烯炔或 C_1-C_{18} 炔烃；

[0093] m 和 n 独立地为 1 与 20 之间的整数；

[0094] X 为阴离子；

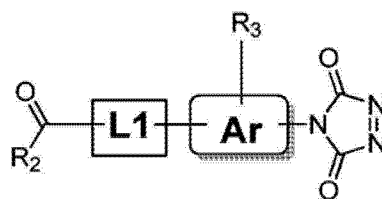
[0095] L_2 为键或连接基团，并且

[0096] Ar 不存在、为芳基或为杂芳基。

[0097] 在一些实施例中，在以上结构中， R_2 为甲基或乙基。在一些实施例中， R_3 不存在。在一些实施例中， R_4 为甲基。在一些实施例中， L_2 为键、肽、寡聚物、PEG、 C_1-C_{20} 亚烷基链、 C_1-C_6 亚烷基链或 C_2-C_4 亚烷基链。在一些实施例中， m 为 1 与 6 之间的整数或 1 与 3 之间的整数。在一些实施例中， n 为 1 与 10 之间的整数、1 与 5 之间的整数或 2 与 4 之间的整数。在一些实施例中， X 为全氟羧酸盐阴离子。在一些实施例中， X 为 CF_3COO^- 、 $CF_3CF_2COO^-$ 、 $CF_3CF_2CF_2COO^-$ 、 $CF_3SO_3COO^-$ 或 $(C_6H_5)_4B^-$ 。

[0098] 根据各种实施例，可以通过两步标记反应来标记酚系 OH 分析物，其中酚系 OH 基团的芳环首先与不含氨氧基标记剂的基于羰基取代的 PTAD 的试剂反应以形成加合物，并且随后用氨氧基标记剂标记加合物以形成标记的加合物。举例来说，根据各种实施例，两步标记反应可以包括使酚系 OH 基团与具有以下结构的基于羰基取代的 PTAD 的试剂反应：

[0099]



[0100] 其中 R_2 为环状、分支链或直链、被取代或未被取代的 C_1-C_{18} 烷基、 C_1-C_{18} 烯炔或

C_1-C_{18} 炔烃或被取代或未被取代的芳族基；

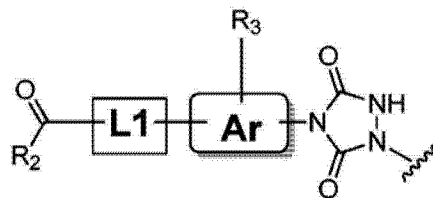
[0101] R_3 不存在或为一或多种相同或不同的取代基, 其为环状、分支链或直链 C_1-C_{18} 烷基、 C_1-C_{18} 烯烃或 C_1-C_{18} 炔烃；卤素（例如 Cl、Br、I 或 F）； $-NO_2$ ；被取代或未被取代的芳族（芳基）基；受保护或未受保护的氨基、酰基、甲酸或硫醇基； $-SO_3H$ 、 $-PO_4^-$ 、硫醚、醚、环氧化物、环硫化物、叠氮化物或氮丙啶；

[0102] Ar 为键、芳基、或杂芳基；并且

[0103] L1 为键或连接基团。

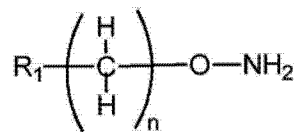
[0104] 在一些实施例中, Ar 为芳基。在一些实施例中, 芳基为苯基或萘基。在一些实施例中, L1 为键、肽、寡聚物、PEG、 C_1-C_{20} 亚烷基链、 C_1-C_6 亚烷基链或 C_2-C_4 亚烷基链。在一些实施例中, R_3 不存在或为 C_1-C_8 烷基、 C_1-C_8 烯烃、 C_1-C_8 炔烃、卤素或 $-NO_2$ 。在一些实施例中, R_3 不存在。酚系 OH 基团的芳环与以上基于羰基取代的 PTAD 的试剂的反应可以产生含有以下子结构的加合物：

[0105]



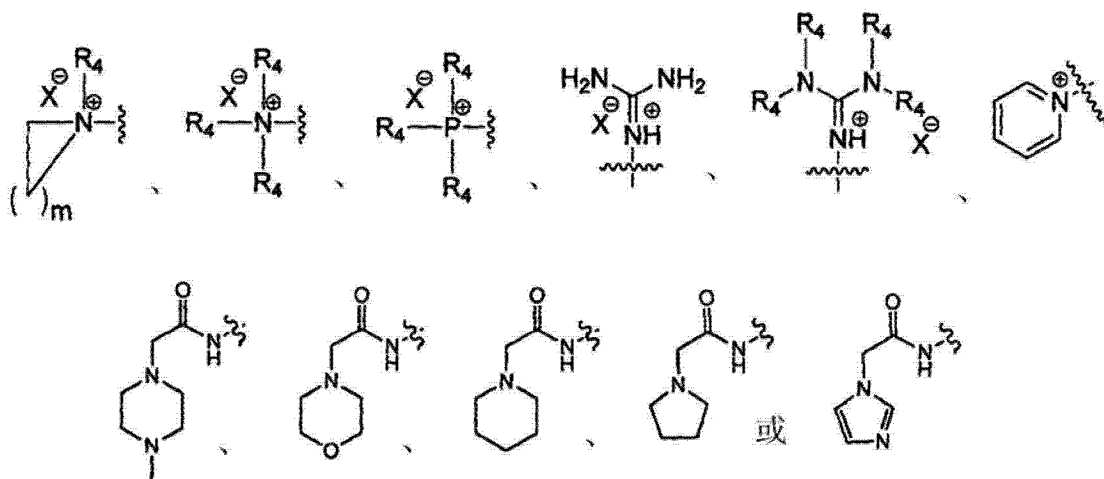
[0106] 加合物随后可以与氨基标记, 如具有以下结构的标记反应：

[0107]



[0108] 其中 n 为 1 到 20、1-15、1 到 10、1 到 5 或 2 到 4 并且 R_1 为季胺或取代基, 其具有以下结构：

[0109]

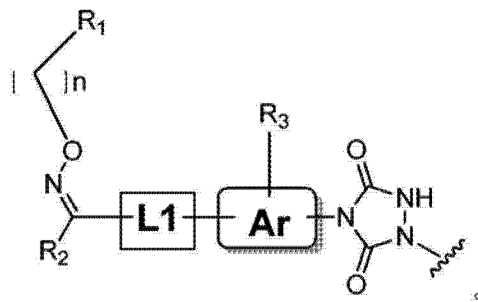


[0110] 其中每一 R_4 独立地为 H 或环状、分支链或直链 C_1-C_{18} 烷基、 C_1-C_{18} 烯烃或 C_1-C_{18} 炔烃；

[0111] m 为 1 与 20 之间的整数, 并且 X 为阴离子, 以形成标记的加合物。

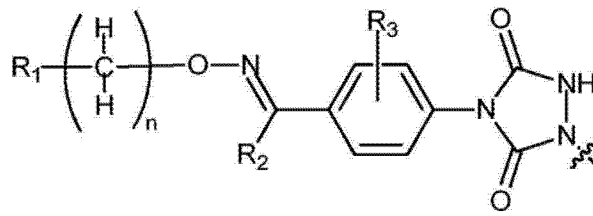
[0112] 标记的加合物具有以下子结构：

[0113]



[0114] 因此,根据各种实施例,两步反应包含用基于羰基取代的 PTAD 的试剂处理酚系 OH 样品以产生加合物和使加合物氨氧基标记反应以形成标记的加合物以用于分析。在一些实施例中,标记的加合物包含以下子结构：

[0115]



[0116] 图 4 说明雌二醇与 QAOC 试剂之间的例示性反应。尽管例示性反应为单步反应,但多步反应,如两步反应也为可能的。在一些实施例中,使用单步标记反应,其中举例来说,如图 1 中所说明的偶合于氨氧基 MS 标记的基于羰基取代的 PTAD 的试剂 (QAOC 试剂) 被用于标记酚系 OH 分析物。如本文所用,术语“氨氧基 MS 标记”可与“氨氧基标记”互换地使用。在其它实施例中,所述方法包含首先用基于羰基取代的 PTAD 的试剂处理酚系 OH 分析物以产生加合物,并且随后用氨氧基质谱 (MS) 标记剂来标记加合物以形成标记的加合物。如本文所用,术语“氨氧基 MS 标记剂”可与“氨氧基标记剂”互换地使用。可以使用质谱来分析标记的加合物。

[0117] 所述方法可以进一步包含提供包含已知酚系 OH 分析物的标准物、用 QAOC 试剂处理标准物的已知酚系 OH 分析物以形成标准物加合物。在各种实施例中,可以根据本发明传授内容通过单步或两步标记反应用 QAOC 试剂或基于羰基取代的 PTAD 的试剂处理标准物以形成标准物加合物。标准物加合物可以随后与加合物混合以形成混合物,通过用 QAOC 试剂或基于羰基取代的 PTAD 的试剂标记酚系 OH 分析物,接着与氨氧基 MS 标记反应来形成所述加合物。随后可以使用质谱,例如使用 LC-MSMS 光谱测定来分析混合物。在一些实施例中,可以获得相对浓度的酚系 OH 分析物。在其它实施例中,可以通过使用已知浓度的标准物来获得酚系 OH 分析物的绝对定量。

