

1 α , 25-(OH)₂D₃ 生物样品含量测定方法的研究进展

陈瑞^{1,2}, 徐智儒^{1,2}, 刘莉^{1,2*}

(1. 中国医药工业研究总院药理评价研究中心; 上海 200040;

2. 上海市生物物质成药性评价专业技术服务中心; 上海 200437)

摘要: 1 α , 25-二羟基维生素 D₃ (1 α , 25-(OH)₂D₃) 是维生素 D 体内代谢的重要活性物质, 被证实与多种疾病的生理病理进程相关。操作简单且高灵敏度的 1 α , 25-(OH)₂D₃ 生物样品含量测定方法的开发有很高的科研和临床应用价值。本综述主要讨论免疫分析法和色谱分析法在 1 α , 25-(OH)₂D₃ 生物样品测定中的应用, 重点阐述液相色谱-串联质谱联用技术在该领域的应用。

关键词: 维生素 D 代谢物; 1 α , 25-二羟基维生素 D₃ (1 α , 25-(OH)₂D₃); 骨化三醇; 生物样品; 免疫分析方法; 色谱分析方法; 液相色谱-串联质谱联用技术

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2017) 08-1357-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.08.02

Research progress of methods for the determination of 1 α , 25-(OH)₂D₃ biological samples

CHEN Rui^{1,2}, XU Zhi-ru^{1,2}, LIU Li^{1,2*}

(1. Center for Pharmacological Evaluation and Research, China State Institute of Pharmaceutical Industry,

Shanghai 200040, China; 2. Shanghai Professional and Technical Service Center for Biological Material

Druggability Evaluation, Shanghai 200437, China)

Abstract: 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ (1 α , 25-(OH)₂D₃) is the most important metabolites of vitamin D *in vivo*, and has been proved to be related to the pathophysiology of various diseases. The development of a simple, highly sensitive 1 α , 25-(OH)₂D₃ method for the determination of biological samples has high value in research and clinical application. In this review, we discuss the applications of immunoassay and chromatographic methods for the determination of 1 α , 25-(OH)₂D₃ biological samples and mainly illustrate the applications of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in this field.

Keywords: vitamin D metabolites; 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ (1 α , 25-(OH)₂D₃); calcitriol; biological sample; immunoassay; chromatographic method; liquid chromatography-tandem mass spectrometry

1 α , 25-二羟基维生素 D₃ (1 α , 25-(OH)₂D₃) 又名骨化三醇 (calcitriol), 是维生素 D 体内代谢的重要活性物质, 是评价体内维生素 D 营养状况最直观且有效的指标。因此, 准确测定 1 α , 25-(OH)₂D₃ 的体内水平对

* 通信作者 Tel: (021) 65102569; E-mail: 2684985396@qq.com

第一作者 Tel: (021) 65102569; E-mail: chenrui180820@foxmail.com

于多种钙磷代谢相关疾病的预防和治疗有重要意义。本文从 $1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 的生物学特性出发,重点对测定生物样品内 $1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 含量的方法进行综述和评价,为 $1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 的临床用药、疾病监测和代谢组学等研究提供参考。

1 $1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 的生物学特性

维生素 D 是类固醇类衍生物,是人体必需的营养素,在机体钙磷调节^[1]、癌症^[2]、心脑血管疾病^[3]和自身免疫疾病^[4]中发挥着重要的作用。人体内自然存在的维生素 D 有 2 种形式,分别是维生素 D_3 (胆钙化醇)和维生素 D_2 (麦角钙化醇),其中维生素 D_3 是主要存在形式^[5]。维生素 D_3 在肝脏中经 CYP27A1、CYP2R1 和 CYP2D25 代谢为 25-羟基维生素 D_3 ($25-(\text{OH})\text{D}_3$),随后被肾脏中的 CYP27B1 转换为活性最高的 $1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ ^[6]。 $1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 体循环浓度在 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 水平,受甲状旁腺激素、钙、磷水平的调节^[7]。 $1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 在光下不稳定,容易在 C-23 或 C-24 位发生氧化,形成更稳定、无活性的共轭形式^[8]。 $1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 主要与体内的维生素 D 结合蛋白 (vitamin D-binding protein, DBP)、白蛋白结合,血浆蛋白结合率可达 99.9%^[9]。

