مقاله پژوهشی

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 ایـران، ارزیـابی صـحیح وضـعیت ایـن ویتـامین بـرای مقاصد بالینی، پژوهشی و بهداشتی اهمیت به سزایی دارد. غلظت سرمی ۲۵-هیدروکسی D (25 (OH)D)، به عنوان نماگر معتبر وضعیت ویتامین D پذیرفته شده است. سنجشهای مبتنـی بـر کروماـتوگرافی مـایع بـا کـارایی بـالا (HPLC)، روشـهای اسـتاندارد اندازه گیری 25(OH)D به شمار می آیند. هدف از انجام این مطالعه راه اندازی یک روش معتبر و نسبتاً سـاده مبتنـی بـر 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 سـپس آمیـزۀ متانـل: ایزوپروپانـل (۹۰:۱۰، حجمـی) رسـوب داده و سـپس ۲۵-هیدروکسی کلسیفرول به کمک فاز آلی هگزان، استخراج شد. هگزان تحت گاز ازت تبخیر و رسوب حاصله در متانـل حـل شـد و پس از فیلتراسیون،نهایتاً ۲۰ µL از محلول صاف شده به ستون Teknochroma tracer excel 150×4, 3µm تزریق و کروماـتوگرافی با فاز متحرک متانل: آب (۸۵:۱۵، حجمی) حاوی ۰/۰۱ درصد BHT و دمای ستون ٤٠ $^{\circ}C$ انجام شد. این روش قـادر بـه شناسـایی افتراقی $25(OH)D_3$ و $25(OH)D_2$ در طول موج ۲۶۵ nm بود. نتایج حاصل از آزمایش ۹۰ نمونۀ سرم انسانی با این روش، با نتـایج دو روش رایج پرتو-ایمنی سنجی (RIA) و واکنش رقابتی پیوند به پروتئین (*CPBA*) مقایسه گردید. درجۀ همخوانی نتایج این سه روش با استفاده از تعیین ضریب همبستگی و آنالیز بلند-آلتمن ارزیابی شد.

نتایج: زمان بازداری برای $25(OH)D_3$ و $25(OH)D_2$ به ترتیب ۹/۵ و ۱۰/۷ دقیقه بـه دسـت آمـد. منحنـی هـای اسـتاندارد بـرای 25 (OH) D3 تا غلظت ۳۷۵ nmol/L و برای $25 (OH)D_2$ تا غلظت ۱۸۷/۵ nmol/L خطی بود. حد آشکار سازی برای هر دو ویتامر ۱۲/۵ nmol/L بود. درصد بازیافت برای $25(OH)D_3$ و $25(OH)D_2$ در آزمایش های متعدد به ترتیب ۵/۶ ± ۱۰۱ ٪ و ٤/۵ ± ۱۰۰/۸ ٪ به دست آمد. تغییرات درون و میان سنجشی بـرای 25(OH)D3 بـه ترتیـب ۸/۱٪ و ۱۲/۶٪ بـود. دو روش RIA و CPBA نتـایج بالاتری نسبت به HPLC به دست دادند (p=۰/۰۲). روش RIA در مقایسه با CPBA همخوانی بیشتری را با HPLC نشان داد.

نتیجه‌نهایی: روش HPLC معرفی شده در این مطالعه برای اندازه گیری سطوح سرمی 25(OH)D، روشـی اسـت قابـل اعتمـاد و نسبتاً سریع با این مزیت که توانایی شناسایی افتراقی $25(OH)D_2$ و $25(OH)D_3$ را نیز دارد.

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

مقدمه :

ارزیابی وضعیت ویتامین D هم از نظر تغذیه ای و هم از نظـر متـابولیکی اهمیـت بـسزایی دارد. غلظـت سـرمی ۲۵-هیدروکسی D (25 (OH)D)، به عنوان نماگر معتبـر وضعیت ویتامین D پذیرفتـه شـده اسـت(۳-۱). در عـین حـال انـدازه گیـری D (OH) 25 سـرم چنـدان سـاده نیست(۴). روشـهای رایـج عمـدتاً شـامل واکـنش رقـابتی اتصال به پـروتئین competitive protein binding assay

* پژوهشگر انستیتو تحقیقات تغذیه ای و صنایع غذایی کشور دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی(tneyestani@nnftri.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

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

شیوع کمبود ویتامین D در قسمت های مختلف ایران از ۴۶/۲٪ در دانش آموزان دبیرستانی اصفهان(۹) تا ۷۹/۶٪ 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 وخیم 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 مقایسهٔ 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 کیتهای RIA و CBPA مربوط به کارخانهٔ DRG، که در بسیاری از آزمایشگاههای تشخیصی در ایران به کار گرفته می شوند، یک روش HPLC با به کار گیری آشکارساز فرابنفش ultraviolet (UV) detector راه اندازی گردید. شرایط متفاوت ستون، رسوب دهی پروتئین ها، فازمتحرک، میزان جریان و دمای ستون به بوتهٔ ازمایش گذارده شد و نهایتاً روشی قابل قبول به دست آمد. این روش، نسبتاً ساده و بر خلاف دو روش ایمنی ـ سنجی، توانایی شناسایی جداگانهٔ کوله کلسیفرول D3 (OH) 25 و ارگوکلسیفرول D2 (OH) 25 را دارا می باشد.

