



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116500281 A

(43) 申请公布日 2023. 07. 28

(21) 申请号 202310753543.X

G01N 30/72 (2006.01)

(22) 申请日 2023.06.26

(71) 申请人 天津赛飞乐生物技术有限公司
地址 300457 天津市滨海新区经济技术开发区滨海-中关村科技园泉州道3号北塘建设发展大厦B座215室

(72) 发明人 王宛

(74) 专利代理机构 天津心知意达知识产权代理
事务所(普通合伙) 12260
专利代理师 赵佳

(51) Int. Cl.

G01N 33/82 (2006.01)

G01N 30/02 (2006.01)

G01N 30/08 (2006.01)

G01N 30/34 (2006.01)

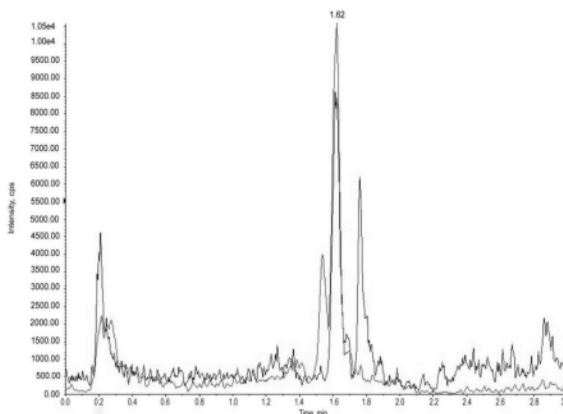
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

1,25-二羟基维生素D的检测材料及制备方法、1,25-二羟基维生素D的检测方法

(57) 摘要

本发明提供了一种1,25-二羟基维生素D的检测材料及其制备方法、1,25-二羟基维生素D的检测方法及检测试剂盒,所述检测材料为结合有维生素D受体蛋白的固载材料,固载材料为磁珠、多糖凝胶材料、多糖纤维材料或亲水聚合物材料。通过将维生素D受体蛋白(VDR)结合至固载材料上,利用VDR和1,25-(OH)₂D₃的特异性结合能力,得到具有特异性结合1,25-二羟基维生素D的检测材料,可将生物流体样品中痕量的1,25-二羟基维生素D进行富集,消除杂质干扰,以满足液质联用检测技术的要求,实现对痕量1,25-二羟基维生素D的含量的准确测定。



1. 一种1,25-二羟基维生素D的检测材料,其特征在于:所述检测材料为结合有维生素D受体蛋白的固载材料;所述固载材料为磁珠、多糖凝胶材料、多糖纤维材料或亲水聚合物材料。

2. 根据权利要求1所述的1,25-二羟基维生素D的检测材料,其特征在于:所述磁珠为无孔磁珠、多孔磁珠、核壳结构的复合磁珠中的一种或多种的混合;

所述多糖凝胶材料为琼脂糖凝胶材料、葡聚糖凝胶材料、海藻糖凝胶材料、壳聚糖凝胶材料中的一种或多种的混合;

所述多糖纤维材料为琼脂糖、葡聚糖、海藻糖、壳聚糖、淀粉、纤维素中的一种或多种的混合构建而成的纤维状或纤维膜状材料;

所述亲水聚合物材料为高分子聚合物经过引入醇羟基、和/或酰胺基而得到的亲水材料。

3. 权利要求1或2所述的1,25-二羟基维生素D的检测材料的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

步骤一、采用基因重组表达技术获得带有His标签的维生素D受体蛋白;

步骤二、将得到的维生素D受体蛋白结合到固载材料上,得到所述检测材料。

4. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于:所述步骤一中,通过大肠杆菌表达得到含有维生素D受体蛋白的溶液,经过免疫亲和层析,获得纯化后的维生素D受体蛋白。

5. 权利要求1或2所述的1,25-二羟基维生素D的检测材料的用途,其特征在于:在生物流体样品中1,25-二羟基维生素D痕量检测中的应用。

6. 一种1,25-二羟基维生素D的检测方法,其特征在于,包括如下步骤:

S1、将生物流体样品溶液的pH值调节至6~9;

S2、将权利要求1或2所述的检测材料与生物流体样品溶液充分接触,吸附其中的1,25-二羟基维生素D;

S3、采用淋洗液对吸附有1,25-二羟基维生素D的检测材料进行清洗,再采用洗脱剂溶液将吸附有1,25-二羟基维生素D的检测材料中的1,25-二羟基维生素D洗脱下来,得到洗脱液;