循环体系中 $1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 一方面具有钙调作用,在肠、骨、甲状旁腺等组织器官中调节血钙和磷酸盐的浓度^[10];另一方面具有非钙调作用,在免疫系统、骨髓(破骨细胞前体和淋巴细胞)、皮肤、乳腺和前列腺上皮细胞等细胞类型中调节细胞分化和抗增殖^[11]。大量的分子生物学研究揭示, $1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 通过维生素 D 受体 (vitamin D receptor, VDR) 介导相关转录机制实现生物学功能,其与 VDR 结合后可以直接调节靶细胞中多种维生素 D 依赖性基因的表达^[12]。

一直以来,人们都认为循环体系中的 $25-(\text{OH})\text{D}_3$ 是反映人体内维生素 D 水平的重要指标,但有文献指出, $1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 血浆浓度相对于 $25-(\text{OH})\text{D}_3$ 或 $24R, 25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ (维生素 D_3 在体内代谢失活的产物)的血浆浓度,可以更好地反映维生素 D 的状态。临床上,测定血清中的 $1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 可用于评估慢性肾衰竭、甲状旁腺功能减退、高磷血症、低镁血症和肉芽肿性疾病等^[13]。因此,操作简便、高灵敏度的 $1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 生物样品含量测定方法的开发有很高的科研和临床应用价值。

2 $1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 生物样品含量测定方法

综合以往的分析技术和方法, $1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 生物样品含量测定方法主要有 2 大类:免疫分析法和色谱分析法。免疫分析法常常由于交叉反应导致特异性不足,而色谱分析法可有效分离待测物,获得足够的特异性,尤其是液相色谱-质谱联用 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 技术显示出很大的优势。下文将讨论免疫分析法和色谱分析法在 $1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 生物样品含量测定中的应用,重点讨论 LC-MS/MS 技术在该领域的应用。

2.1 免疫分析法

测定生物样品中 $1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 的免疫分析法主要有放射免疫分析 (radioimmunoassay, RIA)、酶免疫分析 (enzyme immunoassay, EIA) 和蛋白结合分析 (protein-binding assay, PBA) 3 种方法。这些方法都已经商业化,例如 Diasorin-RIA 试剂盒目前应用在一些医院和临床实验室。免疫分析方法的开发从一开始就受到抗体或受体特异性较差的阻碍,都需要大量且烦琐的样品前处理过程来减小其他物质的干扰,尤其与维生素 D 的其他代谢产物产生交叉反应,无法准确区分 $1, 25-(\text{OH})_2\text{D}_2$ 、 $1, 25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 以及其他非 1 位羟基化代谢物^[14]。目前 RIA 最好的 $1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 抗体的交叉反应在 1% 左右^[15]。

2.1.1 RIA 法 RIA 的原理是在某一特定的环境下抗原抗体相互作用,根据质量守恒定律,这种作用达到平衡状态时,抗体上结合的有放射性的抗原与没有放射性的抗原的量成反比^[16]。用 RIA 法测定 $1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 时往往需要示踪剂和 $1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 的特异性抗体。在以往的研究中^[17]有用 ^3H 作为示踪剂,且大部分验证过的方法都需要 HPLC 的预分离;现在常用放射性 ^{125}I 作为示踪剂。与 ^3H 相比,用放射性 ^{125}I 作为示踪剂的 RIA 需要较少的样品预纯化,不需要使用单个样品内标来评价 $1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 的内源性损失,省去了 HPLC 分离纯化的步骤^[17-18]。 $1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 的特异性抗体主要是羊抗血清,主要与 1 位羟基化的维生素 D 反应^[19]。与其他免疫分析方法相比,RIA 有明显的速度优势,但工作还是比较烦琐,检测限一般可在 $2.0\text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 左右^[20];与 LC-MS/MS 法相比,RIA 法灵敏度高但特异性差,同时其放射性污染不容忽视。有研究报道,在 RIA 中, $24, 25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、 $25, 26-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 可对 $1\alpha, 25-$

