APP NOTE-13/2020GCMS




# Определение суммарного витамина D (25-OH витамин $D_3$ и 25-OH витамин $D_2$) в плазме человека методом газовой хромато-масс-спектрометрии с помощью системы «Маэстро-αMC».

***Колунтаев Д. А.*** *к. б. н., научный сотрудник отдела исследований и разработок,* ***ООО Интерлаб****, Россия, Москва*

***Ключевые слова***

*Газовая хромато-масс-спектрометрия, витамин D, плазма, кровь, Маэстро-αMC, SIM Wizard®, iDwellTime.*

***Резюме***

Два основных метаболита витамина Д (25-гидрокси-холекальциферол и 25-гидрокси-эргокальциферол) были детектированы с помощью газовой хромато-масс-спектрометрии с моноквадрупольным масс-детектором Маэстро-αMC. В качестве дериватизирующего агента была выбрана смесь *N*-метил-*N*-триметилсилилтрифтороацетамид (MSTFA) и иодид аммония (100:0,2, v/w). В ходе работы были получены триметилсилильные производные (TMS-). Целью данного исследования была разработка метода определения витамина D в плазме человека.

## Введение

Витамин D — это жирорастворимый витамин, отличающийся от других витаминов тем, что его основным источником для организма человека является преобразование его прекурсора *(7-дегидрохолестерола (превитамина D))* в коже под воздействием ультрафиолетового излучения. Дополнительным источником витамина D являются продукты питания такие как высокожирные сорта рыбы, яичный желток, печень, молочные продукты, орехи и другие, а также различные пищевые добавки.

К группе витамина D относится шесть стеринов (витамины $D_1$, $D_2$, $D_3$, $D_4$, $D_5$ и $D_6$), при этом ключевую роль в организме человека играют два из них: **витамин $D_2$** — эргокальциферол и **витамин $D_3$** — холекальциферол. Это близкие по химической структуре нерастворимые в воде, но хорошо растворимые в жирах соединения, имеющие схожие этапы метаболизма. Эргокальциферол ($D_2$) образуется в клетках растений из эргостерола и может поступать в организм человека только с пищей или с пищевыми добавками. Холекальциферол ($D_3$), в основном синтезируется у человека в коже под действием ультрафиолетовых лучей диапазона «B» (UVB, 280—315 нм) и также может поступать с продуктами животного происхождения.

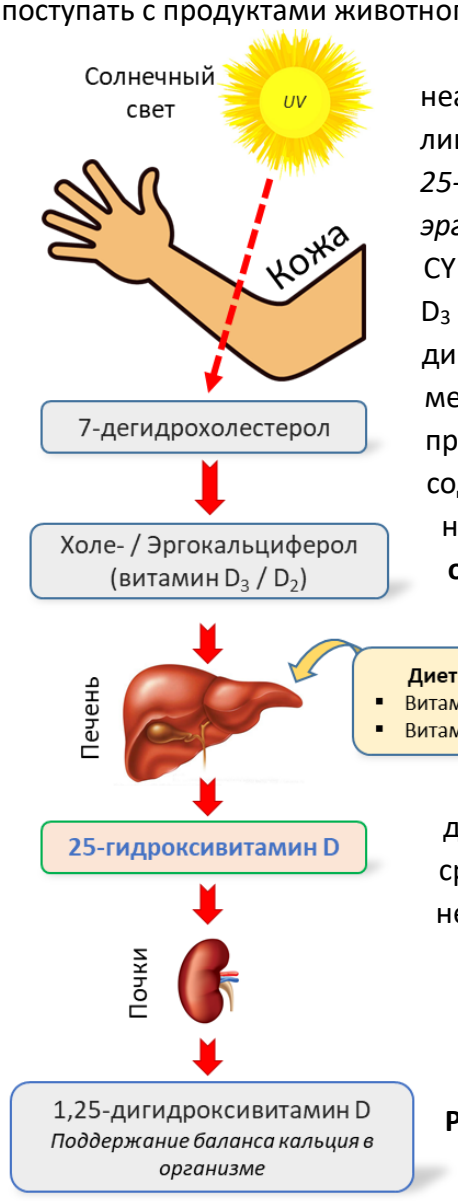



**Рис. 1.** Простая схема метаболизма витамина D в организме человека [2].

Сами по себе витамины $D_2$ и $D_3$ биологически неактивны, реализация их биологических эффектов возможна лишь после их метаболических преобразований в печени до *25-гидрокси-холекальциферола* (25(OH)$D_3$) / *25-гидрокси-эргокальциферола* (25(OH)$D_2$)[1] и в почках с участием фермента CYP27B1 (1α-гидроксилазы) до *1,25-дигидроксивитамина* $D_2$ и $D_3$ соответственно. Несмотря на то, что 1,25-дигидроксивитамин является конечным и самым активным метаболитом витамина D, а по специфике своего действия приравнивается к гормону (D-гормон), суммарное содержание именно метаболитов 25(OH)D считается наиболее **точным индикатором уровня витамина D в организме человека,** отражая как интенсивность его образования в коже (эндогенное накопление), так и поступление с пищей (экзогенное накопление) [1]. Связан ещё такой выбор с тем, что 25(OH)D характеризуется более длительным периодом полувыведения (около 3 недель), по сравнению с 1,25(OH)$_2$D в циркулирующей крови, что также не менее важно в клинической практике [3].

[1] Далее сокращённо суммарное содержание 25(OH)$D_3$ и 25(OH)$D_2$ обозначается как 25(OH)D.

**Табл. 1.** Формы и метаболиты витамина D в организме человека [29]

| Наименование метаболита | | Действие |
|---|---|---|
| **1** | $D_2$ (эргокальциферол) | Поступает в организм с продуктами **растительного происхождения** |
| **2** | $D_3$ (холекальциферол) | Образуется **в коже** под влиянием УФ-В излучения из 7-дегидрохолестерола или поступает в организм с продуктами животного происхождения |
| **3** | $25(OH)D_3$, кальцидол, (25-гидроксихолекальциферол) | **Печёночный метаболит** витамина $D_3$, основной показатель обеспеченности организма витамином D |
| **4** | $1,25(OH)_2D_3$, кальцитриол, (1,25-дигидроксихолекальциферол) | **Почечный метаболит** витамина $D_3$, обеспечивающий основные биологические эффекты витамина D (собственно D-гормон) |

*Биологические функции витамина D.* Витамин D способствует абсорбции кальция в тонком кишечнике и поддерживает необходимые уровни кальция и фосфатов в крови для обеспечения минерализации костной ткани и предотвращения гипокальциемической тетании. Также витамин D необходим для роста костей и процесса костного ремоделирования, т. е. работы остеобластов и остеокластов. Достаточный уровень витамина D предотвращает развитие рахита у детей и остеомаляции у взрослых. Вместе с кальцием витамин D также применяется для профилактики и в составе комплексного лечения остеопороза [4 - 6].

