

UPLC-MS/MS法测定人血浆中25羟基维生素D的浓度及其应用^A

张叶^{*}, 郭少晨, 朱慧, 郭超, 陆宇[#], 陈效友[#] (首都医科大学附属北京胸科医院/北京市结核病胸部肿瘤研究所, 北京 101149)

中图分类号 R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)14-1907-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.14.11

摘要 目的: 建立测定人血浆中25羟基维生素D[25(OH)D]的方法, 并将其应用于临床。方法: 血浆样品经液-液萃取后, 采用超高效液相色谱-串联质谱法测定。以氘代25(OH)D₃为内标, 色谱柱为Zorbax Eclipse Plus C₁₈, 流动相为水(含0.1%甲酸)-甲醇(含0.1%甲酸), 梯度洗脱, 流速为0.35 ml/min, 柱温30℃采用电喷雾离子源, 以多反应离子监测方式进行正离子扫描; 用于定量分析的离子对分别为 m/z 413.2→395.2[25(OH)D₂]、 m/z 401.2→383.2[25(OH)D₃]、 m/z 404.3→368.2(内标)。结果: 25(OH)D₂与25(OH)D₃血药浓度在2~80 ng/ml范围内线性关系均良好(r 分别为0.998 0、0.999 9, $n=3$), 其定量下限均为2 ng/ml, 日间、日内RSD为0.78%~9.42%, 相对偏差为-2.90%~1.95%。采用该法检测78例健康受试者及98例结核患者体内25(OH)D平均血药浓度分别为(21.53±6.33)、(8.84±4.05)ng/ml, 差异有统计学意义($P<0.01$)。结论: 该方法准确、可靠、灵敏度高, 适用于血浆中25(OH)D的定量分析及人体药动学研究。

关键词 超高效液相色谱-串联质谱法; 25羟基维生素D₂; 25羟基维生素D₃; 25羟基维生素D; 血药浓度

Determination of 25-Hydroxyvitamin D in Human Plasma by UPLC-MS/MS and Its Application

ZHANG Ye, GUO Shaochen, ZHU Hui, GUO Chao, LU Yu, CHEN Xiaoyou (Beijing Chest Hospital, Capital Medical University/Beijing Tuberculosis and Thoracic Tumor Research Institute, Beijing 101149, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the determination of 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] in human plasma, and apply it in the clinic. METHODS: After liquid-liquid extraction, UPLC-MS/MS method was used to determine plasma sample. Using deuterium-25(OH)D₃ as internal standard, the determination was performed on Zorbax Eclipse Plus C₁₈ column with mobile phase consisted of water (containing 0.1% formic acid)-methanol (containing 0.1% formic acid) in gradient mode at flow rate of 0.35 ml/min, and the column temperature was 30℃. By ESI, positive ion scanning was conducted in MRM mode; the monitoring transition ion-pair was m/z 413.2→395.2 for 25(OH)D₂, m/z 401.2→383.2 for 25(OH)D₃ and m/z 404.3→368.2 for internal standard. RESULTS: The linear range of 25(OH)D₂ and 25(OH)D₃ were both 2-80 ng/ml ($r=0.998 0$ and $0.999 9$, $n=3$); the limit of quantitation was 2 ng/ml. RSDs of inter-day and intra-day were 0.78%-9.42%, and relative deviation were -2.90%-1.95%, respectively. Average plasma concentration of 25(OH)D in 78 health volunteers and 98 tuberculosis patients were (21.53±6.33) and (8.84±4.05)ng/ml, with statistical significance ($P<0.01$). CONCLUSIONS: The method is accurate, reliable and sensitive. It is suitable for quantitative analysis and pharmacokinetic study of 25(OH)D in human plasma.