(OH)₂D₃ 的表观浓度存在影响,用高碘酸处理样品后该影响大大降低,提高了定量的准确性^[21]。

2.1.2 EIA 法 EIA 是一非放射性标记免疫分析技术,以酶标记抗原或抗体作为示踪物,由高活性的酶催化底物显色或发光,达到定量分析目的。英国 IDS (Immunodiagnostic Systems Limited) 公司开发了一种与 DiaSorin-RIA 有着相似操作流程,但样本体积更低的酶免疫测定试剂盒 IDS-EIA。IDS-EIA 使用单克隆绵羊抗体包被的微孔板、生物素化的 25 位羟基化维生素 D 的示踪剂,还具有用于从其结合蛋白解离 25-(OH)D 的专有缓冲试剂^[22]。Alsalem 等^[23] 在眼屏障上皮细胞表达维生素 D₃ 机制的研究中应用 EIA 法测定细胞培养液中 1 α , 25-(OH)₂D₃ 的含量,为后续的试验提供数据支持。

2.1.3 蛋白结合分析法 Nichols Advantage 的化学发光蛋白结合测定 (chemiluminescence protein-binding assay, CLPBA) 是一种快速和自动化的竞争性蛋白结合分析法。在测定中,1 α , 25-(OH)₂D₃ 包被的磁性颗粒与内源性分析物竞争结合外源性人 DBP 和吡啶标记的抗 DBP 单克隆抗体,将样品在常温下孵育。在洗涤步骤后,加入底物,最终反应产生的光强度与样品中的 1 α , 25-(OH)₂D₃ 浓度成反比^[20]。但是有研究指出 CLPBA 方法的精密度较差,方法特异性不足^[24]。

2.2 色谱分析法

文献报道的色谱分析方法主要是 HPLC-UV 法和 LC-MS/MS 法。随着超高效液相色谱仪的使用,LC-MS/MS 方法以其高灵敏、快速检测等特点迅速成为研究的热点。

2.2.1 HPLC-UV 法 血清或血浆中 1 α , 25-(OH)₂D₃ 的 HPLC 测定法主要均为离线方法,将样品引入测量仪器之前需要一组手动操作^[25]。Mata-Granados 等开发了一种用于净化/预浓缩的自动化装置,在 HPLC 上可在线分离、检测血清中维生素 D₃ 的代谢产物^[26]。在大多数 HPLC-UV 方法中需要大量的样品前处理过程,萃取等操作过程的损失需要通过内标物校正。用 HPLC-UV 法测定生物样品中 1 α , 25-(OH)₂D₃ 主要有 3 个优点:①样品在进入仪器分析之前要经过一系列的分离提取,减少了蛋白质、脂质等物质的干扰;②可实现 1 α , 25-(OH)₂D₂ 和 1 α , 25-(OH)₂D₃ 的分离和准确检测;③相对于免疫测定法而言,HPLC-UV 法具有较好的精密度,与 LC-

MS/MS 法是相当的^[27]。

2.2.2 LC-MS/MS 法 LC-MS/MS 法继承了 HPLC-UV 法优点的同时,显示出更加强大的分离检测能力,特异性高,也是目前应用最多的方法。LC-MS/MS 法被认为是测定类固醇激素的“金标准”^[28]。Hunty 等分析比较了 RIA 法、HPLC-UV 法和 LC-MS/MS 法检测维生素 D 代谢产物的结果,推荐 LC-MS/MS 法作为首选方法^[29]。为了获得较好的分离度和灵敏度,大部分研究使用了超高效液相色谱仪,少部分采用了普通的高效液相色谱仪。

LC-MS/MS 法在分析生物样品前也需要对样品进行一些前处理,以减少其他内源性物质干扰,降低基质效应并且能够保护仪器。大部分测定 1 α , 25-(OH)₂D₃ 的文章中都是先用有机试剂沉淀蛋白,再采用液液萃取或固相萃取法进一步提取,最后浓缩和复溶,这样的前处理过程还是相对复杂的。有的研究采用在线自动固相萃取法或液液萃取法^[30]。Frederick 等^[31] 研究中用到了免疫亲和提取的样品前处理方法。有的研究采用乙腈或丙酮沉淀蛋白后直接进行分析或浓缩后分析,但这些研究均采用 APCI 源或 APPI 源的新一代质谱仪,离子化效率更高^[32-33]。

