

Mata-Granados JM^{1,2,3}, Ferreiro-Verab C², Luque de Castro MD², Quesada Gómez JM^{1,3}

1 Departamento de I+D+i - Grupo Sanyres - Córdoba

2 Departamento de Química Analítica - Campus de Rabanales - Universidad de Córdoba - RETICEF - Córdoba

3 Unidad de Metabolismo Mineral - Hospital Reina Sofía - RETICEF - Córdoba

Determinación de los metabolitos principales de vitamina D en suero mediante extracción en fase sólida en línea con cromatografía líquida espectrometría de masas en tándem

Correspondencia: José Manuel Quesada Gómez - Unidad de Metabolismo Mineral - Hospital Reina Sofía - Avda. de Menendez Pidal, s/n - RETICEF - 14004 Córdoba
Correo electrónico: jmquesada@uco.es

Resumen

La determinación de metabolitos de vitamina D es muy importante en el metabolismo óseo, en enfermedades coronarias, cáncer, inmunología innata, etc. Desafortunadamente, la variabilidad entre los métodos para la determinación de los metabolitos de la vitamina D limita la capacidad de los clínicos para monitorizar el estado, la suplementación y la toxicidad de vitamina D.

En este trabajo se presenta un método automático para la determinación de los metabolitos más importantes de la vitamina D. Se inyectan 0,2 ml de suero en una plataforma XLC-MS/MS (*eXtraction Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry*) para ser limpiados y preconcentrados mediante extracción en fase sólida (SPE). Los analitos retenidos en el cartucho de SPE son eluidos directamente por la fase móvil cromatográfica que contiene un 10% de agua en metanol con 5 mM de formato amónico como agente ionizante a un flujo de 0,3 ml/min para la separación de los analitos y posterior detección mediante espectrometría de masas (MS/MS) triple cuádrupolo.

Los límites de detección oscilaron entre 3,5 y 8,2 pg/ml. Los coeficientes de variación oscilaron entre un 1,5 y 2,3% intra-ensayo en un mismo día y 2,5-3,9% inter-ensayo realizado durante una semana. La recuperación osciló entre 97 y 99,7% para todos los analitos. El tiempo total de análisis fue de 20 minutos. Por tanto, el método propuesto es robusto, barato y adecuado para su uso en laboratorios clínicos y de investigación.

Palabras clave: *Metabolitos de la vitamina D, Población sana, Deficiencia en vitamina D.*

Determining the principal metabolites of vitamin D in the blood through on-line solid phase extraction with liquid chromatography-mass spectrometry in tandem

Summary

The determination of metabolites of vitamin D is very important in bone metabolism, in coronary disease, cancer, innate immunology, etc. Unfortunately, variation in methods for determining the metabolites of vitamin D limits the ability of clinicians to monitor the status, supplementation and toxicity of vitamin D. In this work, an automatic method of determining the most important metabolites of vitamin D is presented. 0.2 ml of serum is injected into an XLC-MS/MS (eXtraction Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry) platform to be cleaned and preconcentrated through extraction in the solid phase (SPE). The analytes retained in the SPE cartridge are eluted directly by the mobile chromatographic phase containing 10% water in methanol, with 5 mM of ammonium formate as ionizing agent, at a flow of 0.3 ml/min for the separation of the analytes, and their later detection through triple quadrupole mass spectrometry (MS/MS).

The limits of detection varied between 3.5 and 8.2 pg/ml. The coefficients of variation within the trial varied between 1.5 and 2.3% during the same day, and between 2.5-3.9% over a week. The recuperation varied between 97 and 99.7% for all analytes. The total time taken for the analysis was 20 minutes. Thus, the proposed method is robust, cheap and appropriate for use in clinical and research laboratories.

Key words: *Metabolites of vitamin D, Healthy population, Deficiency in vitamin D.*

Introducción

La deficiencia en vitamina D constituye una de las situaciones carenciales más prevalentes en el mundo. Afecta a más de la mitad de la población: niños, jóvenes, adultos, mujeres postmenopáusicas y ancianos, en los cuales, si tienen fracturas osteoporóticas, la prevalencia de niveles bajos de vitamina D llega hasta el 100%. En España, pese a que su localización geográfica y climatológica facilita una adecuada insolación, se reproduce fielmente esta situación²³.

