

# PREGLED RAZVOJA METOD ZA DOLOČANJE VITAMINA D V KRVI

## DEVELOPMENT OF METHODS FOR THE MEASUREMENT OF VITAMIN D IN BLOOD – REVIEW

AVTORJI / AUTHORS:

asist. Katarina Mlekuš Kozamernik, dr. med.<sup>1,2</sup>  
izr. prof. dr. Tomaž Kocjan, dr. med.<sup>1,2</sup>  
prof. dr. Tea Lanišnik Rižner, dr. med.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> UKC Ljubljana, Interna klinika, Klinični oddelek  
za endokrinologijo, diabetes in presnovne bolezni,  
Zaloška cesta 7, 1000 Ljubljana

<sup>2</sup> Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta,  
Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

<sup>3</sup> Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta,  
Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko,  
Laboratorij za proučevanje molekularnih osnov  
in bioznačevalcev hormonsko odvisnih bolezni,  
Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana.

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: katarina.mlekuskozamernik@kclj.si

### POVZETEK

Vitamin D je maščobotopen vitamin, ki ima številne pomembne vloge v telesu in omogoča zdravo delovanje več organskih sistemov. Zanimanje za vitamin D poraslo v prvem desetletju 21. stoletja, ko se je pričelo raziskovanje njegove vloge v različnih bolezenskih procesih. Takrat se je strmo povečalo povpraševanje po laboratorijskem določanju 25-hidroksivitamina D, ki ga uporabljamo za določanje zaloga vitamina D v telesu, zato je morala večina kliničnih laboratorijev opustiti dolgotrajne ročne metode in uvesti avtomatizirane. Zaradi različnih metodologij se je povečala medlaboratorijska variabilnost meritev, kar je tudi na raziskovalnem področju vodilo do nekonsistentnih zaključkov raziskav in metaanaliz. V zadnjih letih se tako uveljavlja program standardizacije meritev vitamina D, katerega glavni cilj je zmanjšanje variabilnosti meritev in spodbujanje primerjav meritev posameznih laboratorijev z referenčno metodo.

### KLJUČNE BESEDE:

25-hidroksivitamin D, imunološki testi, masna spektrometrija, standardizacija, vitamin D

### ABSTRACT

Vitamin D is a fat-soluble vitamin that plays an important role in the human body and enables the proper functioning of several organ systems. Interest in vitamin D grew especially in the first decade of the 21st century when its role in the pathogenesis of various diseases was first recognised. At that time, a demand for laboratory measurements of 25-hydroxyvitamin D that is used to assess the vitamin D body stores rose sharply, so most clinical laboratories had to abandon laborious manual methods and had to introduce various automated techniques. Due to different methodologies, the inter-laboratory variability of measurements increased, which led to inconsistent conclusions in studies and meta-analyses in this research field. The Vitamin D Standardization Program has been established in recent years. The main goal is to reduce the variability of measurements and to promote comparisons of individual laboratories' measurements to the reference method.

### KEY WORDS:

25-hydroxyvitamin D, immunological assay, mass spectrometry, standardization, vitamin D



# 1 UVOD

Vitamin D je ime za skupino sekosteroidov, med katerimi sta najpomembnejša holekalciferol (vitamin  $D_3$ ) in ergokalciferol (vitamin  $D_2$ ). Holekalciferol (vitamin  $D_3$ ) lahko tvorimo endogeno ali vnesemo s hrano živalskega izvora (npr. z ribami, kot so sardine in losos, jajčnim rumenjaki, maslom, rdečim mesom ...), z obogatnimi živilni in farmacevtski pripravki, vključno s prehranskimi dopolnili. Ergokalciferol (vitamin  $D_2$ ) se sintetizira iz ergosterola, ki nastaja v glivah. V telo ga vnašamo izključno s hrano (npr. z gobami) oz. prehranskimi dopolnili. Medtem ko v Evropi za dodajanje vitamina D uporabljamo predvsem holekalciferol, so v ZDA v preteklosti uporabljali izključno ergokalciferol (1).

