

Современные тенденции в аналитическом определении витамина D

С. В. Хабаров, д.м.н., проф. кафедры акушерства и гинекологии¹, доцент кафедры клинической лабораторной диагностики и патологической анатомии², гл. врач³, заслуженный врач России
Н. А. Вислоцкий, аспирант кафедры акушерства и гинекологии¹
О. В. Денисова, к.м.н., доцент кафедры клинической лабораторной диагностики и патологической анатомии², гл. врач⁴
Д. Г. Навасардянц, к.б.н., зав. клинко-диагностической лабораторией⁴

¹Медицинский институт ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет», г. Тула

²Академия постдипломного образования ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий» ФМБА России, г. Москва

³ООО «ВИТРОМЕД», г. Москва

⁴ООО «ДиаЛаб+», г. Москва

Current trends in analytical determination of vitamin D

S. V. Khabarov, N. A. Vislotskiy, O. V. Denisova, D. G. Navasardiyants

Tula State University, Tula; Federal Scientific and Clinical Centre for Specialized Medical Care and Medical Technologies, Moscow; VITROMED Co., Moscow; DiaLab+ Co., Moscow; Russia

Резюме

Измерение содержания витамина D значительно возросло за последние годы. В большинстве исследований основное внимание уделялось 25(OH)D, который считается лучшим индикатором состояния витамина D, тогда как в настоящее время возник большой интерес к комбинированному измерению нескольких клинически значимых метаболитов этого витамина с помощью методики LC–MS/MS, позволяющей одновременно определять различные метаболиты витамина D в широком динамическом диапазоне. Многопанельные анализы LC–MS/MS, вероятно, улучшат будущие исследования относительно оптимальной комбинации метаболитов для оценки достаточности витамина D, а также помогут лучше понять его метаболизм в норме и при патологических изменениях в организме человека. В обзоре рассматриваются современные тенденции в аналитическом определении статуса витамина D и их применение в клинических исследованиях.

Ключевые слова: витамин D, витамин-D-статус, метаболизм, 25-гидроксивитамин D, метаболиты витамина D, иммуноферментный анализ, ИФА, высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрия, ВЭЖХ–МС/МС, стандартизация.

Summary

Measurement of vitamin D has increased significantly in recent years. Most studies focused on 25(OH)D, which is considered the best indicator of vitamin D status, while there is now more interest in the combined measurement of several clinically significant vitamin D metabolites using the LC–MS/MS technique, which allows simultaneous determination of various vitamin D metabolites over a wide dynamic range. Multi-panel LC–MS/MS analyses are likely to improve future research on the optimal combination of metabolites to assess vitamin D sufficiency, as well as help us better understand its metabolism in normal and pathological changes in the human body. The review examines current trends in analytical determination of vitamin D status and their application in clinical studies.

Key words: vitamin D, vitamin D status, metabolism, 25-hydroxyvitamin D, vitamin D metabolites, enzyme immunoassay analysis, EIA, liquid chromatography, mass spectrometry, LC–MS/MS, standardization.

В последние годы резко возросло число запросов на определение 25-гидроксивитамина D, который считается лучшим индикатором состояния витамина D, и на комбинированное измерение нескольких клинически значимых его метаболитов [1].

Термин «витамин D» в определенной степени условен. В настоящее время он объединяет более шести сходных по химическому строению биологически активных веществ (секостероидов), оказывающих влияние на 172 основных физиологических показателя здоровья человека, связанных с риском развития различных заболеваний [2, 3, 4]. Выделяют «классические» эффекты витамина D, связанные с его влиянием на кальцие-

во-фосфорный обмен и минеральную плотность костной ткани, и «неклассические» биологические эффекты. К «неклассическим» (внекостным) эффектам витамина относят торможение клеточной пролиферации и ангиогенеза, стимуляцию продукции инсулина и кателицидинов (противомикробных пептидов), ингибирование продукции ренина, противовоспалительное, иммуномодулирующее, антибактериальное, противоопухолевое и ряд других свойств [2, 5, 6, 7, 8].

