

اندازه گیری همزمان ۲۵- هیدروکسی کوله کلسیفرول و ۲۵-هیدروکسی ارگوکلسیفرول به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

دکتر تیرنگ نیستانی*، اعظم غروی**، علی کلایی**، محمد صمدی***

دریافت: ۸۶/۸/۱۳، پذیرش: ۸۷/۳/۱۱

چکیده:

مقدمه و هدف: با توجه به شیوع بالای درجات مختلف کمبود ویتامین D در ایران، ارزیابی صحیح وضعیت این ویتامین برای مقاصد بالینی، پژوهشی و بهداشتی اهمیت به سزایی دارد. غلظت سرمی ۲۵-هیدروکسی D (25(OH)D)، به عنوان نامگر معتبر وضعیت ویتامین D پذیرفته شده است. سنجشهای مبتنی بر کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)، روشهای استاندارد اندازه گیری 25(OH)D به شمار می آیند. هدف از انجام این مطالعه راه اندازی یک روش معتبر و نسبتاً ساده مبتنی بر HPLC برای اندازه گیری غلظت سرمی 25(OH)D با به کار گیری آشکارساز فرابنفش بود.

روش کار: پروتئینهای سرم با استفاده از اتانل و سپس آمیزه متانل: ایزوپروپانل (۹۰:۱۰، حجمی) رسوب داده و سپس ۲۵-هیدروکسی کلسیفرول به کمک فاز آلی هگزان، استخراج شد. هگزان تحت گاز ازت تبخیر و رسوب حاصله در متانل حل شد و پس از فیلتراسیون، نهایتاً ۲۰ μL از محلول صاف شده به ستون Teknochroma tracer excel 150×4, 3μm تزریق و کروماتوگرافی با فاز متحرک متانل: آب (۸۵:۱۵، حجمی) حاوی ۰/۰۱ درصد BHT و دمای ستون ۴۰ °C انجام شد. این روش قادر به شناسایی افتراقی 25(OH)D₂ و 25(OH)D₃ در طول موج ۲۶۵ nm بود. نتایج حاصل از آزمایش ۹۰ نمونه سرم انسانی با این روش، با نتایج دو روش رایج پرتو-ایمنی سنجی (RIA) و واکنش رقابتی پیوند به پروتئین (CPBA) مقایسه گردید. درجه همخوانی نتایج این سه روش با استفاده از تعیین ضریب همبستگی و آنالیز بلند-آلتمن ارزیابی شد.

نتایج: زمان بازداری برای 25(OH)D₂ و 25(OH)D₃ به ترتیب ۹/۵ و ۱۰/۷ دقیقه به دست آمد. منحنی های استاندارد برای 25(OH)D₃ تا غلظت ۳۷۵ nmol/L و برای 25(OH)D₂ تا غلظت ۱۸۷/۵ nmol/L خطی بود. حد آشکار سازی برای هر دو ویتامین ۱۲/۵ nmol/L بود. درصد بازیافت برای 25(OH)D₂ و 25(OH)D₃ در آزمایش های متعدد به ترتیب ۵/۶ ± ۱۰/۱٪ و ۵/۴ ± ۱۰۰/۸٪ به دست آمد. تغییرات درون و میان سنجشی برای 25(OH)D₃ به ترتیب ۸/۱٪ و ۱۲/۶٪ بود. دو روش RIA و CPBA نتایج بالاتری نسبت به HPLC به دست دادند (p=۰/۰۲). روش RIA در مقایسه با CPBA همخوانی بیشتری را با HPLC نشان داد.

نتیجه نهایی: روش HPLC معرفی شده در این مطالعه برای اندازه گیری سطوح سرمی 25(OH)D، روشی است قابل اعتماد و نسبتاً سریع با این مزیت که توانایی شناسایی افتراقی 25(OH)D₂ و 25(OH)D₃ را نیز دارد.