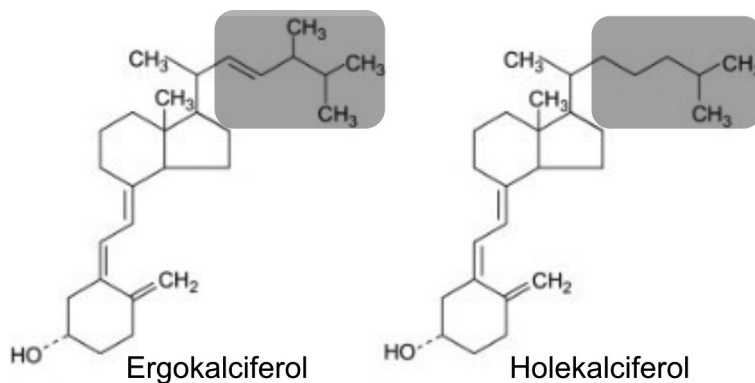
Strukturno se ergokalciferol in holekalciferol razlikujeta po dvojni vezi na mestih C22–C23 in po metilaciji na mestu C24 (slika 1). Zaradi drugačne stranske verige se ergokalciferol šibkeje veže na vezavno beljakovino za vitamin D (DBP, vitamin D binding protein) in hitreje metabolizira, zato njegova serumska koncentracija upada hitreje kot pri holekalciferolu (2). Večina raziskav je pokazala, da je ergokalciferol nekoliko manj učinkovit za nadomeščanje vitamina D in povišanje ravni 25-hidroksivitamina D (25(OH)D) kot holekalciferol (3), obstajajo pa tudi temu nasprotujoče študije (1).

Pri ljudeh vitamin D nastaja v koži pod vplivom sončne svetlobe. 7-dehidroholesterol se z ultravijoličnimi B (UV-B) žarki v koži pretvarja v provitamin  $D_3$ , ki se nato preko termične izomerizacije pretvori v vitamin  $D_3$  (holekalciferol). Ta se v krvi prenaša vezan na DBP in albumin. Vitamina  $D_2$

in  $D_3$ , ki ju v organizem vnesemo s hrano, se do jeter preneseta z lipoproteini (večinoma hilomikroni) (4). V jetrih poteka hidroksilacija, pri kateri nastajata 25-hidroksivitamin  $D_3$  (25(OH) $D_3$  ali kalcidiol) in 25-hidroksivitamin  $D_2$  (25(OH) $D_2$ ). Razmerje med 25(OH) $D_3$  in 25(OH) $D_2$  je pri osebah, ki ne prejemajo ergokalciferola približno 19 : 1 (5). V ledvicah (nekoliko tudi v drugih tkivih) s pomočjo encima  $1\alpha$ -hidroksilaze nastajata biološko aktivni metabolit  $1\alpha,25$ -dihidroksivitamin  $D_3$  ( $1\alpha,25$ -(OH) $_2D_3$  ali kalcitriol) in  $1\alpha,25$ -dihidroksivitamin  $D_2$ . V shemi (slika 2) prikazujemo stopnje v sintezi  $1\alpha,25$ -dihidroksivitamina  $D_3$  oz. kalcitriola.  $1\alpha$ -hidroksilacija je natančno uravnavan korak v sintezi kalcitriola. Izražanje gena za  $1\alpha$ -hidroksilazo stimulira paratiroidni hormon (PTH), zavirata pa ga fibroblastni rastni faktor 23 (FGF23) in sam kalcitriol (6, 7).

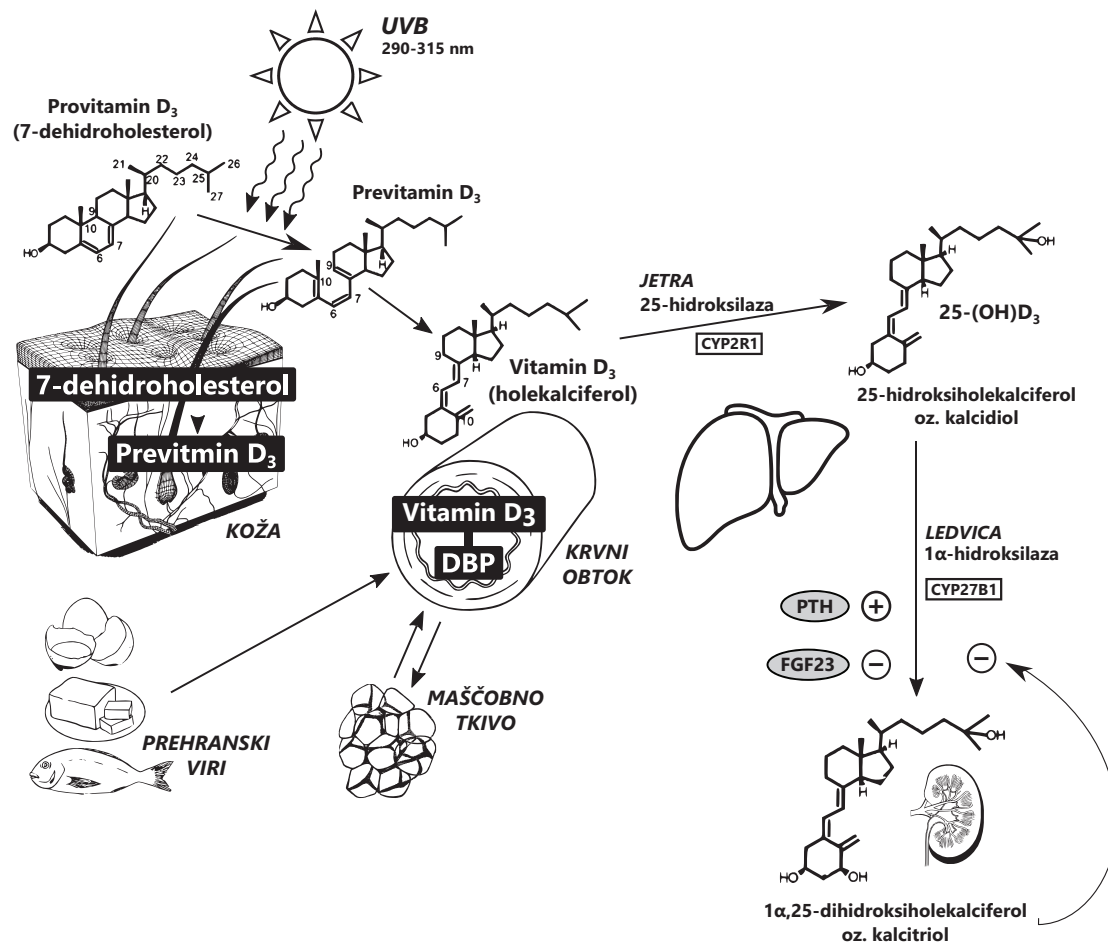
## 2 DOLOČANJE RAVNI VITAMINA D V TELESU