La deficiencia en vitamina D, además de su papel en la etiopatogenia y tratamiento del raquitismo u osteomalacia y osteoporosis, contribuye a múltiples patologías extra-esqueléticas^{1,2}. De hecho, la deficiencia en vitamina D se asocia con aumento del riesgo de padecer diabetes mellitus⁴, hipertensión arterial⁵, insuficiencia cardíaca⁶, enfermedad cardiovascular⁷, enfermedad arterial periférica, infarto agudo de miocardio⁸, cáncer⁹, así como del riesgo de padecer infecciones¹⁰, enfermedades autoinmunes e inflamatorias¹¹ y mortalidad^{12,13}. Además la toma de las dosis habituales en el tratamiento de la osteoporosis se asocia con una disminución en las tasas de mortalidad¹⁴. Todo lo cual ha aumentado el interés por el metabolismo del sistema endocrino de la vitamina D y la cuantificación de sus metabolitos más destacados.

El estado de la vitamina D está determinado por la concentración sérica de 25-hidroxivitamina D [25(OH)D]^{1,2}, que incluye la concentración de 25(OH)D₃ y 25(OH)D₂, aunque no está claro que

ambas tengan la misma actividad ni el mismo peso de la vitamina D₂ o D₃ en el mantenimiento del estado de 25(OH)D en humanos^{15,16}. Para su cuantificación se utilizan normalmente métodos basados en cromatografía líquida (LC)^{17,18}, en ensayo competitivo de proteínas por quimioluminiscencia¹⁹, en radioinmunoensayo de alta y baja frecuencia de muestreo^{20,21}, en métodos automáticos de quimioluminiscencia¹⁹ y en cromatografía líquida espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS)^{22,23}. Estos nuevos métodos han generado mucha controversia debido a que los estudios interlaboratorio realizados no han mostrado unos resultados concordantes entre los distintos métodos, ni entre sí los basados en inmunoensayo²⁴⁻²⁶.

La aplicación clínica de LC-MS/MS ha mejorado la selectividad en la determinación de 25(OH)D, aunque los coeficientes de variación siguen siendo altos (20%) entre los distintos laboratorios que la emplean debido a la inexistencia de procedimientos estandarizados para el análisis de vitamina D, ya que son métodos desarrollados y, generalmente, muy dependientes del operador. La puesta en marcha de medidas internacionales de estandarización que certifiquen la calidad de la metodología como la llevada a cabo por la DEQAS (*Vitamin D External Quality Assessment Scheme*)²⁷ ha puesto de manifiesto las diferencias en la determinación de vitamina y ha desarrollado medidas para la estandarización, como el uso de los mismo estándares para el calibrado del método²⁸.

Tabla 1. Método de extracción en fase sólida

	Caudal	Volumen	Solvente	Comentario
Nuevo cartucho				
Automuestreador				Carga muestra
Solvatación	5 mL/min	2 mL	Metanol	
Solvatación	5 mL/min	4 mL	30% ACN-0,2% FA	
Equilibración	0,4 mL/min	0,4 mL	30% ACN-0,2% FA	
Carga de muestra	0,4 mL/min	2 mL	30% ACN-0,2% FA	
Lavado	2 mL/min	4 mL	30% ACN	
Elución			Fase móvil	7 min
Limpieza tubos	5 ml/min	2 mL	Metanol	
Limpieza tubos	5 mL/min	2 mL	Agua	

La determinación de 1,25(OH)₂ dihidroxivitamina D₃ es necesaria en casos de insuficiencia renal, hipoparatiroidismo, pseudohipoparatiroidismo, cribado de hipercalcemia, etc. Dicha determinación es más complicada que la de 25(OH)D, debido a que la concentración es mucho más pequeña y su estabilidad menor. La mayoría de métodos usan I²⁵ como marcador en radioinmunoensayo después de un proceso de extracción. La similitud estructural entre los metabolitos de la vitamina D provoca que la especificidad del método esté siempre en entredicho, ya que no hay un estudio de interferencias robusto debido a la dificultad de encontrar un método de referencia. La LC-MS/MS se ha utilizado para la determinación de calcitriol, utilizando una precipitación de proteínas y extracción en fase sólida previa²⁹ y, recientemente, aplicando la derivación de Diels-Alder para mejorar la eficiencia de la ionización³⁰.