کلید واژه ها: پرتوایمنی سنجی / سنجش رقابتی پیوند به پروتئین / کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا / ویتامین D

مقدمه:

وضعیت ویتامین D پذیرفته شده است (۳-۱). در عین حال اندازه گیری 25(OH)D سرم چندان ساده نیست (۴). روشهای رایج عمدتاً شامل واکنش رقابتی اتصال به پروتئین competitive protein binding assay

ارزیابی وضعیت ویتامین D هم از نظر تغذیه ای و هم از نظر متابولیسی اهمیت بسزایی دارد. غلظت سرمی ۲۵-هیدروکسی D (25(OH)D)، به عنوان نامگر معتبر

* پژوهشگر انستیتو تحقیقات تغذیه ای و صنایع غذایی کشور دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی (tneyestani@nmftri.ac.ir)

** کارشناس آزمایشگاه انستیتو تحقیقات تغذیه ای و صنایع غذایی کشور دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

*** مربی دانشکده بهداشت و مرکز تحقیقات بهداشت نظامی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران

توسط هگزان استخراج شد. فاز آلی در دمای 40°C و تحت گاز ازت تبخیر و باقیمانده در متانل حل و پس از جداسازی ذرات معلق از طریق فیلتراسیون، به ستون تزریق شد.

مواد: متانل، اتانل، هگزان، استونیتریل، ایزوپروپانل همگی با درجه خلوص HPLC (Romil, UK)، هیدروکسی تولوئن بوتیله (BHT) (Merck) butylated Hydroxyl Toluene، استاندارد ۲۵-هیدروکسی D_3 (Sigma Lot No.) H4014، استاندارد ۲۵-هیدروکسی D_2 (Fluka Lot No.) 17937.

ابزارها: دستگاه HPLC مجهز به پمپ چهار حلاله، آشکار ساز فرابنفش UV730D و گرم کننده ستون (همگی از Young Lin, South Korea)، ستون Teknochroma tracer excel $150 \times 4, 3\mu\text{m}$ و چاپگر، دستگاه گاما کانتر (GenII, Genesys, USA)، دستگاه قرائتگر الیزا (plate reader, StatFax 3200, Awareness, USA) آماده سازی نمونه: به $500\ \mu\text{L}$ سرم $25\ \mu\text{L}$ اتانل افزوده و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس $500\ \mu\text{L}$ متانل: ایزوپروپانل (۱۰:۹۰، حجمی) افزوده و پس از ۱۵ ثانیه هم زدن با همزن برقی (ورتکس)، ۱ میلی لیتر هگزان بدان اضافه و ۶۰ ثانیه دیگر ورتکس شد. بعد از یک دقیقه سانتریفیوژاسیون در $1500\ \text{g}$ ، فاز رویی به لوله دیگر منتقل گردید (مرحله استخراج با هگزان دوباره تکرار شد). هگزان تحت گاز ازت تبخیر و رسوب حاصله در $125\ \mu\text{L}$ متانل حل شد و سپس به منظور حذف ذرات معلق از فیلتر (۴ mm، $0.45\ \mu\text{m}$) عبور داده شد. $20\ \mu\text{L}$ از این محلول به ستون تزریق شد. در ابتدا از ۱۹-نور تستوسترون (ناندرولون) دکانات با غلظت $433\ \text{nmol/L}$ به عنوان استاندارد داخلی استفاده شد منتهی به دلیل زمان بازداری نسبتاً بالای این ماده، زمان کلی آزمایش طولانی شد (شکل ۲). با تکرار مرحله استخراج با هگزان، زمان کل، بدون اینکه دقت پایین بیاید، کاهش داده شد و این مطلب با مقایسه چند بار آزمایش با و بدون استاندارد تایید گشت.