Согласно мнению ряда исследователей, функции витамина D не ограничены только контролем кальций-фосфорного обмена, он также влияет и на другие физиологические процессы в организме, включающие модуляцию клеточного роста, нервно-мышечную проводимость, иммунитет и воспаление [7,5]. Дефицит витамина D может влиять также и на иммунную систему, поскольку этот витамин играет роль иммуномодулятора [14], укрепляя врожденный иммунитет посредством усиления экспрессии и секреции противомикробных пептидов [15–16], что повышает защитные функции слизистой оболочки. Кроме того, в ходе недавнего метаанализа был зарегистрирован защитный эффект добавок витамина D применительно к респираторным инфекциям [17–20].

Витамин D оказывает существенное влияние на множество процессов в организме. Так, он является одним из основных веществ, регулирующих иммунитет человека. При этом, в отличие от лекарственных препаратов, неизбирательно воздействующих на иммунитет, витамин D: сдерживает аутоиммунные реакции и повышает устойчивость организма к внешним и внутренним патологическим воздействиям. Витамин D обладает антипролиферативным действием, то есть тормозит развитие онкологических процессов в организме. Доказано, что для проявления данного защитного эффекта витамина D уровень его транспортной формы (25-гидроксикальциферола) в крови должен быть выше референсных норм, указанных в бланках большинства лабораторий [28].

Многочисленные исследования подтверждают колоссальное влияние витамина D на репродуктивную систему мужчин и женщин. Именно поэтому, своевременная коррекция дефицита витамина D приобретает огромное значение при решении репродуктивных проблем.

*Уровень витамина D в организме.* Дефицит витамина D — явление достаточно распространённое, затрагивающее, по некоторым оценкам [12, 21, 22], до миллиарда жителей Земли. В США, по данным крупного популяционного исследования, проведённого в 2001—2006 годах, распространённость «риска дефицита» витамина D у взрослых и детей старше 1 года составила 8%. К ней можно прибавить 24% людей со статусом «риск недостаточного потребления» [13]. В совокупности это почти треть населения США. В ряде других стран, с достаточным уровнем солнечного облучения, таких как Индия, Пакистан, Иран, Китай, значительная доля населения (по некоторым данным, до 60—80%) имеют симптомы дефицита витамина D [27]. Россия расположена в зоне низкой инсоляции, поэтому практически все её жители входят в группу риска [11].

Вместе с тем приводимые цифры распространённости дефицита витамина D могут значимо отличаться в зависимости от того, какой уровень 25-гидроксихолекальциферола в крови берётся за пограничный (16, 20 или 30 нг/мл или какой-либо другой) [9,7,10]. Институт медицины США в 2010 году ввёл новую классификацию адекватности статуса витамина D в зависимости от уровня 25-гидроксихолекальциферола в сыворотке крови [9] (табл. 2).

**Табл. 2.** Классификация адекватности статуса витамина D (25(OH)D) в крови.

| Категория достаточности витамина D | Уровень 25(OH)D (нг/мл) | Уровень 25(OH)D (нмоль/л) |
|---|---|---|
| Риск дефицита | < 12 | < 30 |
| Риск недостаточного потребления | 12 – 19 | 30 – 49 |
| Достаточное потребление | 20 – 50 | 50 – 125 |
| Уровень, выше которого есть основание для обеспокоенности | > 50 | > 125 |

Эксперты Международного эндокринологического общества придерживаются мнения, что дефицит витамина D определяется как уровень 25(OH)D в сыворотке крови менее 20 нг/мл (50 нмоль/л) [7]. Согласно рекомендациям ≪The Vitamin D Society≫, канадского общества экспертов по изучению витамина D, оптимальным уровнем 25(OH)D в сыворотке крови можно считать 40 – 60 нг/мл (100 – 150 нмоль/л). Только достижение такой концентрации 25(OH)D позволит снизить риск возраст-ассоциированных заболеваний, таких как остеопороз, сахарный диабет 2-го типа, различные виды онкологических заболеваний, и увеличить продолжительность жизни [8].

Избыток витамина D является редким явлением, в основном связанным со случайным или намеренным употреблением чрезмерно больших количеств витамина D, который приводит к гиперкальциемии – повышенному содержанию кальция в крови. Длительная или хроническая гиперкальциемия, в свою очередь, чревата кальцификацией (обызвествлением) тканей, причем это касается таких жизненно важных органов, как почки, сердце, кровеносные сосуды, легкие.

Кроме того, есть данные, что повышенная в течение длительного времени концентрация витамина D существенно повышает онкологические риски, а у детей сказывается на умственном и физическом развитии.

*Методы исследования витамина D.* В настоящий момент используют два типа аналитических методов для контроля уровня витамина D в сыворотке или плазме крови человека — это иммуноферментный анализ и метод, основанный на хроматографическом разделении с последующим неиммунологическим обнаружением [23].

Наиболее распространённым методом является применение тандемной масс-спектрометрии с жидкостной хроматографией (ВЭЖХ-МС/МС) [17,19]. Высокая селективность и чувствительность метода позволяет использовать его в рутинных клинических лабораториях. При этом отмечается ежегодный прирост применения данной методологии в лабораторном секторе [26]. С другой стороны, себестоимость анализа, а также простота использования инструмента являются не менее важными вопросами в рутинных анализах. Более простые системы, такие как газовый моноквадрупольный масс-детектор, позволяют значительно снизить затраты на выполнение одного анализа, при этом селективность и чувствительность системы полностью соответствует требуемым нормативам для контроля статуса 25-гидроксивитамина D в организме человека. Использование данной методологии в литературе встречается относительно редко, можно выделить единичные публикации конца 80-го года [24], а также современный обзор тайваньских специалистов под руководством Ming-Yeh Yang и Ching-Yuan Huang [25].

Целью данного исследования является разработка быстрого, чувствительного и надёжного метода определения концентраций $25(OH)D_3$ и $25(OH)D_2$ в плазме крови человека для клинической диагностики его статуса с помощью моноквадрупольной хромато-масс-спектрометрической системы Маэстро-αМС (ГХ/МС).