Наиболее распространенными, изученными и клинически значимыми формами витамина D являются:

- витамин D₂ – эргокальциферол, образующийся из эргостерола под действием солнечного све-

та в растениях и поступающий в организм человека только с витаминными добавками, а также в очень малых количествах с пищей (хлебобулочные изделия, грибы, сыры с плесенью и продукты растительного происхождения);

- витамин D₃ – холекальциферол, на 90 % синтезирующийся в кератиноцитах кожи человека под действием ультрафиолетовых лучей длиной 290–315 нм из 7-дегидрохолестерола в ходе неферментативной реакции фотолиза через промежуточный изомер пре-витамин D₃, а также в незначительных количествах поступающий в организм с продуктами животного происхождения (жирная рыба [ло-

сось, тунец, скумбрия, сельдь], печень тресковых рыб [треска, пикша, минтай, путассу], говяжья печень, яичный желток); именно его рассматривают как «истинный» витамин D [6, 9, 10, 11].

Витамин D традиционно относят к группе жирорастворимых витаминов. Однако, в отличие от всех других витаминов, витамин D не является собственно витамином в классическом смысле этого термина: он биологически неактивен и только после двух реакций гидроксирования в организме превращается из холестерина в биологически активную гормональную форму; не является кофактором ни одного из известных энзимов; его биологическое действие проявляется вдали от места своего непосредственного синтеза [2, 5].

И поступивший с пищей, и кутанно синтезированный в организме витамин D (D_3 и D_2), всосавшись в тонком отделе кишечника, поступает в общий кровоток, объединяясь в составе хиломикронов с витамин-D-связывающим белком (*VDBP*), и транспортируется в печень, где под действием микросомального фермента *CYP2R1* подвергается первому гидроксированию по 25 атому углерода, образуя транспортную, функционально неактивную форму витамина 25(OH)D (кальцидиол). Транспортная форма 25(OH)D частично поступает в мышечную и жировую ткани, где может создавать депо с длительным сроком существования.

В комплексе с *VDBP* 25(OH)D поступает в кровь и транспортируется в почки, где в ходе второго гидроксирования при участии митохондриального фермента *CYP27B1* метаболизируется до биологически активной формы – 1,25-дигидроксивитамина D – кальцитриола ($1,25(OH)_2D_3$), либо до биологически неактивной формы – 24,25-дигидроксивитамина D ($24,25(OH)_2D$). Кроме того, все вышеперечисленные метаболиты подвергаются эпимеризации с образованием молекул с одинаковой структурой химических связей, но с различной стереохимической конфигурацией – на углероде 3 (3α и 3β) *C3-epi-25(OH)D*), что приводит к получению продуктов с более низким белково-связывающим средством

и пониженной активностью по сравнению с их неэпимеризованными аналогами [10, 11, 12].

Общий циркулирующий 25(OH)D является суммарным показателем уровня $25(OH)D_3 + 25(OH)D_2$ и отражает количество витамина D, синтезированного в коже под действием УФ-облучения и получаемого с пищей и при приеме нативных препаратов витамина. Период полувыведения циркулирующего 25(OH)D составляет 2–3 недели. Активная форма витамина D – $1,25(OH)_2D_3$ имеет короткий период полужизни (менее 4 часов) и концентрацию в 1000 раз ниже, чем 25(OH)D (нмоль/л против пмоль/л). В процессе биотрансформации витамина D, катализируемой *CYP24A1*, *CYP27A1*, *CYP27B1*, *CYP3A4* и *CYP11A1*, образуется более 50 метаболитов, биологическое значение большинства из которых все еще неясно [7, 13, 14, 15]. Однако на сегодняшний день известно клиническое значение трех соединений витамина D:

- уровень 25(OH)D – оценка обеспеченности витамином D;
- уровень $1,25(OH)_2D$ – состояние биосинтеза витамина D;
- уровень $24,25(OH)_2D$ – биодegradация витамина D [13].

При этом уровень общего 25(OH)D является в медицине наиболее значимым для мониторинга количества витамина D в организме в целом и выявления дефицита всех его форм [2, 9, 16].