شرایط کروماتوگرافی: ستون Teknochroma tracer excel $150 \times 4, 3\mu\text{m}$ ، میزان جریان $1\ \text{mL/min}$ ، فشار PSA 1500 ، فاز متحرک متشکل از متانل: آب (۱۵:۸۵، حجمی) حاوی 0.1% درصد BHT، طول موج آشکار ساز $265\ \text{nm}$ ، دمای ستون 40°C حجم تزریق $20\ \mu\text{L}$ ، غلظت

(CPBA) و رادیوایمونواسی (RIA) radioimmunoassay و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا high-performance liquid chromatography (HPLC) می باشند. مطالعات گوناگون نشان داده اند که این روشها دقت های متفاوتی دارند (۵-۸).

شیوع کمبود ویتامین D در قسمت های مختلف ایران از $46/2\%$ در دانش آموزان دبیرستانی اصفهان (۹) تا $79/6\%$ در تهرانی های ۶۹-۲۰ ساله (۱۰) گزارش شده است. دلایل اختلاف در میزانهای شیوع کمبود ویتامین D در کشور کاملاً شناخته نشده است، اگر چه تفاوت در وضعیت جغرافیایی و در نتیجه عادات غذایی ممکن است تا حدودی موثر باشد. از طرف دیگر اختلاف نتایج روش های مختلف و حتی کیت های متفاوت یک روش یکسان را نمی توان نادیده گرفت (۸). این وضعیت نابسامان گاهی به دلیل عدم دسترسی به کیت دلخواه در بازار و خیم تر می شود و عملاً آزمایشگاهها امکان انتخاب را از دست می دهند و برای انجام آزمایشها ناگزیر از خرید کیت قابل دسترس در بازار هستند. این مطلب به ویژه در مورد آزمایشگاههای تشخیص پزشکی صدق می کند. بدیهی است تحت این شرایط نه تنها مقایسه میزانهای ابتلا در سطح ملی تقریباً ناممکن می باشد بلکه حتی پایش وضعیت بیمار در یک آزمایشگاه نیز بسیار مشکل خواهد بود.

در این مطالعه به منظور چیرگی بر این مشکلات و ارزیابی کیت های RIA و CBPA مربوط به کارخانه DRG، که در بسیاری از آزمایشگاههای تشخیصی در ایران به کار گرفته می شوند، یک روش HPLC با به کار گیری آشکار ساز فرابنفش ultraviolet (UV) detector راه اندازی گردید. شرایط متفاوت ستون، رسوب دهی پروتئین ها، فاز متحرک، میزان جریان و دمای ستون به بوتله آزمایش گذارده شد و نهایتاً روشی قابل قبول به دست آمد. این روش، نسبتاً ساده و بر خلاف دو روش ایمنی - سنجی، توانایی شناسایی جداگانه کوله کلسیفرول D_3 (OH) 25 و ارگوکلسیفرول D_2 (OH) 25 را دارا می باشد.

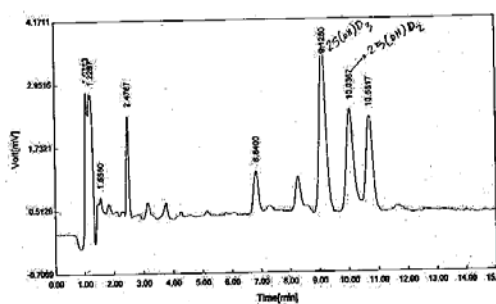
روش کار:

این مطالعه، یک مطالعه تجربی آزمایشگاهی است. برای راه اندازی روش از یک نمونه سرم آمیخته pooled serum استفاده شد. به طور خلاصه، ابتدا پروتئین های سرم با اتانل و سپس آمیزه ای از متانل: ایزوپروپانل رسوب داده و سپس D_2 (OH) 25 و D_3 (OH) 25 در دو مرحله

استفاده شد. برای تعیین همبستگی ها رابطه پیرسون به کار گرفته شد. برای ارزیابی میزان همخوانی میان روشهای گوناگون از آنالیز بلند-آلتمن (۱۲) استفاده شد. در این مطالعه اختلافها در صورت $p < 0.05$ ، معنی دار به شمار آمدند. همه آنالیزهای آماری با نرم افزار Windows/SPSS 11.5 انجام پذیرفت.