KEYWORDS UPLC-MS/MS; 25-hydroxyvitamin D₂; 25-hydroxyvitamin D₃; 25-hydroxyvitamin D; Plasma concentration

应, 因此抗菌药物用量减少对耐药性的影响尚需进行长时间的观察分析^[9]。综上所述, 特殊使用级抗菌药物的使用控制是抗菌药物管理的重要和关键手段, 本研究结果反映出, 虽近期内该方法对致病菌和耐药率的影响并没有显著改善, 但能使耐药率控制在稳定的局面。

参考文献

- [1] 徐华, 申翠华, 李卫光. 使用特殊抗菌药物申请单临床应用调查分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 20(2): 250.
- [2] 卫生部. 2012年全国抗菌药物临床应用专项整治活动方案[S]. 2012-03-05.
- [3] 戴燕鸣, 刘文娟. 6种特殊使用级抗菌药物用药频度和使用强度与医院内部分病原菌耐药率的相关性分析[J]. 中国药业, 2012, 21(24): 79.

△基金项目: 北京市医院管理局重点医学专业发展计划项目(No. ZYLX201304)

* 硕士研究生。研究方向: 内科学。电话: 010-89509358。E-mail: zhangye0915@163.com

#a 通信作者: 研究员, 博士。研究方向: 药理学。电话: 010-89509357。E-mail: luyu4876@hotmail.com

#b 通信作者: 主任医师, 博士。研究方向: 结核病的诊断和治疗。电话: 010-89509343。E-mail: chenxy1998@hotmail.com

- [4] 张楠, 夏文斌. 临床药师参与特殊使用级抗菌药物评估工作模式的实践与探讨[J]. 中国药房, 2013, 24(46): 4 325.
- [5] 陈集志, 王滇, 李刚, 等. 抗菌药物专项整治对某三甲医院特殊使用级抗菌药物应用的影响与分析[J]. 中国药物应用与监测, 2013, 10(5): 291.
- [6] 黄娥, 范文, 段六生, 等. 重症监护病房肺炎克雷伯菌的耐药特性调查[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(16): 3 498.
- [7] Lee YJ, Liu HY, Lin YC, et al. Fluoroquinolone resistance of Pseudomonas aeruginosa isolates causing nosocomial infection is correlated with levofloxacin but not ciprofloxacin use[J]. Int J Antimicrob Agents, 2010, 35(3): 261.
- [8] 吴芳, 刘祖德, 程志英. 我院碳青霉烯类药物使用量与肺炎克雷伯菌耐药相关性分析[J]. 中国药房, 2015, 26(26): 3 660.
- [9] 裴丽淑, 祁伟, 魏殿军, 等. 特殊抗菌药物管理制度实行前后肺炎克雷伯菌耐药率变化[J]. 中华医院感染学杂志, 2015, 25(4): 825.

(收稿日期: 2015-07-17 修回日期: 2015-10-09)

(编辑: 晏妮)

维生素D应用广泛,是重要的免疫调节物质,在多种疾病的发生、发展及预后中都发挥着重要的作用^[1]。早在抗菌药物出现之前,高剂量的维生素D就被广泛地应用于结核病的治疗^[2-3],在抗菌药物耐药不断增加的今天,维生素D在结核病防治方面的作用重新得到关注^[4-6]。25羟基维生素D₂[25(OH)D₂]是衡量机体维生素D水平的最佳指标。液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法结合了色谱和质谱的优点,适用于人体内25(OH)D血药浓度的检测^[7]。在此基础上,本试验建立了超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法,并将其应用于测定健康受试者及结核病患者体内25(OH)D的血药浓度,为进一步探讨在我国汉族人群中维生素D血药浓度与结核病的相关性提供依据。

1 材料

1.1 仪器

4000 Q TRAP型三重四级杆串联线性离子阱复合型质谱仪、Eksigent ekspert™ Ultra LC 110型液相色谱仪(美国ABI Sciex公司);Vortex-Genie 2型漩涡混合器(美国Mo Bio公司);Micro 21R型高速冷冻离心机(美国Thermo Scientific公司);WD-12型水浴氮吹仪(杭州奥盛仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