## *Экспериментальная часть*

*Материалы и методы*

Гексан, ацетонитрил, этанол, бидистиллированная вода – все используемые в эксперименте реагенты имели классификацию, как особо чистые или марку качества «HPLC grade». В качестве процедуры дериватизации использовали реакцию силилирования с образованием триметилсилильных производных с помощью дериватизирующего агента MSTFA в комплексе с иодидом аммония $NH_4I$ (*соотношение компонентов MSTFA/$NH_4I$ 100%/0,2% (v/w)*). В качестве внутреннего стандарта использовали дейтерированные стандарты соединений 25-гидроксивитамина D (6,19,19-$d_3$) производства компании Waters Corporation (*MassTrak Vitamin D Kit Calibrator Set (p/n: 186008096IVD)*). Все работы проводились с использованием виал из темного (янтарного) стекла, для исключения возможной деградации искомых соединений (рис. 4).

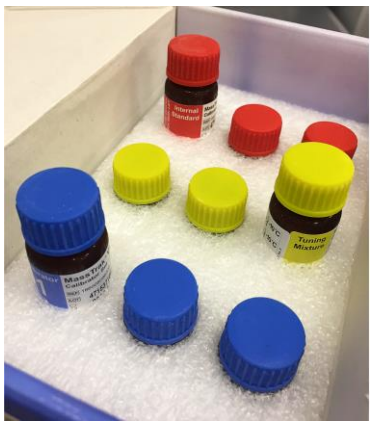


**Рис. 2.** Наборы модельных экстрактов Waters.

В качестве калибровочных стандартов использовали набор Waters Corporation - MassTrak Vitamin D Kit (p/n: 186008096IVD), включающий различные концентрации витамина D в обезвоженных экстрактах модельной матрицы. Линейный диапазон набора составляет от 10 нмоль/л до 375 нмоль/л концентраций, как для $25(OH)D_2$, так и $25(OH)D_3$ соединений. Такой широкий линейный диапазон позволил полностью покрыть все контролируемые категории достаточности витамина D для широкого круга пациентов и исключить дополнительные стадии концентрирования (или разбавления) пробы.

В качестве стандартов для контроля соответствия разрабатываемого метода к предъявляемым требованиям использовали также модельные экстракты компании Waters Corporation (MassTrak Vitamin D Kit Quality Control Set (p/n: 186008097IVD)), представляющие собой две точки контроля количественной оценки метода, в частности точки с высокими

концентрациями содержания витамина $D_2$ и $D_3$ в образце (80 нг/мл и 92 нг/мл, соответственно), а также точки с низкими концентрациями (23,6 нг/мл и 26,1 нг/мл, соответственно).

*Процедура сбора крови и экстракции 25-гидроксивитамина D*

Для апробации методики использовали образцы плазмы крови человека, полученные из аккредитованной лаборатории Института Аналитической Токсикологии[2]. Для отделения плазмы использовали стандартный метод центрифугирования со скоростью 4000 об/мин в течение 5 мин. В случае, когда немедленный анализ был невозможен, образцы плазмы замораживали или хранили при температуре -5°C ÷ -18°C.



**Рис. 3.** Отделение плазмы методом центрифугирования.

Для выполнения анализа использовали аликвоту плазмы объемом 200 мкл, которую помещали в пробирку из тёмного стекла объемом 4 мл и к исследуемому образцу добавляли 20 мкл раствора внутреннего стандарта (в этаноле), после чего к смеси также добавляли 200 мкл ацетонитрила. Полученную смесь помещали в холодильник при 4°C на 10 мин для осаждения белка (рис. 4).



**Рис. 4.** Экстракт плазмы после осаждения белка. Верхний гексановый слой.

Далее к охлаждённой смеси добавляли 1,0 мл гексана, после чего полученную биполярную смесь встряхивали на вортексе. Для улучшения перемешивания использовали орбитальный шейкер в течение 5 мин при скорости вращения 220 RPM.

Слой гексана (0,7 мл) отбирали после центрифугирования смеси в течение 5 мин при скорости 500 об/мин. Полученную органическую фазу сушили с помощью термостата при температуре 69°C в течение 40 мин.

*Дериватизация*

К высушенному остатку добавляли 50 мкл силилирующего реагента (100% MSTFA + 0.2% $NH_4I$, v/w), после чего виалу помещали в термостат при 60°C в течение 40 мин. Полученный дериват инжектировали в хроматограф в объёме 2,0 мкл.

[2] *Основан в 2010 году; независимая клинико-диагностическая лаборатория, ключевым направлением деятельности которой является разработка и внедрение новых методов масс-спектрометрии в медицине и диагностике.*

*Газовая хроматография и масс-спектрометрия*

Масс-спектры и сигналы структурно-характеристических ионов были получены на приборе Маэстро-αMC (ООО «Интерлаб», Россия). Ионизацию молекул выполняли в источнике ионов электронной ионизации с энергией ионизирующих электронов 70 эВ при температуре 230°C. Масс-спектры полного сканирования (m/z 50-600) были получены с целью идентификации и изучения структурно-характеристических ионов целевых соединений. Разделение витамеров осуществляли с помощью капиллярной колонки из плавленого кварца RTx-5MS (*Restek, Cat# 12623*).

Параметры работы хроматографической системы и режимы работы масс-детектора представлены в таблице 3 и 4, соответственно.

***Табл. 3.*** Параметры инструментального метода.

| | |
|---|---|
| ***Оборудование*** | |
| *ГХ-МС система* | ООО Интерлаб, «Маэстро-αMC», Россия |
| *Испаритель и режим газа-носителя* | Split/Splitless, Constant Flow |
| *Тип лайнера* | Прямой лайнер:<br>*Topaz (Restek) Cat#23300* (4 mm x 6,3 x 78,5) |
| *Хроматографическая колонка* | RTx-5MS (30m x 0,25mm; 250um) |
| ***Параметры хроматографического разделения*** | |
| *Объём пробы* | 2,0 мкл |
| *Режим испарителя* | Режим **Splitless** |
| *Врем работы режима* | 1,2 мин, далее 50 мл/мин |
| *Экономия газа-носителя* | 20 мл/мин после 3,0 мин |
| *T° испарителя* | 280°C |
| *Градиент t° печи* | 150°C в течение 1,0 мин;<br>10,0°C/мин до 200°C, удержание 0,0 мин;<br>20,0°C/мин до 290°C, удержание 7,0 мин;<br>5,0°C/мин до 300°C, удержание 2,0 мин; |
| *Скорость газа-носителя* | (He) 1,0 мл/мин |
| *T° интерфейса МС* | 250°C |
| ***Параметры детектирования*** | |
| *Источник ионизации* | *ЭИ (EI)*, 230°C |
| *Задержка растворителя* | 10,0 мин |
| *Режимы сканирования SCAN* | 50 – 600 Да, 2000 Да/sec |
| *Режимы сканирования SIM* | SIM (параметры указаны ниже) |
| *Параметр Dwell Time* | Схема сегментированного сканирования: |