Vitamin D ima pomembno vlogo pri homeostazi kalcija v telesu. Uporabljamo ga za preprečevanje rahitisa in osteomalacije. V zadnjem desetletju so objavili številne raziskave, ki proučujejo vlogo vitamina D v različnih patofizioloških procesih, pri čemer so rezultati nekonsistentni. Zaradi možnih ugodnih učinkov vitamina D na srčno-žilne, maligne in avtoimune bolezni in celo na smrtnost uporaba prehranskih dopolnil, ki vsebujejo vitamin D, narašča (9). S tem narašča tudi pomen meritev vitamina D, saj želimo pri posameznikih zagotoviti zadostne ravni vitamina D in preprečiti na eni strani pomanjkanje vitamina D in na drugi strani toksične učinke.



Slika 1: Strukturi ergokalciferola in holekalciferola.

Figure 1: Structures of ergocalciferol and cholecalciferol.



DBP – vezavna beljakovina za vitamin D, PTH – paratiroidni hormon, FGF23 – fibroblastni rastni faktor 23, CYP2R1 – gen za 25-hidroksilazo, CYP27B1 – gen za 1 $\alpha$ -hidroksilazo

Slika 2: Nastanek in aktivacija vitamina D v človeškem organizmu; prirejeno po (6, 8).

Figure 2: Synthesis and activation of vitamin D in the human body; adopted from (6, 8).

Za določanje zaloge vitamina D uporabljamo merjenje celokupnega 25(OH)D (vključuje 25(OH)D<sub>2</sub> in 25(OH)D<sub>3</sub>) in serumu. 25(OH)D ima dolg razpolovni čas v serumu (približno tri tedne), pri čemer se praktično ves v koži sintetiziran ali zaužit vitamin D<sub>3</sub> pretvori v 25(OH)D<sub>3</sub>, dokler količina sintetiziranega oz. zaužitega vitamina D<sub>3</sub> ne preseže 2000 IE (50  $\mu$ g) na dan (1  $\mu$ g = 40 IE = 2,6 nmol vitamin D<sub>3</sub>). 25(OH)D zato najboljšo odraža tvorbo oz. vnos vitamina D<sub>3</sub> v telo (11).

Serumska raven 25(OH)D nam pove tudi, koliko substrata je na razpolago za ledvično in izvenledvično 1 $\alpha$ -hidroksilazo. V nasprotju s 25-hidroksilacijo, je 1 $\alpha$ -hidroksilacija zelo natančno uravnavan proces. Kadar je raven 25(OH)D prenizka, poraste raven paratiroidnega hormona, ki poveča

izražanje gena za ledvično 1 $\alpha$ -hidroksilazo (CYP27B1) (7). Tako je lahko ob pomanjkanju vitamina D raven 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> nizka, normalna ali celo visoka (12).

Merjenje 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> je zato klinično uporabno le pri hudi ledvični bolezni, pri granulomatoznih boleznih in pri nekaterih redkih boleznih, kot je na vitamin D odporen rahitis (13). Drugi hidroksilirani metaboliti vitamina D, kot so npr. 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 25,26-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in 23,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, so v krvi prisotni običajno v zelo nizkih koncentracijah. Kadar so njihove koncentracije višje, kot npr. koncentracija 25,26-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> pri dializnih bolnikih in pri bolnikih z idio-patsko infantilno hiperkalcemijo, lahko pride do interference pri določanju ravni 25(OH)D z imunskimi metodami (14).