25(OH)D₂对照品(批号:21343-40-8,纯度≥98.0%)、25(OH)D₃(批号:SLBJ9180V,纯度≥98.0%)、牛血清白蛋白(BSA,批号:SLBD3596V)均购自德国Sigma-Aldrich公司;6,19,19-氘代25羟基维生素D₃[d3-25(OH)D₃]对照品(内标,美国IsoSciences公司,批号:RT3-2011-17,纯度≥98.0%);甲醇、甲酸、乙腈为色谱纯,水为去离子水;其余试剂为分析纯。人血浆样本(包括健康人血浆及结核病患者血浆样本)来自于首都医科大学附属北京胸科医院。

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件

色谱柱:Zorbax Eclipse Plus C₁₈(50 mm×2.1 mm,3.5 μm,型号:959743-902);预柱:Zorbax Eclipse Plus C₁₈(12.5 mm×2.1 mm,5 μm,型号:821125-936);流动相:水(A,含0.1%甲酸)-甲醇(B,含0.1%甲酸);梯度洗脱(0~0.1 min,75% B;>0.1~2.5 min,75%~98% B;>2.5~3.5 min,98% B;>3.5~4.0 min,98%~75% B;>4.0~6.0 min,75% B);柱温:30℃;流速:0.35 ml/min;进样量:15 μl。

采用电喷雾离子源(ESI),以多反应监测(MRM)模式扫描,正离子方式检测;电喷雾电压:5 500 V;离子源温度:500℃,气帘气(N₂)流速:10.0 L/min;去簇电压、入口电压、出口电压分别设置为90、10、10 V;用于分析的离子对分别为 m/z 413.2→395.2[25(OH)D₂的定量离子对,碰撞能量:13 V]、 m/z 413.2→355.2[25(OH)D₂的定性离子对,碰撞能量:14 V]、 m/z 401.2→383.2[25(OH)D₃的定量离子对,碰撞能量:13 V]、 m/z 401.2→365.3[25(OH)D₃的定性离子对,碰撞能量:17 V]、 m/z 404.3→368.2(内标的定量离子对,碰撞能量:17 V)。3种待测物的化学结构及其子离子扫描图见图1。

2.2 溶液的制备

精密称取25(OH)D₂和25(OH)D₃对照品各1 mg,加甲醇1.0 ml溶解,混匀,配制成两者质量浓度均为1.0 mg/ml的贮备液;再将其稀释,配制成两者质量浓度均为20、40、100、200、400、800 ng/ml的标准曲线工作液和质量浓度均为60、400、640 ng/ml的质控样品工作液。