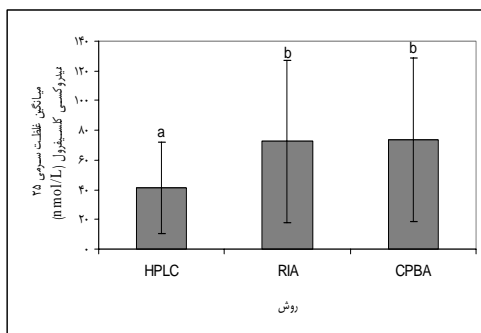
نتایج:

در روش HPLC زمان بازداری retention time برای $25(OH)D_2$ و $25(OH)D_3$ به ترتیب ۹/۵ و ۱۰/۷ دقیقه به دست آمد (شکل ۱).



شکل ۱: کروماتوگرام $25(OH)D_2$ و $25(OH)D_3$ در نمونه سرم غنی شده

منحنیهای استاندارد $25(OH)D_2$ و $25(OH)D_3$ هر دو تا غلظت نهایی، خطی بود. حد آشکارسازی برای هر دو ویتامین $12/5 \text{ nmol/L}$ بود. میانگین و انحراف معیار درصد بازیافت برای $25(OH)D_2$ و $25(OH)D_3$ در آزمایش های متعدد به ترتیب $5/6 \pm 1/01$ و $5/4 \pm 1/008$ به دست آمد. تغییرات درون و میان سنجشی برای $25(OH)D_3$ به ترتیب $1/8/1$ و $1/12/6$ بود. تغییرات میان سنجشی در روش RIA بین $11-2\%$ و در روش CPBA $11-8\%$ به دست آمد. دو روش RIA ($p=0/02$) و CPBA ($p=0/019$) نتایج بالاتری را نسبت به HPLC به دست دادند (شکل ۲).



شکل ۲: مقایسه میانگین سطوح سرمی $25(OH)D_3$ در ۹۰ داوطلب (۴۸ زن و ۴۲ مرد) $40/5 \pm 13/9$ ساله به سه روش متفاوت. حروف لاتین متفاوت بالای ستونها نشاندهنده اختلاف معنی دار هستند.

نمونه ها با استفاده از نرم افزار Autochro 2000 محاسبه شد. آزمونهای کنترل کیفی: به منظور تعیین اعتبار روش، ارزیابی های زیر انجام شد.

الف) دامنه خطی بودن range of linearity: با توجه به اینکه دامنه طبیعی (مطلوب) $25(OH)D_3$ (شامل هر دو ویتامین D_2 و D_3) $175-80 \text{ nmol/L}$ گزارش شده است (۱۱) منحنی های استاندارد برای $25(OH)D_3$ تا غلظت 375 nmol/L و برای $25(OH)D_2$ تا غلظت $187/5$ تهیه شد. منحنی های استاندارد هر دو ویتامین در دامنه مورد آزمایش، خطی بود.

ب) حد آشکار سازی detection limit: حد آشکار سازی با رقیق سازی متوالی کمترین غلظت بکار رفته برای تهیه منحنی استاندارد که دارای اوج (پیک) قابل تشخیص باشد، تعیین گردید.

ج) درصد بازیافت recovery percent: درصد بازیافت برای $25(OH)D_3$ با افزایش استاندارد $57/5 \text{ nmol/L}$ به سرم و برای $25(OH)D_2$ با افزایش استاندارد $28/75 \text{ nmol/L}$ به سرم و پس از تزریق $20 \mu\text{L}$ از هر کدام به ستون، محاسبه شد.