[0118] 根据各种实施例,一种用于一或多种酚系 OH 分析物的相对定量的方法可以包含标记一或多种分析物,接着使用质谱进行分析。根据一些实施例,可以定量一或多种酚系 OH 分析物和 / 或其代谢物。根据一些实施例,氨氧基标记剂可以包含一组同量异位标记。根据一些实施例,在第一步中,可以用基于羰基取代的 PTAD 的试剂标记标准物中的至少一种酚系 OH 分析物以形成标准物加合物。在第二步中,可以用来自一组同量异位标记的第一同量异位标记来标记标准物加合物。测试样品可以与基于羰基取代的 PTAD 的试剂反应以标

记测试样品中的一或多种酚系 OH 分析物（若存在）。随后可以用来自同量异位标记的相同组的第二同量异位标记（其不同于第一同量异位标记）来标记测试样品中的标记的酚系 OH 分析物。随后可以合并标记的标准物和标记的测试样品并且可以在反相管柱上对所得混合物进行液相色谱（LC）分离。标记的酚系 OH 和 / 或酚系 OH 代谢物可以具有相异的保留时间并且可以在分开的时间从管柱洗脱。洗脱峰可以包含含有标记的分析物的峰和含有标记的标准物的峰。随后可以使用质谱来分析来自管柱的洗脱液。

[0119] 应理解可以通过与上文关于相对定量所述相同的方式来进行酚系 OH 分析物的绝对定量，其中标准物具有已知浓度的酚系 OH 分析物。并且，当酚系 OH 分析物和 / 或酚系 OH 分析物的代谢物为上文所提及的时，应理解可以使用任何酚系 OH 分析物。

[0120] 根据各种实施例，可以用不同 QAOC 试剂处理包含多种不同酚系 OH 分析物的样品来用所述试剂中的不同试剂来标记两种或两种以上酚系 OH 分析物中的每一者。随后可以使用质谱，例如 LC/MSMS 来分析标记的样品以定量标记的酚系分析物。在一些实施例中，可以在光谱仪的单一操作中进行样品的所述分析。如上所述，在一些实施例中，酚系 OH 分析物可以为类固醇或类固醇类分析物。

[0121] 根据各种实施例，可以通过不同方法在分析之前富集含有一或多种具有酚系 OH 的化合物的样品。富集方法可以取决于样品类型，如血液（新鲜的或干燥的）、血浆、血清、尿液或唾液。例示性富集方法可以包含（但不限于）蛋白质沉淀、液-液萃取、固-液萃取、亲和力和捕捉 / 释放、抗体介导的富集和超滤。可以使用其它富集方法或两种或两种以上富集方法的组合。在下文实例 1 中提供例示性样品富集方法。

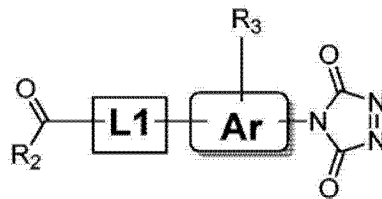
[0122] 在一些实施例中，分析酚系 OH 分析物可以包含例如通过质谱仪中的高能碰撞产生报告子离子，和利用报告子离子的强度或峰面积进行定量。举例来说，以上显示的 QAOC 试剂可以在高能碰撞（MSMS）期间经历中性丢失，保留作为报告子离子的带电分析物质，并且报告子离子随后可以经受 MS^3 分析。在一些实施例中，QAOC 试剂可以在高能碰撞时产生标记片段，并且标记片段可以随后经受 MS^3 分析。

[0123] 根据各种实施例，多种质谱（MS）标记剂可以用于标记一或多种根据本发明传授内容形成的酚系 OH 分析物和 / 或其加合物。根据一些实施例，氨氧基标记剂可以很好地破碎以提供强报告子离子。根据一些实施例，氨氧基标记剂可以包含专门设计用于质谱的标记剂并且根据一些实施例，氨氧基标记剂专门设计用于多重反应监测（MRM）分析。在一些实施例中，氨氧基标记剂可以用于标记通过标记酚系 OH 分析物产生的加合物。在标准物加合物用于定量酚系 OH 分析物的一些实施例中，氨氧基标记剂可以用于标记标准物加合物。在各种实施例中，标准物加合物可以用于如与标准物加合物相比的分析物的相对定量。在一些实施例中（其中已知标准物加合物的浓度），标准物加合物可以用于分析物的绝对定量。在一些实施例中，不同氨氧基 MS 标记剂可以用于标记不同分析物。举例来说，氨氧基 MS 标记剂可以为不同同量异位标记或不同质量差示标记。举例来说，用于标记标准物加合物的氨氧基 MS 标记剂可以包含来自一组同量异位标记的第一同量异位标记，而用于标记来自样品的加合物的氨氧基 MS 标记剂可以包含来自同量异位标记的相同组，但不同于第一同量异位标记的第二同量异位标记。

[0124] 根据一些实施例，至少两个不同类别的氨氧基标记剂可以用于在碰撞下产生报告子基团。可以由使用单步或两步标记反应形成 QAOC 试剂，所述反应使用此等氨氧基标

记剂与具有以下结构的化合物（基于羰基取代的 PTAD 的试剂）合并：

[0125]



[0126] R_2 为环状、分支链或直链、被取代或未被取代的 C_1-C_{18} 烷基、 C_1-C_{18} 烯烃或 C_1-C_{18} 炔烃或被取代或未被取代的芳族基；

[0127] R_3 不存在或为一或多种相同或不同的取代基，其为环状、分支链或直链 C_1-C_{18} 烷基、 C_1-C_{18} 烯烃或 C_1-C_{18} 炔烃；卤素（例如 Cl、Br、I 或 F）； $-NO_2$ ；被取代或未被取代的芳族（芳基）基；受保护或未受保护的氨基、酰基、甲酸或硫醇基； $-SO_3H$ 、 $-PO_4^-$ 、硫醚、醚、环氧化物、环硫化物、叠氮化物或氮丙啶；

[0128] L1 为键或连接基团；并且

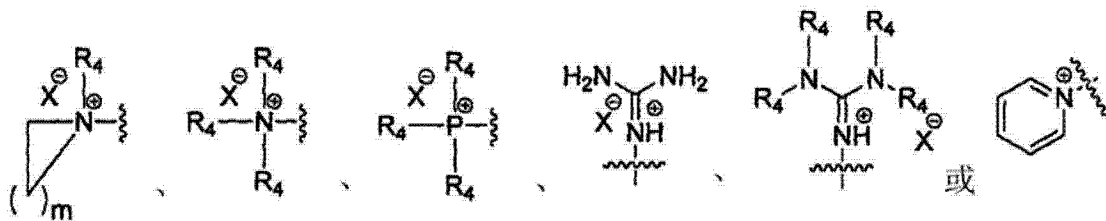
[0129] Ar 为键、芳基或杂芳基。

[0130] 在下文中显示可以使用的来自第一和第二类或组的氨氧基 MS 标记剂的例示性化合物。

[0131] 在第一类中，氨氧基 MS 标记剂为：

[0132] $R_1-(CH_2)_n-OH_2^+$ ，其中 R_1 为季胺或磷酸酯或具有如以下的结构的取代基：

[0133]



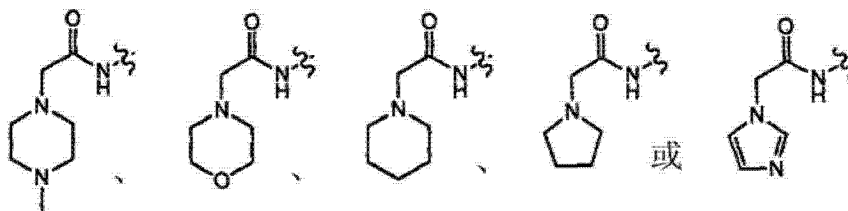
[0134] 其中每一 R_4 独立地为 H 或环状、分支链或直链 C_1-C_{18} 烷基、 C_1-C_{18} 烯烃或 C_1-C_{18} 炔烃， m 为 1 与 20、1 到 15、1 到 10 或 1 到 5 之间的整数，并且 X 为阴离子。

[0135] 在第二类中，氨氧基 MS 标记剂为：

[0136] $R_1-(CH_2)_n-OH_2^+$

[0137] 其中 R_1 可以为（但不限于）这五种结构中之一或多种：

[0138]



[0139] 并且 n 可以为 1 到 20、1 到 15、1 到 10 或 1 到 5。

[0140] 来自第一类氨氧基 MS 标记剂的氨氧基 MS 标记剂可以在高能碰撞 (MSMS) 期间经历中性丢失，保留带电分析物质作为报告子离子，可以随后对其进行 MS^3 分析。来自第二类氨氧基 MS 标记剂的氨氧基 MS 标记剂可以在高能碰撞时产生作为报告子离子的标记片段。