A pesar de que los métodos actuales basados en la LC-MS/MS proporcionan una alta sensibilidad y selectividad, se demanda una plataforma consistente, totalmente automatizada, que permita una alta frecuencia de muestreo, precisión y exactitud que haga innecesaria la presencia de operadores expertos. Desde la experiencia del grupo se cree que la plataforma adecuada es XLC-MS/MS (*eXtraction Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry*), ya que es un sistema cerrado que evita la pérdida de analitos, y es totalmente automática, por lo que proporciona unos coeficientes de variación bajos.

La presente investigación quiere rellenar este hueco mediante el desarrollo de un método automático basado en el acoplamiento en línea de extracción en fase sólida con cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem para determinar las vitaminas D₃ y D₂, los metabolitos 25-hidroxivitamina D₃ y D₂, 24,25(OH)₂ dihidroxivitamina D₃, y 1,25(OH)₂ dihidroxivitamina D₃, y su aplicación en suero de donantes de sangre.

Material y Método

Disolventes y estándares

El formato amónico, la 25-hidroxivitamina D₃, 25(OH)D₃ y las 25-hidroxivitamina D₂ (25(OH)D₂), vitamina D₂ y vitamina D₃, se obtuvieron de Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Las 1,25-dihidroxivitamina D₃ (1,25(OH)₂D₃) y 24,25-dihidroxivitamina D₃ (24,25(OH)₂D₃) fueron proporcionados por Roche (Basilea, Suiza). El metanol, el acetonitrilo y el ácido fórmico, se obtuvieron de Scharlau (Barcelona, España).

Las disoluciones de reserva se prepararon disolviendo una cantidad conocida de analitos (25(OH)D₂, 25(OH)D₃, vitamina D₃, vitamina D₂, 1,25(OH)₂D₃ y 24,25(OH)₂D₃) en metanol. A partir de las disoluciones de reserva se prepararon las disoluciones de trabajo por dilución de un volumen adecuado en metanol, calculando la concentración exacta por fotometría.

Instrumentación

La separación cromatográfica se efectuó en modo fase reversa con un cromatógrafo Agilent 1200 Series (Palo Alto, CA, USA) seguida por ionización *electrospray* (ESI) en modo positivo y la detección mediante espectrometría de masas en tándem (Agilent 6410 Triple cuádrupolo). Los análisis se procesaron mediante el programa informático *MassHunter Workstation Software* (Agilent) para análisis cualitativo y cuantitativo. El extractor en fase sólida automático empleado fue un sistema Prospekt2 (Spark Holland, Emmen, Holanda) y un automuestreador (Midas) con un bucle de muestra de 0,2 ml. El cartucho de extracción en fase sólida fue un Hysphere C18 (Spark Holland) de 10 x 2 mm. La columna analítica utilizada fue Synergi Hydro-RP (Phenomenex, Torrance, CA, USA) de 2,5 µm de tamaño de partícula, 100 x 2,0 mm.

La extracción de la sangre se efectuó mediante el proceso estándar. Una vez obtenido el suero

Tabla 2. Figuras de mérito. *Expresado como porcentaje de la desviación estándar relativa

Analito	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Coefficiente de correlación	Repetitividad* (%)	Reproducibilidad* (%)
24,25(OH) ₂ D ₃	0,055	0,184	0,9978	1,6	2,5
1,25(OH) ₂ D ₃	0,0035	0,012	0,9977	1,8	2,9
25(OH)D ₃	0,082	0,272	0,9987	1,5	3,1
25(OH)D ₂	0,080	0,267	0,9973	1,7	2,8
Vitamina D ₂	0,084	0,284	0,9943	2,3	3,9
Vitamina D ₃	0,085	0,281	0,9915	2,1	3,5

LOD: Límite de detección; LOQ: Límite de cuantificación

por centrifugado a 4° durante 10 minutos se alícuotó y congeló a -80° C hasta su uso.