د) دقت (precision): برای تعیین تکرار پذیری آزمایش، با آزمایش مکرر یک نمونه واحد سرم آمیخته در یک روز و در روزهای متوالی به ترتیب تغییرات درون- و میان-سنجشی Intra-and inter-assay variation تعیین شد.

ارزیابی وضع ویتامین D: به منظور ارزیابی روش، غلظت سرمی $25(OH)D_3$ نمونه از دو جنس (۴۸ زن و ۴۲ مرد) $40/5 \pm 13/9$ ساله با سه روش متفاوت تعیین شد.

هدف مطالعه برای تمام افراد نمونه شرح داده و رضایت نامه کتبی گرفته شد. سپس از هر فرد ۵ میلی لیتر نمونه خون سیاهرگی غیرناشتا گرفته شد و پس از یک ساعت در 2500 g در دمای معمولی سانتریفوژ و سرم آنها جدا و در فریزر -70°C تا روز آزمایش نگهداری شد. غلظت سرمی $25(OH)D_2$ با سه روش HPLC، RIA و CPBA اندازه گیری گردید. دو روش آخر با کیت های تجاری DRG (اتریش) که در بسیاری از آزمایشگاه های تشخیصی ایران استفاده می شوند، انجام شد.

RIA و CPBA: برای انجام آزمایش طبق دستور العمل کارخانه سازنده (DRG, Austria) عمل شد.

آنالیز آماری: میانگین داده های سه گروه با آزمون آنالیز واریانس مقایسه گردید و در صورت معنی دار بودن برای تعیین اختلاف های معنی دار بین هر دو گروه از آزمون توکی

تکنیکهای مختلفی بر مبنای روش HPLC با استفاده از انواع ستونها و ویژگیهای اجرایی گوناگون ابداع شده اند (۱۸-۱۳، ۶، ۷). روش معرفی شده در این مطالعه قابل اعتماد، نسبتاً ساده و حتی مقرون به صرفه تر از کیتهای تجارتي است. مسأله مقرون به صرفه بودن روشهای HPLC برای ارزیابی وضع 25(OH)D سرم توسط دیگر پژوهشگران به تفصیل مورد بحث قرار گرفته است (۷). از جمله ویژگیهای روش کنونی عدم نیاز به استخراج با فاز جامد (SPE) solid phase extraction و به کارگیری شرایط ایزوکراتیک و فاز معکوس می باشد. هرچند چنین شرایطی توسط برخی از دیگر پژوهشگران نیز گزارش شده است (۷) زمان بازداری نسبتاً طولانی داشته اند (حدود ۲۱ دقیقه). پژوهشگران دیگری توانستند بر این مشکل غلبه کنند و زمان بازداری را به حدود ۶-۷ دقیقه (۱۷، ۱۸) و حتی حجم نمونه مورد نیاز را به ۲۰ μL کاهش دهند (۱۸) منتهی روش ایشان مستلزم به کارگیری آشکارساز پیچیده طیف سنج جرمی (LC-MS/MS) tandem mass spectrometry می باشد که اولاً بسیار گران است و لذا نه در آزمایشگاههای تشخیصی و نه حتی در بسیاری از مراکز پژوهشی در ایران در دسترس نیست و ثانیاً به پرسنل بسیار زبده ای نیاز دارد. از سویی دیگر به تازگی گزارش شده است که آشکارسازهای رایج می توانند به اندازه LC-MS/MS در اندازه گیری 25(OH)D سرم درستی و دقت داشته باشند (۶). در روش معرفی شده در این مطالعه، هرچند زمان بازداری نسبتاً کوتاه است (۱۱-۹/۵ دقیقه)، هنوز به حجم نسبتاً بالایی از نمونه برای آزمایش نیاز می باشد (۵۰۰ μL) که ممکن است به کارگیری آن را به ویژه در کودکان (به خصوص اگر قرار باشد در مطالعه ای تعداد نسبتاً زیادی آزمون بر روی یک نمونه انجام گیرد) محدود سازد. چندی است که روش آشکارسازی نیمه خودکار کمیلومینسنت (chemiluminescent) همراه با نمونه پرداز خودکار (automated sample preparation) نیز با دقت بالا برای اندازه گیری سطوح سرمی 25(OH)D و 1,25(OH)2D معرفی شده است. این روش هرچند ممکن است برای آزمایشگاههای تشخیصی و یا برای مطالعات غربالگری به کار آید، به هیچ وجه جایگزین HPLC نشده است و HPLC همچنان روش استاندارد برای اندازه گیری ویتامین D خون به شمار می آید (۱۹).