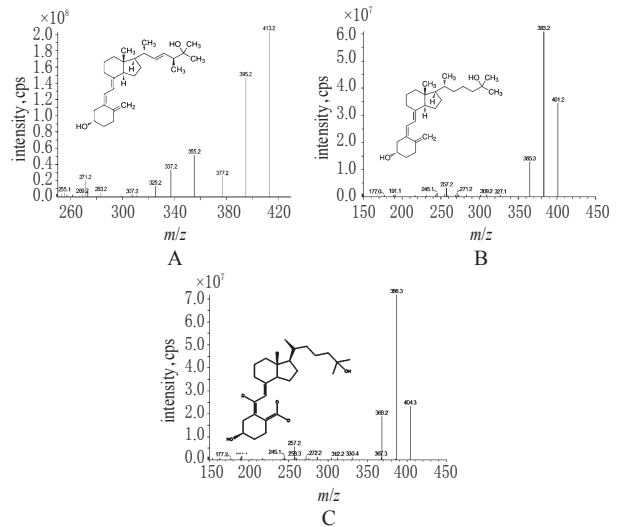


图1 3种待测物的化学结构及其子离子扫描图

A. 25(OH)D₂; B. 25(OH)D₃; C. d3-25(OH)D₃

Fig 1 Chemical structures and product ion scans of 3 analytes

A. 25(OH)D₂; B. 25(OH)D₃; C. d3-25(OH)D₃

精密称取内标对照品1 mg,加乙腈1.0 ml溶解,混匀,配制质量浓度为1.0 mg/ml的内标贮备液;再将其稀释,配制所需质量浓度的内标溶液。

上述溶液均置于-80℃下避光保存,备用。

2.3 血浆样品的处理

取血浆(或替代血浆,5% BSA溶液)200 μl,加入乙腈400 μl(含内标,其质量浓度为10 ng/ml),涡旋混匀10 s,室温下静置10 min后,加入正己烷1 000 μl萃取,室温下涡旋混匀10 min,于4℃下,13 800×g离心10 min。精密吸取上层清液800 μl置另一离心管中,室温下以高纯氮吹干后,用50%甲醇水溶液50 μl复溶,涡旋混匀1 min;于4℃下,13 800×g离心2 min,取上层清液置于进样瓶中,待测。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性考察 取空白5% BSA溶液(见图2A)、含25(OH)D₂对照品的5% BSA溶液(质量浓度为40 ng/ml,见图2B)、含25(OH)D₃对照品的5% BSA溶液(质量浓度为40 ng/ml,见图2C)、含内标的5% BSA溶液(质量浓度为40 ng/ml,见图2D)、1份健康受试者的血浆样品(见图2E)和1份结核病患者血浆样品(见图2F)各适量,按“2.3”项下方法处理后,进样分析。结果显示,在“2.1”项条件下,待测物与内标物峰形良好,内源性物质不干扰测定。典型色谱图见图2。

2.4.2 标准曲线的绘制 精密吸取5% BSA溶液、所需质量浓度的标准曲线工作液各适量,分别配制成25(OH)D₂质量浓度为2、4、10、20、40、80 ng/ml,25(OH)D₃质量浓度为2、4、10、20、40、80 ng/ml的溶液,按“2.3”项下方法处理后,进样分析,记录色谱图。以待测物与内标质量浓度的比值(x)为横坐标、两者峰面积的比值(y)为纵坐标,用加权最小二乘法进行线性回归,权重因子为 $1/x^2$,得回归方程分别为 $y_{D2}=0.010\ 8x_{D2}+0.006\ 7$ ($r=0.998\ 0$, $n=3$)、 $y_{D3}=0.032\ 9x_{D3}+0.027\ 7$ ($r=0.999\ 9$, $n=3$)。结果表明,25(OH)D₂、25(OH)D₃血药浓度在2~80 ng/ml范围内线性关系均良好。

2.4.3 定量下限及检测下限的考察 分别配制25(OH)D₂、25(OH)D₃质量浓度均为2 ng/ml的5% BSA溶液各5份,按“2.3”

