



# Czy umiemy wiarygodnie mierzyć stężenia klinicznie ważnych metabolitów witaminy D? Problemy i ich konsekwencje

Can we accurately measure the concentration of clinically relevant vitamin D metabolites in the circulation? The problems and their consequences

Zbigniew Bartoszewicz<sup>1, 2</sup>, Agnieszka Kondracka<sup>1, 3</sup>, Radosław Jaźwiec<sup>4</sup>, Michał Popow<sup>1</sup>, Michał Dadlez<sup>4</sup>, Tomasz Bednarczuk<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych i Endokrynologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny

<sup>2</sup>Zespół Kliniczno-Badawczy Epigenetyki Człowieka, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego, Polska Akademia Nauk

<sup>3</sup>Zakład Neuropeptydów, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego, Polska Akademia Nauk

<sup>4</sup>Środowiskowe Laboratorium Proteomiki, Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk

Przedrukowano za zgodą z: Endokrynologia Polska 2013; 64 (3): 238–245

## Streszczenie

Wzrost zainteresowania oznaczeniami stężenia witaminy D przyczynił się do opracowania w ostatnich latach nowych testów immunochemicznych (manualnych oraz do automatycznych analizatorów). Do laboratoriów diagnostycznych wprowadza się również techniki dotychczas niestosowane w rutynowych oznaczeniach witaminy D, takie jak HPLC (wysokosprawna chromatografia cieczowa) oraz LC-MS/MS (tandemowa spektrometria mas sprzężona z wysokosprawną chromatografią cieczową). W związku z różnorodnością testów i metod pojawia się pytanie o ich wiarygodność. W niniejszej pracy przeglądowej opisano występujące w krwiobiegu metabolity witaminy D, przedstawiono zalety i wady stosowanych metod oznaczania ich stężenia oraz omówiono czynniki mające wpływ na wiarygodność wyników tych oznaczeń. (*Endokrynol Pol* 2013; 64 (zeszyt edukacyjny II): 22–30)

**Słowa kluczowe:** witamina D, kalcydiol, kalcytriol, testy immunochemiczne, LC-MS/MS

## Abstract

Increased interest in vitamin D measurements in clinical studies has contributed to the development in recent years of several new immunochemical assays (manual and for automatic analyzers). New methods, including HPLC (high performance liquid chromatography), and LC-MS/MS (liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry) have also been introduced into routine diagnostic laboratories. Because of the variety of assays and methods used, the question arises which one is the most accurate for the measurement of vitamin D metabolites concentration. In this review, we summarise the advantages and disadvantages of these methods, describe the complexity of vitamin D metabolites pattern in the circulation, and discuss the problem of accurate measuring its concentration. (*Endokrynol Pol* 2013; 64 (education supplement II) 22–30)

**Key words:** vitamin D, calcidiol, calcitriol, immunoassays, LC-MS/MS

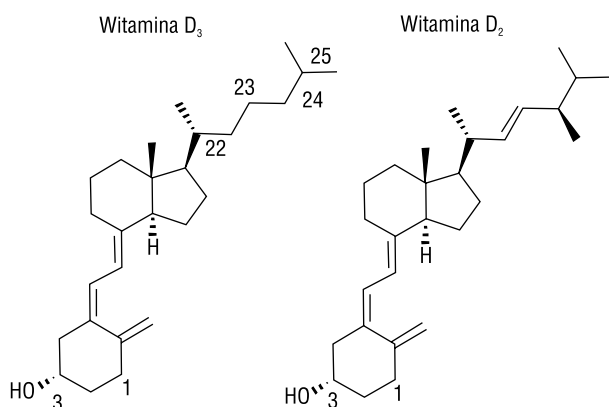
## Wstęp

Duże zainteresowanie witaminą D wynikające z ważnej, plejotropowej roli, którą odgrywa w organizmie oraz znaczenie skutków jakie niesie jej niedobór spowodowały znaczny wzrost zapotrzebowania na oznaczanie stężeń jej metabolitów [1–4]. Uważa się, że status witaminy D w organizmie człowieka najlepiej odzwierciedla stężenie jej 25-monohydroksylowanych izoform (25(OH)D, kalcydiol), które są

najczęściej mierzonymi metabolitami witaminy D, jakkolwiek w ograniczonym zakresie są oznaczane również 1,25-dihydroksylowane formy witaminy D (1,25(OH)<sub>2</sub>D, kalcytriol) [5, 6]. We krwi obwodowej występuje ponad 40 metabolitów witaminy D, a stosowane do oznaczania ich stężeń metody i testy odznaczają się różną wiarygodnością otrzymywanych wyników co ma duże znaczenie dla praktyki klinicznej. Te zagadnienia szczegółowo omówiono w niniejszym artykule.



Dr n. med. Zbigniew Bartoszewicz, Laboratorium Naukowe Katedry i Kliniki Chorób Wewnętrznych i Endokrynologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Banacha 1a, 02-097 Warszawa, tel.: +48 22 599 17 53, faks: +48 22 599 19 75, e-mail: zbigniew.bartoszewicz@wum.edu.pl



**Rycina 1.** Struktura chemiczna witaminy  $D_3$  (cholecalciferol) i  $D_2$  (ergocalciferol) z zaznaczonymi atomami węgla podlegającymi hydroksylacji. Atom węgla C-3 stanowi potencjalne centrum epimeryzacji

**Figure 1.** Chemical structure of vitamin  $D_3$  (cholecalciferol) and vitamin  $D_2$  (ergocalciferol) with marked carbon atoms undergoing hydroxylation. Carbon atom C-3 is a potential centre for epimerisation

## Różnorodność metabolitów witaminy D w krwiobiegu

Witamina D występuje w dwóch formach chemicznych —  $D_2$  i  $D_3$ , które różnią się obecnością podwójnego wiązania pomiędzy atomami węgla 22 i 23 oraz grupy metylowej połączonej z atomem węgla 24 (ryc. 1). Formą powszechną u ludzi jest powstająca głównie podczas syntezy skórnej z udziałem słonecznego promieniowania UV witamina  $D_3$ , która stanowi około 90% całej puli witaminy D w organizmie [7, 8]. Podczas ekspozycji na słońce w lecie promieniowanie UVB umożliwia wytworzenie około 1,000–2,000 IU witaminy  $D_3$  dziennie [8]. Witamina  $D_3$  może być również dostarczona do organizmu z dietą pochodzenia zwierzęcego (bogatym jej źródłem są naturalnie odżywiające się tłuste ryby morskie) [9]. Witamina  $D_2$  jest dostarczana do organizmu w produktach pochodzenia roślinnego. Do jej syntezy zdolne są również grzyby i drożdże [10, 11]. Obie formy  $D_2$  i  $D_3$  mogą być podawane pacjentom z niedoborem witaminy D. U ludzi przyjmujących suplementację w postaci witaminy  $D_2$  stosunek ilościowy  $D_3$  do  $D_2$  może znacznie odbiegać od przeciętnie występującego w populacji.