Z vidika metodologij določanja vitamina D je pomemben 3-epimer 25(OH)D<sub>3</sub> (3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>). Ta molekula se od 25(OH)D<sub>3</sub> razlikuje le v konfiguraciji hidroksilne skupine na atomu C3. Zaradi enake molekulske mase ga tudi metode, ki temeljijo na masni spektrometriji, lahko lažno zaznajo kot 25(OH)D<sub>3</sub>. V visokih koncentracijah je 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> prisoten pri dojenčkih, v nizkih koncentracijah pa so ga zaznali tudi pri nekaterih odraslih (15, 16).

Večina celic v telesu je izpostavljenih prostemu 25(OH)D (razen celic v ledvicah in obščitnicah, v katere lahko vstopa vezan na DBP preko mehanizma megalin/kubilin), ki pri zdravih zelo dobro korelira s celokupnim 25(OH)D. Pomembne razlike se pojavljajo pri ljudeh z bistveno spremenjeno ravno DBP (17). V bodoče bo potrebno meritve serumskega DBP in neposredne meritve prostega 25(OH)D standardizirati, da jih bo mogoče uporabljati v klinični praksi (18).

### 3 ZGODOVINSKI PREGLED RAZVOJA METOD DOLOČANJA VITAMINA D V KRVI

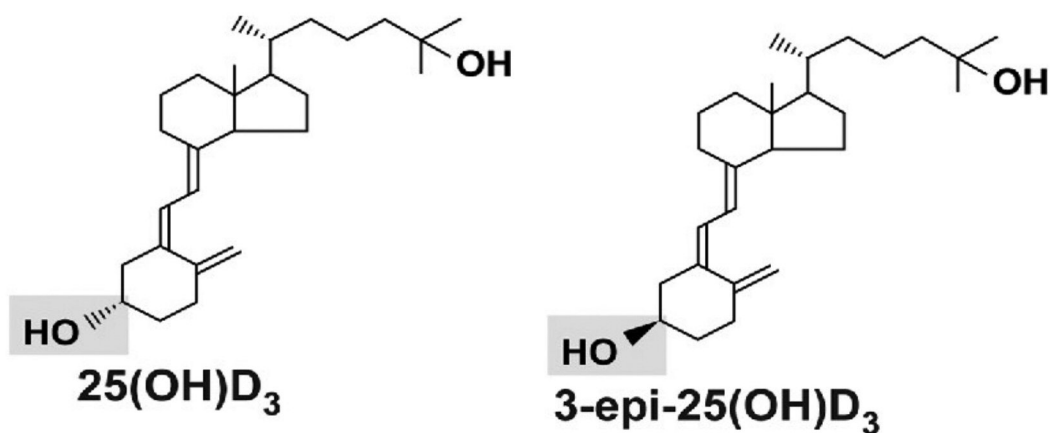
Že leta 1932 so Askew in sod. izolirali vitamin D<sub>2</sub>, vendar so šele v času med 1965 in 1995 bolj podrobno raziskali sintezo vitamina D (19). Povsem novo obdobje v raziskovanju se je začelo po letu 1967, ko so razjasnili metabolne poti vitamina D<sub>3</sub> in njegovo pretvorbo v hormonsko aktivno obliko (20). Od takrat je bilo na temo vitamina D (npr. o pogostosti pomanjkanja, o dodajanju vitamina D in o vplivu pomanjkanja na bolezenske procese) objavljenih okrog

60.000 člankov, pri čemer so v raziskavah uporabljali zelo različne načine merjenja ravni 25(OH)D (21).

Haddad in sod. so prvi opisali ročno metodo s kompetitivno vezavo na beljakovino (CBPA, *competitive binding-protein assays*) za določanje 25(OH)D (22). Leta 1977 so razvili prvo metodo za določanje plazemske koncentracije vitamina D s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC, *high-performance liquid chromatography*) (23). Leta 1981 so Parviainen in sod. razvili metodo, ki vključuje ločevanje metabolitov vitamina D s HPLC in določevanje njihove koncentracije s CBPA (24). Ta metoda je bila dolgotrajna in zato ni prešla v rutinsko uporabo. Zaradi razvoja poliklonskih protiteles proti 25(OH)D, ki je vodil do razvoja radioimunskih metod (RIA, *radioimmunoassay*) in posodobitve aparaturo za HPLC so ročne metode CBPA do sredine 80-ih let postale zastarele (25).