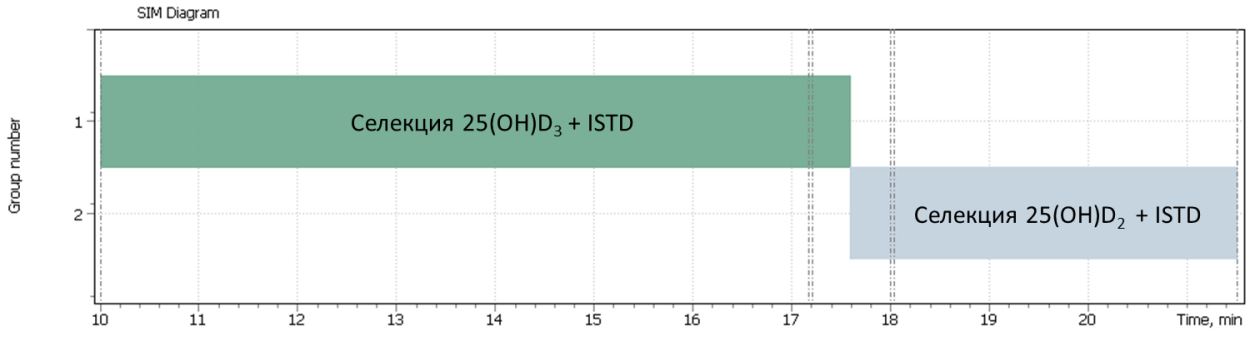


***Табл. 4.*** Времена элюирования искомых пиков целевых ионов и параметры их сканирования.

| *№* | *Перечень производных соединений* | *Главный ион (Quant)* | *Подтв. ион (Qual-1)* | *Подтв. ион (Qual-2)* | *Время элюирования, мин* |
|---|---|---|---|---|---|
| ***1*** | 25-гидроксихолекальциферол ($D_3$) | *544.4* | *529.4* | *413.4* | 17.20 |
| ***2*** | 25-гидроксиэргокальциферол ($D_2$) | *556.4* | - | - | 18.03 |
| ***3*** | 25-гидроксихолекальциферол_d3 ($D_3$) | *416.4* | *532.4* | *547.4* | 17.17 |
| ***4*** | 25-гидроксиэргокальциферол_ d3 ($D_2$) | *559.4* | - | - | 17.99 |

*Линейность*

Калибровочные кривые для всех анализируемых соединений были построены с помощью коммерческих матричных стандартов MassTrak Vitamin D Kit Calibrator Set (p/n: 186008096IVD). Диапазон концентраций для всех соединений составил от 0,0 нмоль/л (0 нг/мл) до 370,0 нмоль/л (150 нг/мл). Отношение интеграла пика стандартного вещества к интегралу пика внутреннего стандарта использовали для количественного определения содержания соединения в плазме.

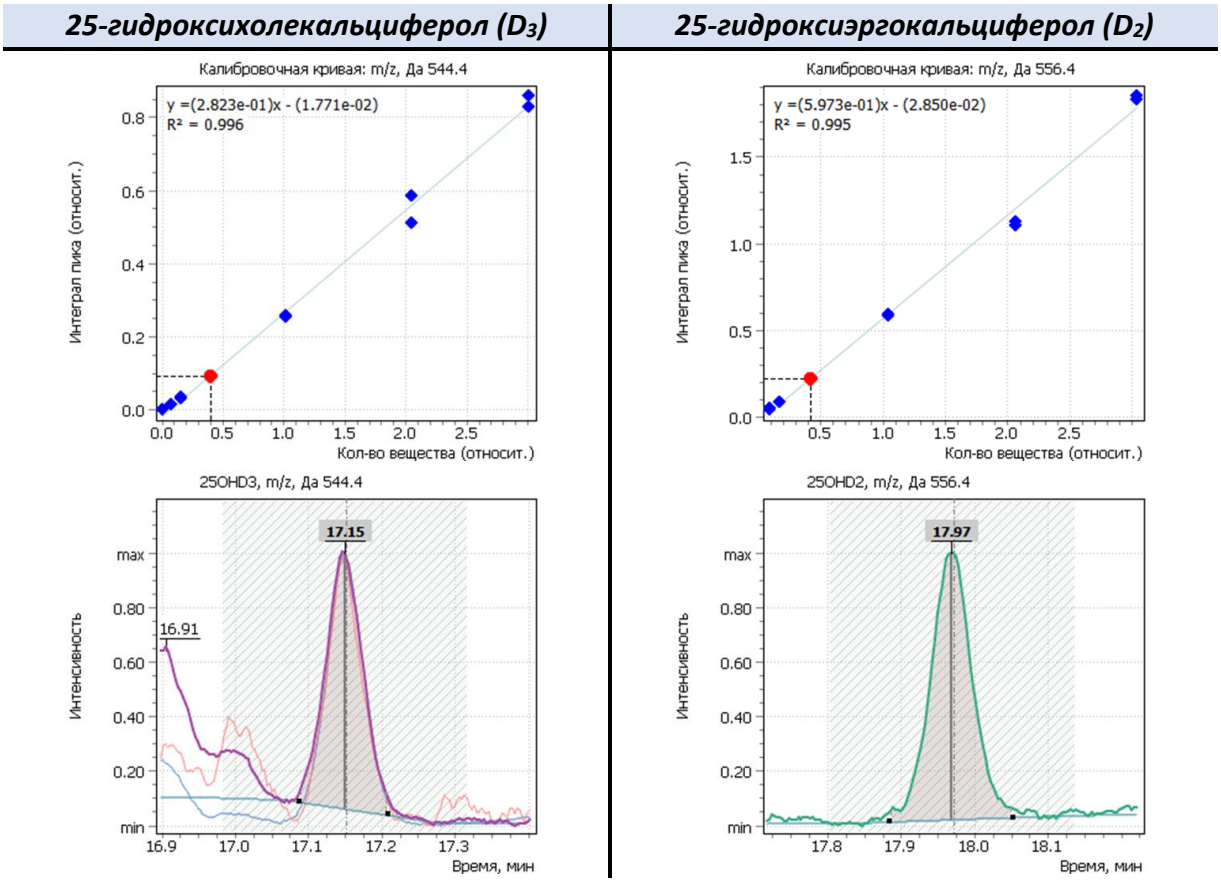



***Рис. 5.*** Сигналы целевых ионов метаболитов витамина D, участвующих в построении калибровочных зависимостей (концентрация соединений 20 нг/мл).