Witamina D produkowana lub dostarczana do organizmu jest transportowana w krwiobiegu do wątroby w formie związanej, głównie ze specyficznym białkiem wiążącym witaminę D (VDBP, *vitamin D binding protein*), natomiast jej nadmiar jest magazynowany przede wszystkim w tkance tłuszczowej i mięśniach.

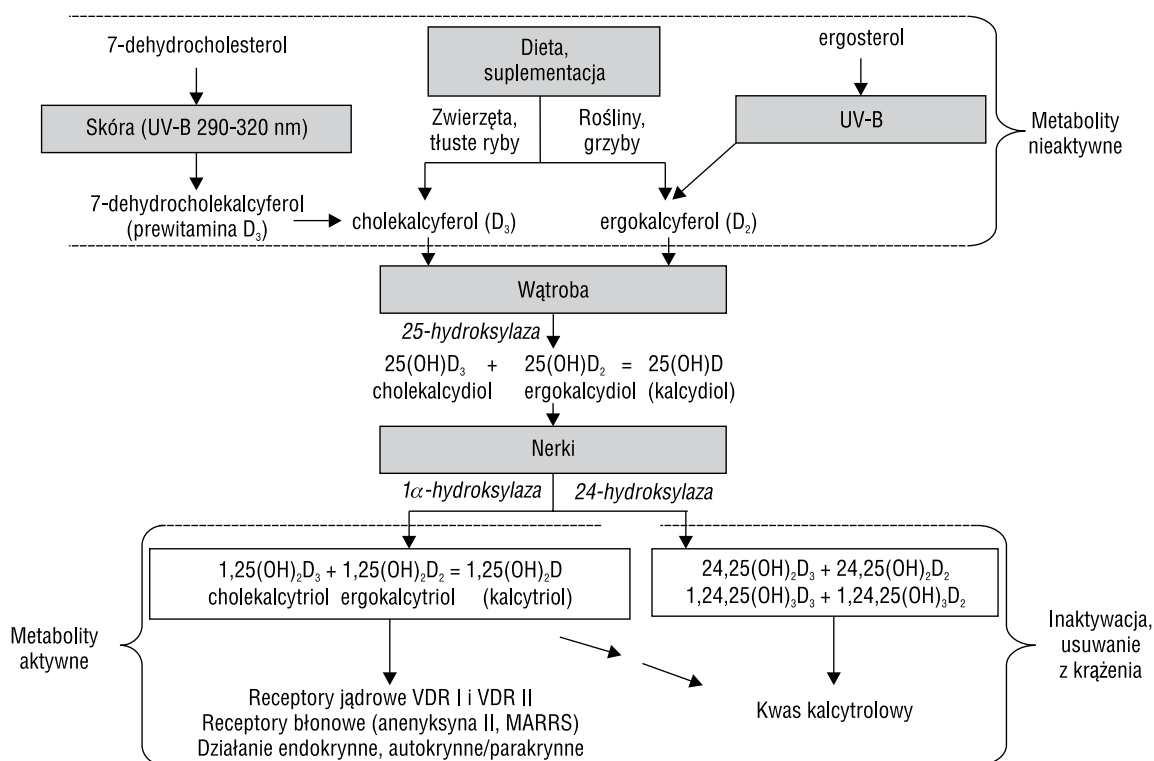
Magazynowanie w tkance tłuszczowej znacznie wydłuża okres półtrwania witaminy  $D_3$  nawet do dwóch miesięcy w porównaniu z okresem półtrwania we krwi obwodowej, który wynosi około 2–3 dni (tab. I). Przed jeszcze szybszym metabolizmem i wydalaniem z obiegu zabezpiecza witaminę D wiązanie z VDBP. Ze względu na niższe powinowactwo witaminy  $D_2$  do VDBP okres jej półtrwania we krwi jest krótszy niż witaminy  $D_3$  [12]. Obie formy  $D_2$  i  $D_3$  ulegają hydroksylacji, najpierw w wątrobie do metabolitów 25-monohydroksylowanych  $25(OH)D_2$  i  $25(OH)D_3$  (kalcydiol), a następnie w nerce ( $1\alpha$ -hydroksylacja) do najbardziej aktywnego biologicznie kalcytriolu, czyli metabolitów:  $1,25(OH)_2D_2$  i  $1,25(OH)_2D_3$  (ryc. 2) [6, 7, 13].

Synteza kalcytriolu jest kontrolowana w nerkach w mechanizmie ujemnego sprzężenia zwrotnego, a jego wysokie stężenie hamuje syntezę parahormonu (PTH) na poziomie genetycznym. Na skutek działania kalcytriolu następuje wzrost reabsorpcji fosforanów prowadzący do uwolnienia FGF-23 (czynnik wzrostu fibroblastów 23). Wzrastające stężenie tego czynnika hamuje aktywność  $1\alpha$ -hydroksylazy — enzymu odpowiedzialnego za syntezę  $1,25(OH)_2D$  i aktywuje 24-hydroksylazę — enzym odpowiedzialny za syntezę 24,25-dihydroksy-witaminy D ( $24,25(OH)_2D$ ) — metabolitu powstającego w pierwszym etapie inaktywacji i usunięcia witaminy D z obiegu (ryc. 2). Na kolejnym etapie jest produkowany rozpuszczalny w wodzie kwas kalcytrolowy, który jest wydalany z żółcią. Uważa się, że  $24,25(OH)_2D$  jest nieaktywnym metabolitem witaminy D, jakkolwiek ostatnie doniesienia wskazują, że może on pełnić ważną funkcję w dojrzewaniu i wzroście chrząstki [14, 15]. Poza metabolitami witaminy D hydroksylowanymi w pozycji 1, 24 i 25 we krwi obserwuje się również metabolity hydroksylowane przy węglu 23 oraz 26 [13].

Zróżnicowanie strukturalne metabolitów witaminy D występujących we krwi zwiększa się dodatkowo na skutek dwóch naturalnych procesów — epimeryzacji i laktonizacji. Epimeryzacja  $25(OH)D$ ,  $1,25(OH)_2D$  i innych metabolitów witaminy D polega na enzymatycznej konwersji wokół asymetrycznego atomu węgla C-3 przy udziale swoistych epimeraz zlokalizowanych we frakcji cytozolowej wątroby lub lokalnie w komórkach (np. w keratynocytach i makrofagach). W wyniku epimeryzacji naturalnie syntetyzowane epimery C-3 $\beta$ -hydroksy witaminy D ulegają przekształceniu do odpowiednich C-3 $\alpha$ -hydroksy epimerów (epimery-C3). Epimeryzacja nie zmienia ciężaru cząsteczkowego oraz sekwencji występujących w związku atomów, ale zmienia ich konfigurację przestrzenną, wpływając na aktywność chemiczną i biologiczną metabolitów witaminy D [16, 17]. Zarówno  $\alpha$ , jak i  $\beta$  epimery witaminy D mogą być dalej hydroksylowane w nerce [18]. Inną

Tabela I. Charakterystyka witaminy D<sub>3</sub> i jej metabolitówTable I. Characteristics of vitamin D<sub>3</sub> and its metabolites