Концентрация кальцидиола в крови считается самым лучшим показателем уровня витамина D, чем циркулирующий $1,25(OH)_2D$, поскольку последний жестко регулируется и его уровни строго удерживаются между пределами, даже когда начинают происходить неблагоприятные эффекты. Этот анализ является наиболее точным, поскольку высокая концентрация облегчает его измерение.

При этом эксперты в области витамина D стремятся к еще большему улучшению стандартизации и воспроизводимости анализов в разных лабораториях.

Уровень суммарного содержания 25(OH)D в крови очень variabelен и зависит от многих причин: рациона питания (мясо, морепродукты или растительная пища); присутствия

в рационе пищевых или прямых добавок витамина D; географического проживания обследуемого; времени года (зима – лето); степени естественной инсоляции; цвета кожи; наличия острых или хронических заболеваний (поражение почек, печени, костей [рахит, остеопороз], ЖКТ [включая мальабсорбцию и бариатрические операции], ожирения); расовых, социально-экономических, культурных и религиозных традиций (характера питания и ношения одежды, препятствующей доступу солнечных лучей); приема лекарственных препаратов, замедляющих 25-гидроксирование витаминов группы D в печени (глюкокортикоиды, антиретровирусные, противогрибковые, противоэпилептические препараты, холестирамин, пероральные антикоагулянты). На сегодня недостаточность, а в большей степени дефицит 25(OH)D представляют собой пандемию, затрагивающую преобладающую часть общей популяции, включая детей и подростков, беременных женщин, кормящих матерей, лиц старше 60 лет [16, 17, 18, 19, 20].

Однако эксперты считают широкий популяционный скрининг населения на дефицит витамина D ненужным и рекомендуют проводить скрининг только пациентам, имеющим вышеуказанные факторы риска его развития [21, 22].

Взаимосвязь дефицита витамина D с широчайшим кругом хронических заболеваний – сердечно-сосудистой и цереброваскулярной патологией, артериальной гипертензией, диабетом, ожирением, опухолевыми, инфекционными заболеваниями и др. указывает на необходимость определения уровней различных метаболитов витамина D для расширения диагностических возможностей.

Определение $1,25(OH)_2D$ может быть целесообразным при врожденных или приобретенных нарушениях метаболизма витамина D и фосфатов, например при хронической болезни почек, фосфат-теряющей нефропатии, онкогенной остеопорозии, наследственном псевдовитамин D-зависимом рахите (также известном как витамин D-зависимый рахит типа 1), хронических гранулематозных заболеваниях и некоторых лимфомах, когда

может иметь место дефицит или, наоборот, избыток активности фермента 1 α -гидроксилазы как почечного, так и внепочечного происхождения [10].

Доказана значимость 24,25(OH)₂D в диагностике редкого генетического расстройства – идиопатической детской гиперкальциемии, обусловленного инактивирующей мутацией *CYP24A1*.

В настоящее время существуют различные методы для определения содержания витамина D [2, 8, 23]:

1. непрямые (иммунохимические) методы, использующие измерение определенного параметра соответствующей тест-системы в результате связывания лиганда со связывающим агентом, и включающие радиоиммунологический анализ (*Radioimmunoassay, RIA*), иммуноферментный анализ (*Enzyme Immunoassay Analysis, EIA*); иммунохемилюминесцентный анализ на микрочастицах (*Chemiluminescent Immunological Analysis, CLIA*), в том числе методы конкурентного связывания белка (*CPBA, CLPBA*);
2. прямые методы, основанные на непосредственном измерении уровня анализируемого вещества, к которым относятся высокоэффективная жидкостная хроматография (*High Performance Liquid Chromatography, HPLC*) как самостоятельная методика или в сочетании с масс-спектрометрией (*Liquid Chromatographic-Tandem Mass Spectrometric, LC-MS/MS*).

RIA, который в основном использовался клиническими лабораториями в 1980-х и начале 1990-х годов, оставаясь высокочувствительным методом, основанным на реакции «антиген – антитело» с применением антител, меченных радионуклидом и применяемым для определения веществ, содержащихся в исследуемом материале в минорных концентрациях (10⁻¹²–10⁻¹⁵ г/л), в последнее время не столь широко применяется в клинической лабораторной практике, что связано в первую очередь с ограниченным сроком годности радиоактивной метки. *RIA* постепенно уступил место ручным, а затем автоматизированным *EIA*.