## *Обсуждение процедуры анализа*

25-гидроксихолекальцифрол, а также 25-гидроксиэргокальциферол представляют собой слаболетучие молекулы, анализ которых в нативной форме для ГХ-МС не представляется возможным. Для решения данной проблемы в практике газовой хроматографии принято дериватизировать слаболетучие молекулы по строго определённым функциональным группам и тем самым изменять их физические свойства через получение производных.

Для дериватизации 25-гидроксивитамина D был использован метод силилирования, который выражается в превращении аналита в его триметилсилильное производное.

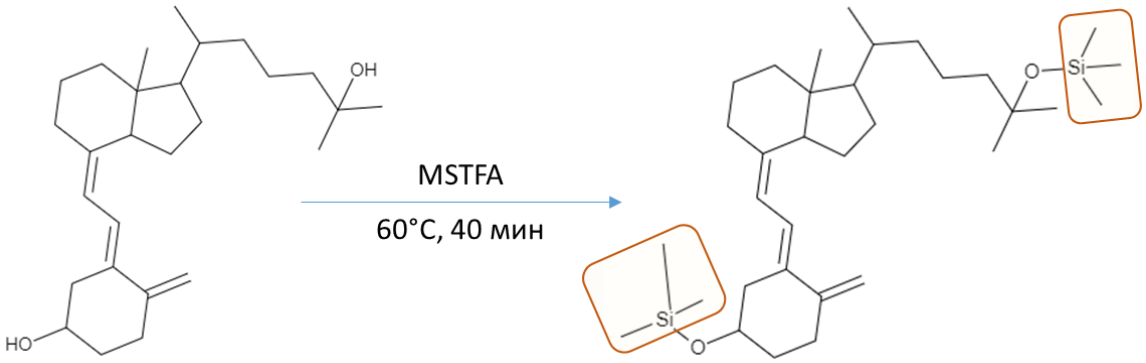


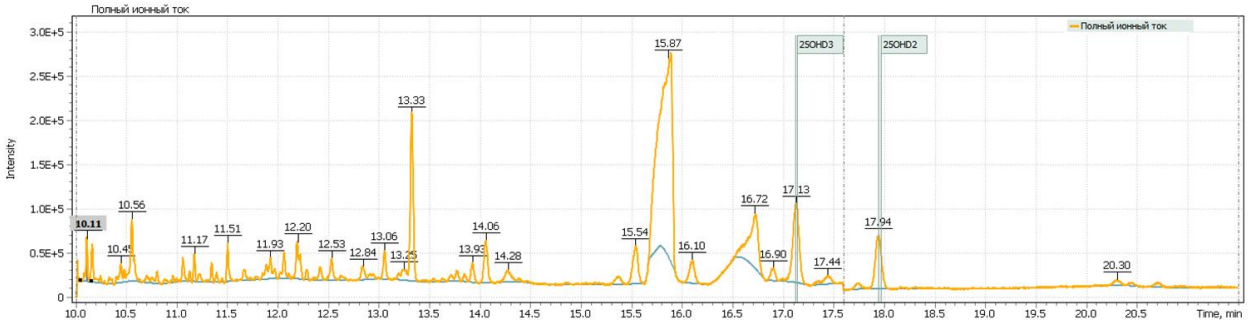

**Рис. 6.** Стадия силилирования 25-гидроксивитамина D.

Все силилирующие агенты, включая используемый MSTFA, обеспечивают достаточно высокую чувствительность определения компонента. Но такая, казалось бы, простая на первый взгляд процедура имеет и свои недостатки, которые выражаются резким увеличением на получаемых хроматограммах количества фоновых соединений. Это могут быть производные органических многоосновных кислот, сахаров и других соединений, широко распространённых в биологической матрице, которые после силилирования также приобретают свойства летучести и соответственно формируют значительные матричные влияния на профиле хроматограммы. Это резко затрудняет обработку полученных данных и в ходе разработки методики пробоподготовки требует досконального изучения температурных режимов и времени реакции дериватизации. Для решения данного вопроса было предложено использовать результаты работы Ming-Yeh Yang, Ching-Yuan Huang и др. [25], где была продемонстрирована возможность проведения полной реакции дериватизации с использованием смеси MSTFA/$NH_4I$ (100:0,2%) в течение 40 минут при 60°C.

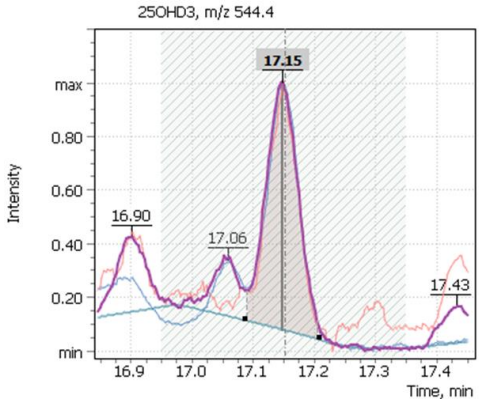
На рисунке 7 показаны хроматограммы полного ионного тока и выделенных ионных токов целевых соединений 25-гидкросивитамина D в QC-пробе набора MassTrak (*Waters Corp.*). Наличие подобного типа проб, подразумевает под собой возможность их применения для верификации корректности построения калибровочной кривой, а также контроля работоспособности аналитического метода (его апробация). Функционал программного обеспечения Маэстро-αМС позволяет наложить получаемые результаты контрольных проб на расчётную калибровочную кривую и оценить точность работы аналитического метода (табл. 7 б,в).