[0141] 如上所述, 氨基 MS 标记剂可以与通过用基于羰基取代的 PTAD 的试剂标记酚系 OH 分析物形成的加合物的羰基部分合并以产生标记的加合物。

[0142] 根据各种实施例, 对于每一类型的氨基 MS 标记剂, 可以调配和使用多种同量异位标记或质量差示标记剂。图 2A 和 2B 各自分别描绘一组同量异位 4 路氨基 MS 标记剂。每一组同量异位标记剂可以具有相同化学结构和质量但可以包含同位素的不同组合和 / 或定位。

[0143] 在一些实施例中, 可以使用三重四极 MS 平台进行标记的酚系 OH 分析物的母离子 - 子离子跃迁监测 (PDITM)。关于 PDITM 和其用途的更多细节描述于美国专利申请公开案第 US2006/0183238A1 号中, 所述公开案以全文引用的方式并入本文中。在如本文中所述的标记的酚系 OH 分析物上进行的质谱分析的类型不受限制。在各种实施例中, 可以采用 LC-MSMS。在一些实施例中, 使氨基 MS 标记剂在 MSMS 期间经历中性丢失并留下报告子离子, 即带电分析物质。在一些实施例中, 氨基 MS 标记剂在 MSMS 期间形成报告子离子, 其为标记片段。

[0144] 在一些实施例中, 一种分析根据本发明传授内容的含有酚系 OH 分析物的样品的方法可以采用内标。在一些实施例中, 可以通过使酚系 -OH 分析物与 QAOC 标记试剂的一或多种同位素变体反应制得所述内标。本发明传授内容的标记化学和方法可以提供相对于已知方法的增加的敏感度, 并且在各种实施例中, 可以消除对于酚系 OH 分析物的含 ^2H 、含 ^{13}C 、含 ^{15}N 和含 ^{18}O 的标准物的需要。一些酚系 OH 分析物的同位素标记的标准物不是可商购的, 其使得难以在无本发明传授内容的情况下对这些分析物进行绝对定量。根据本发明传授内容, 在一些实施例中, 每一分析物可以具有其自身的内标。报告子信号可以特定针对于标准物样品和测试样品。

[0145] 在一些实施例中, 用于标记的标准物的 QAOC 试剂可以包含来自一组质量差分标记的第一质量差示标记。标记的样品可以包含来自质量差示标记的相同组, 但不同于第一质量差示标记的第二质量差示标记。随后可以使用标记的样品的质谱、LC-MSMS 分析、其组合等来分析标记的样品。根据各种实施例, 定量一或多种酚系 OH 分析物的方法可以包含两步化学反应以改质分析物, 接着使用质谱进行质量分析。根据各种实施例, 两步化学反应可以包含首先在酚系 OH 分析物中用基于羰基取代的 PTAD 的试剂衍生酚系 OH 官能团的芳环以形成加合物, 并且随后用 (MS) 标记剂, 例如氨基 MS 标记剂来标记加合物。根据一些实施例, 液相色谱 - 串联质谱 (LC-MSMS) 可以用于分析改质的分析物。不同分析物的加合物可以具有截然不同的反相管柱上的保留时间和相异的质量, 并且可以在分开的时间从柱洗脱。可以对来自柱的洗脱液进行 MSMS 分析。在碰撞下, 可以产生报告子基团。报告子基团的强度或峰面积可以用于鉴别和 / 或定量。

[0146] 同量异位标记允许多路复用并且提供一种用于多重分析酚系 OH 分析物的方法, 每样品分析具有高通量和较低成本。由于在所有酚系 OH 分析物中存在一个共同官能团, 在各种实施例中, 每一分析物仅需要一个标记。在一些实施例中, 使用 PDITM 增加特异性并且减小误差风险。试剂设计使其为 FlashQuant™ 应用的良好工具并且实现帮助确认分析物身份的 MS³ 能力。

[0147] 根据各种实施例, 可以使来自一组同量异位试剂的第一同量异位标记与可以包含已知酚系 OH 分析物 (例如在已知浓度下) 的标准物接触。可以在促进第一同量异位标记

与标准物之间的反应的条件下进行接触。可以使与第一同量异位标记来自同量异位试剂的相同组的第二同量异位标记与包含未知浓度的酚系 OH 分析物的样品接触。如下文中进一步描述,标准物和样品的标记的分析物可以共同地混合并且经分析以确定样品中的分析物浓度。分析可以包含分离混合物以形成经分离的分析物,和分析经分离的分析物。可以使用的分离方法包括气相色谱法、液相色谱法、其它色谱法、电泳法、电渗法、质量差示分离法等。在例示性实施例中,液相色谱用于分离混合物中的不同分析物并且因此形成经分离的分析物。

[0148] 在一些实施例中,可以在反相管柱上进行色谱分离并且可以对从管柱洗脱的峰进行后续分析。在一些实施例中,后续分析可以包含质谱或更具体地说,母离子-子离子跃迁监测(PDITM)。通过比较来自 PDITM 的结果,可以确定样品中的酚系 OH 分析物的浓度(如下文中更详细地描述)。关于 PDITM 和其用途的更多细节可见于公开的申请案 US2006/0183238A1 中,其以全文引用的方式并入本文中。

[0149] 根据一些实施例,可以使用质量差示标记剂来代替同量异位标记试剂。在图 3A 和 3B 中描绘例示性质量差示剂对。根据各种实施例,氨氧基 MS 标记剂可以用于多重分析中的相对和绝对定量。根据一些实施例,氨氧基 MS 标记剂可以用于两重、三重、四重和其它多重分析。

[0150] 在一些实施例中,试剂可以与含有如美国公开专利申请案 2011/0212534(以引用的方式并入本文中)中所述的一或多种维生素 D 化合物以及如本文中所述的酚系 OH 分析物的样品反应以对两类化合物进行多重分析。

[0151] 在一些实施例中,QAOC 试剂与样品以酚系 OH 部分的等摩尔浓度合并。在一些实施例中,将相对于酚系 OH 部分过量(举例来说,大约 10%、大约 20%、大约两倍过量或大约四倍过量)的 QAOC 试剂添加到酚系 OH 样品。在一些实施例中,使用小于等摩尔浓度的 QAOC,举例来说,QAOC 浓度可以为酚系 OH 部分的摩尔浓度的大约 25%、大约 50% 或大约 75%。在一些实施例中,QAOC 试剂与样品在样品溶液中的 $1 \mu\text{g/mL}$ - 100mg/mL 之间或 $100 \mu\text{g/mL}$ - 10mg/mL 之间的浓度下合并。

[0152] 在一些实施例中,可以在任何三重四极仪器,例如包括具有 MALDI 源的 FlashQuant™ 的那些仪器上进行标记化学和方法。在一些实施例中提供试剂盒、数据分析软件和 MS 平台作为用于酚系 OH 分析物和其代谢物的分析器。

[0153] 可以根据本发明教示的各种实施例使用的不同液相色谱和质谱方法、系统和软件包括描述于 2009 年 5 月 31 日提交的美国临时专利申请第 61/182,748 号和 2006 年 8 月 17 日公开的美国专利申请第 US2006/0183238A1 号中的那些。这些参照案均以引用的方式并入本文中。

[0154] 根据本发明教示的其它实施例,提供一种包含 QAOC 试剂(如上文所论述的试剂)的试剂盒。在其它实施例中,提供一种包含基于羰基取代的 PTAD 的试剂和一或多种氨氧基 MS 标记剂的试剂盒。氨氧基 MS 标记剂可以包含来自上文所述的第一和/或第二类或组的氨氧基 MS 标记剂的化合物。在一些实施例中,试剂盒可以包含标准物,所述标准物包含已知酚系 OH 分析物。

[0155] 根据本发明教示的各种实施例,提供一种可以包含基于羰基取代的 PTAD 的试剂和氨氧基 MS 标记剂中的一或多者的试剂盒。在一些实施例中,试剂盒可以包含含有已知浓

度的类固醇分析物的标准物,所述分析物包含酚系 OH。

[0156] 在一些实施例中,试剂盒可以包含至少一种包含已知浓度的已知酚系 OH 分析物的标准物。根据一些实施例,氨基 MS 标记剂可以为来自一组同量异位标记的同量异位标记,并且在一些实施例中,试剂盒可以包括来自一组同量异位标记的多种不同同量异位标记。根据一些实施例,氨基 MS 标记剂可以为来自一组质量差示标记的质量差示标记,并且在一些实施例中,试剂盒可以包括来自一组质量差示标记的多种不同质量差示标记。根据一些实施例,试剂盒可以包含基于羰基取代的 PTAD 的试剂、氨基 MS 标记剂、包含已知酚系 OH 分析物和 / 或已知浓度的已知酚系 OH 分析物的标准物,并且进一步可以包含标记酚系 OH 分析物的说明书。

[0157] 根据本发明传授内容的其它实施例,试剂盒可以包含如图 1 中所示的 QAOC 试剂、不同 QAOC 试剂、其组合等。试剂盒也可以包含标准物,所述标准物包含已知酚系 OH 分析物。在一些实施例中,标准物可以包含至已知浓度的已知酚系 OH 分析物。在一些实施例中,试剂盒中所包括的 QAOC 试剂可以包含来自一组同量异位标记的一个或一个以上同量异位标记。在一些实施例中,试剂盒可以包含来自一组同量异位标记的多个不同的同量异位标记。在一些实施例中,试剂盒中所包括的 QAOC 试剂可以包含来自一组质量差示标记的一个或一个以上质量差示标记。在一些实施例中,试剂盒可以包含来自一组质量差示标记的多个不同的质量差示标记。