Parametr	D <sub>3</sub>	25(OH)D <sub>3</sub>	1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>
Stężenie w osoczu	0,4–2,8 ng/ml	8–56 ng/ml (zimną do 24 ng/ml)	16–65 pg/ml
Czas półtrwania	36–78 godz.	15–25 dni	3,5–21 godz
Powinowactwo do VDBP		K <sub>a</sub> = 500–700 uM <sup>-1</sup>	K <sub>a</sub> = 40 uM <sup>-1</sup>
Powinowactwo do albuminy		K <sub>a</sub> = 0,6 uM <sup>-1</sup>	K <sub>a</sub> = 0,054 uM <sup>-1</sup>
% związany z VDBP		85–99%	60–85%
% związany z albuminą		13–15%	38%
Fracja wolna (%)		0,03–0,4%	2–0,4%
Powinowactwo do VDR		K <sub>a</sub> = 0,6 uM <sup>-1</sup>	K <sub>a</sub> = 10 <sup>4</sup> –10 <sup>5</sup> uM <sup>-1</sup>



Rycina 2. Synteza i metabolizm witaminy D

Figure 2. Synthesis and metabolism of vitamin D

strukturalną modyfikacją witaminy D jest laktonizacja z utworzeniem dodatkowego pierścienia pomiędzy atomem węgla 23 i 26 [19, 20]. Powstałe laktony działają jako częściowi agoniści receptora witaminy D (VDR, *vitamin D receptor*) i mogą wpływać na jego aktywność [21].

Ze względu na wysoką hydrofobowość metabolity witaminy D są słabo rozpuszczalne w środowisku wodnym i podobnie jak hormony steroidowe i hormony tarczycy są transportowane we krwi w formie związanej, głównie ze specyficznym białkiem

transportującym VDBP i niespecyficznie z albuminą (tab. I). Wolne metabolity 25(OH)D<sub>3</sub> i 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> stanowią odpowiednio około 0,03–0,4% i 0,4–2% ich całkowitej puli. Stężenie niezwiązanej witaminy 1,25(OH)<sub>2</sub>D dobrze koreluje z jej aktywnością biologiczną co wskazuje, że hipoteza wolnych hormonów może być stosowana również do witaminy D [12]. Dotychczas nie opracowano bezpośrednich metod diagnostycznych pozwalających na pomiar stężenia wolnych frakcji 25(OH)D i 1,25(OH)<sub>2</sub>D.

Tabela II. Wartości odcięcia używane najczęściej dla oceny statusu witaminy D [3, 11, 34]

Table II. Frequently used cut-points for vitamin D status [3, 11, 34]

Klasyfikacja	25(OH)D ng/ml*	25(OH)D nmol/l*
Poziom toksyczny	> 100	> 250
Poziom optymalny	30–80 dorośli 20–60 dzieci	75–200 dorośli 50–150 dzieci
Niedobór	20–30 dorośli 10–20 dzieci	50–75 dorośli 25–50 dzieci
Deficyt	10–20	25–50
Głęboki deficyt	< 10	< 25

\*przeliczanie jednostek stężenia 25(OH)D: nmol/l x 0.40 = ng/ml (ng/ml = ug/l); ng/ml x 2.50 = nmol/l

Wiązanie ze składnikami krwi nadaje metabolitom witaminy D w surowicy i osoczu wysoką trwałość [22]. Dlatego próbki przeznaczone do analiz stężenia 25(OH)D można przetrzymywać przez wiele dni w temperaturze pokojowej, są niepodatne na działanie światła i wielokrotne rozmrażanie [23]. Po wyizolowaniu z krwi i oddysocjowaniu od VDBP trwałość metabolitów witaminy D znacznie spada i jest zależna od światła i temperatury [24, 25]. Dlatego używane w wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) oraz w chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas (LC-MS/MS) wzorce witaminy D oraz próbki wyekstrahowane z surowicy muszą być przetrzymywane w niskiej temperaturze  $-70^{\circ}\text{C}$  w zaciemnionych naczyniach plastikowych lub szklanych.

### Kliniczna użyteczność pomiarów stężenia metabolitów witaminy D

Zapewnienie optymalnego stężenia witaminy D w organizmie jest niezbędne dla naszego zdrowia [1, 7, 26]. Witamina D działa wielokierunkowo [1, 27]. Jej aktywny metabolit  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  bierze bezpośredni udział w absorpcji wapnia i fosforanów, zapewniając prawidłową mineralizację kości. Wiele badań wskazuje, że spadek 25(OH)D we krwi poniżej 20 ng/ml wiąże się ze wzrostem ryzyka chorób układu krążenia, niektórych nowotworów oraz chorób autoimmunologicznych [28, 29]. Ostatnie prace zwracają również uwagę na nieklasyczny mechanizm działania witaminy D wskazujący na jej udział w regulacji wrodzonej i nabytej odporności [30–32]. Witamina D stymuluje różnicowanie się prekursorów monocytów do bardziej dojrzałych makrofagów fagocytujących i poprzez wiązanie z TLR2 (*toll-like receptor*), głównym receptorem rozpoznającym patogeny, pobudza ekspresję białek antybakteryjnych między innymi katelicyny. Przeciwbakteryjny i przeciwwirusowy efekt działania witaminy D obserwowano w wielu chorobach, takich jak: gruźlica, stwardnienie

rozсіяne, choroba Crohna, cukrzyca typu 1, zakażenia bakteryjne wątroby, malaria i dur-brzuszy [31].

Przedstawione przykłady jednoznacznie wskazują jak ważne jest utrzymanie optymalnego poziomu witaminy D, który możemy uzyskać poprzez ekspozycję na słońce, prawidłową dietę oraz suplementację preparatami farmaceutycznymi [33, 34]. Stężenie witaminy D w organizmie jest zależne od wielu czynników związanych z nawykami żywieniowymi, warunkami klimatycznymi determinującymi syntezę skórną, czynnikami genetycznymi (pigmentacja skóry), zwyczajami kulturowymi zezwalającymi na odsłonięcie ciała na działanie słońca (szczególnie ważne u kobiet) [35, 36]. Zgodnie z międzynarodowymi i polskimi rekomendacjami optymalne stężenie witaminy 25(OH)D w surowicy powinno wynosić powyżej 30 ng/ml dla dorosłych i 20 ng/ml dla dzieci (tab. II) [6, 11, 33, 34]. Badania populacyjne prowadzone w wielu krajach wykazały jednak, że mamy do czynienia z globalnym niedoborem witaminy D, który dotyczy również populacji polskiej [33, 34].

### Oznaczenie metabolitów witaminy D

**25(OH)D.** Intensywność hydroksylacji witaminy D przy węglu 25 w wątrobie jest limitowane przez zdolność wątroby i tkanki tłuszczowej do gromadzenia tego hormonu. Mechanizm ten jednak ma ograniczoną efektywność. Z tego powodu oznaczanie całkowitego stężenia 25-monohydroksylowanych izoform 25(OH)D<sub>3</sub> i 25(OH)D<sub>2</sub> ma największe znaczenie kliniczne, gdyż pozwala na wykrycie zarówno niedoboru witaminy D, jak i przedawkowania wynikającego z nieprawidłowej suplementacji [3, 26, 37, 40].