当然,直接串联质谱分析 1 α , 25-(OH)₂D₃ 很具有挑战,原因在于 1 α , 25-(OH)₂D₃ 的化学结构缺少离子化位点,在电喷雾电离 (electrospray ionization, ESI) 下离子化效率低^[34-35]。为了获得较高的灵敏度,许多研究都应用了 4 位取代的 1, 2, 3-三唑啉-3, 5-二酮 (1, 2, 3-triazoline-3, 5-dione, TAD) 对 1 α , 25-(OH)₂D₃ 进行衍生化反应。通过衍生化反应引入 1 个含丰富 N 原子的基团后,衍生化产物在 ESI⁺ 模式下很容易形成 [M+H]⁺ 峰,分析灵敏度大大提高^[36]。Netzel 等^[37] 评价了 5 种不同的 TAD 类衍生试剂,他们发现对于 TAD 的表观离子抑制更多依赖于样品基质而不是所使用的 TAD 的类型。目前应用较多的还是 4-苯基-1, 2, 3-三唑啉-3, 5-二酮 (4-phenyl-1, 2, 3-triazolin-3, 5-dione, PTAD), Aronov 等^[38] 在 LC-MS/MS 分析前用 PTAD 衍生化,最低定量限可达 25 pg·mL⁻¹。由于 1 α , 25-(OH)₂D₃ 的 C-3 差向异构体共洗脱,PTAD 衍生化可能导致测得的 1 α , 25-(OH)₂D₃ 偏高^[39]。Shoujiro Ogawa 等用 4-(4'-二甲基氨基苯基)-1, 2, 4-三唑啉-3, 5-二酮 (4-(4'-dimethylaminophenyl)-1, 2, 4-triazoline-3, 5-dione,

DAPTAD)作为衍生化试剂,试验结果表明,DAPTAD衍生化的检测限比PTAD衍生化的检测限低2倍,还可以解决 $1\alpha, 25-(OH)_2D_3$ 的C₃差向异构体问题^[40]。近期Hedman报道了一个新的衍生化试剂Amplifex diene,是由含有季胺基团的有机化合物与TAD组合得到的。与PTAD相比,Amplifex试剂仅与顺式二烯化合物反应,季胺基团的存在使衍生化产物更易离子化且离子碎片仅限于几个特定的类型,定量用的碎片结构更大且不容易受其他内源性物质的干扰。Amplifex试剂衍生化后的信噪比是PTAD衍生化的10倍,在使用小样本体积的时候具有更高的灵敏度,但该试剂价格昂贵^[41]。当然,Casetta等^[42]用AB Sciex 5500 Qtrap仪器采取不衍生化的办法测定血清中的 $1\alpha, 25-(OH)_2D_3$,经过了液液提取和复杂的多步骤固相纯化,定量下限为 $15\text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。Fang等^[43]开发的LC-MS/MS方法中样品经过液液提取、非衍生化处理,定量下限为 $10\text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$,需要指出的是他们所用的仪器是AB Sciex API6500 Qtrap质谱仪。

定量离子对的选择同样会影响分析的灵敏度。大部分的研究选择了 $[M-H_2O+H]^+$ 作为母离子进行检测^[37]。Casetta、Fang和Yuan选择了 $[M+Li]^+$ 作为母离子进行检测,他们解释了定量 $1\alpha, 25-(OH)_2D_3$ 的锂加合物在离子化过程中很稳定,母离子中没有失水片段。在碰撞诱导解离后,在产物全扫描中检测到分别脱掉1、2和3个水分子的主要产物离子,脱去三分子水的通道具有高的特异性^[42-44]。Kissmeyer等开发了一个不用衍生化的LC-MS/MS方法定量大鼠和猪血清中 $1\alpha, 25-(OH)_2D_3$ 的铵加合物,样品在蛋白质沉淀后经过一个自动的固相萃取程序,定量下限为 $20\text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ^[45]。也有的研究为了提高分析灵敏度,在流动相中添加了一定量的甲胺,使得分析物形成响应较高的 $[M+CH_3NH_3]^+$ ^[46]。