[0158] 根据各种实施例,试剂盒可以包含缓冲剂、一个或一个以上色谱柱和任选地对进行分析有用的其它试剂和 / 或成分。在一些实施例中,试剂盒可以包含例如均质分析以使得使用者仅需要添加样品。在一些实施例中,试剂盒可以包含校准或归一化试剂或标准物。可以或应该用于进行分析的关于仪器设定的信息也可以包括于试剂盒中。在一些实施例中,关于样品制备、操作条件、体积量、温度设定等的信息包括于试剂盒内。

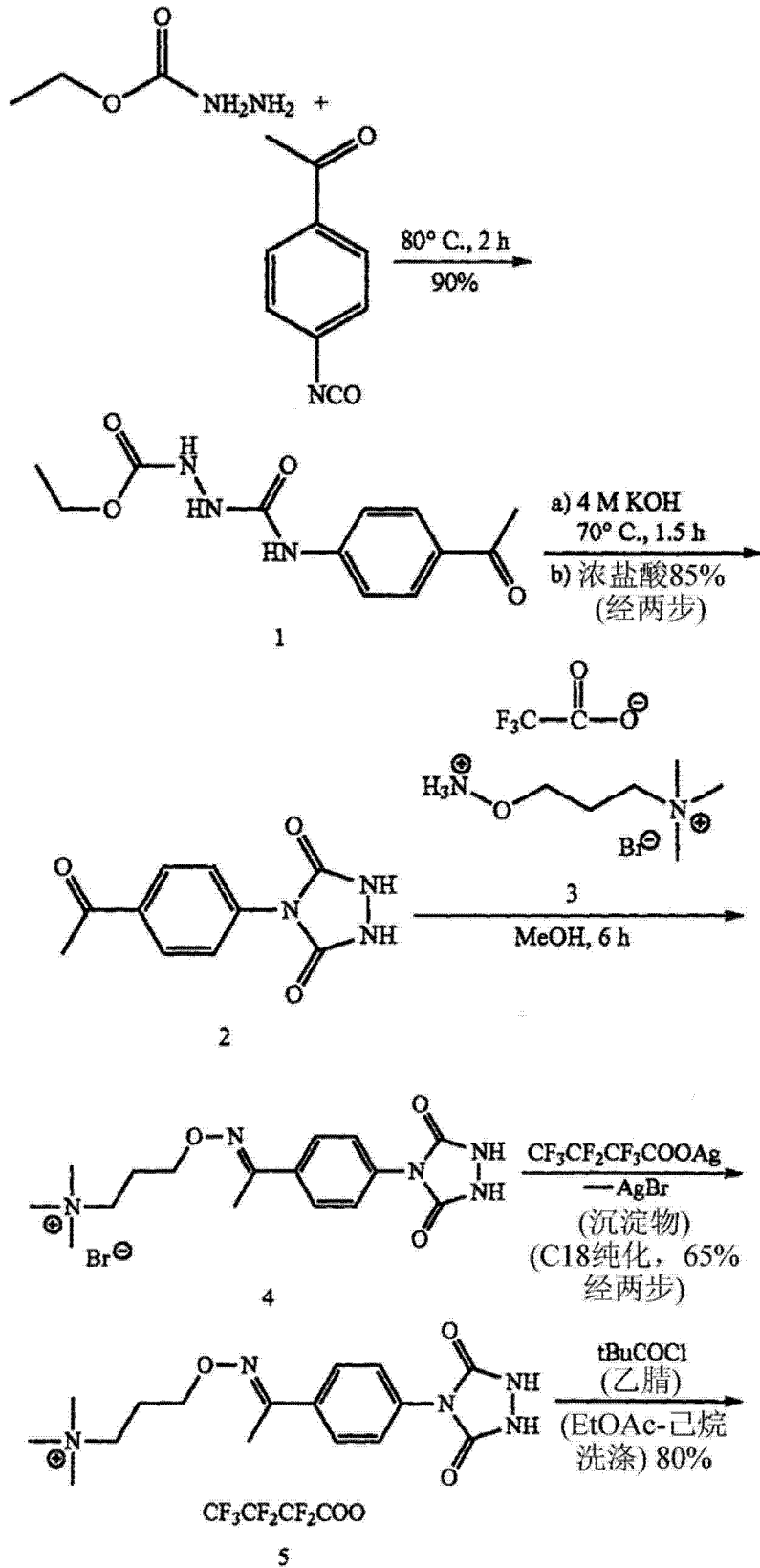
[0159] 试剂盒可以包装于含有一个或一个以上试剂容器和适当说明书的气封箱中。电子媒体可以包括于试剂盒中,在所述电子媒体上储存有关于一个或一个以上分析、测量值、跃迁对、操作说明书、用于进行操作的软件、其组合等的电子信息。根据各种实施例,可以提供一种用于合成 QAOC 试剂和其中间体的方法。

[0160] 可以根据以下实例来进一步理解本发明传授内容的方面,所述实例不应该理解为以任何方式限制本发明传授内容的范围。

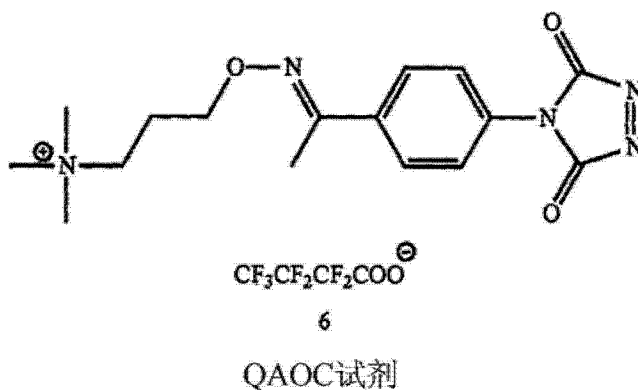
[0161] 实例

[0162] 实例 1- 图示合成标记的 QAOC 试剂的步骤

[0163]



[0164]



[0165] 合成对乙酰基-4-苯基-1-乙酯基氨基脒 (1)

[0166] 逐滴添加 4-乙酰基苯基异氰酸酯 (10g, 62.05mmol) 于甲苯 (250mL) 中的溶液至脒基甲酸乙酯 (6.46g, 62.05mmol) 于甲苯 (100mL) 中的溶液中。在室温下搅拌反应混合物 2h 并且随后在 80°C 下搅拌 2h。反应中形成的沉淀物经过滤并且在真空烘箱中干燥以得到对乙酰基-4-苯基-1-乙酯基氨基脒 1 (16.5g, 90%)。将其不经进一步纯化即用于下一反应步骤中。(合成改自: 有机合成汇编 (Organic Syntheses, Coll.) 第 6 卷, 第 936 页 (1988); 第 51 卷, 第 121 页 (1971). 4-苯基-1,2,4-三唑啉-3,5-二酮)。在各种方面中, 用于此实例中的每一成分的值可以增加或减小在大约 5% 到大约 20% 范围内的量, 举例来说, 可以以比用于此实例中的值小 5% 到大 5% 的量使用每一成分、可以以比用于此实例中的值小 10% 到大 10% 的量使用每一成分、可以以比用于此实例中的值小 15% 到大 15% 的量使用每一成分或可以以比用于此实例中的值小 20% 到大 20% 的量使用每一成分。在各种方面中, 可以通过大约加上或减去 5% 到 20% 来改变所述值。

[0167] 合成对乙酰基-4-苯基脒唑 (2)

[0168] 在 70°C 下用 4M KOH 水溶液 (28mL, 112mmol) 加热对乙酰基-4-苯基-1-乙酯基氨基脒 1 (15g, 56mmol) 大约 2h。使用烧结的过滤漏斗来过滤残余的粒状固体。将滤过物冷却到室温并且用浓缩 HCl 进行酸化。过滤形成的沉淀物并且在真空烘箱中进行干燥以得到对浅黄色固体形式的乙酰基-4-苯基脒唑 2 (12.4g, 85%)。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): s = 1.65 (s, 3H), 6.70 (d, 2H), 7.10 (d, 2H), 9.50 (s, 2H)。(合成选自: 有机合成汇编 (Organic Syntheses, Coll.) 第 6 卷, 第 936 页 (1988); 第 51 卷, 第 121 页 (1971). 4-苯基-1,2,4-三唑啉-3,5-二酮)。在各种方面中, 用于此实例中的每一成分的值可以增加或减小在大约 5% 到大约 20% 范围内的量, 举例来说, 可以以比用于此实例中的值小 5% 到大 5% 的量使用每一成分、可以以比用于此实例中的值小 10% 到大 10% 的量使用每一成分、可以以比用于此实例中的值小 15% 到大 15% 的量使用每一成分或可以以比用于此实例中的值小 20% 到大 20% 的量使用每一成分。在各种方面中, 可以通过大约加上或减去 5% 到 20% 来改变所述值。

[0169] 合成溴化对乙酰基-4-苯基脒唑季氨氧基加合物 (4)