S4、采用液质联用系统对洗脱液进行检测,得到1,25-二羟基维生素D的测定结果。

7. 根据权利要求6所述的1,25-二羟基维生素D的检测方法,其特征在于:所述S1中,生物流体样品为血液样品、尿液样品、汗液样品或组织提取液样品;采用pH值为7的浓度为20~1000mmol/L的磷酸盐缓冲液调节所述生物流体样品溶液pH值至6~9。

8. 根据权利要求6所述的1,25-二羟基维生素D的检测方法,其特征在于:所述S2中,检测材料与生物流体样品溶液的质量比为1:1~1:10。

9. 根据权利要求6所述的1,25-二羟基维生素D的检测方法,其特征在于:所述S3中,淋洗液为甲醇与水的质量比为1:1~1:19的混合液;洗脱剂溶液为pH低于4的浓度为20~1000mmol/L的磷酸盐缓冲液。

10. 一种1,25-二羟基维生素D的检测试剂盒,其特征在于:包括权利要求1或2所述的1,25-二羟基维生素D的检测材料、调节生物流体样品溶液pH值的pH值调节溶液、淋洗液及洗脱剂溶液。

1,25-二羟基维生素D的检测材料及制备方法、1,25-二羟基维生素D的检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物检测技术领域,尤其是涉及一种1,25-二羟基维生素D的检测材料及该检测材料的制备方法、1,25-二羟基维生素D的检测方法及检测试剂盒。

背景技术

[0002] 1,25-二羟基维生素D,是维生素D的活性形式。维生素D为类固醇衍生物,属于脂溶性维生素。维生素D主要是由人体皮肤经过紫外线照射后合成而得,少部分从食物或者补充品中摄入。维生素D不仅仅影响钙磷代谢,而且具有广泛的生理作用,是维持人体健康、细胞生长和发育的必不可少的物质,与多种疾病密切相关。在人体内有两种形式的维生素D——维生素D₃(胆钙化醇)和维生素D₂(麦角钙化醇),维生素D₃在肝脏中通过羟基化作用转化成25-羟基维生素D(25-OH-D₃),然后在肾脏中转换为具有活性的1,25-(OH)₂D₃。它的生物学效应主要通过基因组与非基因组两种机制介导。基因组机制依赖于细胞核内的特异性受体——维生素D受体(VDR)。非基因组机制是通过跨膜信号转到引起的一些快速生物学效应。

[0003] 临床通过测定1,25-(OH)₂D₃的水平来了解代谢性骨病时活性维生素D的水平。1,25-(OH)₂D₃是钙(和磷酸盐)新陈代谢的主要调节者之一,刺激肠内钙吸收和逐渐增加的骨重吸收。它同样抑制甲状旁腺激素的产生,直接作用于甲状旁腺和间接升高血清钙水平。1,25-(OH)₂D₃的产生也是受到甲状旁腺激素的刺激,因此形成一个有效的控制循环。1,25-(OH)₂D₃缺乏症通常与饮食不足相关,最常见于素食主义者,也与低阳光照射和皮肤较黑有关。在肾衰竭的晚期,1 α -羟基可能被损害,出现一个低的1,25-(OH)₂D₃水平结果。

[0004] 由于1,25-二羟基维生素D是维生素D的活性形式,相比较于25-OH维生素D的检测,对1,25-二羟基维生素D进行检测,所得结果在临床上更具有指导意义。但是1,25-二羟基维生素D在人体内的含量处于一个极其低下的水平,如何对其进行准确地测定是个公认的难题。

[0005] 采用常规的单分子层吸附-解析机理的固相萃取材料难以在将其富集的同时去除干扰杂质。而采用测定它的代谢前体25-OH维生素D(比1,25-二羟基维生素D的浓度高1000倍左右)来进行间接地表征代谢性骨病,此种检测又不能真正地反应人体的健康状况。

[0006] 目前液质联用系统可以对痕量物质进行检测,相比较于传统临床领域的化学发光法等采用比色法原理的检测手段,液质联用技术对小分子化合物的检测准确度更高;但是它十分容易受到样品基质中的杂质所带来的干扰,即所谓的基质效应,导致检测结果的不准确。特别地,目标物含量越低,基质效应越大。因此,相比较于25-OH 维生素D,液质联用技术检测浓度更低的1,25-二羟基维生素D的难度更大,对生物流体样品中1,25-二羟基维生素D的分离技术提出了更高的要求。