其他的研究中,Duan等^[47]采用PTAD衍生化且微流速的LC-MS/MS方法,获得的最低定量限为 $5\text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$,但LC分离过程的运行时间长达27 min。Wang等报道了1个与 $1\alpha, 25-(OH)_2D_3$ 共洗脱、新的维生素D的代谢产物 $4\beta, 25-(OH)_2D_3$,并开发了1个新的LC-MS/MS方法可以将 $1\alpha, 25-(OH)_2D_3$ 和 $4\beta, 25-(OH)_2D_3$ 完全分离^[48]。有研究报道,C-3差向异构体以高浓度存在于一些新生儿的体循环中(也可能存在于一些成年人样品中),使用LC-MS/MS

法可以通过调节反相柱和延长运行时间来拆分C-3差向异构体^[22]。Bailey和Shah的2篇文章^[49-50]中都提出了用LC-MS/MS的方法解决 $1\alpha, 25-(OH)_2D_3$ 的C-3差向异构体的方法。

3 基质校正

从定量分析和方法验证的角度来看,生物样品中 $1\alpha, 25-(OH)_2D_3$ 的定量测定是非常复杂和困难的。生物样品中 $1\alpha, 25-(OH)_2D_3$ 的测定首先需要选择合适的方法制备标准曲线和质控样品,目前最大的问题是如何取得真正不含待测物的基质并进行定量测定。现有的大部分文献报道的解决办法主要有以下2种:①采用真正基质和真正分析物进行定量:Casetta、Fang、Aronov均采用了“标准加入法”,在等分的样品中加入已知不同浓度的 $1\alpha, 25-(OH)_2D_3$,以加入浓度和测得的 $1\alpha, 25-(OH)_2D_3$ 的响应值做标准曲线,利用标准曲线的截距计算出内源未知的 $1\alpha, 25-(OH)_2D_3$ 浓度^[38,42-43]。虽然“标准加入法”方法应用很广泛,但它需要生物样品有较大的体积,标准加入的浓度选择也影响结果的准确性,不适合大量生物样品的测定。②采用替代基质和真正分析物进行定量:当无法得到空白生物基质时,可以采用人工或替代的基质。替代基质种类很多,在测定生物样品中 $1\alpha, 25-(OH)_2D_3$ 时应用最多的是磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS),其pH(7.4)和离子强度($150\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)都与血浆和血清类似。考虑到生物基质中存在蛋白质等物质,在PBS中可以加入牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)或人血清白蛋白(human serum albumin, HSA),增加疏水性化合物的溶解性^[51]。大部分的研究(Frederick、Brian、Netzel、Kissmeyer等)使用BSA作为替代基质,仅在Wang等的研究中用HSA作为替代基质^[31,37,45,48]。这种方法的局限性在于血浆的复杂组成很难被模拟,目标分析物在替代基质与真正基质中的溶解性、提取能力、蛋白结合等情况很难保证一致。Yuan等^[44]利用活性炭除去真正基质中内源性成分而获得的“剥离基质”作为替代基质。需要指出的是,活性炭必须完全去除,否则残余的微量活性炭可能会与目标分析物结合,导致目标分析物浓度降低^[51]。

4 总结展望

尽管 $1\alpha, 25-(OH)_2D_3$ 生物样品的测定方法有很多,LC-MS/MS法(尤其是UPLC-MS/MS)作为分析方法的金标准凭借其特有的优势在现在和将来的应

用中成为重点。为了建立一个高灵敏度的 $1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 生物样品含量测定的 LC-MS/MS 分析方法, 最好还是应用衍生化的样品处理方法, 选择 ESI⁺ 源检测。为了提高分析的准确性, 要对所有可能的内源性干扰物和 $1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 实现完全的色谱分离, 要有相应的同位素内标做校正, 选择合适的方法进行基质校正。进行高灵敏度的 $1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 生物样品含量测定方法的开发还有很多问题等待解决。