Procedimiento

El automuestreador llena el bucle de muestra (0,2 ml) e inicia la secuencia de operaciones descritas en la Tabla 1. Básicamente, el proceso de extracción comienza con una preparación del cartucho mediante una activación de la fase estacionaria con metanol, acondicionamiento y equilibración con una disolución acuosa de 0,2% de ácido fórmico en un 30% de acetonitrilo. Con esta misma disolución, la muestra es arrastrada hacia el cartucho. En estas condiciones los analitos son retenidos en el absorbente contenido en el cartucho, y a continuación se usa un 30% de acetonitrilo como disolución de lavado de interferencias. Posteriormente, comienzan las etapas de elución y separación cromatográfica poniendo la fase móvil en contacto con el cartucho de extracción mediante el giro de una válvula. El tiempo de elución es de 7 minutos.

La fase móvil inicial era 5 mM de formato amónico contenido en 90% de metanol a un caudal de 0,3 ml/min. En el minuto 2 se programó un gradiente lineal en 5 minutos para obtener 5 mM de formato amónico en 100% de metanol. La temperatura de la columna fue de 15° C. El tiempo total de análisis fue de 20 minutos.

El eluido de la columna cromatográfica fue ionizado mediante ESI en modo positivo y monitorizado por MS/MS en modo de monitorización de reacciones múltiples (MRM). El flujo y la temperatura del gas (nitrógeno) de secado en el ESI fueron 13 l/min y 350° C, respectivamente. Mientras que presión del nebulizador fue de 35 psi y el voltaje del capilar de 4.000 V. El tiempo de barrido de cada transición de MS/MS fue de 50 minutos.

Resultados

El límite de detección (LOD) según la definición de la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) es la mínima cantidad de ana-

lito detectable y se calcula experimentalmente como la concentración que corresponde a 3 veces la desviación estándar de la señal del ruido calculado en 10 muestras. El límite de cuantificación (LOQ) según la IUPAC es la mínima cantidad cuantificable de analito, generalmente corresponde a la concentración más pequeña de la recta de calibrado y se calcula como la concentración que corresponde a una señal 10 veces la desviación estándar de la señal del ruido calculado en 10 muestras. Los valores individuales de dichos límites y los coeficientes de regresión se encuentran en la Tabla 2.

Evaluación de la precisión del método

Los coeficientes de variación intra- (repetitividad) e inter-ensayo (reproducibilidad) se calcularon durante siete días realizando dos medidas por día con replicas a un suero de concentración conocida³¹. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Evaluación de la exactitud del método

La exactitud del método y el efecto matriz se estudiaron utilizando muestras con y sin fortificar con disoluciones patrón. La recuperación fue calculada con dos configuraciones en el Prospekt2, una de doble cartucho para muestras sin fortificar y otra de un solo cartucho para muestras fortificadas³². Esto se hizo porque la recuperación puede no ser adecuada por dos motivos: uno por una mala retención en el cartucho del compuesto en estudio, que se ve en la configuración de doble cartucho porque lo que no se retiene en el primer cartucho lo hace en el segundo; el segundo motivo es una baja elución, que se puede probar mediante una muestra fortificada cuya concentración es conocida.

La recuperación en el sistema de doble cartucho se calcula como cantidad del primer cartucho/[cantidad en el cartucho 1+cantidad en el cartucho 2]. La configuración de un solo cartucho, se calcula como [concentración final- concentración inicial]/concentración añadida evaluada en una

única muestra en cinco repeticiones en un mismo día bajo idénticas condiciones. Se entiende que la concentración inicial es la concentración de analito presente en la muestra antes de añadir una cantidad conocida del mismo, es decir, la cantidad en una muestra blanco. Los resultados se encuentran en la Tabla 3.

Aplicación del método

Se analizaron muestras provenientes de 92 donantes de sangre. Un cromatograma representativo de una muestra fortificada con disoluciones estándares aparece en la Figura 1. No se detectan niveles de vitamina D₂, pero sí de vitamina D₃: $10,4 \pm 4,8$ ng/ml. Los niveles séricos de 25(OH)D ($21,3 \pm 5,7$ ng/ml) corresponden a la suma de 25(OH)D₂ y 25(OH)D₃. La participación de la 25(OH)D₂ al total de la 25(OH)D es 1,9 %. El 5% de la población estudiada tenían niveles séricos de 25(OH)D < 10 ng/mL, el 42% < 20 ng/ml, el 40% entre 20 y 30 ng/ml, y sólo un 18% fue > 30 ng/ml. Los niveles séricos de 24,25(OH)₂D₃ fueron $4,1 \pm 1,6$ ng/ml y de los de 1,25(OH)₂D₃ $48,2 \pm 11,4$ pg/ml.