В настоящее время в большинстве клинических лабораторий содержа-

ние 25(OH)D в крови определяется иммунохимическими методами *EIA* [24, 25, 26].

Ведущие производители лабораторного оборудования производят реагенты для выполнения данного исследования на автоматических анализаторах, которые в значительной степени заменили ручные анализаторы, что увеличило пропускную способность и уменьшило сложность.

1. *Roche Diagnostics (cobas E 601)* – 27-минутный конкурентный анализ. В качестве связывающего вещества в тест-системе *Elecsys Vitamin D total* используется белок, связывающий витамин D (*VDBP*), который присоединяется к витамину 25(OH)D₂ и витамину 25(OH)D₃. Метод детекции – электрохемилюминесценция. Линейность – 7,5–175,0 нмоль/л; коэффициент вариации (*CV*) – 2,2–6,8%.
2. *Siemens Healthcare Diagnostics (Advia Centaur)* – 18-минутный одностадийный конкурентный иммунохемилюминесцентный анализ на антитела. Между количеством витамина D в образце пациента и количеством относительных световых единиц, зарегистрированных системой, существует обратная зависимость. Линейность – 10,5–375,0 нмоль/л; *CV* – 4,8–11,1%.
3. *Beckman Coulter (Unicel DXI 800)* – 39-минутный двухстадийный конкурентный иммунохемилюминесцентный анализ на антитела. Линейность – 5,0–525,0 нмоль/л; *CV* – 5,6–9,3%.
4. *Abbott Diagnostics (Architect)* – 36-минутный одностадийный конкурентный иммунохемилюминесцентный анализ на антитела. Линейность – 20–400 нмоль/л; *CV* – 2,4–4,6%.
5. *DiaSorin (Liason)* – 35-минутный одностадийный конкурентный иммунохемилюминесцентный анализ на антитела. Линейность – 10–375 нмоль/л; *CV* – 2,9–5,5%.

Автоматизированные методы исследования требуют небольшого объема пробы, благодаря амплифицирующему характеру имеют широкий диапазон измерений, производят оценку за минимально короткий период времени и, как правило, обладают

достаточно высокой точностью, чувствительностью и специфичностью, хотя не всегда удовлетворяют критериям приемлемости.

Правильность определения 25(OH)D методами *EIA* зависит от специфики используемого антитела (насколько хорошо антитела распознают D₂ и D₃), полноты отделения 25(OH)D от *VDBP*, перекрестной реактивности антител с другими циркулирующими в крови метаболитами витамина D.

Кроме того, недоучет наличия примесей, поглощающих в УФ-спектре, 24,25(OH)₂D, диастереоизомеров α -кольца или эпимеров, что характерно для повсеместно используемого *EIA* на витамин D, усложняет точное измерение концентраций его метаболитов и приводит к завышению обеспеченности организма витамином D на 8–16% [10, 13]. Это особенно важно для образцов от детей в возрасте до 1 года, в котором C3-эри-25(OH)D составляет основную долю от общего количества 25(OH)D.

Учитывая эти обстоятельства, использование *EIA* для измерения 25(OH)D не рекомендуется в конкретных группах пациентов, включая пациентов на гемодиализе, с остеопоротической и печеночной недостаточностью, беременных женщин и лиц, получающих добавку D₂, и, с осторожностью, оправданно в неисследованных группах пациентов [27, 28].

Если производителям иммуноанализа удастся усовершенствовать новые поколения автоматизированных иммуноанализов, они могут преодолеть проблемы, с которыми сталкиваются сегодня, и оказаться надежными в диагностике пациентов.

HPLC – современный и высокоточный референсный физико-химический метод, открытый в начале XX века отечественным ботаником-физиологом и биохимиком растений М. С. Цветом, позволяет разделять и идентифицировать компоненты сложных смесей, как жидких, так и газообразных.

Широкое применение и признание с начала 1930-х годов *HPLC* в медицине связано, прежде всего, с ее исключительно универсальными аналитическими возможностями, позволяющими изучать как смеси ионов или молекул, так и смеси различ-

ных ферментов, витаминов, гормонов, лекарственных препаратов и других органических и неорганических соединений.