参考文献

- [1] DOROU DI M, PLAISANCE M C, BOYAN BD, *et al.* Membrane actions of $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$, are mediated by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in bone and cartilage cells [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2015, 145: 65
- [2] MEEKER S, SEAMONS A, PAIK J, *et al.* Increased dietary vitamin D suppresses MAPK signaling, colitis, and colon cancer [J]. *Cancer Res*, 2014, 74(16): 4398
- [3] DURK MR, HAN K, CHOW EC, *et al.* $1\alpha, 25$ -Dihydroxyvitamin D_3 reduces cerebral amyloid- β accumulation and improves cognition in mouse models of Alzheimer's disease [J]. *J Neurosci*, 2014, 34(21): 7091
- [4] LIU W, LI H, HAO Y, *et al.* Decreased immunosuppressive actions of $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D_3 in patients with immune thrombocytopenia [J]. *Mol Immunol*, 2016, 78: 89
- [5] COLEMAN LA, MISHINA M, THOMPSON M, *et al.* Age, serum 25 -hydroxyvitamin D and vitamin D receptor (VDR) expression and function in peripheral blood mononuclear cells [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(24): 35512
- [6] CHRISTAKOS S, DHAWAN P, VERSTUYF A, *et al.* Vitamin D: metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects [J]. *Physiol Rev*, 2016, 96(1): 365
- [7] KARRAS SN, SHAH I, PETROCZI A, *et al.* An observational study reveals that neonatal vitamin D is primarily determined by maternal contributions: implications of a new assay on the roles of vitamin D forms [J]. *Nutr J*, 2012, 12(1): 1
- [8] SAKAKI T, KAGAWA N, YAMAMOTO K, *et al.* Metabolism of vitamin D_3 by cytochromes P450 [J]. *Front Biosci*, 2005, 10(1): 119
- [9] JONES G. Metabolism and biomarkers of vitamin D [J]. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 2012, 243(4): 7
- [10] POSA F, BENEDETTO AD, COLAIANNI G. Vitamin D effects on osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells from dental tissues [J]. *Stem Cells Int*, 2016, 2016(6): 1
- [11] LORVAND AMIRI H, AGAH S, TOLOUEI AZAR J, *et al.* Effect of daily calcitriol supplementation with and without calcium on disease regression in non-alcoholic fatty liver patients following an energy-restricted diet: randomized, controlled, double-blind trial [J]. *Clin Nutr*, 2016: 1
- [12] LI F, ZHANG A, SHI Y, *et al.* $1\alpha, 25$ -Dihydroxyvitamin D_3 prevents the differentiation of human lung fibroblasts via microRNA-27b targeting the vitamin D receptor [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 36(4): 967
- [13] PRENTICE A, GOLDBERG GR, SCHOENMAKERS I. Vitamin D across the lifecycle: physiology and biomarkers [J]. *Am J Clin Nutr*, 2008, 88(2): 500S
- [14] CARTER GD. 25 -hydroxyvitamin D: a difficult analyte [J]. *Clin Chem*, 2012, 58(3): 486
- [15] KRISHNAN A, VENKATESH B. Vitamin D measurement in the intensive care unit: methodology, clinical relevance and interpretation of a random value [J]. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2013, 12(4): 230
- [16] ENKO D, FRIDRICH L, REZANKA E, *et al.* 25 -hydroxy-Vitamin D status: limitations in comparison and clinical interpretation of serum-levels across different assay methods [J]. *Clin Lab*, 2014, 60(9): 1541
- [17] SERTESER M, COSKUN A, INAL TC, *et al.* Challenges in vitamin D analysis/Izazovi u analizi vitamina D [J]. *J Med Biochem*, 2012, 31(4): 326
- [18] FRASER WD, DURHAM BH, BERRY JL, *et al.* Measurement of plasma $1, 25$ dihydroxyvitamin D using a novel immunoextraction technique and immunoassay with iodine labelled vitamin D tracer [J]. *Ann Clin Biochem*, 1997, 34(6): 632
- [19] van HELDEN J, WEISKIRCHEN R. Experience with the first fully automated chemiluminescence immunoassay for the quantification of $1\alpha, 25$ -dihydroxy-vitamin D [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2014, 53(5): 761
- [20] GLENDENNING P, NOBLE JM, TARANTO M, *et al.* Issues of methodology, standardization and metabolite recognition for 25 -hydroxyvitamin D when comparing the DiaSorin radioimmunoassay and the Nichols Advantage automated chemiluminescence protein-binding assay in hip fracture cases [J]. *Ann Clin Biochem*, 2003, 40(5): 546
- [21] TERRY AH, SANDROCK T, MEIKLE AW. Measurement of 25 -hydroxyvitamin D by the Nichols ADVANTAGE, DiaSorin LIAISON, DiaSorin RIA, and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Clin Chem*, 2005, 51(8): 1565
- [22] GALLO S, COMEAU K, AGELLON S, *et al.* Methodological issues in assessing plasma 25 -hydroxyvitamin D concentration in newborn infants [J]. *Bone*, 2014, 61(4): 186
- [23] ALSALEM JA, PATEL D, SUSARLA R, *et al.* Characterization of vitamin D production by human ocular barrier cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014, 55(4): 2140
- [24] CARTER GD, JONES JC, BERRY JL. The anomalous behaviour of exogenous 25 -hydroxyvitamin D in competitive binding assays [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2007, 103(3-5): 480
- [25] MATA-GRANADO JM, CASTRO LD, QUESADA GOMEZ JM. Inappropriate serum levels of retinol, alpha-tocopherol, 25 hydroxyvitamin D_3 and $24, 25$ dihydroxyvitamin D_3 levels in healthy Spanish adults: simultaneous assessment by HPLC [J]. *Clin Biochem*, 2008, 41(9): 676
- [26] MATA-GRANADO JM, CABALLO-LOPEZ A, CASTRO LD,