Discusión

El análisis de la vitamina D y sus metabolitos representa un gran reto debido al alto carácter lipofílico de dichos compuestos, lo que condiciona que se encuentren fuertemente unidos a sus proteínas transportadoras; uniones que se deben romper para su análisis mediante cromatografía líquida. La limpieza de los extractos es fundamental, ya que otros lípidos endógenos van a co-extraerse con los metabolitos de la vitamina D, lo que provoca extractos sucios que pueden distorsionar la forma de los picos cromatográficos y acortar la vida de la columna. Se hace necesario el uso de sistemas selectivos y altamente sensibles como la espectrometría de masas para una cuantificación exacta. También resulta crítico el uso de un sistema cerrado, que evite la degradación de los metabolitos de la vitamina D por la luz. El avance en metodologías para

Figura 1. Cromatograma de una muestra de suero fortificada. (1) 24,25(OH)₂D₃; (2) 1,25(OH)₂D₃; (3) 25(OH)D₃; (4) 25(OH)D₂; (5) vitamina D₂, (6) vitamina D₃

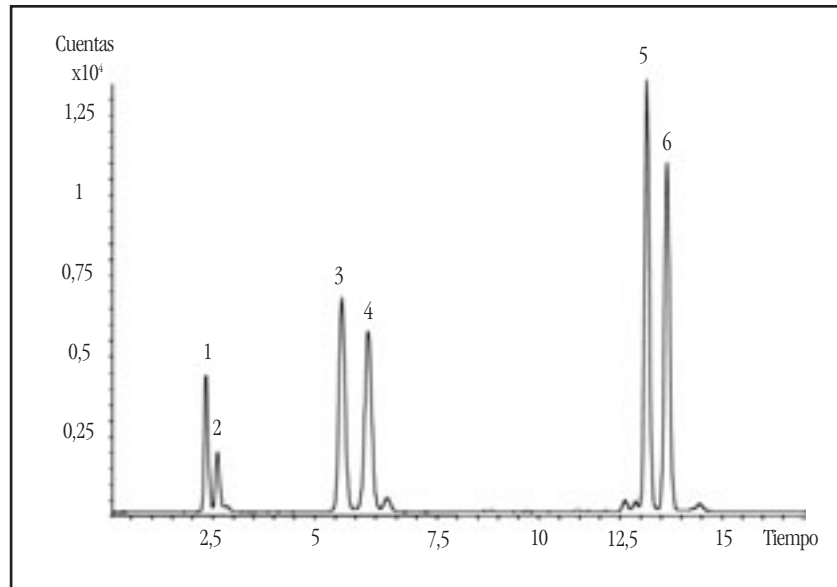


Tabla 3. Recuperación de cada analitos: (1) configuración de dos cartuchos, (2) configuración de un cartucho

Analito	Recuperación (1)	Recuperación (2)
24,25(OH) ₂ D ₃	97,0	96,5
1,25(OH) ₂ D ₃	100,2	99,5
25(OH)D ₃	99,8	99,3
25(OH)D ₂	98,9	99,0
Vitamina D ₂	99,1	99,4
Vitamina D ₃	98,3	98,4

asegurar la determinación de vitamina D no ha mejorado las variaciones previamente puestas de manifiesto en la medida de 25(OH)D^{24,25}.

La disparidad en los resultados afecta a todos los laboratorios con las mismas o con diferentes metodologías. El uso de métodos con bajo nivel de automatización provoca que la medida de vitamina D sea altamente dependiente del usuario y requiere un riguroso control de calidad para asegurar los resultados. Los métodos basados en RIA no son todos iguales, dando diferente especificidad para 25(OH)D₃ y 25(OH)D₂; por tanto, hay unos que sobreestiman niveles de 25(OH)D y otros que dan valores más bajos para alguno de los metabolitos^{26,33}.

La HPLC es comúnmente reconocida como técnica patrón oro para la determinación de metabolitos de vitamina D^{3,17,18,34}, pero tiene un elevado

coste de equipamiento y posee una baja frecuencia de muestreo debido a la obligatoria precipitación de proteínas y/o extracción líquido-líquido de los métodos previamente descritos, lo que ha dificultado su implantación en los laboratorios como técnica de rutina.