Данным методом исследуются различные биологические объекты, такие как кровь, ее сыворотка и плазма, моча, слюна, спинномозговая жидкость, желчь, желудочный сок, пот, амниотическая жидкость, грудное молоко, гомогенаты органов и тканей [29].

HPLC обладает высокой эффективностью и селективностью разделения, которое проводится в мягких условиях (низкая температура, инертный растворитель, отсутствие контакта с кислородом), что очень важно при анализе термически и химически биологически активных соединений [30]. В результате различные компоненты соединений становятся разделенными. Каждый из них затем входит в масс-спектрометр для ионизации атомов и молекул и последующего разделения образующихся ионов в электрическом или магнитном поле. Это позволяет выявлять химические компоненты или аналиты в химическом образце, определять количество каждого химического вещества в нем и проводить анализ структуры сложных молекул. В 1978 году было опубликовано первое описание метода *LC-MS/MS* для измерения 25(OH)D, и в настоящее время данный метод рассматривается как «золотой стандарт» для обнаружения и количественного определения 25(OH)D₂ и 25(OH)D₃ и других метаболитов витамина D [11, 23, 31, 32].

Метод *HPLC* с последующей тандемной *MS*, когда используется более одного масс-спектрометра для разделения больших ионов на более мелкие ионы для детального анализа, считается референсным для точной количественной оценки содержания 25(OH)D. *HPLC / LC-MS/MS* обеспечивают сопоставимые результаты уровня 25(OH)D и позволяют одновременно измерять и обе его формы – 25(OH)D₂ и 25(OH)D₃, что особенно важно при лабораторном контроле приема лекарственных препаратов витамина D [26, 30].

Однако применение методов, основанных на *LC-MS/MS*, требует использования дорогостоящего оборудования, а их сложность – высококвалифицированного персонала для эксплуатации и технического обслуживания. Для

уменьшения фонового шума и увеличения чувствительности необходимо наличие стандартов, калибраторов и растворителей особой чистоты; проведение пробоподготовки приводит к увеличению времени выполнения теста [32]. Недостатки современных приборов *LC-MS/MS* могут быть решены более простым в использовании прибором и внедрением полностью автоматизированных систем *LC-MS/MS*.

Методы *LC-MS/MS*, хотя и являются более точными, на сегодняшний день являются привилегией специализированных и исследовательских лабораторий. Большинство лабораторий по-прежнему зависят от ручного и автоматизированного иммуноанализов. Ручные иммуноанализаторы все еще могут быть хорошо приспособлены для измерения 25(OH)D в группах пациентов, где адекватная пробоподготовка решает проблемы специфичности метода. Автоматизированные иммуноанализаторы все еще могут быть пригодны для определения уровня 25(OH)D в больших группах здоровых людей, где примеси и метаболиты менее важны. Однако измерение 25(OH)D в клинических условиях значительно выигрывает от перехода от *EIA* к *LC-MS/MS*.

В целом измерение метаболизма витамина D значительно выиграло от введения *LC-MS/MS* в клинических лабораториях. Это позволило значительно улучшить специфичность и точность, а также дало возможность совместно измерять несколько метаболитов одновременно [12, 30, 34, 35]. Он уже доказал свою большую пользу в диагностике многочисленных состояний, и новые поколения более чувствительных приборов *LC-MS/MS* позволяют дополнительно тщательно изучить на сегодняшний день необъяснимые состояния, связанные с метаболизмом витамина D.

До настоящего времени сохраняется значительная внутри- и межлабораторная вариабельность в результатах определения витамина D (особенно при низких его концентрациях) как между различными методами, так и лабораториями, использующими одинаковые методы, что может привести к неправильной диагностике дефицита/недостаточности витамина D [16, 24, 26, 36].