[0007] 免疫亲和技术是以抗原抗体中的一方作为配基亲和吸附另一方的分离技术,通常用于大分子物质(如蛋白质)的纯化。对于小分子的免疫亲和配基的制备,通常需要将小分

子偶联到一个较大的分子量的物质上,如某种蛋白质,然后再通过免疫动物获得其配基——抗体;但是在上述偶联过程中,偶联到蛋白质上的小分子的活性结构位点会因为偶联而损失,其分子结构也会变形,因此,所得到的抗体,对游离状态的小分子的特异性并不强,对于浓度较高的25-OH 维生素D,此方法所得到的抗体,勉强可以将它从生物流体样品中纯化出来,但对于比25-OH 维生素D的浓度低1000倍左右的1,25-二羟基维生素D,上述方法制备的抗体,往往特异性不够,难以在将1,25-二羟基维生素D富集起来。因此,针对1,25-二羟基维生素D在人体中的浓度极低的特点,有必要开发更具特异性的识别配基,能够与1,25-二羟基维生素D特异性结合,在能够富集1,25-二羟基维生素D的同时去除干扰杂质,以与液质联用检测技术结合,实现对痕量1,25-二羟基维生素D的含量的准确测定。

发明内容

[0008] 有鉴于此,为解决上述问题,本发明提出了一种1,25-二羟基维生素D的检测材料及其制备方法,同时提供了1,25-二羟基维生素D的检测方法及检测试剂盒。通过将维生素D受体蛋白(VDR)结合至固载材料上,利用VDR和1,25-(OH)₂D₃的特异性结合能力,得到具有特异性结合1,25-二羟基维生素D的检测材料,可将生物流体样品中痕量的1,25-二羟基维生素D进行富集,消除杂质干扰,以满足液质联用检测技术的要求,实现对痕量1,25-二羟基维生素D的含量的准确测定。

[0009] 为达到上述目的,本发明的技术方案是这样实现的:

[0010] 本发明一方面提供了一种1,25-二羟基维生素D的检测材料,所述检测材料为结合有维生素D受体蛋白的固载材料;所述固载材料为磁珠、多糖凝胶材料、多糖纤维材料或亲水聚合物材料。

[0011] 维生素D受体蛋白(VDR)是一种可以特异性结合1,25-二羟基维生素D的物质,它是一种亲核蛋白,是介导1,25-二羟基维生素D发挥生物效应的核内生物大分子。维生素D的许多生物学功能都是通过VDR介导调节靶基因转录来实现的。1,25-二羟基维生素D激素信号分子在靶细胞与VDR结合形成激素-受体复合物,该复合物作用于靶基因上的特定DNA序列,对结构基因的表达产生调节作用;

[0012] 对VDR蛋白进行测序,合成相应的核酸片段,并进行重组表达,纯化得到VDR蛋白,在将VDR蛋白与亲和层析材料结合,就可得到所述检测材料——具有VDR蛋白的亲层析材料,此检测材料可从生物流体样品中纯化1,25-二羟基维生素D,去除绝大部分干扰物质,可以为液质联用技术检测1,25-二羟基维生素D打下良好的基础。

[0013] 在本发明的一些优选的1,25-二羟基维生素D的检测材料的实施方式中,所述磁珠为无孔磁珠、多孔磁珠、核壳结构的复合磁珠中的一种或多种的混合。

[0014] 在本发明的一些优选的1,25-二羟基维生素D的检测材料的实施方式中,所述多糖凝胶材料为琼脂糖凝胶材料、葡聚糖凝胶材料、海藻糖凝胶材料、壳聚糖凝胶材料中的一种或多种的混合。

[0015] 在本发明的一些优选的1,25-二羟基维生素D的检测材料的实施方式中,所述多糖纤维材料为琼脂糖、葡聚糖、海藻糖、壳聚糖、淀粉、纤维素中的一种或多种的混合构建而成的纤维状或纤维膜状材料。

[0016] 在本发明的一些优选的1,25-二羟基维生素D的检测材料的实施方式中,所述亲水

聚合物材料为高分子聚合物经过引入醇羟基、和/或酰胺基而得到的亲水材料。

[0017] 本发明另一方面提供了1,25-二羟基维生素D的检测材料的制备方法,包括如下步骤:

[0018] 步骤一、采用基因重组表达技术获得带有His标签的维生素D受体蛋白;