[0170] 在环境温度下搅拌对乙酰基-4-苯基脒唑 2 (2.10g, 9.58mmol) 和季氨氧基标记 3 (6.74g, 20.6mmol) 于 100mL 甲醇-乙酸 (95 : 5v/v) 中的悬浮液 (在公开的美国申请 2011-0003395 (以全文引用的方式并入本文中) 中描述作为标记试剂的季氨氧基标记) 48h。在此阶段的 HPLC 分析显示 2 到产物对乙酰基-4-苯基脒唑季氨氧基加合物 4 的

转化率为 95%。管柱:DeltaPak C18, 3.9. times. 150mm, 缓冲液 A:水 +0.1% TFA, 缓冲液 B:乙腈 +0.085% TFA, 波长(信号 = 254nm, 参考 = 360nm), 流量 = 1mL/min。分析物的浓度大致为甲醇中的 0.25mg/mL。对乙酰基-4-苯基脲唑 2 的保留时间 = 5.1min 并且对乙酰基-4-苯基脲唑季氨氧基加合物 4 的保留时间 = 5.5min。ES-MS 数据: M+ (计算值 M+ = $C_{16}H_{24}N_5O_3^+$ = 334.19, 观测值 M+ = 334.20 和 275.50 (-Me₃N))。在去除甲醇之后分离白色固体形式的粗产物。在各种方面中, 用于此实例中的每一成分的值可以增加或减小在大约 5% 到大约 20% 范围内的量, 举例来说, 可以以比用于此实例中的值小 5% 到大 5% 的量使用每一成分、可以以比用于此实例中的值小 10% 到大 10% 的量使用每一成分、可以以比用于此实例中的值小 15% 到大 15% 的量使用每一成分或可以以比用于此实例中的值小 20% 到大 20% 的量使用每一成分。在各种方面中, 可以通过大约加上或减去 5% 到 20% 来改变所述值。

[0171] 抗衡离子交换: 如此获得的固体溶解于 40mL 水中并且其中的 30mL (11.50mmol 的 4) 用于交换。立即添加七氟丁酸银溶液 (3.69g, 15mL 去离子水中的 11.53mmol) 到此溶液 (50mL 离心管中) 中并且通过翻转所述管进行简单混合。通过持续 2min 的 3000rpm 下的离心来分离沉淀物。通过添加七氟丁酸银的稀释溶液 (1 滴) 检查上清液是否存在任何溴化物离子 (Br⁻)。形成混浊表明存在 Br⁻。为确保溴离子完全沉淀, 添加另一 0.2 当量 (0.738mg, 5mL 水中) 的七氟丁酸银、经混合、离心并且检查是否存在 Br⁻。澄清溶液表明所有 Br⁻ 被完全消耗。在注射器中获取滤过物并且再次经由 5 微米过滤器 (25 毫米, Millex LCR, PTEF, 25 毫升 / 过滤器) 过滤并且通过急骤层析来纯化 (分两批进行纯化: 43g, C18 Isco 管柱, 流量 = 40ml/min, 溶剂 A: 水, 溶剂 B: 甲醇, 用 100mL 50% B 接着用 250mL 2% B 来平衡管柱。将样品以溶液形式装载于管柱上, 0-6min 2% B 接着为 6-35min 2-85% B, 波长 = 254nm)。通过分析型 HPLC 来分析含有产物的洗脱份的纯度并且收集纯 (> 95%) 溶离份并且在旋转蒸发器中进行干燥以得到白色固体形式的七氟丁酸对乙酰基-4-苯基脲唑季氨氧基加合物 5。用 20mL 甲苯共蒸发固体并且在真空中干燥以确保完全去除水。最终产率和 HPLC 纯度为 2.6g (65%) 和 > 98%。在各种方面中, 用于此实例中的每一成分的值可以增加或减小在大约 5% 到大约 20% 范围内的量, 举例来说, 可以以比用于此实例中的值小 5% 到大 5% 的量使用每一成分、可以以比用于此实例中的值小 10% 到大 10% 的量使用每一成分、可以以比用于此实例中的值小 15% 到大 15% 的量使用每一成分或可以以比用于此实例中的值小 20% 到大 20% 的量使用每一成分。在各种方面中, 可以通过大约加上或减去 5% 到 20% 来改变所述值。

[0172] 合成标记的 QAOC 试剂 (6)

[0173] 逐滴添加 (2-3min 的添加) tBuOCl (0.175mL, 7mL 无水乙腈中的 1.46mmol) 的溶液到七氟丁酸对乙酰基-4-苯基脲唑季氨氧基加合物 5 (800mg, 1.46mmol, 在氩气氛围下) 的冷悬浮液中, 同时进行搅拌。在完成添加之后, 在 0-5°C 下搅拌反应混合物 30min。通过旋转蒸发器去除乙腈 (用氮排出) 并且用无水 EtOAc 洗涤粉红色固体 (在氩气覆盖下用滴管从顶部去除)。在真空中干燥之后, 获得 0.65g (80%) 橙红色固体形式的 6。产物储存于 -40°C 下、不含水分并且保护免于强光。在各种方面中, 用于此实例中的每一成分的值可以增加或减小在大约 5% 到大约 20% 范围内的量, 举例来说, 可以以比用于此实例中的值小 5% 到大 5% 的量使用每一成分、可以以比用于此实例中的值小 10% 到大 10% 的量使用

每一成分、可以以比用于此实例中的值小 15% 到大 15% 的量使用每一成分或可以以比用于此实例中的值小 20% 到大 20% 的量使用每一成分。在各种方面中, 可以通过大约加上或减去 5% 到 20% 来改变所述值。

[0174] 实例 2- 样品富集

[0175] 样品体积、萃取溶剂和其组成、试剂溶液、萃取介质量和分子量截断膜类型为典型的。

[0176] 干血点 : 用内标对滤纸上的干燥人类或动物血液样品 (3-10 μ L) 进行加标并且用 100 μ L 乙酸乙酯 - 己烷, 优选地以 1 : 1 的组合物, 更优选地多次地进行萃取 (可能需要声处理以提高萃取效率)。随后使用离心真空浓缩器或热气流或全体的组合来干燥合并的乙酸乙酯 - 己烷层。添加 50 μ L 试剂溶液 (乙腈中的 2mg/mL) 到干燥样品。样品经涡旋以进行混合并且随后在室温下培育至少 30min。添加水 (20 μ L), 样品经涡旋以进行混合, 并且随后通过 LC-MSMS 分析样品。

[0177] 蛋白质沉淀 : 添加 0.8mL 乙腈到含有内标的人类或动物血清或血浆样品 (200 μ L)。样品经涡旋以进行混合并且随后于 10,000xg 下离心 5min。去除上清液 (750 μ L) 并且随后使用离心真空浓缩器或热气流或全体的组合来进行干燥。添加 50 μ L 试剂溶液 (乙腈中的 2mg/mL) 到干燥样品。样品经涡旋以进行混合并且随后在室温下培育至少 30min。添加水 (20 μ L), 样品经涡旋以进行混合, 并且随后通过 LC-MSMS 分析样品。

[0178] 液 - 液萃取 (LLE) : 用 1mL 乙酸乙酯 - 己烷, 优选地 1 : 1 的组合物, 更优选地多次地萃取含有内标的人类或动物血清或血浆样品 (200 μ L)。随后使用离心真空浓缩器或热气流或全体的组合来干燥合并的乙酸乙酯 - 己烷层。添加 50 μ L 试剂溶液 (乙腈中的 2mg/mL) 到干燥样品。样品经涡旋以进行混合并且随后在室温下培育至少 30min。添加水 (20 μ L), 样品经涡旋以进行混合, 并且随后通过 LC-MSMS 分析样品。

[0179] 固 - 液萃取 (SLE) : 将含有内标的人类或动物血清或血浆样品 (200 μ L) 涂覆于 200mg 硅藻土介质 (优选地呈筒柱或 96 孔板或任何其它合适的形式) 上, 允许吸收 5-10 分钟并且随后用 1mL 二异丙基醚, 优选地多次地进行萃取。随后使用离心真空浓缩器或热气流或全体的组合来干燥合并的二异丙基醚萃取物。添加 50 μ L 试剂溶液 (乙腈中的 2mg/mL) 到干燥样品。样品经涡旋以进行混合并且随后在室温下培育至少 30min。添加水 (20 μ L), 样品经涡旋以进行混合, 并且随后通过 LC-MSMS 分析样品。

[0180] 游离 (非结合) 雌激素 : 将人类或动物血清或血浆样品 (400 μ L) 涂覆于 30kDa 超滤 (UF) 膜或装置上并且在 3000-5000g 下离心 1 小时。随后用内标对滤过物进行加标并且用 1mL 二异丙基醚, 优选地多次地进行萃取。随后使用离心真空浓缩器或热气流或全体的组合来干燥合并的二异丙基醚萃取物。添加 50 μ L 试剂溶液 (乙腈中的 2mg/mL) 到干燥样品。样品经涡旋以进行混合并且随后在室温下培育至少 30min。添加水 (20 μ L), 样品经涡旋以进行混合, 并且随后通过 LC-MSMS 分析样品。

[0181] 实例 3- 质谱分析

[0182] 可以在 LC-MSMS 分析中使用以下参数来分析样品。

[0183] HPLC 参数

[0184] 管柱 : AAA C18 管柱 (C18 反相, 5 μ m, 4.6mm \times 150mm)