روش کار:

این مطالعه، یک مطالعهٔ تجربی آزمایشگاهی است. برای راه اندازی روش از یک نمونهٔ سرم آمیخته pooled serum استفاده شد. به طور خلاصه، ابتدا پروتئین های سرم با اتانل وسپس آمیزه ای از متانل: ایزوپروپانل رسوب داده و سپس D_2 (OH) 25 و D_3 (OH) 25 در دو مرحله توسط هگزان استخراج شد. فاز آلی در دمای C ۴۰° 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 درجهٔ خلوص HPLC (Romil, UK)، هیدروکسی تولوئن بوتیله (Merck) (BHT) 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 کنندهٔ ستون (همگی از Young Lin, South Korea)، ستون Teknochroma tracer excel 150×4, 3µm و چاپگر، دستگاه گاما کانتر (GenII,Genesys, USA)، دستگاه قرائتگر الیزا (plate reader, StatFax 3200, Awareness, USA)

آماده سازی نمونه : به µL ۵۰۰ سرم µL ۲۵ اتانل افزوده و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس µL ۵۰۰ متانل: ایزوپروپانل (۹۰:۱۰، 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 سانتریفیگاسیون در g ۱۵۰۰، فاز رویی به لولهٔ دیگر منتقل گردید (مرحله استخراج با هگزان دوباره تکرار شد). هگزان تحت گاز ازت تبخیر و رسوب حاصله در µL ۱۲۵ متانل حل شد و سپس به منظور حذف ذرات معلق از فیلتر (۴ mm، ۰/۴۵ µm) عبور داده شد. µL ۲۰ از این محلول به ستون تزریق شد. در ابتدا از ۱۹-نور تستوسترون (ناندرولون) دکانوات با غلظت nmol/L ۴۳۳ به عنوان استاندارد داخلی استفاده شد منتهی به دلیل زمان بازداری نسبتاً بالای این ماده، زمان کلی آزمایش طولانی شد (شکل ۲). با تکرار مرحلهٔ 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 150×4, 3µm، میزان جریان mL/min ۱/۲، فشار PSA ۲۹۰۰، فاز متحرک متشکل از متانل: آب (۸۵:۱۵، حجمی) حاوی ۰/۰۱ درصد BHT، طول موج آشکار ساز nm ۲۶۵، دمای ستون C°40 حجم تزریق µL ۲۰، غلظت

نمونه ها با استفاده از نرم افزار Autochro 2000 محاسبه شد.

آزمونهای کنتـرل کیفـی: بـه منظـور تعیـین اعتبـار روش، ارزیابی های زیر انجام شد.

الف) دامنهٔ خطی بودن range of linearity : با توجه بـه اینکـه دامنهٔ طبیعی (مطلوب) D (OH) 25 (شامل هر دو ویتامر D_2 و D_3) ۱۷۵-۸۰ nmol/L گـزارش شـده اسـت(۱۱) منحنـی هـای اسـتاندارد بـرای D_3 (OH) 25 تـا غلظـت ۳۷۵ nmol/L و بـرای D_2(OH) 25 تـا غلظـت nmol/L ۱۸۷/۵ تهیه شد. منحنی های استاندارد هـر دو ویتـامر در دامنهٔ مورد آزمایش، خطی بود.

ب) حد آشکار سازی detection limit: حـد آشـکار سـازی بـا رقیق سازی متوالی کمترین غلظت بکار رفتـه بـرای تهیـه منحنـی اسـتاندارد کـه دارای اوج (پیـک peak) قابـل تشخیص باشد، تعیین گردید.

ج) درصد بازیافـت recovery percent: درصـد بازیافـت بـرای $25(OH)D_3$ با افزایش استاندارد nmol/L ۵۷/۵ به سرم و برای $25(OH)D_2$ با افزایش استاندارد nmol/L ۲۸/۷۵ به سرم و پس از تزریق µL ۲۰ از هر کدام به ستون، محاسبه شد.

د) دقت (precision) : برای تعیین تکرار پذیری آزمـایش، بـا آزمایش مکرر یک نمونه واحد سرم آمیختـه در یـک روز و در روزهای متـوالی بـه ترتیـب تغییـرات درون- و میـان-سنجشی Intra-and inter-assay variation تعیین شد.