[0019] 步骤二、将得到的维生素D受体蛋白结合到固载材料上,得到所述检测材料。

[0020] 在本发明的一些优选的1,25-二羟基维生素D的检测材料的制备方式的实施方式中,通过大肠杆菌表达得到含有维生素D受体蛋白的溶液,经过免疫亲和层析,获得纯化后的维生素D受体蛋白;

[0021] 在本发明的一些优选的1,25-二羟基维生素D的检测材料的制备方式的实施方式中,所述步骤二中,采用NHS活化法、溴化氰活化法、戊二醛活化法等方式将蛋白结合到固载材料上。

[0022] 本发明另一方面提供了1,25-二羟基维生素D的检测材料的用途,所述1,25-二羟基维生素D的检测材料在生物流体样品中1,25-二羟基维生素D痕量检测中的应用。

[0023] 在本发明的一些优选的1,25-二羟基维生素D的检测材料的用途的实施方式中,所述1,25-二羟基维生素D的检测材料在生物流体样品中1,25-二羟基维生素D痕量检测中与液质联用检测技术结合中的应用。

[0024] 本发明另一方面提供了一种1,25-二羟基维生素D的检测方法,包括如下步骤:

[0025] S1、将生物流体样品溶液的pH值调节至6~9;

[0026] S2、将1,25-二羟基维生素D的检测材料与生物流体样品溶液充分接触,吸附其中的1,25-二羟基维生素D;

[0027] S3、采用淋洗液对吸附有1,25-二羟基维生素D的检测材料进行清洗,再采用洗脱剂溶液将吸附有1,25-二羟基维生素D的检测材料中的1,25-二羟基维生素D洗脱下来,得到洗脱液;

[0028] S4、采用液质联用系统对洗脱液进行检测,得到1,25-二羟基维生素D的测定结果。

[0029] 在本发明的一些优选的1,25-二羟基维生素D的检测方法的实施方式中,所述S1中,生物流体样品为血液样品、尿液样品、汗液样品或组织提取液样品;其中,血液样品、尿液样品、汗液样品为原始形态,组织提取液一般为缓冲盐溶液和组织混合在一起进行匀浆。

[0030] 在本发明的一些更优选的1,25-二羟基维生素D的检测方法的实施方式中,所述S1中,采用pH值为7的浓度为20~1000mmol/L的磷酸盐缓冲液调节所述生物流体样品溶液pH值至6~9。

[0031] 在本发明的一些优选的1,25-二羟基维生素D的检测方法的实施方式中,所述S2中,检测材料与生物流体样品溶液的质量比为1:1~1:10。

[0032] 在本发明的一些优选的1,25-二羟基维生素D的检测方法的实施方式中,所述S3中,淋洗液为甲醇与水的质量比为1:1~1:19的混合液。

[0033] 在本发明的一些优选的1,25-二羟基维生素D的检测方法的实施方式中,所述S3中,洗脱剂溶液为pH低于4的浓度为20~1000mmol/L的磷酸盐缓冲液。

[0034] 本发明另一方面提供了一种1,25-二羟基维生素D的检测试剂盒,包括所述的1,25-二羟基维生素D的检测材料、调节生物流体样品溶液pH值的pH值调节溶液、淋洗液及洗脱剂溶液。

[0035] 在本发明的一些优选的1,25-二羟基维生素D的检测试剂盒的实施方式中,所述pH值调节溶液为pH值为7的浓度为20~1000mmol/L的磷酸盐缓冲液。

[0036] 本发明的一些优选的1,25-二羟基维生素D的检测试剂盒的实施方式中,所述淋洗液为混合质量比为1:1~1:19的甲醇与水的混合液。

[0037] 本发明的一些优选的1,25-二羟基维生素D的检测试剂盒的实施方式中,所述洗脱剂溶液为pH值低于4的浓度为20~1000mmol/L的磷酸盐缓冲液。

[0038] 相对于现有技术,本发明所述的1,25-二羟基维生素D的检测材料及其制备方法、1,25-二羟基维生素D的检测方法及检测试剂盒具有以下优势:

[0039] (1) 本发明所述的1,25-二羟基维生素D的检测材料及其制备方法,通过对1,25-(OH)₂D₃具有特异性结合能力的维生素D受体蛋白结合到固载材料上,制备得到具有特异性结合1,25-二羟基维生素D能力的检测材料,能够将生物流体样品中痕量的1,25-二羟基维生素D进行富集,消除杂质干扰,可适配于液质联用系统,消除液质联用系统检测1,25-二羟基维生素D的基质效应,获得准确检测结果。