Los métodos existentes para la cuantificación de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ son laboriosos y consumen mucho tiempo; por tanto, se requieren métodos más rápidos, baratos y simples, y que reduzcan el riesgo para la salud asociado al uso de isótopos radiactivos. En estudios recientes, un kit EIA tenía una pobre correlación con un análisis típico por RIA³⁵. Kissmeyer y cols.²⁹ publicaron en 2001 un método mediante LC-MS/MS para determinar $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, pero el mismo requería 1-mL de suero, además de una precipitación previa de proteínas y una etapa de secado con corriente de nitrógeno y posterior reconstitución, lo que derivaba en una baja frecuencia de muestreo y en relativamente altos coeficientes de variación, porque todas las etapas de tratamiento de muestra previa al análisis cromatográfico eran manuales.

Como conclusiones, el método propuesto mejora a los existentes ya que permite determinar de forma rápida y automática la concentración de la vitaminas D_3 y D_2 , y los metabolitos $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $25(\text{OH})\text{D}_3$ y $25(\text{OH})\text{D}_2$ empleando una pequeña cantidad de suero, permitiendo tanto la investigación en la fisiología y fisiopatología del sistema endocrino de la vitamina D, como estudios clínicos de asociación o su utilización en la práctica habitual.

El uso de un sistema en línea para la extracción, permite que no se produzcan pérdidas de analitos por degradación, y la automatización total del proceso de análisis hace que se mejore la precisión y la exactitud y evita la necesidad de un usuario experto.

Por tanto el método propuesto es rápido, con una alta sensibilidad, exactitud y precisión. El mayor inconveniente que presenta es el elevado coste de la instrumentación utilizada, aunque la aplicación del método es barata.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Sanyres la financiación de la investigación y al centro regional de donación de sangre por su colaboración en la recogida de muestras. A laboratorios Roche por proporcionarnos amable y desinteresadamente los metabolitos $1,25$ dihidroxivitamina D_3 y $24,25$ dihidroxivitamina D_3 .

Bibliografía

- Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007;357:266-81.
- Quesada JM. Insuficiencia de calcifediol. Implicaciones para la salud. *Drugs of Today* 2009;(supl A):1-31.
- Mata-Granados JM, Luque de Castro MD, 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. *Clin Biochem* 2008;41:676-80.
- Danescu LG, Levy S, Levy J. Vitamin D and diabetes mellitus. *Endocrine* 2009;35:11-7.
- Forman JP, Giovannucci E, Holmes MD, Bischoff-Ferrari HA, Tworoger SS, Willett WC, et al. Plasma 25-hydroxyvitamin D levels and risk of incident hypertension. *Hypertension* 2007;49:1063-9.
- Pilz S, März W, Wellnitz B, Seelhorst U, Fahrleitner-Pammer A, Dimai HP, et al. Association of vitamin D deficiency with heart failure and sudden cardiac death in a large cross-sectional study of patients referred for coronary angiography. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:3927-35.
- Kendrick J, Targher G, Smits G, Chonchol M. 25-hydroxyvitamin D deficiency is independently associated with cardiovascular disease in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Atherosclerosis* 2009;205:255-60.
- Giovannucci E, Liu Y, Hollis BW, et al. 25-hydroxyvitamin D and risk of myocardial infarction in men: A prospective study. *Arch Intern Med* 2008;168:1174-80.
- Garland CF, Gorham ED, Mohr SB, Garland FC. Vitamin D for cancer prevention: global perspective. *Ann Epidemiol* 2009;19:468-83.
- Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 2006;311:1770-3.
- Arnson Y, Amital H, Shoenfeld Y. Vitamin D and autoimmunity: new aetiological and therapeutic considerations. *Ann Rheum Dis* 2007;66:1137-42.
- Dobnig H, Pilz S, Schrnagl H, Renner W, Seelhorst U, Wellnitz B, et al. Independent association of low serum 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin d levels with all-cause and cardiovascular mortality. *Arch Intern Med* 2008;168:1340-9.
- Ginde AA, Scragg R, Schwartz RS, Camargo CA Jr. Prospective study of serum 25-hydroxyvitamin d level, cardiovascular disease mortality, and all-cause mortality in older U.S. Adults. *Am Geriatr Soc* 2009;57:1595-603.
- Autier P, Gandini S. Vitamin D supplementation and total mortality: A metaanalysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med* 2007;167:1730-7.
- Armas LAG, Hollis B, Heaney RP. Vitamin D_2 is much less effective than vitamin D_3 in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:5387-91.
- Holick MF, Biancuzzo RM, Chen TC, Klein EK, Young A, Bibuld D, et al. Vitamin D_2 is as effective as vitamin D_3 in maintaining circulating concentrations of 25-hydroxyvitamin D. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:677-81.
- Álvarez JC, De Mazancourt PJ. Rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of retinol, alpha-tocopherol, 25-hydroxyvitamin D_3 and 25-hydroxyvitamin D_2 in human plasma with photodiode-array ultraviolet detection. *J Chromatogr B* 2001;755:129-35.
- 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.
- Roth HJ, Zahn I, Alkier R, Schmidt H. Validation of the first automated chemiluminescence protein-binding assay for the detection of 25-hydroxycalciferol. *Clin Lab* 2001;47:357-65.
- Hollis BW, Kamerud JQ, Selvaag SR, Lorenz JD, Napoli JL. Determination of vitamin D status by radioimmunoassay with an ^{125}I -labeled tracer. *Clin Chem* 1993;39:529-33.
- Ersfeld DL, Rao DS, Body JJ, Sackrison Jr. JL, Miller AB, Parikh N, et al. Analytical and clinical validation of the 25 OH vitamin D assay for the LIAISON automated analyzer. *Clin Biochem* 2004;37:867-74.
- Maunsell Z, Wright DJ, Rainbow SJ. Routine isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for simultaneous measurement of the 25-hydroxy metabolites of vitamins D_2 and D_3 . *Clin Chem* 2005;51:1683-90.