С 1995 года функционирует международная программа по контролю качества исследований метаболитов витамина D *DEQAS (International External Quality Assessment Scheme for Vitamin D Metabolites)*. В *DEQAS* значения, полученные конкретными лабораториями для рассылаемых ежеквартально образцов сыворотки, сравниваются как со средними значениями для конкретного метода (*Method Mean, MM*) определения витамина D, средними значениями всех методов, используемых лабораториями, участвующими в программе *DEQAS (All-Laboratory Trimmed Mean, ALTM)*, а также универсальным стандартом, разработанным Национальным институтом стандартов и технологий США (*National Institute of Standards and Technology, NIST*). Программа присуждает сертификат качества, если целевая производительность лаборатории соответствовала нахождению 80% всех результатов в диапазоне $\pm 30\%$ от *ALTM*. Однако, несмотря на попытки стандартизировать анализ и свести к минимуму его вариабельность, существующее смещение для измеренных концентраций витамина D часто все еще выше желательного критерия.

Другим путем преодоления вариабельности методов оценки уровня витамина D в крови является применение стандарта, по которому метод может быть валидирован. Так, *NIST* разработан стандарт для определения метаболитов витамина D (*SRM 972a*) и калибровочный раствор для определения 25(OH)D₂ + 25(OH)D₃ (*SRM 2972*).

Поскольку последствия низких концентраций витамина D при несkeletalных заболеваниях все еще частично неизвестны, необходимы международные руководящие рекомендации по установлению значимых диапазонов в любое время года независимо не только от экологических и личных факторов, но и от инструментальной изменчивости. Для преодоления этой проблемы была разработана Всемирная программа стандартизации с использованием международных стандартов калибровки [16, 22]. В 2010 году Управление пищевых добавок (*Office of Dietary Supplements, ODS*) *NIST*, Национальный институт здоровья (*National Institute of Health, NIH*), Центр по контролю и профилактике заболеваний (*Center for Disease*

Control and Prevention, CDC) в Атланте и Справочная лаборатория витамина D Гентского университета объединили экспертные знания и создали программу стандартизации витамина D (*Vitamin D Standardization Program, VDSP*), которая представляет собой международную совместную работу по стандартизации и сопоставимости по времени, местоположению и лабораторной процедуре измерений статуса витамина D, и координировали ее работу [18, 37].

Оценка статуса витамина D должна проводиться путем определения уровня общего 25(OH)D в сыворотке крови надежным методом. Рекомендуется проверка надежности используемого в клинической практике метода определения 25(OH)D относительно международных стандартов (*DEQAS, NIST*). При определении концентрации 25(OH)D в динамике рекомендуется использование одного и того же метода (*EIA* против *LC-MS/MS*) и одной и той же конкретной лаборатории [24].

В конечном счете измерение метаболитов витамина D является и будет иметь важное значение для диагностики ряда различных состояний. Дальнейшие усилия по стандартизации анализов повысят общее качество методов диагностики и обеспечат клиницистов надежными результатами.

Выводы

Два аналитических метода, наиболее часто используемые для оценки уровня витамина D (*EIA* и *LC-MS/MS*), определяют 25(OH)D, но по разным принципам. Самую большую разницу между результатами методов обуславливают наличие метаболитов, поскольку хроматографические методы могут различать метаболиты витамина D, тогда как методы *EIA* измеряют лишь общий его уровень.

Для большинства целей достаточно рассмотреть состояние витамина D человека путем определения общей концентрации 25(OH)D в сыворотке крови (сумма 25(OH)D₂ и 25(OH)D₃).

Определение уровня витамина D методом *EIA* в настоящее время является скрининговым тестом, а методом *LC-MS/MS* – референсным (экспертным) исследованием в ряде групп па-

циентов, включая беременных женщин, пациентов в ходе интенсивной терапии, пациентов с печеночной недостаточностью, пациентов на гемодиализе и остеопоротических больных, где *EIA* оказались ненадежными. Поэтому у этих пациентов не рекомендуется измерение 25(OH)D с помощью автоматизированного иммуноанализа.