[0040] (2) 本发明所述的1,25-二羟基维生素D的检测方法,通过使用具有特异性结合1,25-二羟基维生素D能力的检测材料,选择性地从生物流体样品中吸附1,25-(OH)₂D₃,并通过淋洗、洗脱的步骤,最终获得较为纯净的洗脱液,然后进行液质联用系统的检测,由于VDR的特异性选择能力,可以消除大部分的干扰物质,减少质谱检测器的基质效应,从而获得准确的1,25-二羟基维生素D测定结果;

[0041] (3) 本发明所述的1,25-二羟基维生素D的检测试剂盒,包含有具有特异性结合1,25-二羟基维生素D能力的检测材料及其它的检测用辅助试剂溶液,可与液质联用系统结合使用,准确检测生物流体样品中的1,25-二羟基维生素D。

附图说明

[0042] 图1为本发明实施例6中的1,25-(OH)₂D₃LC-MSMS图(添加水平10pg/mL)。

具体实施方式

[0043] 除有定义外,以下实施例中所用的技术术语具有与本发明所属领域技术人员普遍理解的相同含义。以下实施例中所用的试验试剂,如无特殊说明,均为常规生化试剂;所述实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。

[0044] 下面结合实施例及附图来详细说明本发明。

[0045] 1. 实施例1~4 制备不同固载材料的1,25-二羟基维生素D检测材料

[0046] 实施例1

[0047] 1) 通过大肠杆菌表达得到含有维生素D受体蛋白的溶液,经过免疫亲和层析,获得纯化后的维生素D受体蛋白;

[0048] 2) 取10mg 羧基修饰的粒径为500nm的磁珠,加入20ml pH4.0、0.1M的MES缓冲液,充分混匀,加入10mg的NHS、20mg的EDC,室温振荡反应(20转/分钟)10min;

[0049] 将1ml的50μg/mL的VDR蛋白溶液加入到上述混好的磁珠溶液中,轻摇混匀,室温振荡反应(20转/分钟)2小时,得到维生素D受体蛋白结合到磁珠上的检测材料。

[0050] 实施例2

[0051] 1) 与实施例1相同,不做赘述;

[0052] 2) 取1ml NHS活化琼脂糖凝胶,加入20ml pH4.0、0.1M的MES缓冲液,充分混匀;

[0053] 将1ml的100 μ g/mL的VDR蛋白溶液加入到上述混好的溶液中,轻摇混匀,室温振荡反应(20转/分钟)2小时,得到维生素D受体蛋白结合到NHS活化琼脂糖凝胶上的检测材料。

[0054] 实施例3

[0055] 1) 与实施例1相同,不做赘述;

[0056] 2) 取1ml NHS活化的亲水改性聚丙烯甲基丙烯酸聚合物,加入20ml pH4.0、0.1M的MES缓冲液,充分混匀;

[0057] 将1ml的50 μ g/mL的VDR蛋白溶液加入到上述混好的溶液中,轻摇混匀,室温振荡反应(20转/分钟)2小时,得到维生素D受体蛋白结合到NHS活化的亲水改性聚丙烯甲基丙烯酸聚合物上的检测材料。

[0058] 实施例4

[0059] 1) 与实施例1相同,不做赘述;

[0060] 2) 取100mg NHS活化的纤维素膜,加入20ml pH4.0、0.1M的MES缓冲液,浸没,充分混匀;

[0061] 将1ml的50 μ g/mL的VDR蛋白溶液加入到上述混好的溶液中,轻摇混匀,室温振荡反应(20转/分钟)2小时,得到维生素D受体蛋白结合到NHS活化的纤维素膜上的检测材料。

[0062] 2. 对实施例1~4制备的检测材料进行元素分析检测

[0063] 将实施例1~4中修饰后的固载材料取出,通过元素分析测试其中的N元素,结果表明实施例1~4中修饰后的固载材料中均存在N元素,由于合成过程中除了VDR,没有其他试剂可以引入N元素,可证明固载材料上的确修饰了VDR蛋白。