یافته های مطالعه کنونی مؤید گزارش های دیگر

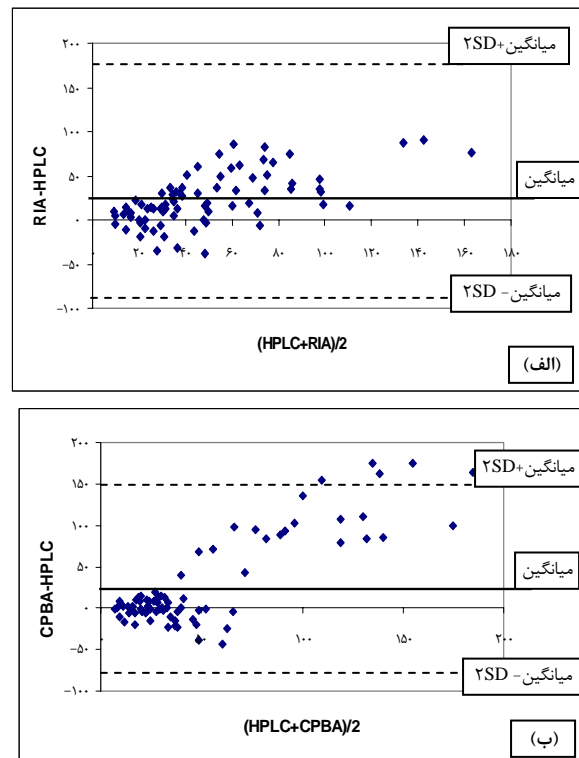
نتایج به دست آمده از هر سه روش ارتباط مستقیم معنی داری را با یکدیگر نشان دادند. قویترین ارتباط بین HPLC و RIA به دست آمد و آنالیز بلند-آلتمن نیز مؤید این یافته بود (شکل ۳، الف). در این حال همبستگی میان سه روش HPLC (X) و RIA (Y_1) و CPBA (Y_2) به شکل زیر دیده شد:

$$Y_1 = 2/2273X - 19/475, R = 0/8783$$

$$Y_2 = 1/6729X - 4/1882, R = 0/7510$$

$$Y_1 = 0/8132 Y_2 + 12/945, R = 0/7142$$

روش CPBA همخوانی خوبی با HPLC نشان نداد (شکل ۳، ب). از سویی دیگر هرچند میانگین اختلاف نتایج دو روش RIA و CPBA بسیار پایین بود (۰/۷۵)، با این حال درصد قابل توجهی از نتایج همخوانی نداشتند (اطلاعات نشان داده نشده اند).



شکل ۳: ارزیابی همخوانی روشهای اندازه گیری ۲۵-هیدروکسی کلسیفرول سرم انسان (الف) HPLC و RIA و (ب) HPLC و CPBA.