V začetku 80-ih so se tako pričele razvijati metode RIA. Leta 1984 so Bouillon in sod. prvi opisali poenostavljeno RIA, ki ni potrebovala predhodnega ločevanja s kromatografijo (26). Osnovana je bila na zajčjih poliklonskih protitelesih. Uporabnost metode je bila omejena, saj z njo ni bilo možno razlikovati med 25(OH)D<sub>2</sub> in 25(OH)D<sub>3</sub> (takrat so v ZDA za nadomeščanje vitamina D večinoma uporabljali ergokalciferol).

Konec 80-ih let je bilo tudi v slovenskem prostoru opravljeno obsežnejše delo na področju analitike vitamina D (27, 28). Leta 1993 so Hollis in sodelavci opisali RIA za določitev tako 25(OH)D<sub>3</sub> kot tudi 25(OH)D<sub>2</sub> na osnovi kozjih poliklonskih protitelesih in <sup>125</sup>I (29). Na podlagi te metode so razvili prvo komercialno metodo RIA (tržil jo je DiaSorin) za določitev tako 25(OH)D<sub>2</sub> kot tudi 25(OH)D<sub>3</sub> (25).



Slika 3: 3-epimer 25 hidroksivitamina D<sub>3</sub> (3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>).  
Figure 3: 3-epimer 25 hydroxyvitamin D<sub>3</sub> (3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>).

V prvem desetletju 21. stoletja se je pričelo raziskovanje vloge vitamina D v različnih bolezenskih procesih. Zaradi velikega povpraševanja po določanju vitamina D, je morala večina kliničnih laboratorijev opustiti ročne metode CBPA in RIA, ki so jih uporabljali v 80-ih in zgodnjih 90-ih, in preiti na avtomatizirane CBPA, klasične encimsko-immunske metode (ELISA, *enzyme-linked immunoassays*) ali kemiluminiscenčne imunološke metode (CLIA, *chemiluminescent immunoassays*) (25).

Te avtomatizirane metode so relativno enostavne in hitre, vendar imajo pomembne pomanjkljivosti. Glavno težavo predstavlja zelo lipofilna narava 25(OH)D in njegova močna vezava na transportne beljakovine, kot so DBP in albumin, ter na lipoproteine. Pri ročnih CBPA in RIA za sproščanje 25(OH)D z vezavnih beljakovin uporabljamo organska topila, ki pa z imunološkimi metodami in metodami avtomatizirane CBPA niso kompatibilna (30). Za ekstrakcijo pri različnih avtomatiziranih tehnikah uporabljamo različne pristope, kar vpliva na končne rezultate (30). Razlike med rezultati ob uporabi avtomatiziranih metod se še povečajo pri posameznikih, ki imajo zaradi svojega fiziološkega stanja ali bolezni bistveno spremenjeno raven DBP. Taki skupini sta npr. nosečnice in bolniki s kronično ledvično boleznijo (30). Prav tako se ravni DBP razlikujejo pri različnih rasnih skupinah (31). Poleg tega tudi pri avtomatiziranih tehnikah, kot pri vseh imunoloških testih, heterofilna protitelesa povzročajo napake in predstavljajo interferenco (32). Avtomatizirane metode morajo biti tudi zelo občutljive, saj je serumska koncentracija 25(OH)D zelo nizka; njihova meja kvantifikacije mora biti vsaj 10 ng/ml oz. 25 nmol/L (33). Leta 1994 so v Mednarodnem programu za zunanjo oceno kakovosti določanja vitamina D (DEQAS, *International Vitamin D External Quality Assessment Scheme*) ugotovili, da se rezultati ravni 25(OH)D med različnimi laboratoriji lahko razlikujejo celo do 32 % (25). Če torej uporabljamo tradicionalne meje za opredeljevanje zaloge vitamina D (30, 50 in 75 nmol/L) kot pomanjkljivo, zadostno in optimalno, lahko z nekaterimi metodami bolnikovo zalogo ocenimo narobe in se tudi napačno odločimo glede nadomeščanja (1 nmol/L = 1 ng/mL  $\times$  2,5; v literaturi pogosto zasledimo tudi sledeče meje 20 ng/mL, kar je ekvivalent 50 nmol/L, in 30 ng/mL, kar je ekvivalent 75 nmol/L) (25). Nadgradnja na področju določanja vitamina D so metode tekočinske kromatografije sklopljene s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS, *liquid chromatography with tandem-mass spectrometry*). Prednosti te metode so, da omogoča merjenje vseh metabolitov, je relativno hitra ter ima visoki občutljivost in specifičnost. Slabosti pa so predvsem visoka cena inštrumentov in njihova kompleksnost,

ki zahteva visoko usposobljeno osebje za upravljanje in vzdrževanje (25). Leta 1991 so Watson in sod. opisali metodo LC-MS/MS za določanje vitamina D<sub>3</sub> in vitamina D<sub>2</sub> ter njihovih mono- in dihidroksiliranih metabolitov (34). Uporaba LC-MS/MS v klinične namene od takrat stalno narašča. V poročilu DEQAS iz leta 2013 so ugotovili, da je koeficient variacije med vsemi laboratoriji (n = 437) med 11 do 25 %, medtem ko je koeficient variacije med laboratoriji, ki uporabljajo LC-MS/MS (n = 147), le med 9,7 in 11,3 % (35). Takrat je LC-MS/MS uporabljalo 25 % sodelujočih laboratorijev (35).