[0185] 温度 : 50 $^{\circ}$ C

[0186] 移动相 :A = H₂O+0.1% FA B = 乙腈 +0.1% FA

[0187] 注射体积 :20 μ L

[0188] 梯度 :

[0189]

步骤	总时间(min)	流动速率(μ l/min)	A (%)	B (%)
0	0.00	1000	70.0	30.0
1	5.00	1000	5.0	95.0
2	5.50	1000	5.0	95.0
3	6.00	1000	70.0	30.0
4	10.00	1000	70.0	30.0

[0190] HPLC 和 MS 参数为典型值并且为非限制性的。

[0191] 实例 4- 分析 API-5500QTRP 上的雌激素

[0192] 使用类似方法,根据显示于图 4 中的机制使雌二醇与式 I 的标记的 QAOC 反应并且使用 Q1-MS-Q1 扫描进行分析。图 5A 提供使用由 AB SCIEX 制造的 API-5500QTRP™ 质谱仪的反应混合物的扫描。如所展示,预期的 M⁺ = 604.35,但发现于 604.2。

[0193] 根据一些实施例,当同量异位标记为氨氧基 MS 标记剂时,报告子信号可以经受进一步分裂 (MS³)。使报告子信号经受进一步分裂可以通过与标准数据库比较提供使得能够对分析物进行验证鉴别的峰值。根据一些实施例,可以使来自管柱的洗脱液经受母离子-子离子跃迁监测 (PDITM)。m/z604.3 处的此产物离子经受碰撞能量扫描并且结果显示于图 6A 中。可以在图 6B 中看见母离子以及一些 MRM 片段,包括 545.1 处的中性丢失片段。此反应混合物随后关于两个 MRM 跃迁 :604.3 \rightarrow 545.1 和 604.3 \rightarrow 217.2 进行 LC-MRM 特征曲线描绘,其显示于图 7 中 (虚线和连续轨迹)。在 8min 内于乙腈-水 (0.1% 甲酸) 梯度 5 \rightarrow 95% B, Water / s Acquity C8UPLC 管柱,0.7mL/min,5 μ L 注射液,40°C 管柱室中提供反应混合物。

[0194] 实例 5- 分析 3200QTRAP 上的雌激素

[0195] 雌酮、雌二醇和雌三醇各自经富集并且与式 I 的标记的 QAOC 试剂反应并且已经确定产物离子的分裂模式。使用 3200QTRAP 仪器的 MSMS 参数为 :

[0196]

化合物	Q1	Q3	时间 (毫秒)	DP	EP	CE	CXP
雌酮 (E1)	602.4	543.3	50	46	4.0	29	6
雌二醇 (E2)	604.4	545.3	50	46	7.0	31	6
雌三醇 (E3)	620.4	561.3	50	51	6.5	30	6

[0197] 使用的源 / 气体参数为 :

[0198] CUR : 10.00

[0199] IS : 5000.00

[0200] TEM : 500.00

[0201] GS1 : 20.00

[0202] GS2 : 20.00

[0203] The : 开

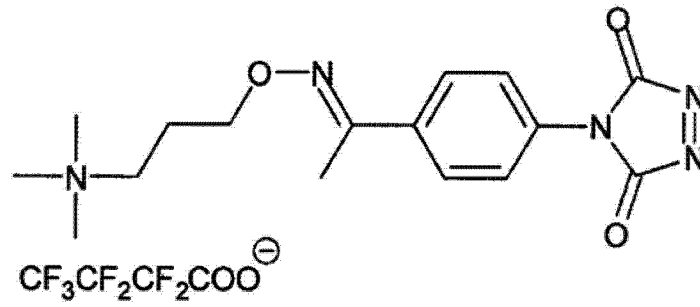
[0204] CAD : 高

[0205] 图 8 提供包含用图 1 的 QAOC 试剂标记的雌酮、雌二醇和雌三醇的反应的 LC-MRM 特征曲线。

[0206] 本文中所述的章节标题仅用于组织目的并且无论如何不应理解为限制所述标的物。

[0207] 虽然结合各种实施例来描述本申请人的传授内容,但并不打算将申请人的传授内容限制为实施例。与其相反,本申请人的传授内容涵盖如所属领域的技术人员将了解的各种替代方案,修改方案以及等效物。

[0208] 虽然以上描述提供了各种实施例的实例和具体细节,但是应了解,所述实施例的一些特征和 / 或功能允许在不脱离所述实施例的范围的情况下加以修改。以上描述意图说明本发明,其范围仅由在此随附的权利要求的语言进行限制。从本说明书和本文所公开的本发明传授内容的实践来考虑,本发明传授内容的其它实施例对所属领域的技术人员来说将为显而易见的。预期将本说明书和实例仅视为例示性的。