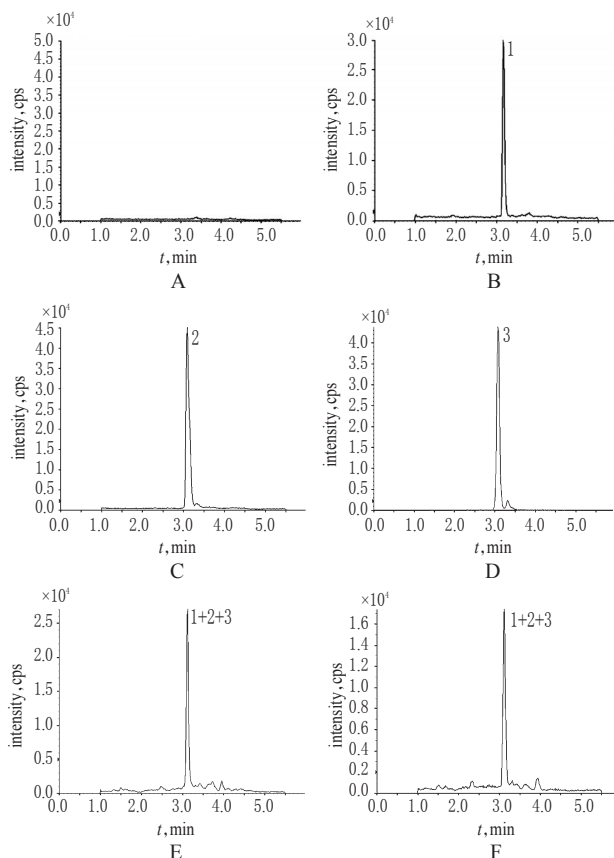


图2 典型色谱图

A. 5% BSA; B. 5% BSA+25(OH)₂; C. 5% BSA+25(OH)₃; D. 5% BSA+内标; E. 健康受试者血浆样品+内标; F. 结核患者血浆样品+内标; 1. 25(OH)₂; 2. 25(OH)₃; 3. 内标

Fig 2 Representative chromatograms

A. 5% BSA; B. 5% BSA+25(OH)₂; C. 5% BSA+25(OH)₃; D. 5% BSA+internal standard; E. plasma sample from healthy volunteer+internal standard; F. plasma sample from tuberculosis patients+internal standard; 1. 25(OH)₂; 2. 25(OH)₃; 3. internal standard

项下方法处理后,进样测定。结果表明,在该质量浓度下,本方法的实测质量浓度在理论质量浓度的90%~110%范围内,25(OH)₂和25(OH)₃的定量下限均为2 ng/ml[信噪比(S/N)≥10],再逐级二倍稀释,得两者检测下限均为0.5 ng/ml(S/N≥3)。

2.4.4 精密度与准确度试验 精密吸取5% BSA溶液、所需质量浓度的质控样品工作液各适量,分别配制成25(OH)₂低、中、高质量浓度(6、40、64 ng/ml,下同)和25(OH)₃低、中、高质量浓度(6、40、64 ng/ml,下同)的质控样品,按“2.3”项下方法处理后,进样分析。每质量浓度取5样本分析,连续测定3 d,根据当日标准曲线计算各样品的实测质量浓度,考察方法的准确度和精密度。精确度以相对标准差(RSD)来表示,准确度以相对偏差(RE)来表示。结果显示,25(OH)₂的日内RSD为4.33%~8.42%,日间RSD为4.49%~9.42%,RE为-1.83%~1.95%;25(OH)₃的日内RSD为0.78%~5.08%,日间RSD为4.39%~8.78%,RE为-2.90%~1.83%。精密度与准确度试验结果见表1。

2.4.5 稳定性试验 分别配制25(OH)₂和25(OH)₃低、中、高质量浓度质控样品,每质量浓度取5样本分析,分别考察其在室温(25℃)放置0、2、4 h,室温下于进样瓶中放置0、2、4、8 h,经历3次冻融循环,-80℃保存1、2、4、6个月等条件下的稳

表1 精密度与准确度试验结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 1 Results of precision and accuracy tests($\bar{x} \pm s, n=5$)

待测物	理论质量浓度, ng/ml	日内			日间		
		实测质量浓度, ng/ml	RSD, %	RE, %	实测质量浓度, ng/ml	RSD, %	RE, %
25(OH) ₂	6	5.89±0.50	8.42	-1.83	6.04±0.57	9.42	0.67
	40	40.78±2.67	6.54	1.95	39.91±2.77	6.94	-0.23
	64	64.08±2.78	4.33	0.13	64.77±2.91	4.49	1.20
25(OH) ₃	6	6.11±0.15	2.51	1.83	5.92±0.52	8.78	-1.33
	40	38.84±0.30	0.78	-2.90	39.66±1.74	4.39	-0.85
	64	62.32±3.17	5.08	-2.63	63.57±4.49	7.06	-0.67