Trenutno so v kliničnih laboratorijih v uporabi različne avtomatizirane metode (npr. Abbott Architect, DiaSorin Liaison, IDS ISYS, Roche Elecsys in Cobas, Siemens Advia Centaur) in tudi metode LC-MS/MS (npr. ClinMass) (36, 37). Ob tem avtorji opozarjajo, da se kakovost avtomatiziranih metod lahko bistveno razlikuje, pri čemer ne dosegajo vse ciljnega koeficienta variacije, ki je do 10 % (38). Večina proizvajalcev priporoča, da vsak laboratorij za posamezno metodo sam določi referenčne vrednosti, kar pa je v praksi pogosto težko izvedljivo (39). Za Slovenijo je bila postavitve metode in pridobitev referenčnih vrednosti opravljena v dveh diplomskih delih (40, 41).

V bodoče pričakujemo večjo standardizacijo in analitično zmogljivost avtomatiziranih metod in pogostejšo uporabo LC-MS/MS, ob čemer pričakujemo boljšo kakovost in primerljivost rezultatov.

## 4 STANDARDIZACIJA DOLOČANJA VITAMINA D

Zaradi vseh težav pri določanju 25(OH)D in za zmanjšanje posledic, ki jih te težave povzročajo, so leta 2010 uvedli program standardizacije meritev vitamina D (VDSP, *The Vitamin D Standardization Program*), v katerega so vključeni: Ameriški Nacionalni inštitut za zdravje (oddelek za prehranska dopolnila), Center za preprečevanje in obvladovanje bolezni in Center za okolje in zdravje iz ZDA, Nacionalni inštitut za standardizacijo in tehnologijo iz ZDA in Referenčni laboratorij za vitamin D univerze v Gentu (21, 42). Glavni cilj tega programa je zmanjšanje medlaboratorijske variabilnosti meritev koncentracije 25(OH)D in spodbujanje primerjav meritev posameznih laboratorijev z referenčno metodo.

Po uvedbi standardizacije so v Ameriki opravili retrospektivne analize rezultatov meritev 25(OH)D. Pred retrospektivno

standardizacijo so npr. podatki raziskav NHANES III (1988–1994) in NHANES 2005–2006 kazali, da je v tem obdobju prišlo do bistvenega upada ravni 25(OH)D v populaciji. Po standardizaciji rezultatov pa so dokazali, da se ravni 25(OH)D v teh petnajstih letih niso bistveno spremenile (43).

## 5 SKLEP

Vitamin D je dostopen širokemu krogu ljudi v farmacevtskih pripravkih. Zaradi učinkov na kosti in potencialno ugodnih drugih učinkov vitamina D poraba teh pripravkov v zadnjem času narašča. S tem se veča tudi število določitev ravni 25(OH)D in tudi število različnih laboratorijskih metod. Ob tem raziskovalci opozarjajo, da vse metode niso enako kakovostne in ne omogočajo vedno zanesljivega ločevanja med pomanjkljivo, zadostno, optimalno in toksično ravno vitamina D v telesu. Zato je pomembno dobro poznavanje posamezne metode in upoštevanje njenih omejitev pri interpretaciji rezultatov. Ob heterogenosti laboratorijskih metod, ki se uporabljajo v raziskovalnem delu, je omejena tudi primerljivost rezultatov posameznih raziskav.

V Mednarodni shemi za zunanjo oceno kakovosti določitev vitamina D (DEQAS) in v Programu za standardizacijo meritve vitamina D (VDSP) spodbujajo uporabo kakovostnih laboratorijskih metod, kar je ključno tako v kliničnem delu kot tudi z vidika raziskovalnega dela, saj omogoča boljšo primerljivost med različnimi raziskavami in zanesljivejše izsledke metaanaliz. Vedno več laboratorijev je vključenih v DEQAS, zato lahko v bodoče pričakujemo večjo primerljivost laboratorijskih metod in boljše podatke iz raziskav, ki proučujejo vpliv vitamina D na bolezenske procese pri ljudeh.