بحث:

روشهایی که در ایران برای اندازه گیری غلظت سرمی 25(OH)D به کار می روند، عموماً CPBA و RIA می باشند و گزارش شده است که این هر دو روش به درجاتی خطا دارند (۵). روش HPLC روش استاندارد برای سنجش سطوح خونی ویتامین D شناخته شده است (۴). تاکنون

منابع:

- Giovannucci E, Liu Y, Rimm EB, Hollis BW, Fuchs CS, Stampfer MJ, Willett WC. Prospective study of predictors of vitamin D status and cancer incidence and mortality in men. *J Natl Cancer Inst.* 2006;98:451-9.
- Pothiwala P, Evans EM, Chapman-Novakofski KM. Ethnic Variation in Risk for Osteoporosis among Women: A Review of Biological and Behavioral Factors. *J Womens Health (Larchmt).* 2006;15:709-19.
- Burleigh E, Potter J. Vitamin D deficiency in outpatients:--a Scottish perspective. *Scott Med J* 2006 May;51(2):27-31.
- Hollis BW. Editorial: The determination of circulating 25-hydroxyvitamin D: no easy task. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89: 3149-51.
- Lips P, Chapuy MC, Dawson-Hughes B, Pols HA, Holick MF. An international comparison of serum 25-hydroxyvitamin D measurements. *Osteoporos Int* 1999;9:394-7.
- Lensmeyer GL, Wiebe DA, Binkley N, Drzner MK. HPLC method for 25-hydroxyvitamin D measurement: comparison with contemporary assays. *Clin Chem* 2006;52: 1120-6.
- Turpeinen U, Hohenthal U, Stenman UH. Determination of 25-hydroxyvitamin D in serum by HPLC and immunoassay. *Clin Chem* 2003;49:1521-4.
- Hollis BW. Comparison of commercially available 125I-based RIA methods for the determination of circulating 25-hydroxyvitamin D. *Clin Chem* 2000;46:1657-61.
- Moussavi M, Heidarpour R, Aminorroaya A, Pournaghshband Z, Amini M. Prevalence of vitamin D deficiency in Isfahani high school students in 2004. *Horm Res* 2005; 64(3): 144-8.
- Hashemipour S, Larijani B, Adibi H, Sedaghat M, Pajouhi M, Bastan-Hagh MH, et al. The status of biochemical parameters in varying degrees of vitamin D deficiency. *J Bone Miner Metab.* 2006;24:213-8.
- Bringham FR, Demay MB, Krane SM, Kronenberg HM. Bone and mineral metabolism in health and disease. In: Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL (eds.). *Harrison's principles of internal medicine.* 16th ed. New York: McGraw-Hill 2005:2248.
- Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;i:307-10.
- Hollis BW. Detection of vitamin D and its major metabolites. In: Feldman D, Glorieux FH, Pike JW. *Vitamin D.* San Diego: Academic Press, 1997:587-606.

پژوهشگران در خصوص عدم کارایی روشهای RIA (۲۰) و CPBA (۱۹) در شناسایی حالات کمبود ویتامین D می باشند. تغییرات دوره ای بازار ایران نیز خود مزید بر علت است چه در این حال امکان دارد کیت‌های کارخانه‌های متفاوتی در دسترس باشند و بسیاری از آزمایشگاه‌های تشخیصی و گاه حتی پژوهشی ناگزیر از خرید آنها برای انجام آزمایش‌های خود هستند. بدیهی است در چنین شرایطی مقایسه میزانه‌های ابتلا نه تنها در سطح بین‌المللی که حتی در سطح ملی نیز چندان میسر نخواهد بود.