**1,25(OH)<sub>2</sub>D** jest aktywnym biologicznie hormonem, o krótkim okresie półtrwania we krwi. Zależność jego syntezy od prawidłowej funkcji nerek oraz niskie stężenie w osoczu (ponad 1000 niższe niż 25(OH)D) sprawia, że oznacza się go rzadko, a konieczność stosowania czułych metod stanowi duże wyzwanie dla współczesnej diagnostyki [12]. Dodatkowo parametr ten nie jest

przydatny do monitorowania niedoboru witaminy D, ponieważ nawet przy jej głębokim niedoborze stężenie  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  może pozostawać w granicach wyników prawidłowych. Monitorowanie stężenia  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  jest użyteczne w rzadkich przypadkach niewydolności nerek i wątroby, podejrzeniu oporności na witaminę D oraz we wrodzonych i nabytych chorobach związanych z metabolizmem  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  [37].

**D<sub>3</sub> i D<sub>2</sub>.** Stężenie witaminy D<sub>3</sub> i D<sub>2</sub> jest bezpośrednio zależne od diety i suplementacji, duży wpływ na stężenie witaminy D<sub>3</sub> ma również synteza skórna [12]. Zmienność stężenia tego parametru we krwi powoduje, że nie jest on użytecznym markerem statusu witaminy D w organizmie. Ostatnio próbuje się oznaczać stężenie witaminy D<sub>3</sub> w tkankach, szczególnie w tkance tłuszczowej [38]. Wyższe stężenie D<sub>3</sub> obserwuje się w tkance tłuszczowej pacjentów otyłych w porównaniu z osobami z prawidłowym BMI, jakkolwiek oznaczenie to nie ma znaczenia praktycznego [39].

**24,25(OH)<sub>2</sub>D** jakkolwiek uznawana jest za metabolit nieaktywny, odgrywa ważną rolę przy dojrzewaniu i wzrastaniu chrząstek. Może być też markerem wzrastającej fosfatemii, choć znacznie czulszym parametrem jest w tym przypadku poziom fosfatonin (np. FGF23).

### *Kliniczne zastosowanie oznaczeń metabolitów witaminy D*

Chociaż brak jest konkretnych wytycznych w odniesieniu do tego kiedy i u kogo należy oznaczać metabolity witaminy D, ich udział w prewencji wielu chorób uzasadnia badanie ich poziomu w organizmie. Pomiar stężenia metabolitów witaminy D jest użyteczny w następujących sytuacjach klinicznych [1–6, 32, 41–43]:

**Osteoporoza.** Witamina D jest jedynym znanym hormonem wpływającym na ekspresję kalbidyny, która jest odpowiedzialna za aktywne wchłanianie wapnia ze światła jelita cienkiego. Niedobór witaminy D wiąże się ze zmniejszeniem siły mięśni i wzrostem ryzyka upadków ze złamaniami kości.

**Zaburzenia wchłaniania.** Choroby związane z zaburzeniami wchłaniania, takie jak choroba Crohna, celiakia czy skrobiawica jelit obejmują proksymalną część jelita cienkiego. Choroby te prowadzą do upośledzenia wchłaniania wapnia oraz chylomikronów z zawartą w nich witaminą D.

**Ciąża.** Metabolizm kobiety w ciąży jest bezpośrednio podporządkowany rozwojowi płodu. Łożyskowe wydzielanie PTHrP (białka podobnego do PTH) wpływa na zmianę naturalnego kierunku transportu jonów wapniowych od matki do dziecka na przeciwny. Wzrost zapotrzebowania na wapń zwiększa absorpcje tego jonu z przewodu pokarmowego. Ten wyrównawczy proces wymaga prawidłowego zaopatrzenia w witaminę D, ponadto niezależnie od wpływu innych

czynników prawidłowe stężenie witaminy D zmniejsza ryzyko występowania cukrzycy ciężowej oraz rzucawki porodowej [44–46].

**Zaburzenia równowagi wapniowo fosforanowej.** Stężenie  $25(\text{OH})\text{D}$  powinno być oznaczane u pacjentów z pierwotną nadczynnością przytarczyc. Uważa się, że optymalne zbilansowanie metabolizmu witaminy D zmniejsza ryzyko wystąpienia zespołu głodnych kości, obniża poziom parathormonu i zmniejsza resorpcję kości. Wskazaniem do pomiaru stężenia  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  (kalcytriolu) jest głównie diagnostyka różnicowa hiperkalcemii ze względu na zdolność niektórych ziarniaków do  $1\alpha$ -hydroksylacji witaminy D.

**Niewydolność nerek.** Niewydolność nerek prowadzi do obniżenia stężenia  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  na skutek zmniejszonej  $1\alpha$ -hydroksylacji. Uzasadnionym, ale kosztownym badaniem jest analiza stopnia zaburzeń hydroksylacji witaminy D w przewlekłej chorobie nerek.

**Krzywice.** Określenie statusu witaminy D jest przydatne w diagnostyce różnicowej krzywicy (niedobór witaminy D, oporność receptora na witaminę D, krzywice hipofosfatemiczne w przebiegu nadmiernej sekrecji fosfatonin).

**Monitorowanie suplementacji witaminy D, szczególnie przy stosowaniu witaminy D<sub>2</sub>.** Niższe powinowactwo do białek nośnikowych (VDBP) i wynikający z tego faktu krótszy okres półtrwania sugerują niższą w porównaniu z  $25(\text{OH})\text{D}_3$  aktywność biologiczną tej izoformy. Monitorowanie suplementacji może okazać się kluczowe u pacjentów z zaburzeniami wchłaniania jelitowego, ciężką niewydolnością nerek lub narażonych na zwiększone ryzyko niedoboru witaminy D (np. u bardzo młodych lub starszych osób).

**Inne choroby.** Niskie stężenie witaminy  $25(\text{OH})\text{D}$  może być związane z występowaniem chorób sercowo-naczyniowych, nadciśnieniem tętniczym, zespołem metabolicznym, wysokim stężeniem cukru we krwi i innymi chorobami przewlekłymi. Optymalne stężenie witaminy D poprawia rokowania u chorych w stanie krytycznym. Postulowany wpływ witaminy D na poprawę odporności immunologicznej oraz zmniejszenie ryzyka rozwoju chorób nowotworowych opiera się na badaniach statystycznych. Brak jest uzasadnienia dla oznaczania witaminy D w celu określenia ryzyka występowania jakichkolwiek nowotworów.

### **Przegląd metod stosowanych do oznaczania stężenia metabolitów witaminy D**

Spośród wielu metod stosowanych do oznaczania metabolitów witaminy D w osoczu lub surowicy najbardziej rozpowszechnione są metody immuno-

chemiczne. Jednak ze względu na niesatysfakcjonujące wyniki kontroli jakości dla oznaczeń immunochemicznych uzyskiwane w międzynarodowych programach kontroli międzylaboratoryjnej coraz częściej do rutynowej diagnostyki laboratoryjnej są wprowadzane nowe metody, takie jak wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC), chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS) oraz chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (LC-MS/MS) [47–55].