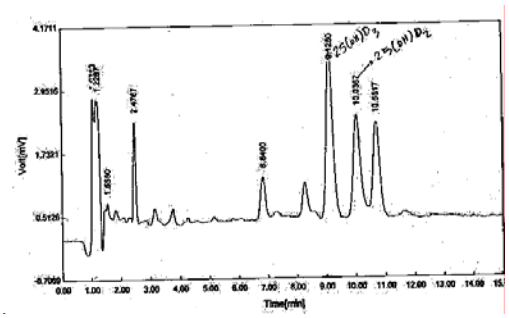
ارزیابی وضع ویتامین D: بـه منظـور ارزیـابی روش، غلظـت سرمی D (OH) 25 ۹۰ نمونـه از دو جـنس (۴۸ زن و ۴۲ مرد) ۱۳/۹ ± ۴۰/۵ ساله با سه روش متفاوت تعیین شد. هدف مطالعه برای تمام افراد نمونـه شـرح داده و رضـایت نامهٔ کتبی گرفته شد. سپس از هر فرد ۵ میلی لیتر نمونـهٔ خون سیاهرگی غیرناشتا گرفته شد و پس از یـک سـاعت در g ۲۵۰۰ در دمای معمولی سانتریفوژ و سرم آنها جدا و در فریزر C °۷۰- تا روز آزمایش نگاهـداری شـد. غلظـت سرمی D_2(OH) 25 بـا سـه روش HPLC، RIA و CPBA اندازه گیری گردید. دو روش آخر با کیتهای تجارتی DRG (اتریش) که در بسیاری از آزمایشگاههای تشخیصی ایـران استفاده می شوند، انجام شد.

RIA و CPBA: بـرای انجـام آزمـایش طبـق دسـتور العمـل کارخانهٔ سازنده (DRG, Austria) عمل شد.

آنالیز آماری: میانگین داده های سه گروه بـا آزمـون آنـالیز واریانس مقایسه گردید و در صورت معنی دار بـودن بـرای تعیین اختلافهای معنی دار بین هر دو گروه از آزمون توکی استفاده شد. برای تعیین همبستگی ها رابطهٔ پیرسـون بـه کار گرفته شد. برای ارزیابی میزان همخوانی میان روشهای گوناگون از آنالیز بلند-آلتمن (۱۲) اسـتفاده شـد. در ایـن مطالعه اختلافها در صورت $p<۰/۰۵$، معنی دار به شمار آمدند. همهٔ آنالیزهای آماری با نرم افـزار Windows/SPSS 11.5 انجام پذیرفت.

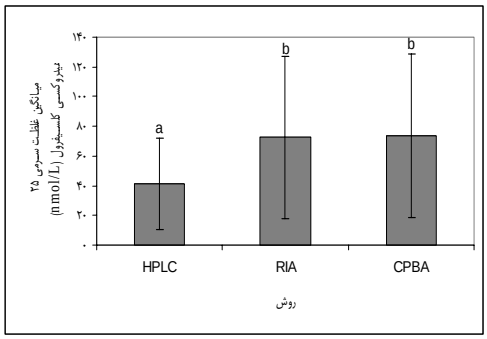
نتایج :

در روش HPLC **ز**مان بازداری retention time بـرای 25(OH)D3 و 25(OH)D2 به ترتیـب ۹/۵ و ۱۰/۷ دقیقـه به دست آمد (شکل ۱).



شکل ۱: کروماتوگرام 25(OH)D3 و 25(OH)D2 در نمونهٔ سرم غنی شده

منحنیهای استاندارد $25(OH)D_3$ و $25(OH)D_2$ هـر دو تـا غلظت نهایی، خطی بود. حد آشکارسازی برای هردو ویتامر ۱۲/۵ nmol/L بود. میانگین و انحراف معیار درصد بازیافت برای $25(OH)D_3$ و $25(OH)D_2$ در آزمایش های متعدد به ترتیب۵/۶ ± ۱۰۱ ٪ و۵/۴ ± ۱۰۰/۸ ٪ به دست آمد. تغییرات درون و میان سنجشی برای $25(OH)D_3$ به ترتیب ۸/۱٪ و ۱۲/۶٪ بود. تغییـرات میـان سنجـشی در روش RIA بـین ۱۱-۲٪ و در روش CPBA ۱۱-۸٪ به دست آمد. دو روش RIA (p=۰/۰۲) و CPBA (p=۰/۰۱۹) نتـایج بـالاتری را نسبت به HPLC به دست دادند(شکل ۲).



شکل۲: مقایسهٔ میانگین سطوح سرمی 25(OH)D در ۹۰ داوطلب (۴۸ زن و ۴۲ مرد) ۱۳/۹ ± ۴۰/۵ ساله به سه روش متفاوت.

حروف لاتین متفاوت بالای ستونها نشاندهندهٔ اختلاف معنی دار هستند.