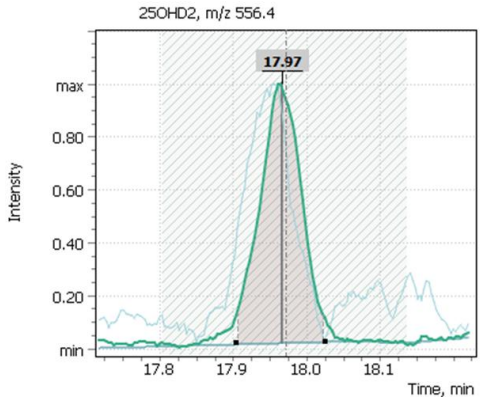
**Рис. 7.** Апробация метода.

- а) хроматограмма модельного образца плазмы с известным содержанием 25-гидкросивитамина D (23,6 нг/мл ($D_3$) / 26,1 нг/мл ($D_2$)).

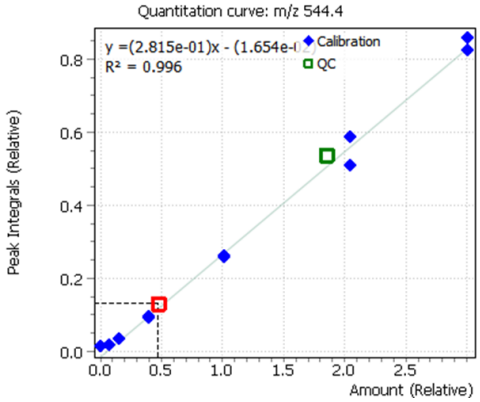



- б) сигналы количественных ионов модельных образцов плазмы




- в) оценка правильности построения калибровочной зависимости
(зелёный флаг □ – концентрации модельных образцов и их расчёт на ранее построенной калибровочной зависимости)



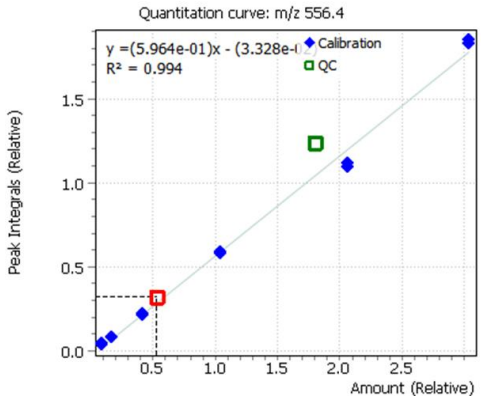



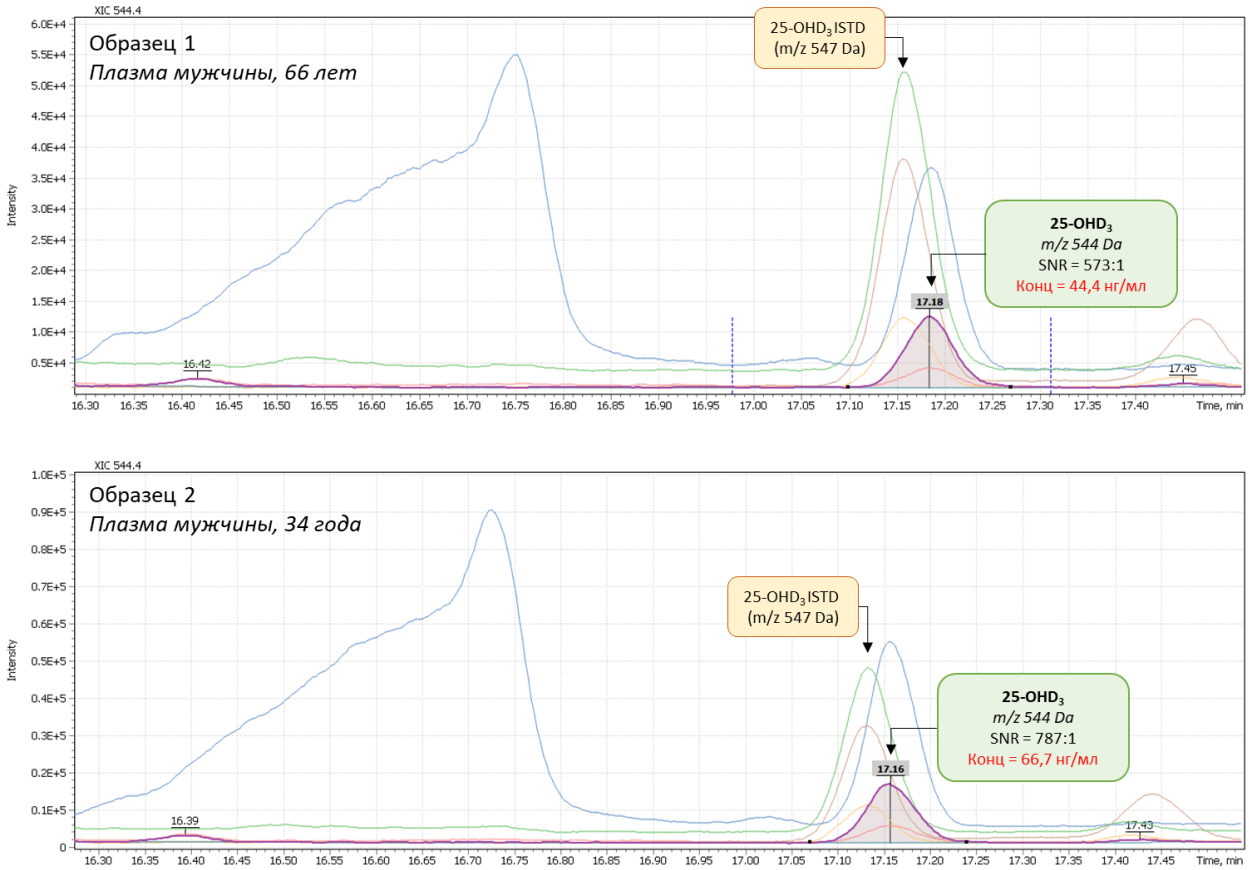

**Табл. 5.** Результирующая таблица апробации методики, а также её аналитические характеристики.

| **Результаты валидации методики:** | | |
|---|---|---|
| | 25(OH)$D_3$ | 25(OH)$D_2$ |
| *Низкий уровень концентраций, нг/мл* | | |
| Искомая концентрация | 23,6 | 26,1 |
| Точность метода, % | 105 (± 20%) | 107,1 (± 20%) |
| *Высокий уровень концентраций, нг/мл* | | |
| Искомая концентрация | 80 | 92 |
| Точность метода, % | 97,7 (± 20%) | 104,5 (± 20%) |

| **Аналитические характеристики метода:** | | |
|---|---|---|
| | $25(OH)D_3$ | $25(OH)D_2$ |
| • *Линейность* | | |
| $R^2$ | 0.996 | 0.995 |
| • *Рассчитанные значения предела определения* | | |
| Концентрация, нг/мл | 12.04 | 15.2 |

Пределы определения 25-гидкросивитамина D с помощью моноквадрупольного масс-детектора Маэстро-αMC были рассчитаны с использованием модельных калибровочных стандартов с известными уровнями концентраций целевых соединений.