## Metody immunochemiczne

**Pomiar stężenia 25(OH)D.** Do pomiarów stosuje się różne warianty testów immunochemicznych: testy bezpośrednie oraz testy ze wstępną ekstrakcją. We wszystkich z nich napotyka się trudności metodyczne. Po pierwsze używane w testach przeciwciała wykazują różne powinowactwo do dwu różniących się budową chemiczną form 25-monohydroksy witaminy D: 25(OH)D<sub>3</sub> oraz 25(OH)D<sub>2</sub> (ryc. 1, tab. III). W konsekwencji wynik oznaczenia całkowitego stężenia 25(OH)D pacjenta jest uzależniony od stosunku ilościowego 25(OH)D<sub>3</sub> do 25(OH)D<sub>2</sub> oraz rodzaju przeciwciała użytego do konstrukcji testu [49–51]. W niektórych testach zamiast przeciwciała stosuje się VDBP, które również z różnym powinowactwem rozpoznaje metabolity witaminy D [56]. Przedstawione powyżej fakty powodują, że napotyka się duże trudności z porównaniem wyników uzyskiwanych za pomocą różnych testów immunochemicznych. Dotyczy to przede wszystkim wyników pomiarów całkowitego stężenia 25(OH)D u osób przyjmujących suplementację witaminą D<sub>2</sub> lub D<sub>3</sub> oraz będących na diecie zawierającej relatywnie wysokie stężenia witaminy D<sub>2</sub> (np. dieta wegetariańska).

Kolejnym problemem jest zdolność przeciwciał stosowanych w testach immunochemicznych do rozpoznania izoform epimeru C-3 witaminy 25(OH)D. Ma to małe znaczenie dla populacji osób dorosłych, w której epimery C-3 występują w niskich stężeniach. Zgodnie z badaniami Lensmeyera i wsp. [57] stężenia 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> w 92% próbek surowicy osób dorosłych testowanych metodą LC-MS/MS było równe lub niższe od 3,0 ng/ml, jakkolwiek w niektórych próbkach udział tej izoformy stanowił do 25% całkowitego stężenia 25(OH)D. U osób dorosłych stężenie 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> nie koreluje z wiekiem [58], a wyższe stężenia epimeru są najczęściej obserwowane przy wzrastającym stężeniu 25(OH)D<sub>3</sub> [57]. Epimeryzacja przy węglu C-3 może jednak stanowić istotny problem diagnostyczny podczas pomiarów stężenia 25(OH)D u niemowląt oraz matek w trzecim trymestrze ciąży [58, 59]. Stężenie 3-epi-25(OH)D u niemowląt

mierzone metodą LC-MS/MS waha się od 5 ng/ml do 93 ng/ml i stanowi 8,7–61,1% całkowitego stężenia 25(OH)D [59].

Oddzielnym problemem są stosowane w testach immunochemicznych odczynniki do blokowania reakcji krzyżowych z hormonami steroidowymi. Przy oznaczeniach immunochemicznych trudno również uniknąć reakcji krzyżowych ze związkami strukturalnie podobnymi do 25(OH)D, takimi jak witamina D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>2</sub>, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 24,25(OH)<sub>2</sub>D oraz ich epimery C-3 i laktony, które mogą u niektórych pacjentów prowadzić do wyników fałszywych. Przedstawione powyżej problemy wskazują na to, jak trudno jest wiarygodnie oznaczyć witaminę 25(OH)D metodami immunochemicznymi oraz precyzyjnie ustalić granice jej deficytu.

W konsekwencji znaczące dysproporcje w wynikach stężeń 25(OH)D uzyskanych różnymi testami immunochemicznymi mogą mieć wpływ na podejmowanie odmiennych decyzji dotyczących leczenia danego pacjenta [52, 53]. Przykładowo z grupy 492 pacjentów, których stężenie 25(OH)D zmierzono testem firmy Diasorin Liaison, 52% zakwalifikowano jako pacjentów z deficytem witaminy D, podczas gdy test RIA firmy IDS wykazywał deficyt witaminy D jedynie u 36% tych osób [52]. Znaczne różnice w wynikach 25(OH)D w tych samych próbkach badanych z użyciem testów immunochemicznych pochodzących od różnych producentów zaobserwowano też w międzynarodowych programach kontroli jakości [51, 55, 56]. Wyniki programu dotyczącego wiarygodności metod stosowanych do oznaczeń 25(OH)D prowadzonego w Europie od ponad 20 lat przez dr. Cartera (DEQAS, *Vitamin D External Quality Assessment Scheme*) wykazują, że jakość metod immunochemicznych ulega stałej poprawie. W ostatnich 10 latach odchylenie standardowe od wartości średniej dla wszystkich wyników uzyskanych metodami immunochemicznymi przez laboratoria biorące udział w programie zmalało z 35% do 20% [51, 54, 56]. Zawsze jednak wyniki stężeń 25(OH)D należy interpretować w powiązaniu z innymi wynikami laboratoryjnymi (stężeniem wapnia zjonizowanego, wydalaniem wapnia, stężeniem fosforanów i PTH) oraz stanem klinicznym pacjenta.

**Pomiar stężenia 1,25(OH)<sub>2</sub>D.** Stężenie 1,25(OH)<sub>2</sub>D we krwi jest około trzy rzędy wielkości niższe w porównaniu z 25(OH)<sub>2</sub>D, co stanowi utrudnienie w procedurach pomiarowych. Jednak w niektórych przypadkach klinicznych pomiar stężenia tego aktywnego metabolitu witaminy D może być użyteczny. Znacznym utrudnieniem jest brak testów przeznaczonych do automatycznych analizatorów. Pracochłonne zestawy manualne bazują na wstępnej izolacji 1,25(OH)<sub>2</sub>D z su-

**Tabela III.** Reakcje krzyżowe (%) metabolitów witaminy D<sub>2</sub> i D<sub>3</sub> w testach immunochemicznych używanych do diagnostycznych pomiarów stężenia 25(OH)D. Nie uwzględniono reakcji krzyżowych dla 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>2</sub> i 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, ponieważ ich stężenie jest nieistotne w stosunku do innych metabolitów witaminy D

**Table III.** Cross-reactions (%) of vitamin D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub> metabolites in diagnostic immunoassays used for 25(OH)D measurement. Data from manufacturer's instructions. The cross-reactions with 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>2</sub> and 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> were not considered, because of their irrelevant concentration compared to other vitamin D metabolites