Список литературы

- Rodd C, Sokoro A, Lix LM, et al. Increased rates of 25-hydroxy vitamin D testing: Dissecting a modern epidemic. *Clin Biochem*. 2018; 59: 56–61. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2018.07.005.
- Витамин D и репродуктивное здоровье женщины. Под ред. И.Е. Зазерской. СПб: Эко-Вектор. 2017; 151 с.
- Громова О. А., Торшин И. Ю. Микронутриенты и репродуктивное здоровье: руководство. М: ГЭОТАР-Медиа, 2019; 672 с.
- Dahl SR, Thorsby PM. Hvordan måle vitamin D-status? *Tidsskr Nor Lægeforen*. 2014; 134: 729–31. DOI: 10.4045/tidsskr.13.0981.
- Шварц Г. Я. Ренессанс витамина D: Молекулярно-биологические, физиологические и фармакологические аспекты. Медицинский совет. 2015; 18: 102–10.
- Доброхотова Ю. Э., Боровкова Е. И., Залеская С. А. и соавт. Витамин D 3 и здоровье женщины. *Гинекология*. 2019; 21: 1: 44–51. DOI: 10.26442/2079-5696-2019.1.190235.
- Tuckey RC, Cheng CYS, Slominski AT. The serum vitamin D metabolome: What we know and what is still to discover. *J Steroid Biochem*. 2019 Feb; 186: 4–21. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2018.09.003.
- Vázquez-Lorente H, Herrera-Quintana L, Quintero-Osso B, et al. Current trends in the analytical determination of vitamin D. *Nutr Hosp*. 2019; 36 (6): 1418–23. DOI: 10.20960/nh.02713.
- Громова О. А., Торшин И. Ю. Витамин D. Смена парадигмы. Под ред. Е. И. Гусева, И. Н. Захаровой. М: ГЭОТАР-Медиа, 2017; 576 с.
- Dirks NF, Ackermans MT, Lips P, et al. The When, What & How of Measuring Vitamin D Metabolism in Clinical Medicine. *Nutrients*. 2018 Apr; 10 (4): 482. DOI: 10.3390/nu10040482.
- Kwak HS, Chung HJ, Cho DH, et al. Efficacy of the Measurement of 25-Hydroxyvitamin D 2 and D 3 Levels by Using PerkinElmer Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Vitamin D Kit Compared With DiaSorin Radioimmunoassay Kit and Elecsys Vitamin D Total Assay. *Ann Lab Med*. 2015 Mar; 35 (2): 263–5. DOI: 10.3343/alm.2015.35.2.263.
- Jenkinson C, Taylor AE, Hassan-Smith ZK, et al. High throughput LC-MS/MS method for the simultaneous analysis of multiple vitamin D analytes in serum. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2016; 1014: 56–63. DOI: 10.1016/j.jchromb.2016.01.049.
- Гильевс А. В., Гришина Т. П., Громова О. А. и соавт. Метаболиты витамина D: роль в диагностике и терапии витамин-D-зависимых патологий. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2016; 4: 9–18.
- Gao C, Bergagnini-Kolev MC, Liao MZ, et al. Simultaneous quantification of 25-hydroxyvitamin D 3–3-sulfate and 25-hydroxyvitamin D 3–3-glucuronide in human serum and plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with DAPTAD-derivatization. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2017 Aug; 1060: 158–65. DOI: 10.1016/j.jchromb.2017.06.017.
- Hoofnagle AN, Eckfeldt JH, Lutsey PL. Vitamin D-Binding Protein Concentrations Quantified by Mass Spectrometry. *N Engl J Med*. 2015 Oct 8; 373 (15): 1480–2. DOI: 10.1056/NEJMc1502602.
- Ferrari D, Lombardi G, Banfi G. Concerning the vitamin D reference range: pre-analytical and analytical variability of vitamin D measurement. *Biochem Med (Zagreb)*. 2017; 27: 3, 030501. DOI: 10.11613/BM.2017.030501.
- Aydin CG, Dinçel YM, Ankan Y, et al. The effects of