- et al.* Automated method for the determination of vitamin D₃ hydroxymetabolites in serum [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2003, 377 (2): 287
- [27] ROTH HJ, SCHMIDT-GAYK H, WEBER H, *et al.* Accuracy and clinical implications of seven 25-hydroxyvitamin D methods compared with liquid chromatography-tandem mass spectrometry as a reference [J]. *Ann Clin Biochem*, 2008, 45 (2): 153
- [28] WALLACE AM, GIBSON SHA, LAMBERG AC, *et al.* Measurement of 25-hydroxyvitamin D in the clinical laboratory: current procedures, performance characteristics and limitations [J]. *Steroids*, 2010, 75 (7): 477
- [29] de la HUNTY A, WALLACE AM, GIBSON S, *et al.* UK food standards agency workshop consensus report: the choice of method for measuring 25-hydroxyvitamin D to estimate vitamin D status for the UK National Diet and Nutrition Survey [J]. *Br J Nutr*, 2010, 104 (4): 612
- [30] MATA-GRANADOS JM, VARGAS VJVC, CASTRO LD, *et al.* Evaluation of vitamin D endocrine system (VDES) status and response to treatment of patients in intensive care units (ICUs) using an on-line SPE-LC-MS/MS method [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2010, 121 (1-2): 452
- [31] STRATHMANN FG, LAHA TJ, HOOFNAGLE AN. Quantification of 1 α , 25 dihydroxy vitamin D by immunoextraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Clin Chem*, 2011, 57 (9): 1279
- [32] ADAMEC J, JANNASCH A, HUANG J, *et al.* Development and optimization of an LC-MS/MS-based method for simultaneous quantification of vitamin D₂, vitamin D₃, 25-hydroxyvitamin D₂ and 25-hydroxyvitamin D₃ [J]. *J Sep Sci*, 2011, 34 (1): 11
- [33] HERRMANN M, HARWOOD T, GASTON-PARRY O, *et al.* A new quantitative LC-tandem mass spectrometry assay for serum 25-hydroxyvitamin D [J]. *Steroids*, 2010, 75 (13-14): 1106
- [34] MAHLOW J, BUNCH DR, WANG S. Quantification of 1, 25-dihydroxyvitamin D₂ and D₃ in serum using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1378: 291
- [35] SUDSAKORN S, PHATARPHEKAR A, O' SHEA T, *et al.* Determination of 1, 25-dihydroxyvitamin D₂ in rat serum using liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2011, 879 (2): 139
- [36] CHAN N, KALETA EJ. Quantitation of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D by LC-MS/MS using solid-phase extraction and fixed-charge derivitization in comparison to immunoextraction [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2015, 53 (9): 1399
- [37] NETZEL BC, CRADIC KW, BRO ET, *et al.* Increasing liquid chromatography-tandem mass spectrometry throughput by mass tagging: a sample-multiplexed high-throughput assay for 25-hydroxyvitamin D₂ and D₃ [J]. *Clin Chem*, 2011, 57 (3): 431
- [38] ARONOV PA, HALL LM, DETTMER K, *et al.* Metabolic profiling of major vitamin D metabolites using Diels-Alder derivitization and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2008, 391 (5): 1917