Producent (analityzator)	Roche Diagnostics (Elecys, Cobas)	Roche Diagnostics (Elecys, Cobas)	IDS (iSYS)	DiaSorin (Liaison)	Siemens (Advia, Centaur)	Abbott (Architect)	DiaSource	DiaSource	DiaSource	Immunodiagnostic	Immunodiagnostic
Nazwa testu	Vitamin D Total	Vitamin D <sub>3</sub> (25-OH)	25-OH Vitamin D	25-OH-vit D Total	Vitamin D Total	25-OH Vitamin D	250H-vit D Total ELISA	250H-vit D Total RIA-CT	250H-vit D <sub>3</sub> RIA-CT	25-OH Vitamin D direct ELISA	25-OH Vitamin D EIA
25(OH)D <sub>3</sub>	98	100	100	100	97,4	105	100	100	100	100	100
25(OH)D <sub>2</sub>	81	< 10	75	100	106,2		83	95	< 0,3	67,8	100
C3-epi-25(OH)D <sub>3</sub>	93			0	1	2,7	< 0,2				
24,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	121	< 20	> 100			112	> 100	> 100	< 0,8	> 100	100
25,26(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>							> 100				
D <sub>3</sub>	5	< 1	< 0,01	1,1%	0,3	0,3	< 0,2	< 0,3	< 0,03		< 1
D <sub>2</sub>	6	< 1	< 0,03	1,4%	0,5	0,1	< 0,2	< 0,3	< 0,03	0,3	< 1

rowicy na kolumnach powinowactwa z selektywnymi, monoklonalnymi przeciwciałami i następnie pomiarze stężenia 1,25(OH)<sub>2</sub>D w wyluowanym materiale za pomocą testów immunochemicznych. Przeciwciała używane w tych testach w różnym stopniu rozpoznają izoformy 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>2</sub> i 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> oraz mogą reagować krzyżowo z innymi metabolitami witaminy D co wpływa na końcowy wynik pomiaru podobnie jak ma to miejsce przy opisywanych wcześniej pomiarach stężenia 25(OH)D.

## LC-MS/MS

Ze względu na wysoki stopień komplikacji aparatury i wymagany od personelu wyższy poziom kompetencji technicznej, LC-MS/MS był dotychczas traktowany w laboratoriach diagnostycznych głównie jako metoda referencyjna. Znaczący postęp w automatyzacji pracy oraz coraz szersze stosowanie tej techniki w innych dziedzinach analityki, zwiększyły dostępność wykwalifikowanego personelu, co wpłynęło na wzrost zainteresowania LC-MS/MS jako alternatywy dla me-

tod immunochemicznych w rutynowej diagnostyce medycznej [38, 48, 50, 53, 57–62].

**Opis metody.** Podobnie jak dla innych metod specyficzność metody LC-MS/MS opiera się na różnicy mas cząsteczkowych analitu i matrycy. Dodatkowo próbki poddawane są rozdzielaniu chromatograficznemu przed analizą MS. W celu zapewnienia najlepszej możliwej precyzji używa się standardów wewnętrznych znakowanych stabilnymi izotopami. W rutynowych oznaczeniach ilościowych najczęściej używanym zestawem są chromatografy cieczone (HPLC lub UPLC) sprzężone ze spektrometrem mas typu potrójnego kwadrupola [62].

Bardzo ważny dla czułości metody analitycznej jest wybór właściwej metody jonizacji. Spektrometry mas analizują jony w wysokiej próżni stąd krytyczne znaczenie ma proces odparowania faz ruchomych i jonizacji analitu. W technice LC-MS/MS używane są trzy główne tryby jonizacji. Najbardziej popularny jest tryb elektrorozpraszania (ESI, *electrospray ionization*). Wśród jego zalet można wymienić łatwość obsługi, szeroki zakres dynamiczny metody (do czterech rzędów

wielkości) oraz możliwość jonizacji analitów o dużych masach cząsteczkowych (białka i peptydy). Analizując substancje niepolarne, takie jak na przykład witamina D, lepsze efekty uzyskuje się, stosując tryby jonizacji chemicznej lub fotojonizacji (APCI, *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, APPI, *Atmospheric Pressure Photo Ionization*). Ze względu na to, że jonizacja w tych dwóch trybach odbywa się w fazie gazowej ogranicza to stosowanie tych metod do relatywnie małych cząsteczek (< 1 kDa).

Najczęściej stosowany w analizie ilościowej jest tryb monitorowania wybranych reakcji (MRM, *Multi Reaction Monitoring*). W tym trybie przez zadany czas (rzędu kilkunastu milisekund) pierwszy kwadrupol przepuszcza tylko jony o stosunku ładunku do masy odpowiadającym analizowanej substancji (jony macierzyste). W komorze kolizyjnej (historycznie drugi kwadrupol — aktualnie częściej wykorzystywane są układy innego typu) w wyniku zderzeń z gazem obojętnym (argon) jony macierzyste ulegają kontrolowanej fragmentacji. Ostatni kwadrupol przepuszcza tylko jony fragmentacyjne (potomne) charakterystyczne dla analizowanego analitu. Monitorowanie dwóch par jon macierzysty–jon potomny (nazywanych transmisjami) jest uważane za wystarczającą weryfikację tożsamości analitu w oznaczeniach ilościowych. Tryb MRM charakteryzuje się bardzo wysoką czułością i powtarzalnością, pozwalając jednocześnie na osiągnięcie lepszej specyficzności niż detektory spektrofotometryczne i fluorometryczne.

**Oznaczenie stężenia 25(OH)D.** Oznaczenie witaminy D we krwi za pomocą LC-MS/MS pozwala nie tylko na specyficzne oznaczenie 25(OH)D, ale również na identyfikację mniej aktywnych biologicznie metabolitów jak 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> i wyznaczenie stosunków ilościowych pomiędzy różnymi metabolitami w pojedynczej analizie. Dzięki wysokiej specyficzności możliwe jest uniknięcie problemów związanych z reakcjami krzyżowymi przeciwiał używanymi w metodach immunochemicznych. Stosowanie standardów znakowanych stabilnymi izotopami pozwala na uniknięcie błędów wynikających z nierównego odzysku analitu i standardu charakterystycznych dla klasycznych metod HPLC [60–62].

**Oznaczenie stężenia innych metabolitów witaminy D.** Mimo że technika LC-MS/MS pozwala na uzyskanie wystarczającej czułości wymaganej do oznaczania 1,25(OH)<sub>2</sub>D, takie oznaczenia nie są jeszcze rutynowo wykonywane. Ostatnio opracowano metodę oznaczania 1,25(OH)<sub>2</sub>D techniką LC-MS/MS po uprzedniej wstępnej izolacji tego metabolitu z surowicy na kolumnach powinowactwa z selektywnymi przeciwiałami [38, 63]. Podejmowane są prace nad oznaczaniem witaminy D<sub>2</sub> i D<sub>3</sub> w tkankach, w szczegól-

ności w tkance tłuszczowej, jednak nie są to rutynowe badania diagnostyczne.