## 6 LITERATURA

- Holick MF, Biancuzzo RM, Chen TC, Klein EK, Young A, Bibuld D, et al. Vitamin D2 is as effective as vitamin D3 in maintaining circulating concentrations of 25-hydroxyvitamin D. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(3):677–81.
- Gallagher JC, Bikle DD. Vitamin D: Mechanisms of Action and Clinical Applications. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America.* 2017;46(4):xvii–xviii.
- Trang HM, Cole DE, Rubin LA, Pierratos A, Siu S, Vieth R. Evidence that vitamin D3 increases serum 25-hydroxyvitamin D more efficiently than does vitamin D2. *Am J Clin Nutr.* 1998;68(4):854–8.
- Trifiletti RR. Vitamin D. V: Aminoff MJ, Daroff RB, uredniki. *Encyclopedia of the Neurological Sciences (Second Edition) [Internet].* Oxford: Academic Press; 2014 [cited 2021 Sep 4]. 719–20. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123851574001184>
- Clemens TL, Zhou XY, Myles M, Endres D, Lindsay R. Serum vitamin D2 and vitamin D3 metabolite concentrations and absorption of vitamin D2 in elderly subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 1986;63(3):656–60.
- Henry HL. Regulation of vitamin D metabolism. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2011;25(4):531–41.
- Brenza HL, DeLuca HF. Regulation of 25-hydroxyvitamin D3 1 $\alpha$ -hydroxylase gene expression by parathyroid hormone and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Arch Biochem Biophys.* 2000;381(1):143–52.
- Jäpelt RB, Silvestro D, Smedsgaard J, Jensen PE, Jakobsen J. Quantification of vitamin D3 and its hydroxylated metabolites in waxy leaf nightshade (*Solanum glaucophyllum* Desf.), tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and bell pepper (*Capsicum annuum* L.). *Food Chem.* 2013;138(2–3):1206–11.
- Bjelakovic G, Gluud LL, Nikolova D, Whitfield K, Wetterslev J, Simonetti RG, idr. Vitamin D supplementation for prevention of mortality in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews [Internet].* 2014 [cited 2022 Apr 4];(1). Available from: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD007470.pub3/full>
- Yu CL, Falk RT, Kimlin MG, Rajaraman P, Sigurdson AJ, Horst RL, idr. The impact of delayed blood centrifuging, choice of collection tube, and type of assay on 25-hydroxyvitamin D concentrations. *Cancer Causes Control.* 2010;21(4):643–8.
- Heaney RP, Armas LAG, Shary JR, Bell NH, Binkley N, Hollis BW. 25-Hydroxylation of vitamin D3: relation to circulating vitamin D3 under various input conditions. *Am J Clin Nutr.* 2008;87(6):1738–42.
- Cannell JJ, Hollis BW. Use of vitamin D in clinical practice. *Altern Med Rev.* 2008;13(1):6–20.
- Lips P. The relative value of 25(OH)D and 1,25(OH)2D measurements. *Endocrine Abstracts [Internet].* 2009 [cited 2021 Avg 1];20. Available from: <https://www.endocrine-abstracts.org/ea/0020/ea0020me11>
- Carter GD, Jones JC, Shannon J, Williams EL, Jones G, Kaufmann M, idr. 25-Hydroxyvitamin D assays: Potential interference from other circulating vitamin D metabolites. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2016;164:134–8.
- Lensmeyer G, Poquette M, Wiebe D, Binkley N. The C-3 epimer of 25-hydroxyvitamin D(3) is present in adult serum. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(1):163–8.
- Singh RJ, Taylor RL, Reddy GS, Grebe SKG. C-3 epimers can account for a significant proportion of total circulating 25-hydroxyvitamin D in infants, complicating accurate measurement and interpretation of vitamin D status. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(8):3055–61.
- Fraser WD, Tang JCY, Dutton JJ, Schoenmakers I. Vitamin D Measurement, the Debates Continue, New Analytes Have Emerged, Developments Have Variable Outcomes. *Calcif Tissue Int.* 2020;106(1):3–13.
- Bikle D, Bouillon R, Thadhani R, Schoenmakers I. Vitamin D metabolites in captivity? Should we measure free or total