- [39] AGHAJAFARI F, FIELD CJ, RABI D, *et al.* Plasma 3-epi-25-hydroxycholecalciferol can alter the assessment of vitamin D status using the current reference ranges for pregnant women and their newborns [J]. *J Nutr*, 2015, 146 (1): 70
- [40] OGAWA S, OOKI S, MOROHASHI M, *et al.* A novel cookson-type reagent for enhancing sensitivity and specificity in assessment of infant vitamin D status using liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2013, 27 (21): 2453
- [41] HEDMAN CJ, WIEBE DA, DEY S, *et al.* Development of a sensitive LC/MS/MS method for vitamin D metabolites: 1, 25 Dihydroxyvitamin D₂ & 3 measurement using a novel derivitization agent [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2014, 953-954 (1): 62
- [42] CASETTA B, JANS I, BILLEN J, *et al.* Development of a method for the quantification of 1 α , 25 (OH)₂-vitamin D₃ in serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry without derivitization [J]. *Eur J Mass Spectrom (Chichester)*, 2010, 16 (1): 81
- [43] FANG H, YU S, QIAN C, *et al.* Determination of 1, 25-dihydroxyvitamin D₂, and 1, 25-dihydroxyvitamin D₃, in human serum using liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2016, 1027: 19
- [44] YUAN C, KOSEWICK J, HE X, *et al.* Sensitive measurement of serum 1 α , 25-dihydroxyvitamin D by liquid chromatography/tandem mass spectrometry after removing interference with immunoaffinity extraction [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2011, 25 (9): 1241
- [45] KISSMEYER AM, SONNE K. Sensitive analysis of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ in biological fluids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2001, 935 (1-2): 93
- [46] DING S, SCHOENMAKERS I, JONES K, *et al.* Quantitative determination of vitamin D metabolites in plasma using UHPLC-MS/MS [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 398 (2): 779
- [47] DUAN X, WEINSTOCK-GUTTMAN B, WANG H, *et al.* Ultrasensitive quantification of serum vitamin D metabolites using selective solid-phase extraction coupled to microflow liquid chromatography and isotope-dilution mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2010, 82 (6): 2488
- [48] WANG Z, SENN T, KALHORN T, *et al.* Simultaneous measurement of plasma vitamin D₃ metabolites including 4 β , 25-dihydroxyvitamin D₃ using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Anal Biochem*, 2011, 418 (1): 126
- [49] BAILEY D, VELJKOVIC K, YAZDANPANA M, *et al.* Analytical measurement and clinical relevance of vitamin D (3) C₃-epimer [J]. *Clin Biochem*, 2013, 46 (3): 190
- [50] SHAH I, JAMES R, BARKER J, *et al.* Misleading measures in vitamin D analysis: a novel LC-MS/MS assay to account for epimers and isobars [J]. *Nutr J*, 2011, 10 (2): 1
- [51] MERBEL NCVD. Quantitative determination of endogenous compounds in biological samples using chromatographic techniques [J]. *Trends Anal Chem*, 2008, 27 (10): 924

(本文于2017年1月6日收到)