## HPLC i GC-MS

Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) oraz chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS) są technikami często używanymi do oznaczeń stężenia metabolitów witaminy D w wielu materiałach, ale raczej w projektach naukowych niż w rutynowej diagnostyce medycznej. Wysokosprawna chromatografia cieczowa zwykle wymaga czasochłonnej, wstępnej izolacji witaminy D poprzez ekstrakcję rozpuszczalnikami organicznymi oraz dalszego oczyszczenia z zastosowaniem ekstrakcji z fazy stałej (SPE, *solid phase extraction*). W ostatnich latach wiele wysiłku włożono w automatyzację wstępnych procesów oczyszczania witaminy D i zmniejszenie pracochłonności tych etapów [64], jednak trzeba pamiętać, że mogą one wpływać na uzyskanie fałszywych wyników ze względu na różny odzysk poszczególnych izoform witaminy D i używanych wzorców [62]. Aby prawidłowo określić stężenie metabolitów witaminy D techniką HPLC, konieczny jest ich rozdział na kolumnach chromatograficznych od innych strukturalnie podobnych związków. Nie zawsze jest to możliwe, szczególnie w przypadku rozdzielania  $\alpha$  i  $\beta$  epimerów C-3 [65, 66].

Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas jest bardzo czułą techniką, wymaga jednak dodatkowego etapu w celu przekształcenia metabolitów witaminy D w lotne pochodne. Na tym etapie są stosowane szkodliwe odczynniki, a zależna od struktury chemicznej związku reakcja nie zawsze zachodzi z tą samą wydajnością dla wszystkich badanych metabolitów witaminy D [67]. Podstawowym problemem, nie do końca rozwiązany w przypadku stosowania obu technik HPLC i GC-MS, jest wiarygodność standaryzacji tych metod.

## Podsumowanie

Całkowite stężenie 25(OH)D jest najczęściej mierzonym i najbardziej użytecznym w praktyce klinicznej parametrem oceny zaopatrzenia w witaminę D. Zawodność obecnie stosowanych do pomiarów stężeń 25(OH)D metod immunochemicznych spowodowała, że metoda LC-MS/MS coraz częściej znajduje zastosowanie do pomiarów metabolitów witaminy D w rutynowej diagnostyce medycznej. Powszechne stosowanie międzynarodowych programów kontroli jakości i wewnętrznych systemów zapewnienia jakości wpłynęły na polepszenie wiarygodności otrzymywanych wyników stężeń metabolitów witaminy D, ale ważne jest, aby pracownicy laboratoriów i środowisko medyczne zdawało sobie sprawę z ograniczeń stosowanych metod.