季氨基氧基库克森试剂

图 1

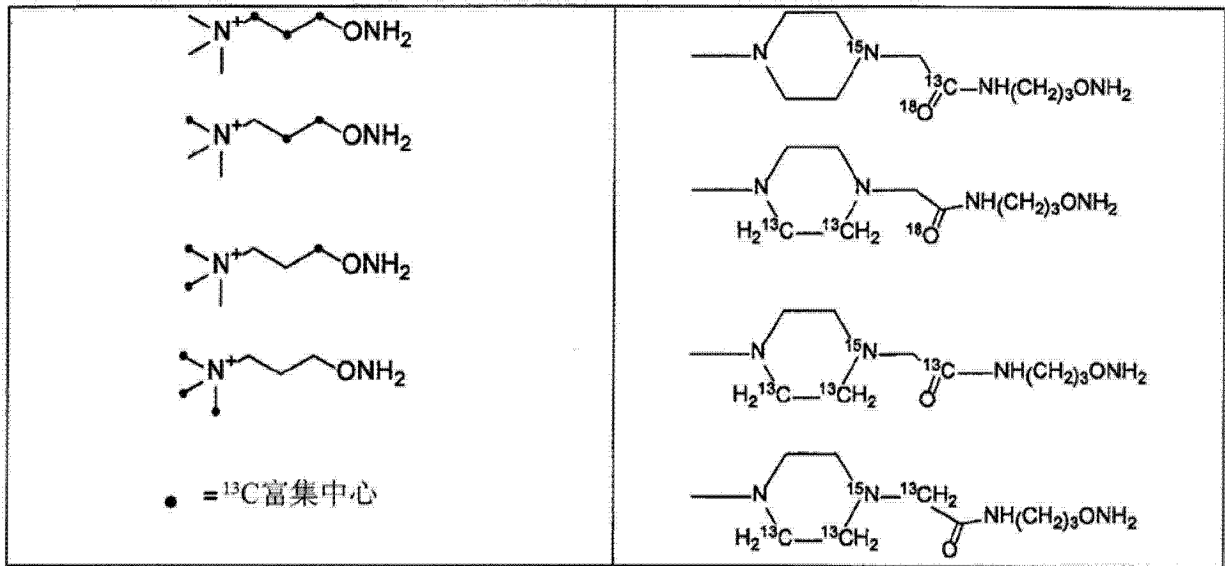


图2A

图2B

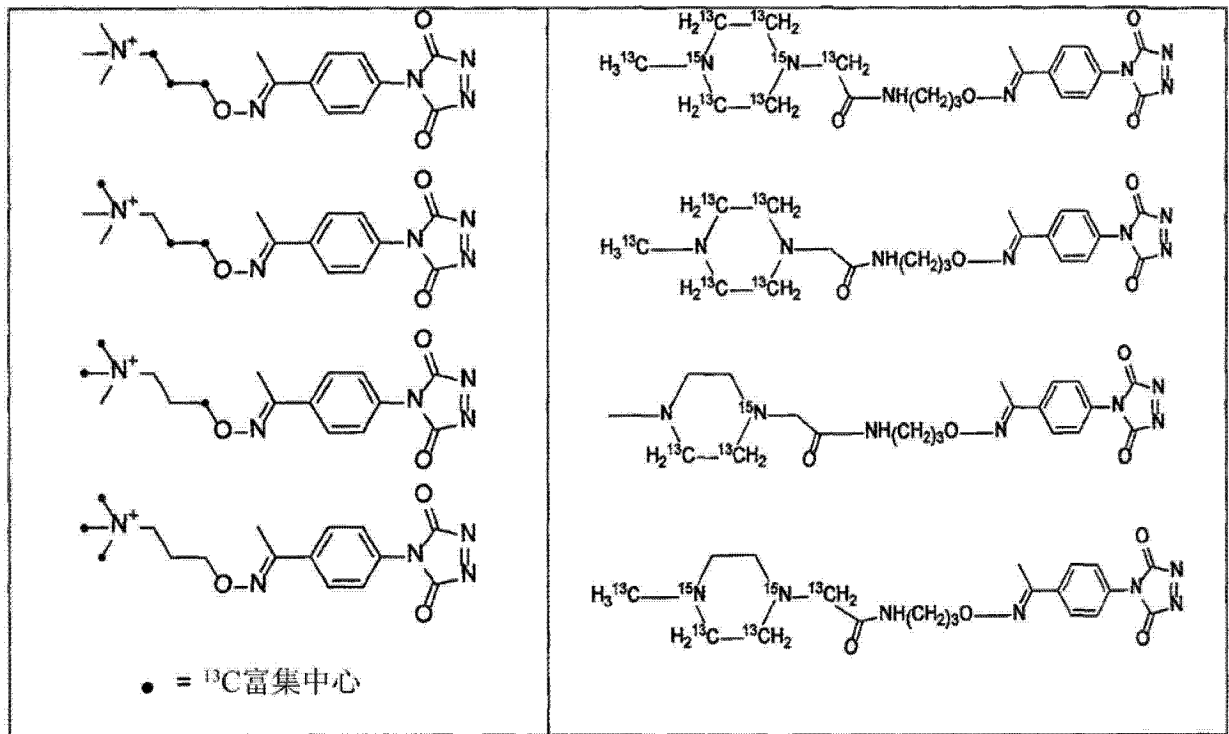


图3A

图3B

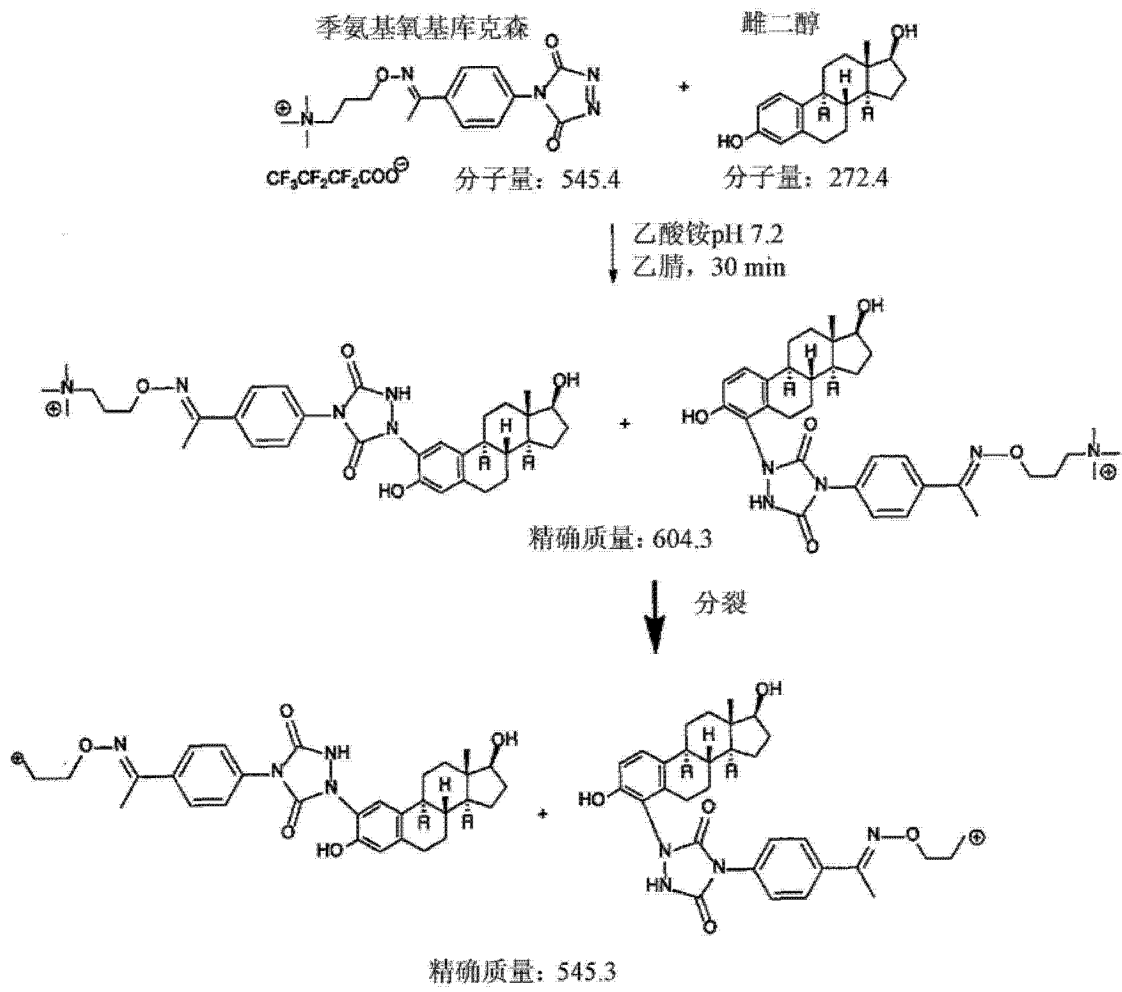


图 4

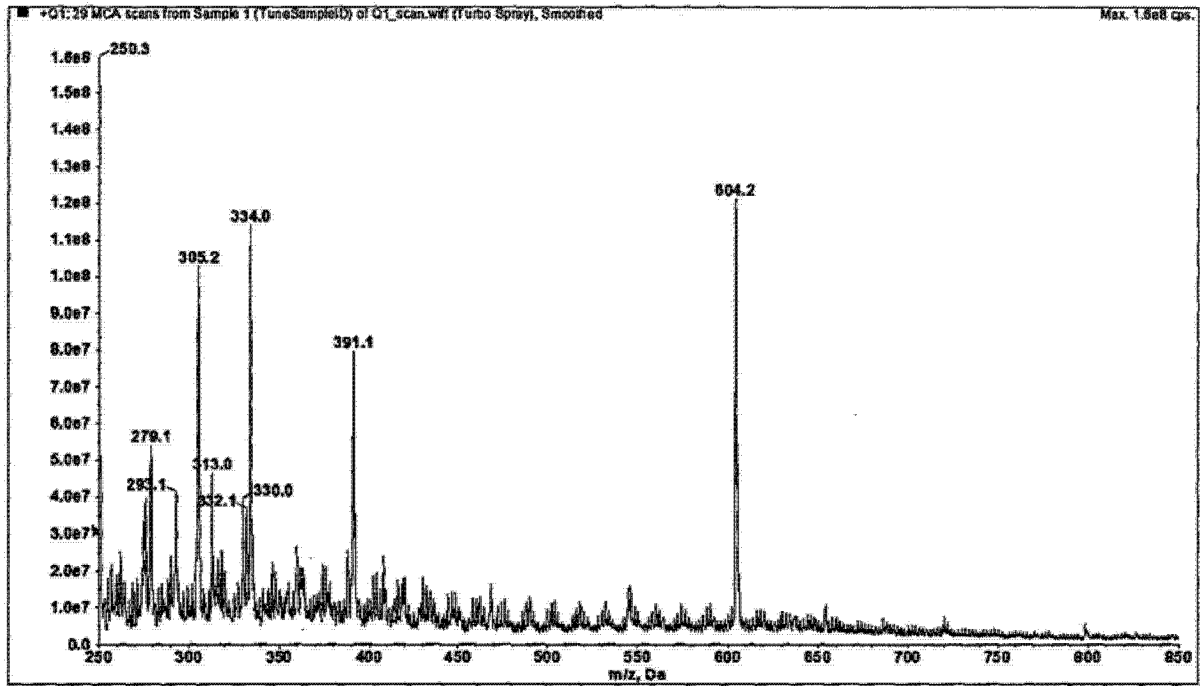


图 5A

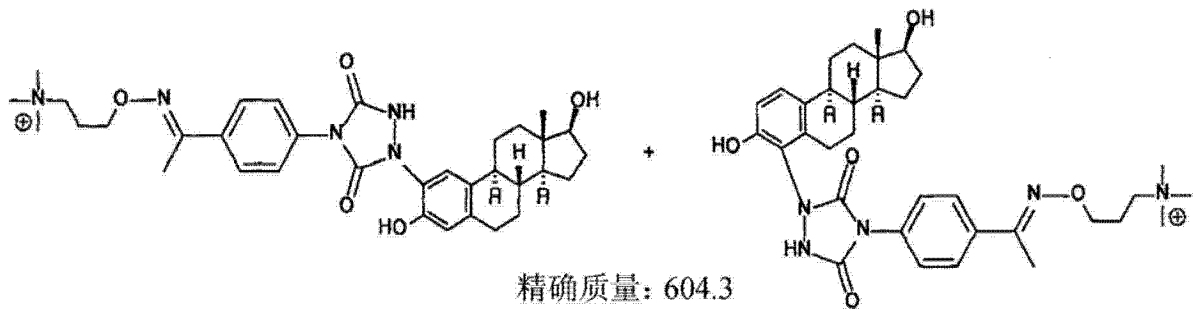