[0064] 3. 实施例5~8 采用实施例1~4制备的检测材料对生物流体样品进行1,25-二羟基维生素D的检测

[0065] 实施例5

[0066] 将添加有1pg/mL的1,25-(OH)₂D₃的100 μ L全血样品加入100 μ L的10mmol/L的pH6.8的磷酸盐缓冲液中,加入到10mg结合维生素D受体蛋白的磁珠(实施例1制备的检测材料),震荡1min,用含5%甲醇水溶液淋洗,然后用100 μ L的pH2.5的盐酸溶液(含50%甲醇)洗脱,得到洗脱液;采用C18液相色谱柱,以含0.02%甲酸的水为A相,以含0.02%甲酸的甲醇为B相,按一定的梯度条件(0min-1min时,B相为80%;1min至3min时,B相从80%升到90%)洗脱,设置合适的质谱参数(扫描模式:电喷雾电离正模式;采集模式:多反应监测(MRM);IS/V:+5500V;TEM:600 $^{\circ}$ C;DP:63V),对洗脱液进行质谱检测。

[0067] 重复本次实验5次。

[0068] 实施例6

[0069] 将添加有10pg/mL的1,25-(OH)₂D₃的100 μ L血清样品加入到100 μ L的10mmol/L的pH6.8的磷酸盐缓冲液中,加入到装填有60mg结合维生素D受体蛋白的NHS活化琼脂糖凝胶(实施例2制备的检测材料)的3mL固相萃取柱中,用含5%甲醇水溶液淋洗,然后用300 μ L的pH2.5的盐酸溶液(含50%甲醇)洗脱,得到洗脱液;采用C18液相色谱柱,以含0.02%甲酸的水为A相,以含0.02%甲酸的甲醇为B相,按一定的梯度条件(0min-1min时,B相为80%;1min至3min时,B相从80%升到90%)洗脱,设置合适的质谱参数(扫描模式:电喷雾电离正模式;采集

模式:多反应监测(MRM);IS/V:+5500V;TEM:600 °C;DP:63V),对洗脱液进行质谱检测(图1)。

[0070] 重复本次实验5次。

[0071] 实施例7

[0072] 将添加有3pg/mL的1,25-(OH)₂D₃的100μL血浆样品加入到100μL的10mmol/L的pH6.8的磷酸盐缓冲液中,加入到装填有10mg结合维生素D受体蛋白的NHS活化亲水改性聚丙烯甲基丙烯酸聚合物(实施例3制备的检测材料)的1mL固相萃取柱中,用含5%甲醇水溶液淋洗,然后用200μL的pH2.5的盐酸溶液(含50%甲醇)洗脱,得到洗脱液;采用C18液相色谱柱,以含0.02%甲酸的水为A相,以含0.02%甲酸的甲醇为B相,按一定的梯度条件(0min-1min时,B相为80%;1min至3min时,B相从80%升到90%)洗脱,设置合适的质谱参数(扫描模式:电喷雾电离正模式;采集模式:多反应监测(MRM);IS/V:+5500V;TEM:600 °C;DP:63V),对洗脱液进行质谱检测。

[0073] 重复本次实验5次。

[0074] 实施例8

[0075] 将添加有5pg/mL的1,25-(OH)₂D₃的100μL血浆样品加入到100μL的10mmol/L的pH6.8的磷酸盐缓冲液中,加入到装填有10mg结合维生素D受体蛋白的NHS活化的纤维素膜的1mL固相萃取柱中,用含5%甲醇水溶液淋洗,然后用100μL的pH2.5的盐酸溶液(含50%甲醇)洗脱,得到洗脱液;采用C18液相色谱柱,以含0.02%甲酸的水为A相,以含0.02%甲酸的甲醇为B相,按一定的梯度条件(0min-1min时,B相为80%;1min至3min时,B相从80%升到90%)洗脱,设置合适的质谱参数(扫描模式:电喷雾电离正模式;采集模式:多反应监测(MRM);IS/V:+5500V;TEM:600 °C;DP:63V),对洗脱液进行质谱检测。

[0076] 重复本次实验5次。

[0077] 4. .实施例5~8的检测结果进行分析

[0078] 实施例5中,测试结果显示5次平行测试的1,25-(OH)₂D₃平均回收率为89.5%,5次平行测试的偏差为6.1%。

[0079] 实施例6中,测试结果显示1,25-(OH)₂D₃平均回收率93.7%,5次平行测试的偏差为3.8%。

[0080] 实施例7中,测试结果显示1,25-(OH)₂D₃平均回收率91.3%,5次平行测试的偏差为4.3%。

[0081] 实施例8中,测试结果显示1,25-(OH)₂D₃平均回收率87.5%,5次平行测试的偏差为8.7%。

[0082] 上述测试结果显示,针对不同添加浓度水平的不同样品,采用不同萃取材料,均可实现1,25-(OH)₂D₃平均回收率大于85%,平均偏差小于15%,血样中1,25-(OH)₂D₃检出限可达1pmol/L,检测结果精准。