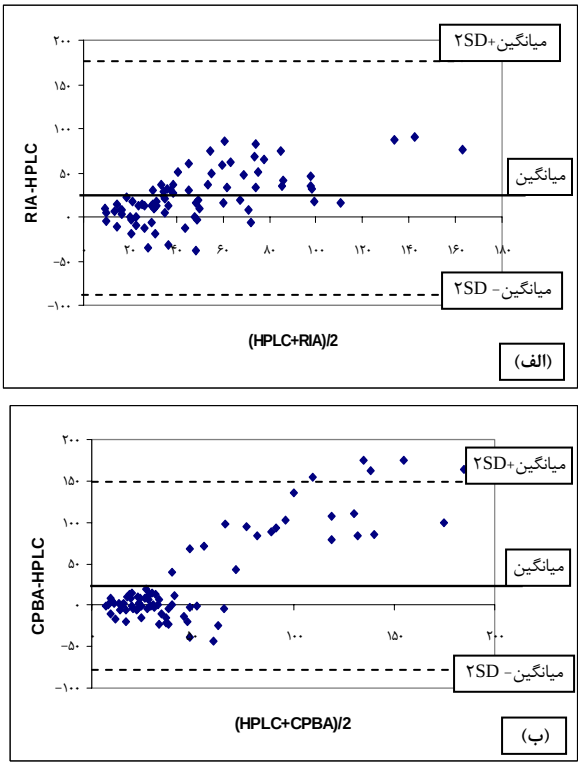
نتایج به دست آمده از هرسه روش ارتباط مستقیم معنی داری را با یکدیگر نشان دادند. قویترین ارتباط بین HPLC و RIA به دست آمد و آنالیز بلند-آلتمن نیز مؤید این یافته بود (شکل ۳، الف). در این حال همبستگی میان سه روش HPLC (X) و RIA (Y_1) و CPBA (Y_2) به شکل زیر دیده شد:

Y_1= ۲/۲۲۷۳X – ۱۹/۴۷۵, R = ۰/۸۷۸۳

Y_2 = ۱/۶۷۲۹X – ۴/۱۸۸۲, R = ۰/۷۵۱۰

Y_1 = ۰/۸۱۳۲ Y_2 + ۱۲/۹۴۵, R = ۰/۷۱۴۲

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 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 تجارتی است. مسالهٔ 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 solid phase extraction (SPE) 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 ۷-۶ دقیقه(۱۷،۱۸) و حتی حجم نمونهٔ مورد نیاز را به ۲۰ µL کاهش دهند(۱۸) منتهی روش ایشان مستلزم به کارگیری آشکارساز پیچیدهٔ طیف سنج جرمی tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) 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 اندازهٔ 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 برروی 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 مطالعهٔ کنونی مؤید گزارش های دیگر

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 کارخانه های 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 مقایسهٔ میزانهای ابتلا نه تنها در سطح بین المللی 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 برنامه های مداخله ای، به ویژه غنی سازی، به خوبی احساس می شود. در این حال در صورتی که از ارگوکلسیفرول برای غنی سازی استفاده شود و یا اگر در مناطقی این ویتامر از طریق جیرهٔ غذایی دریافت گردد، ارزیابی تاثیر برنامه های مداخله ای و وضعیت ویتامین D افراد با روشهای ایمنی-سنجی ممکن است نتایج قابل اعتمادی را به دست ندهد. مسالهٔ اضافه براورد کردن over-estimation غلظت سرمی $25(OH)D_3$ در روشهایRIA 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 زبدگی و تجربه نیاز دارد در غیر این صورت دامنهٔ تغییرات نتایج حاصله ممکن است بسیار وسیع باشد(۲۳).

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

منابع :

1. 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.
2. 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.
3. Burleigh E, Potter J. Vitamin D deficiency in outpatients:--a Scottish perspective. Scott Med J 2006 May;51(2):27-31.
4. Hollis BW. Editorial: The determination of circulating25-hydroxyvitamin D: no easy task. J Clin Endocrinol Metab 2004;89: 3149-51.
5. 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.
6. Lensmeyer GL, Wiebe DA, Binkley N, Drezner MK. HPLC method for 25-hydroxyvitamin D measurement: comparison with contemporary assays. Clin Chem 2006;52: 1120-6.
7. Turpeinen U, Hohenthal U, Stenman UH. Determination of 25-hydroxyvitmain D in serum by HPLC and immunoassay. Clin Chem 2003;49:1521-4.
8. Hollis BW. Comparison of commercially available 125I-based RIA methods for ther determination of circulating 25-hydroxyvitamin D. Clin Chem 2000;46:1657-61.
9. 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.
10. 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.
11. Bringhurst 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.
12. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. Lancet 1986;i:307-10.
13. 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.

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.