Дополнительно, в контексте работы были выполнены несколько тестирований реальных образцов плазмы. При этом образцы собирали, как у мужчин (2 образца), так и у женщин (2 образца), для наблюдения за возможной корреляцией интенсивности витамина D от возраста пациента. Полученные хроматограммы представлены на рисунке 8, где видно, что в разработанных и апробированных условиях пик 25-гидроксивитамина D хорошо детектируется и надёжно интерпретируется даже в сложной биологической матрице. Пик имеет правильную геометрическую форму и не подвержен каким-либо матричным влияниям.



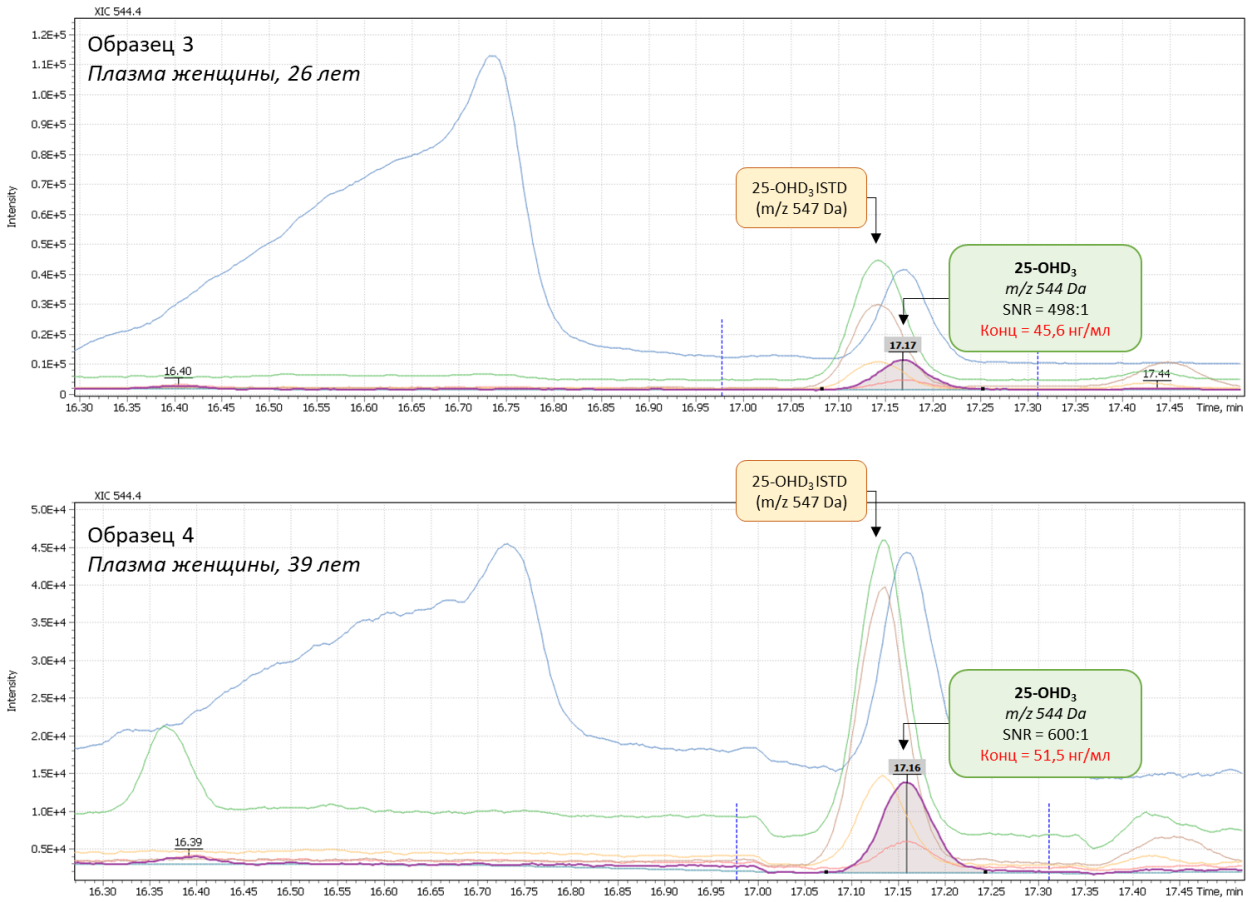



**Рис. 8.** Сравнение реальных проб плазмы мужчин и женщин.

## *Выводы*

В результате работы был разработан надёжный и чувствительный метод анализа основных метаболитов витамина D в плазме крови человека. Получены силилированные производные целевых соединений, которые в результате дериватизации содержали минимальное количество вариантов производных, а также показали хорошие хроматографические свойства. Жидко-жидкостная экстракция соединений из плазмы позволила достичь высокой степени извлечения компонентов.

Разработанный аналитический метод с использованием масс-спектрометрической системы Маэстро-αMC (ООО «Интерлаб») позволяет реализовать, как ежедневый рутинный контроль витамина D в крови человека, так и проводить крупномасштабные исследования, направленные на поиск корреляций его содержания с возможными заболеваниями человека.