23. Priego Capote F, Ruiz Jiménez J, Mata-Granados JM, Luque de Castro MD. Identification and determination of fat-soluble vitamins and metabolites in human serum by liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry with multiple reaction monitoring. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2007;21:1-10.
24. Carter GD, Carter R, Jones J, Berry J. How accurate are assays for 25-hydroxyvitamin D? Data from the international vitamin D external quality assessment scheme. *Clin Chem* 2004;50:2195-7.
25. Binkley N, Krueger D, Cowgill CS, Plum L, Lake E, Hansen KE, et al. Assay variation confounds the diagnosis of hypovitaminosis D: a call for standardization. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:3152-7.
26. Souberbielle JC, Fayol V, Sault C, Lawson-Body E, Kahan A, Cormier C. Assay-specific decision limits for two new automated parathyroid hormone and 25-hydroxyvitamin D assays. *Clin Chem* 2005;51:395-400.
27. Binkley N, Krueger D, Gemar D, Drezner MK. Correlation among 25-hydroxy vitamin D assays. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:1804-8.
28. Carter GD, Jones JC. Use of a common standard improves the performance of liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods for serum 25-hydroxyvitamin-D. *Ann Clin Biochem* 2009;46:79-81.
29. Kissmeyer AM, Sonne K. Sensitive analysis of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in biological fluids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2001;935:93-103.
30. Aronov PA, Hall LM, Dettmer K, Stephensen CB, Hammock BD. Metabolic profiling of major vitamin D metabolites using Diels-Alder derivatization and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2008;391:1917-30.
31. Massart DL, Vandeginste BGM, Buydens LMC, De Jong S, Lewi PJ, Smeyers-Verbeke J. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Part A*. Amsterdam: Elsevier, 1997.
32. Bert Ooms JA, Mark Van Gils GJ, Duinkerken AR, Halmingh O. Development and validation of protocols for solid-phase extraction coupled to LC and LC-MS. *Am Lab* 2000;32:52-7.
33. Leventis P, Garrison L, Sibley M, Peterson P, Egerton M, Levin G et al. Underestimation of serum 25-hydroxyvitamin D by the Nichols Advantage Assay in patients receiving vitamin D replacement therapy. *Clin Chem* 2005;51:1072-4.
34. Turpeinen U, Hohenthal U, Stenman UH. Determination of 25-hydroxyvitamin D in serum by HPLC and immunoassay. *Clin Chem* 2003;49:1521-4.
35. Kimball SM, Reinhold V. A comparison of automated methods for quantitation of serum 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D. *Clin Biochem* 2007;40:1305-10.