## Piśmiennictwo

- Holick MF. Vitamin D: evolutionary, physiological and health perspectives. *Curr Drug Targets* 2011; 12: 4–18.
- Adams JS, Hewison M. Update in vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 471–478.
- Rosner CJ. Vitamin D insufficiency. *N Engl J Med* 2011; 364: 248–254.
- Hanley DA, Cranney A, Jones G i wsp. Vitamin in adult health and disease: a review and guideline statement from osteoporosis Canada. *CMAJ* 2010; 182: E610–E618.
- Hollis BW. Assessment of circulating 25(OH)D and 1,25(OH)2D: emergence as clinically important diagnostic tools. *Nutr Rev* 2007; 65: S87–S90.
- Hollis BW. Assessment of vitamin D status and definition of normal circulating range of 25-hydroxyvitamin D. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2008; 15: 489–494.
- Holick MF. Vitamin D: a D-lightful health perspective. *Nutr Rev* 2008; 66: S182–S194.
- Grant WB. The health benefits of solar irradiance and vitamin D and the consequences of their deprivation. In: Holick MF (ed.). *Vitamin D — Physiology, Molecular Biology and Clinical Applications*. Springer, New Jersey 2010; 745–764.
- Office of Dietary Supplements, NIH. Dietary Supplement Fact Sheet: Vitamin D. 2008; <http://ods.od.nih.gov/factsheets/vitaminD-Health-Professional/>
- Matilla PH, Piironen VI, Uusi-Rauva EJ i wsp. Vitamin D Contents in edible mushrooms. *J Agric Food Chem* 1994; 42: 2449–2453.
- Holick MF. Vitamin D and health: evolution, biological functions, and recommended dietary intakes for vitamin D. W: MF Holick (red.). *Nutrition and Health: Vitamin D*. Springer Science+Business Media 2010: 3–34.
- Vieth R. The pharmacology of vitamin D, including fortification strategies. W: Feldman F, Glorieux (red.). *Vitamin D, Second Edition*. Elsevier, San Diego 2005; 995–1015.
- Prosser DE, Jones G. Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. *Trends Biochem Sci* 2004; 29: 664–673.
- St-Arnaud R, Glorieux FH. 24,25-dihydroxyvitamin D — active metabolite or inactive catabolite? *Endocrinology* 1988; 139: 3371–3374.
- Dean DD, Boyan BD, Schwart Z i wsp. Effect of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and 24R,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on metalloproteinase activity and cell maturation in growth plate cartilage in vivo. *Endocrine* 2001; 14: 311–323.
- Higashi T, Ogasawara A, Shimada K. Investigation of C-3 epimerization mechanism of 24,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in rat using liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal Sci* 2000; 16: 477–482.
- Masuda S, Kamao M, Schroeder NJ i wsp. Characterization of 3-epi-1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> involved in 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> pathway in cultured cell lines. *Biol Pharm Bull* 2000; 23: 133–139.
- Kamao M, Tatematsu S, Hatakeyama S i wsp. C-3 epimerization of vitamin D<sub>3</sub> metabolites and further metabolism of C-3 epimers. *J Biol Chem* 2004; 279: 15897–15907.
- Eguchi T, Takatsuto S, Ishiguro M i wsp. Synthesis and determination of configuration of natural 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 26,23-lactone. *Proc Natl Acad Sci* 1981; 78: 6579–6583.
- Tanaka Y, Wichmann JK, Paaren HE, Schnoes HK, DeLuca HF. Role of kidney tissue in the production of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-26,23-lactone and 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-26,23-lactone. *Proc Natl Acad Sci* 1980; 77: 6411–6414.
- Inaba Y, Yamamoto K, Yoshimoto N i wsp. Vitamin D<sub>3</sub> derivatives with adamantane or lactone ring side chains are cell type-selective vitamin D receptor modulators. *Mol Pharmacol* 2007; 71: 1298–12311.
- Wielders JPM, Wijnberg FA. Preanalytical stability of 25(OH) — vitamin D<sub>3</sub> in human blood or serum at room temperature: solid as a rock. *Clin Chem* 2009; 55: 1584–1585.
- Antonucci DM, Black DM, Sellmeyer DE. Serum 25-hydroxyvitamin D is unaffected by multiple freeze-thaw cycles. *Clin Chem* 2005; 51: 258–260.
- Zerwekh JE. The measurement of vitamin D analytical aspects. *Ann Clin Biochem* 2004; 42: 272–281.
- Hollis BW. Measuring 25-hydroxyvitamin D in a clinical environment: challenges and needs. *Am J Clin Nutr* 2008; 88 (supl.): 507–510S.
- Thacher TD, Clarke BL. Vitamin D insufficiency. *Mayo Clin Proc* 2011; 86: 50–60.
- Plum LA, DeLuca HF. Vitamin D, disease and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9: 941–955.
- Kuryłowicz A, Bednarczuk T, Nauman J. Wpływ niedoboru witaminy D na rozwój nowotworów i chorób autoimmunologicznych. *Endokrynol Pol* 2007; 58: 140–152.
- Zeeb H, Greiner R. The role of vitamin D in cancer prevention. *Dtsch Arztebl Int* 2010; 107: 638–643.
- van Etten E, Steffen K, Gysemans C i wsp. Regulation of vitamin D homeostasis: implications for the immune system. *Nutr Rev* 2008; 66: S125–S134.
- Hawison M. Vitamin D and the immune system: new perspectives on an old theme. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2010; 39: 365–379.
- Soubrierbielle J-C, Body J-J, Lappe JM i wsp. Vitamin D and musculoskeletal health, cardiovascular disease, autoimmunity and cancer: recommendation for clinical use. *Autoimmun Rev* 2010; 8: 709–715.
- Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA i wsp. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: 1911–1930.
- Marcinkowska-Suchowierska E, Walicka M, Talataj M i wsp. Vitamin D supplementation in adults — guidelines. *Endokrynol Pol* 2010; 61: 723–729.
- Holick MF. Environmental factors that influence the cutaneous production of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 1995; 61: 638S–645S.
- Tsaras WG, Weinstock MA. Factors influencing vitamin D status. *Acta Derm Venereol* 2011; 91: 115–124.
- Wootton A. Improving the measurement of 25-hydroxyvitamin D. *Clin Biochem Rev* 2005; 26: 33–36.
- Blum M, Dolnikowski G, Seyoum E i wsp. Vitamin D<sub>3</sub> in fat tissue. *Endocrine* 2008; 33: 90–94.
- Lin E, Armstrong-Moore D, Liang Z i wsp. Contribution of adipose tissue to plasma 25-hydroxyvitamin D concentrations during weight loss following gastric bypass surgery. *Obesity* 2011; 19: 588–594.
- Jones G. Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. *Am J Clin Nutr* 2008; 88: 582S–596S.
- Vannell J, Hollis BW. Use of vitamin D in clinical practice. *Altern Med Rev* 2008; 13: 6–20.
- Krasowski MD. Pathology consultation on vitamin D testing. *Am J Clin Pathol* 2011; 136: 507–514.
- Yetley EA, Pfeiffer CM, Chleicher RL i wsp. NHANES monitoring of serum 25-hydroxyvitamin D: a roundtable summary. *J Nutr* 2010; 2030S–2045S.
- Hollis BW, Wagner CL. Nutritional vitamin D status during pregnancy: reason for concern. *CMAJ* 2006; 174: 1287–1290.
- Barrett H, McElduff A. Vitamin D and pregnancy: an old problem revisited. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2010; 24: 527–539.
- Grayson R, Hewison M. Vitamin D and human pregnancy. *Fetal Matern Med Rev* 2011; 22: 67–90.
- Carter GD. 25-hydroxyvitamin D assays: The quest for accuracy. *Clin Chem* 2009; 55: 1300–1302.
- El-Khoury JM, Reineks EZ, Wang S. Progress of liquid chromatography-mass spectrometry in measurement of vitamin D metabolites and analogues. *Clin Biochem* 2011; 44: 66–76.
- Castro MDL, Fernandez-Romero JM, Ortiz-Boyer F i wsp. Determination of vitamin D<sub>3</sub> metabolites: state-of-the-art and trends. *J Pharm Biomed Anal* 1999; 20: 1–17.
- Wallace AM, Gibson S, Hunty A i wsp. Measurement of 25-hydroxyvitamin D in the clinical laboratory: current procedures, performance characteristics and limitations. *Steroids* 2010; 75: 477–488.
- Carter GD, Carter CR, Gunter E i wsp. Measurement of vitamin D metabolites an international perspective on methodology and clinical interpretation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004; 467–471.
- Barake M, Dauer RI, Salti I i wsp. 25-hydroxyvitamin D assay variation and impact on clinical decision making. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97: 835–843.
- Farrell CJ, Martin S, McWhinney B i wsp. State-of-the-art vitamin D assays: a comparison of automated immunoassays with liquid chromatography — tandem mass spectrometry methods. *Clin Chem* 2012; 58: 531–542.
- Carter GD. 25-hydroxyvitamin D: a difficult analyte. *Clin Chem* 2012; 58: 486–488.
- Singh RJ. Are clinical laboratories prepared for accurate testing of 25-hydroxy vitamin D? *Clin Chem* 2008; 54: 221–223.
- Carter GD. Accuracy of 25-hydroxyvitamin D assays: confronting the issues. *Curr Drug Targets* 2012; 12: 19–28.
- Lensmeyer G, Poquette M, Wiebe D i wsp. The C-3 epimer of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> is present in adult serum. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97: 163–168.
- Strathmann FG, Sadikova K, Laha TJ i wsp. 3-epi-25 hydroxyvitamin D concentrations are not correlated with age in a cohort of infants and adults. *Clin Chim Acta* 2012; 413: 203–208.
- Singh JR, Taylor LR, Reddy S i wsp. C-3 epimers can account for a significant proportion of total circulating 25-hydroxyvitamin D in infants, complicating accurate measurement and interpretation of vitamin D status. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 3055–3061.
- Jiwan J-LH, Wallemacq, Herent M-F. HPLC-high resolution mass spectrometry in clinical laboratory? *Clin Biochem* 2011; 44: 136–147.
- Adamec J, Jannasch A, Huang J i wsp. Development and optimization of an LC-MS/MS-based method for simultaneous quantification of vitamin D<sub>2</sub>, vitamin D<sub>3</sub>, 25-hydroxyvitamin D<sub>2</sub> and 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *J Sep Sci* 2011; 34: 11–20.
- Ding S, Schoenmakers J, Jones K i wsp. Quantitative determination of vitamin D metabolites in plasma using UHPLC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem* 2010; 398: 779–789.
- Pramyothin P, Biancuzzo RM, Lu Z i wsp. Vitamin D in adipose tissue and serum 25-Hydroxyvitamin D after Roux-en-Y gastric bypass. *Obesity* 2011; 19: 2228–2234.
- Brunetto MR, Obando MA, Gallignani M i wsp. HPLC determination of Vitamin D<sub>3</sub> and its metabolite in human plasma with on-line sample cleanup. 2004; *Talanta* 64: 1364–1370.
- Hymoller L, Jensen SK. Vitamin D analysis in plasma by high performance liquid chromatography (HPLC) with C(30) reversed phase column and UV detection-easy and acetonitrile-free. *J Chromatog* 2011; 1218: 1835–1841.
- Jakobsen J, Bysted A, Andersen R i wsp. Vitamin D status assessed by a validated HPLC method: within and between variation in subjects supplemented with vitamin D<sub>3</sub>. *Scand J Clin Lab Invest* 2009; 69: 190–197.
- Coldwell RD, Porteous CE, Trafford DJ, Malkin HL. Gas chromatography-mass spectrometry and the measurement of vitamin D metabolites in human serum or plasma. *Steroids* 1987; 49: 155–196.