- 25(OH)D to assess vitamin D status? *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2017;173:105–16.
19. Askew FA, Bourdillon RB, Bruce HM, Jenkins RGC, Webster TA, Dale HH. The distillation of vitamin D. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Containing Papers of a Biological Character.* 1930;107(748):76–90.
  20. Norman AW, Henry HL. *Hormones.* Academic Press; 2014. p. 430.
  21. Binkley N, Dawson-Hughes B, Durazo-Arvizu R, Thamm M, Tian L, Merkel JM, idr. Vitamin D measurement standardization: The way out of the chaos. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2017;173:117–21.
  22. Haddad JG, Chyu KJ. Competitive protein-binding radioassay for 25-hydroxycholecalciferol. *J Clin Endocrinol Metab.* 1971;33(6):992–5.
  23. Eisman JA, Shepard RM, DeLuca HF. Determination of 25-hydroxyvitamin D2 and 25-hydroxyvitamin D3 in human plasma using high-pressure liquid chromatography. *Anal Biochem.* 1977;80(1):298–305.
  24. Parviainen MT, Savolainen KE, Korhonen PH, Alhava EM, Visakorpi JK. An improved method for routine determination of vitamin D and its hydroxylated metabolites in serum from children and adults. *Clin Chim Acta.* 1981;114(2–3):233–47.
  25. Le Goff C, Cavalier E, Souberbielle JC, González-Antuña A, Delvin E. Measurement of circulating 25-hydroxyvitamin D: A historical review. *Pract Lab Med.* 2015;2:1–14.
  26. Bouillon R, Van Herck E, Jans I, Tan BK, Van Baelen H, De Moor P. Two direct (nonchromatographic) assays for 25-hydroxyvitamin D. *Clin Chem.* 1984;30(11):1731–6.
  27. Osredkar J, Vrhovec I. A method for determination of 25-hydroxyvitamin D3 and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human serum by using high-performance liquid chromatography with gradient elution and radioimmunologic detection. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies.* 1989;12(10):1897–907.
  28. Osredkar J, Vrhovec I. Vitamin D in presnovki : fiziologija, patofiziologija in metode določanja = Vitamin D and its metabolites : physiology, pathophysiology and determination methods. *Farmacevtski vestnik.* 1989;40(1):5–26.
  29. Hollis BW, Kamerud JQ, Selvaag SR, Lorenz JD, Napoli JL. Determination of vitamin D status by radioimmunoassay with an 125I-labeled tracer. *Clin Chem.* 1993;39(3):529–33.
  30. Depreter B, Heijboer AC, Langlois MR. Accuracy of three automated 25-hydroxyvitamin D assays in hemodialysis patients. *Clin Chim Acta.* 2013;415:255–60.
  31. Powe CE, Evans MK, Wenger J, Zonderman AB, Berg AH, Nalls M, idr. Vitamin D-binding protein and vitamin D status of black Americans and white Americans. *N Engl J Med.* 2013;369(21):1991–2000.
  32. Cavalier E, Carlisi A, Bekaert AC, Rousselle O, Chapelle JP. Human anti-animal interference in DiaSorin Liaison total 25(OH)-vitamin D assay: towards the end of a strange story? *Clin Chim Acta.* 2012;413(3–4):527–8.
  33. Ofenloch-Haehle B. Approaches to measurement of vitamin D concentrations - immunoassays. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 2012;243:50–3.
  34. Watson D, Setchell KD, Ross R. Analysis of vitamin D and its metabolites using thermospray liquid chromatography/mass spectrometry. *Biomed Chromatogr.* 1991;5(4):153–60.
  35. Carter GD, Berry J, Durazo-Arvizu R, Gunter E, Jones G, Jones J, idr. Hydroxyvitamin D assays: An historical perspective from DEQAS. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 2018;177:30–5.
  36. Arneson WL, Arneson DL. Current Methods for Routine Clinical Laboratory Testing of Vitamin D Levels. *Lab Med.* 2013;44(1):e38–42.
  37. Enko D, Kriegshäuser G, Stolba R, Worf E, Halwachs-Baumann G. Method evaluation study of a new generation of vitamin D assays. *Biochem Med (Zagreb).* 2015;25(2):203–12.
  38. Stöckl D, Sluss PM, Thienpont LM. Specifications for trueness and precision of a reference measurement system for serum/plasma 25-hydroxyvitamin D analysis. *Clinica Chimica Acta.* 2009;408(1):8–13.
  39. Osredkar J, Marc J. Vitamin D in presnovki: fiziologija, patofiziologija in referenčne vrednosti. *Medicinski razgledi.* 1996;35:543–65.
  40. Kokalj T. Določanje orientacijskih referenčnih vrednosti vitamina D in njegovih presnovkov v človeškem krvnem serumu = Determination of reference values of vitamin D and its metabolites in human blood serum : diplomsko delo. Ljubljana; 1995.
  41. Gros K. . Določitev orientacijskih referenčnih vrednosti vitamina D (25-OH) v serumu = Determination of reference values of vitamin D in human blood serum : diplomska naloga,. Ljubljana; 2008
  42. *Hormone and Vitamin D Standardization Programs (HoSt/VDSCP) | CDC [Internet].* 2019 [cited 2021 Aug 1]. Available from: <https://www.cdc.gov/labstandards/hs.html>
  43. Schleicher RL, Sternberg MR, Lacher DA, Sempos CT, Looker AC, Durazo-Arvizu RA, idr. The vitamin D status of the US population from 1988 to 2010 using standardized serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D shows recent modest increases. *Am J Clin Nutr.* 2016;104(2):454–61.