[0083] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

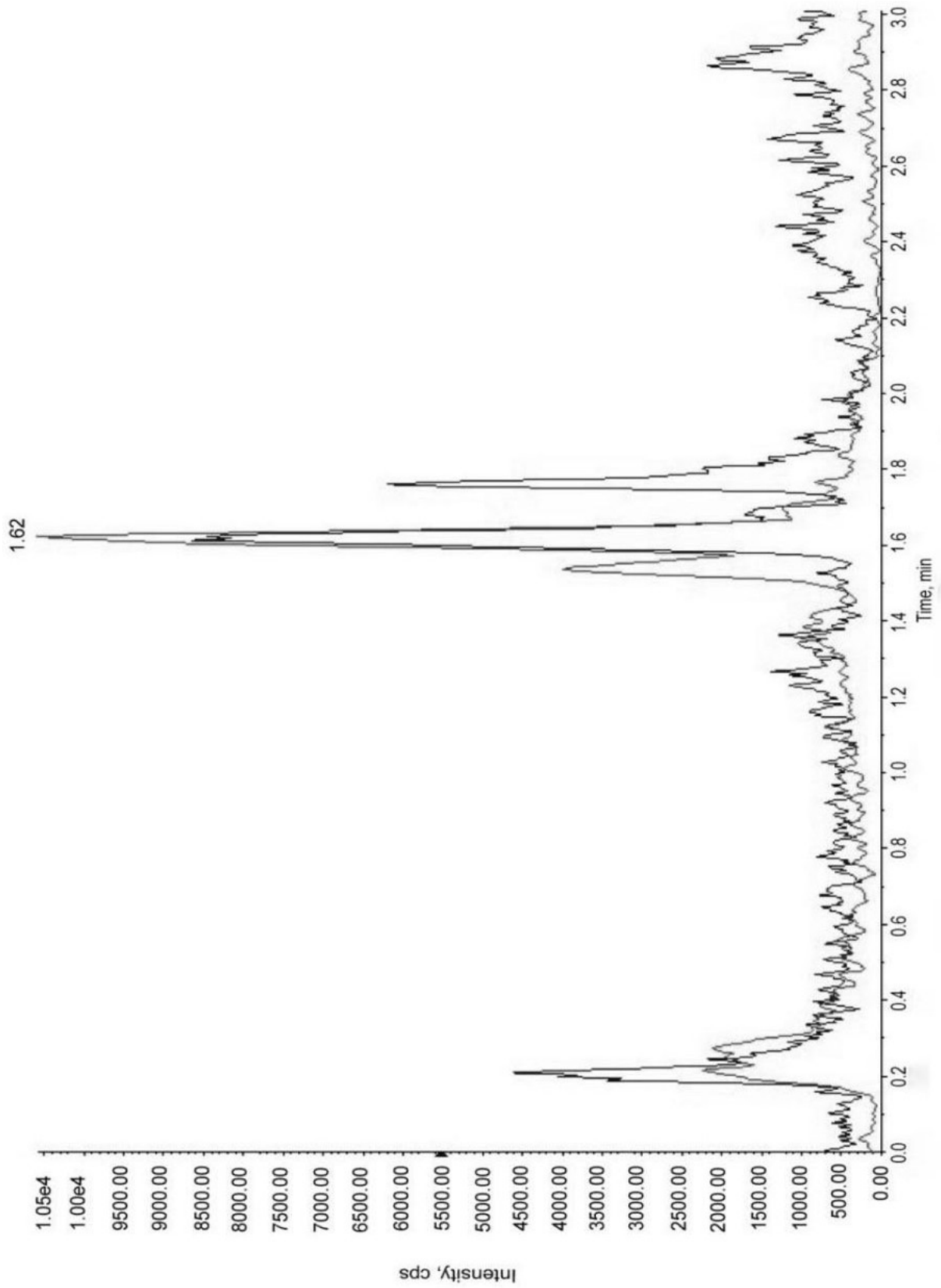


图 1