با توجه به نتایج چند مطالعه ای که در ایران انجام پذیرفته اند و حتی با روش‌های ایمنی سنجی نیز شیوع درجات مختلف کمبود ویتامین D را بسیار بالا (بالغ بر ۵۰٪) گزارش کرده اند (۹،۱۰)، لزوم اجرای برنامه‌های مداخله ای، به ویژه غنی‌سازی، به خوبی احساس می‌شود. در این حال در صورتی که از ارگوکلسیفرول برای غنی‌سازی استفاده شود و یا اگر در مناطقی این ویتامین از طریق جیره غذایی دریافت گردد، ارزیابی تاثیر برنامه‌های مداخله ای و وضعیت ویتامین D افراد با روش‌های ایمنی-سنجی ممکن است نتایج قابل اعتمادی را به دست ندهد. مسأله اضافه برآورد کردن over-estimation غلظت سرمی $25(OH)D_3$ در روش‌های RIA و CPBA و ناتوانی این روش‌ها در شناسایی $25(OH)D_2$ توسط دیگر پژوهشگران نیز گزارش گردیده است (۲۱،۲۲). بدیهی است روش‌های ایمنی سنجی نیز مانند هر روش آزمایشگاهی دیگری به درجاتی از زبستگی و تجربه نیاز دارد در غیر این صورت دامنه تغییرات نتایج حاصله ممکن است بسیار وسیع باشد (۲۳).

نتیجه نهایی:

روش HPLC معرفی شده در این مطالعه برای اندازه‌گیری سطوح سرمی $25(OH)D$ ، روشی است قابل اعتماد و نسبتاً سریع با این مزیت بر روش‌های CPBA و RIA که توانایی شناسایی افتراقی $25(OH)D_2$ و $25(OH)D_3$ را نیز دارد.

سپاسگزاری:

این پژوهش با بودجه انستیتو تحقیقات تغذیه ای و صنایع غذایی کشور انجام گردید. بدین وسیله از معاونت پژوهشی و دیگر همکاران آن مرکز و نیز از کلیه افرادی که با اهدای مقداری از خون خود موجبات انجام این پژوهش را فراهم آوردند، سپاسگزاری می‌شود.

14. Askens L. Simultaneous determination of retinol, α -tocopherol, and 25-hydroxyvitamin D3 in human serum by high-performance liquid chromatography. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1994;18:339-43.
15. Shimada K, Mitamura K, Kitama N, Kawasaki M. Determination of 25-hydroxyvitamin D3 in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr* 1997; 689:400-14.
16. Alvarez JC, De Mazancourt P. Rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of retinol, α -tocopherol, 25-hydroxyvitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D2 in human plasma with photodiode array ultraviolet detection. *J Chromatogr* 2001; 755: 129-35.
17. Higashi T, Awada D, Shimada K. Simultaneous determination of 25-hydroxyvitamin D2 and 25-hydroxyvitamin D3 in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry employing derivatization with a Cookson-type reagent. *Biol Pharm Bull* 2001;24:738-43.
18. Saenger AK, Laha TJ, Bremner DE, Sadrzadeh SM. Quantification of serum 25-hydroxyvitamin D(2) and D(3) using HPLC-tandem mass spectrometry and examination of reference intervals for diagnosis of vitamin D deficiency. *Am J Clin Pathol*. 2006; 125:914-20.
19. Hollis BW, Horst RL. The assessment of circulating 25(OH)D and 1,25(OH)2D: where we are and where we are going. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007;103:473-6.
20. Vieth R, Chan A, Pollard A. 125I-RIA kit cannot distinguish vitamin D deficiency as well as a more specific assay for 25-hydroxyvitamin D. *Clin Biochem* 1995;28:175-9.
21. Glendenning P, Taranto M, Noble JM, Musk AA, Hammond C, Goldswain PR, et al. Current assays overestimate 25-hydroxyvitamin D3 and underestimate 25-hydroxyvitamin D2 compared with HPLC: need for assay-specific decision limits and metabolite-specific assays. *Ann Clin Biochem* 2006;43:23-30.
22. Foo LH, Fraser DR, Greenfield H, Trube A, Simpson JM. Determination of 25-hydroxyvitamin D by competitive protein-binding assay and 125I-based radioimmunoassay method: a validation study. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2004;13(Suppl):S151.
23. Binkley N, Kueger D, Cowgill CS, Plum L, Lake E, Hansen KE, DeLuca HF, Drezner MK. Assay variation confounds the diagnosis of hypovitaminosis D: a call for standardization. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:3152-7.