- indoor and outdoor sports participation and seasonal changes on vitamin D levels in athletes. *SAGE Open Med*. 2019; 7. DOI: 10.1177/2050312119837480.
- Cashman KD, Dowling KG, Škrabáková Z, et al. Vitamin D deficiency in Europe: pandemic? *Am J Clin Nutr*. 2016 Apr; 103 (4): 1033–44. DOI: 10.3945/ajcn.115.120873.
- Reid IR. What diseases are causally linked to vitamin D deficiency? *Arch Dis Child*. 2016; 101: 185–9. DOI: 10.1136/archdischild-2014-307961.
- Woodford HJ, Barrett S, Pattman S. Vitamin D: too much testing and treating? *Clin Med*. 2018; 18: 196–200. DOI: 10.7861/clinmedicine.18-3-196.
- Дефицит витамина D у взрослых: диагностика, лечение и профилактика: клинические рекомендации М.: Российская ассоциация эндокринологов ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава РФ. 2015; 77 с.
- Siggelkow H. Vitamin-D-Analytic. *Diabetology*. 2016; 12: 248–53. DOI: 10.1007/s11428-016-0099-0.
- Le Goff C, Cavalier E, Souberbielle JC, et al. Measurement of circulating 25-hydroxyvitamin D: A historical review. *Practical Laboratory Medicine*. 2015; 2: 1–14. DOI: 10.1016/j.plabm.2015.04.001.
- Atef SH. Vitamin D assays in clinical laboratory: Past, present and future challenges. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2018; 175: 136–7. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2017.02.011.
- Enko D, Kriegshäuser G, Stolba R, et al. Method evaluation study of a new generation of vitamin D assays. *Biochem Med (Zagreb)*. 2015 Jun; 25 (2): 203–12. DOI: 10.11613/BM.2015.020.
- Alfieri B, Cavalier E, Perez-Lopez FR. Vitamin D testing: advantages and limits of the current assays. *Eur J of Clin Nutr*. 2020; 74 (3): 1–17. DOI: 10.1038/s41430-019-0553-3.
- Kleine C, Obi Y, Streja E, et al. Seasonal variation of serum 25-hydroxyvitamin D and parameters of bone and mineral disorder in dialysis patients. *Bone*. 2019; 124: 158–65. DOI: 10.1016/j.bone.2019.03.003.
- Li L, Zeng Q, Yuan J, et al. Performance evaluation of two immunoassays for 25-hydroxyvitamin D. *J Clin Biochem Nutr*. 2016 May; 58 (3): 186–92. DOI: 10.3164/jcbn.15-61.
- Oberson JM, Bénéf S, Redeuil K, et al. Quantitative analysis of vitamin D and its main metabolites in human milk by supercritical fluid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2020; 412 (2): 365–75. DOI: 10.1007/s00216-019-02248-5.
- Nair H, Clark W. *Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory*. Elsevier Science. 2017. 304 p. ISBN: 9780128008713.
- Nikooyeh B, Samiee SM, Farzami MR, et al. Harmonization of serum 25-hydroxycalciferol assay results from high-performance liquid chromatography, enzyme immunoassay, radioimmunoassay, and immunochemiluminescence systems: A multicenter study. *J Clin Lab Anal*. 2017; 31. DOI: 10.1002/jcla.22117.
- Van den Ouweland J. Analysis of vitamin D metabolites by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Trends Anal Chem*. 2016; 84: 117–30. DOI: 10.1016/j.trac.2016.02.005.
- Karąńiewicz-Lada M, Główska A. A review of chromatographic methods for the determination of water- and fat-soluble vitamins in biological fluids. *J Sep Science*. 2016; 39: 132–48. DOI: 10.1002/jssc.201501038.
- Couchman L, Moniz CF. Analytical considerations for the biochemical assessment of vitamin D status. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2017; 9 (4): 97–104. DOI: 10.1177/1759720X17692500.
- Abu Kassim NS, Shaw PN, Hewavitharana AK. Simultaneous determination of 12 vitamin D compounds in human serum using online sample preparation and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2018; 1533: 57–65. DOI: 10.1016/j.chroma.2017.12.012.
- Garg U. 25-Hydroxyvitamin D Testing Immunoassays Versus Tandem Mass Spectrometry. *Clin. Lab. Med.*, 2018. DOI: 10.1016/j.cll.2018.05.007.
- Le Goff C, Souberbielle J-C, Delvin E, Cavalier E. Le dosage de la vitamine D: considérations pré-analytiques et analytiques. *Annales de Biologie Clinique*. 2015; 73 (1): 79–92. DOI: 10.1684/abc.2014.1002.