## *Литература*


1. *Мальцев С.В., Мансурова Г.Ш.*, Метаболизм витамина D и пути реализации его основныз функций. Практическая медицина 09 (14) Педиатрия (http://mfvt.ru/metabolizm-vitamina-d-i-puti-realizacii-ego-osnovnyx-funkcij/)
2. *Pepe J, Romagnoli E, Nofroni I, Pacitti M.T., De Geronimo S, Letizia C, et al.* Vitamin D status as the major factor determining the circulating levels of parathyroid hormone: a study in normal subjects. Osteoporos Int 2005; 16:805e12.
3. *Jones K.S., Assar S, Harnpanich D, Bouillon R, Lambrechts D, Prentice A, et al.* 25(OH)D2 half-life is shorter than 25(OH)D3 half-life and is influenced by DBP concentration and genotype. J Clin Endocrinol Metab 2014; 99:3373e81.
4. Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. Washington, DC: National Academy Press, 2010
5. *Калинченко С.Ю., Пигарова Е.А., Гусакова Д.А., Плещева А.В.* Витамин D и мочекаменная болезнь. Consilium Medicum. 2012. Т. 14. № 12. С. 97-102.
6. *Cranney C, Horsely T, O'Donnell S, Weiler H, Ooi D, Atkinson S, et al.* Effectiveness and safety of vitamin D. Evidence Report/Technology Assessment No. 158 prepared by the University of Ottawa Evidence-based Practice Center under Contract No. 290-02.0021. AHRQ Publication No. 07-E013. Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality, 2007
7. *Holick M.F, Binkley N.C, Bischoff-Ferrari H.A, et al.* Endocrine Society. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: An Endocrine Society clinical practice guideline. J Clin Endocrinol Metab. 2011;96(7):1911-1930.
8. The Vitamin D Society. URL. *http://www.vitamindsociety.org/benefits.php*
9. *Dawson-Hughes B, Mithal A, Bonjour J.P, et al.*: IOF position statement: vitamin D recommendations for older adults. Osteoporos Int 2010; 21(7): 1151-4
10. *Gómez de Tejada Romero M.J, Sosa Henríquez M, Del Pino Montes J, Jódar Gimeno E, Quesada Gómez J.M, Cancelo Hidalgo M.J, Díaz Curiel, Mesa Ramos M, Muñoz Torres M, Carpintero Benítez P, Navarro Ceballos C, Valdés y Llorca C, Giner Ruíz V, Blázquez Cabrera J.A, García Vadillo J.A, Martínez Rodríguez M.E, Peña Arrebola A, Palacios Gil-Antuñano S.* Position document on the requirements and optimum levels of vitamin D. Rev Osteoporos Metab Miner 2011 3;1:53-64.
11. *Ziaee A, Javadi A, Javadi M, Zohal M, Afaghi A.* Nutritional Status Assessment of Minodar Residence in Qazvin City, Iran: Vitamin D Deficiency in Sunshine Country, a Public Health Issue // Global Journal of Health Science. — 2013. — Vol. 5, iss. 1. — P. 174—179. — ISSN 1916-9736. — doi:10.5539/gjhs.v5n1p174.
12. Vitamin D and Health | The Nutrition Source | Harvard School of Public Health
13. *Looker A. C., Johnson C. L., Lacher D. A., Pfeiffer C. M., Schleicher R. L., Sempos C. T.* Vitamin D status: United States, 2001–2006. // NCHS Data Brief. — 2011. — March (№ 59). — С. 1—8. — PMID 21592422.
14. *Greiller C.L, Martineau A.R.* Modulation of the immune response to respiratory viruses by vitamin D. Nutrients. 2015;7(6):4240-70.
15. *Wang T.T, Dabbas B, Laperriere D, Bitton AJ, Soualhine H, Tavera-Mendoza LE, et al.* Direct and indirect induction by 1,25-dihydroxyvitamin D3 of the NOD2/CARD15-defensin beta2 innate immune pathway defective in Crohn disease. Journal of Biological Chemistry. 2010;285(4):2227-31.

16. *Gombart A.F, Borregaard N, Koeffler H.P.* Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1, 25-dihydroxyvitamin D3. The FASEB Journal. 2005; 19(9):1067-1077.
17. *Yakoob M.Y, Salam R.A, Khan F.R, Bhutta Z.A.* Vitamin D supplementation for preventing infections in children under five years of age. Cochrane Database Systematic Reviews. 2016;11:CD008824.
18. *Bergman P, Lindh ÅU, Björkhem-Bergman L, Lindh JD.* Vitamin D and respiratory tract infections: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. PLoS one. 2013;8(6): e65835.
19. *Charan J, Goyal J.P, Saxena D, Yadav P.* Vitamin D for prevention of respiratory tract infections: a systematic review and meta-analysis. Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics. 2012;3(4):300-303.
20. *Martineau A.R, Jolliffe D.A, Hooper R.L, Greenberg L, Aloia J.F, Bergman P, et al.* Vitamin D supplementation to prevent acute respiratory tract infections: systematic review and meta-analysis of individual participant data. BMJ. 2017;356: i6583.
21. *Palacios C, Gonzalez L.* Is vitamin D deficiency a major global public health problem? Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology. 2014;144(2014):138-145.
22. *Wahl D.A, Cooper C, Ebeling P.R, Eggersdorfer M, Hilger J, Hoffmann K, Josse R et al.* A global representation of vitamin D status in healthy populations. Archives of Osteoporosis. 2012;7(1):155–172.
23. *Snellman G, Melhus H, Gedeborg R, Byberg L, Berglund L, Wernroth L, et al.* Determining vitamin D status: a comparison between commercially available assays. PLoS One 2010;5: e11555.
24. *Ruth D. Coldwell, Caroline E. Porteous, David J.H. Trafford, Hugh L.J. Makin.* Gas chromatography—mass spectrometry and the measurement of vitamin D metabolites in human serum or plasma. Steroids Volume 49, Issues 1–3, January–March 1987, Pages 155-196
25. *Ming-Yeh Yang, Ching-Yuan Huang, Tina H.T. Chiu, Kai-Chih Chang, Ming-Nan Lin, Liang-Yü Che, Anren Hu.* Using gas chromatography and mass spectrometry to determine 25-hydroxyvitamin D levels for clinical assessment of vitamin D deficiency. journal of food and drug analysis 27 (2019) 494 – 501.
26. *Yeung B, Vouros P, Reddy GS.* Characterization of vitamin D3 metabolites using continuous-flow fast atom bombardment tandem mass spectrometry and high-performance liquid chromatography. J Chromatogr 1993; 645:115e23.
27. *Harinarayan C.V, Joshi S.R.* Vitamin D status in India — Its implications and Remedial Measures // Journal of the Association of Physicians of India. — 2009. — Vol. 57, iss. January. — P. 40—48. — PMID 19753759.
28. *А. А. Гусова.* Загадочный витамин D. https://proandro.ru/obrazovanie/biblioteka/
29. *С.Ю. Калинченко, М.И. Жиленко, Д.А. Гусакова, И.А. Тюзиков, Г.Ж. Мсхалая, К.С. Саблин, А.В. Дымова.* Витамин D и репродуктивное здоровье женщин. Проблемы репродукции, 4, 2016
30. Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food, 2016