图 5B

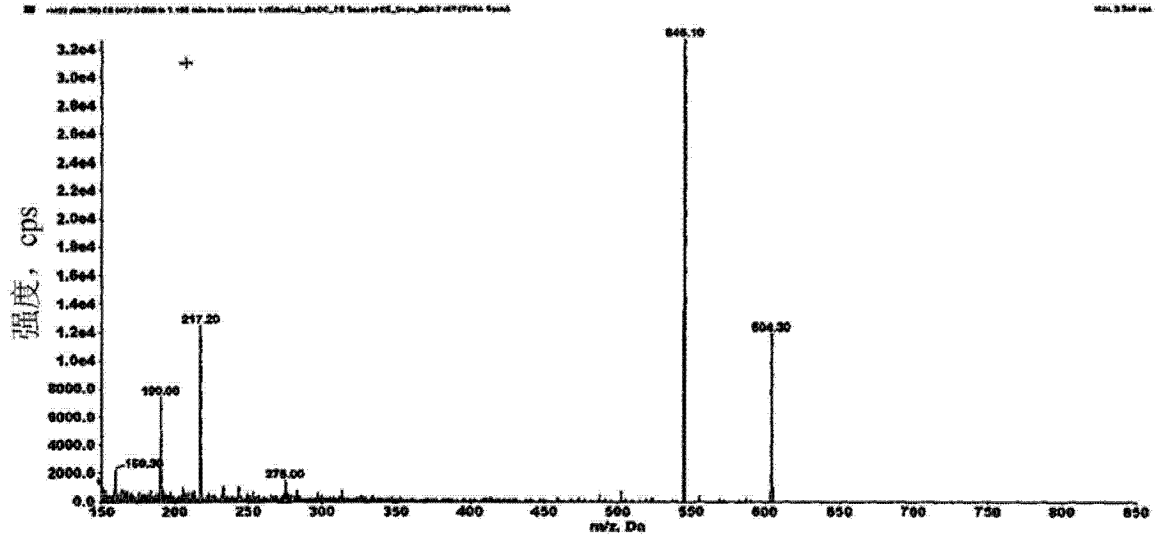


图 6A

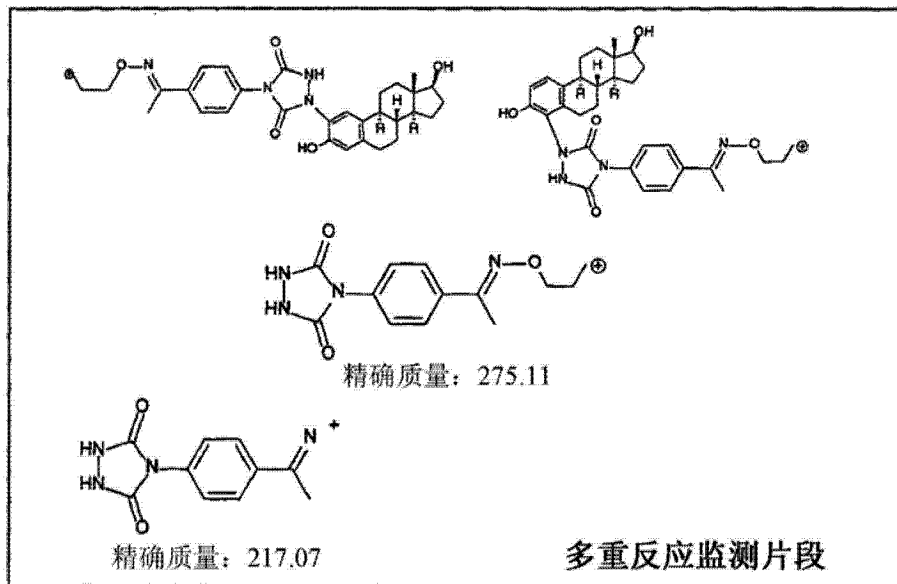
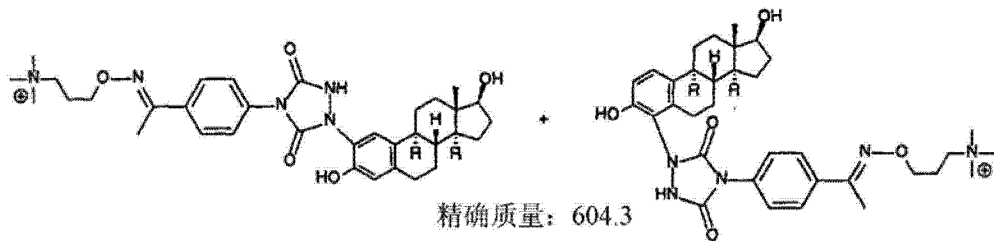


图 6B

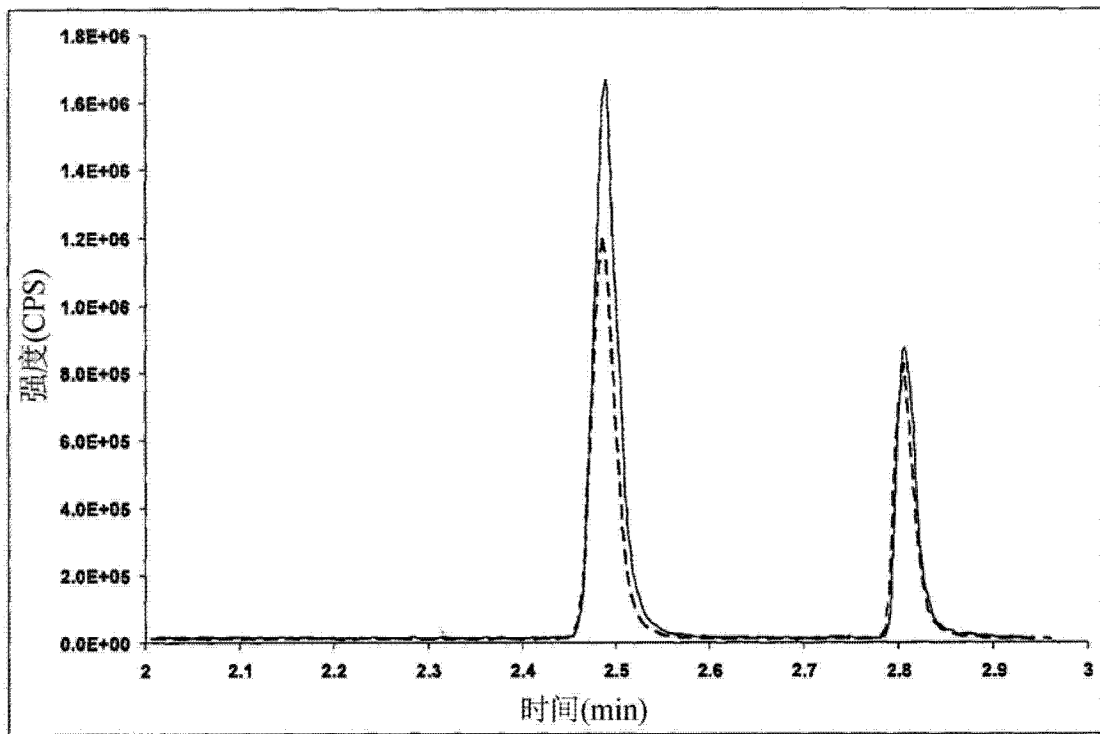


图 7

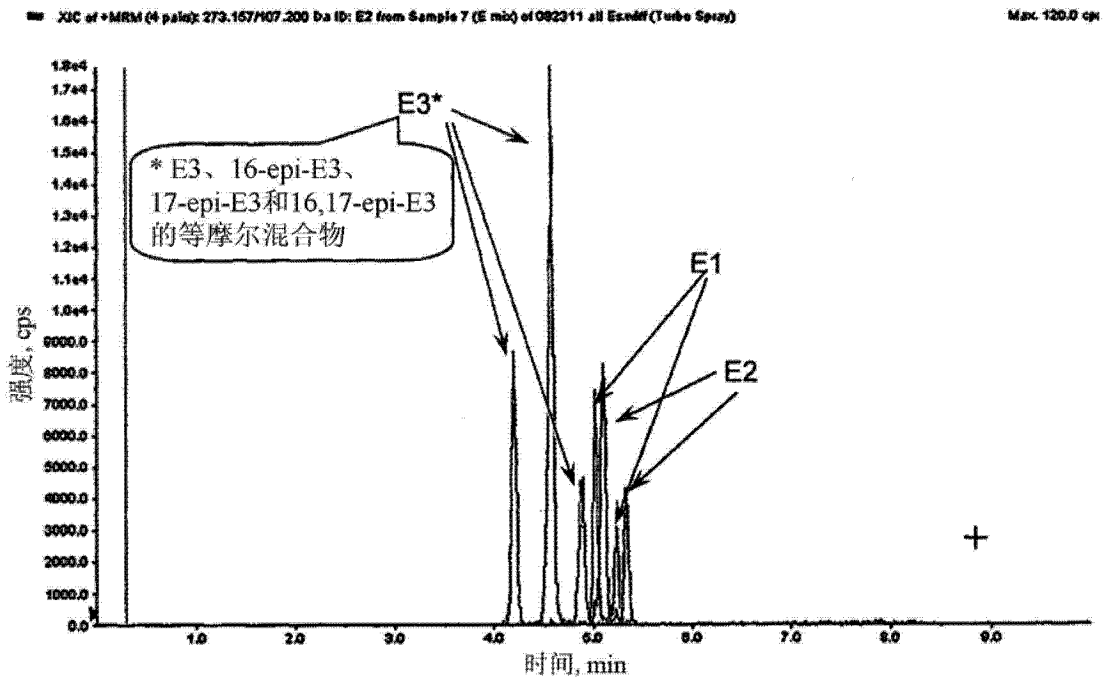


图 8