定性。结果显示,在上述各条件下,各质控样品均保持稳定,其实测质量浓度与理论质量浓度的偏差均不超过±15%。

2.4.6 回收率试验 分别以5% BSA溶液和去离子水为溶剂,配制25(OH)₂和25(OH)₃低、中、高质量浓度质控样品各5份,按“2.3”项下方法处理后,进样分析,根据当日标准曲线计算实测质量浓度与理论质量浓度的比值,考察本法的相对回收率。另以50%甲醇水溶液为溶剂,配制25(OH)₂和25(OH)₃低、中、高质量浓度质控样品各5份,不进行蛋白沉淀和萃取,在室温下以高纯氮气吹干后,用50%甲醇水溶液50 μl复溶,涡旋混匀1 min,取上清液进样分析,比较此样品的峰面积与上述以5% BSA溶液和去离子水为溶剂的质控样品的峰面积,考察本法的绝对回收率。回收率试验结果见表2。

表2 回收率试验结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 2 Results of recovery tests($\bar{x} \pm s, n=5$)

待测物	理论质量浓度, ng/ml	5% BSA		去离子水	
		相对回收率, %	绝对回收率, %	相对回收率, %	绝对回收率, %
25(OH) ₂	6	100.00±8.03	65.44	103.87±12.67	71.29
	40	101.94±6.67	53.37	98.30±6.45	61.52
	64	100.13±4.34	50.64	96.13±2.48	59.13
25(OH) ₃	6	101.87±2.56	41.28	104.13±6.76	45.23
	40	103.80±3.27	31.06	102.67±3.16	35.51
	64	104.75±9.29	33.63	100.25±1.91	38.03

2.4.7 基质效应的考察 分别以5% BSA溶液和去离子水为溶剂,配制25(OH)₂和25(OH)₃低、中、高质量浓度质控样品各5份,按“2.3”项下方法处理后,进样测定,比较不同溶剂质控样品的峰面积。基质因子(%)=以5% BSA溶液为溶剂的质控样品的峰面积/以水为溶剂的质控样品的峰面积×100%,内标校正的基质因子(%)=以5% BSA溶液为溶剂的质控样品峰面积与内标的比值/以水为溶剂的质控样品的峰面积与内标的比值×100%。结果显示,本方法可以有效避免基质效应。基质效应试验结果见表3。

表3 基质效应试验结果

Tab 3 Results of matrix effects tests

理论质量浓度, ng/ml	25(OH) ₂		25(OH) ₃	
	基质因子, %	内标校正的基质因子, %	基质因子, %	内标校正的基质因子, %
6	87.82	96.20	91.49	98.80
40	87.60	103.80	87.95	101.00
64	85.72	104.20	88.57	104.60

2.5 临床应用

采用本试验建立的UPLC-MS/MS法测定健康受试者及结核病患者血浆中25(OH)₂与25(OH)₃的浓度,并求得得出25(OH)D的血药浓度,以考察其体内维生素D的水平。所有受试者年龄18~65岁,分为对照组和患者组。其中,对照组受试者78例,为无结核病史且无结核病临床症状的健康受试者;患者组受试者98例,为我院2015年2月-2015年4月入院、且确诊为结核病的患者,排除平时口服维生素D或拒绝入选的

患者。本研究方案经我院医学伦理委员会审核通过,所有受试者均知情同意并签署知情同意书。

所有受试者禁食、禁水12 h后,于次日晨起空腹静脉采血3 ml,置于肝素抗凝管中,于4℃下1 000×g离心15 min,取上清液按“2.3”项下方法处理后,进样分析。采用SPSS 19.0统计软件分析和处理所得数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验;计数资料以%表示,采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

t 检验结果显示,患者组25(OH)D平均血药浓度低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$),表明结核病患者血浆中维生素D的水平明显低于健康人群。以12、20 ng/ml分别作为维生素D缺乏、不足和充足的分界点^[8],将两组受试者按不同维生素D水平划分,比较两组各水平受试者的比例。 χ^2 检验结果显示,患者组维生素D缺乏者的比例显著高于对照组,维生素D充足者的比例显著低于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.01$),提示维生素D缺乏的人群有可能更容易感染结核。2组受试者维生素D水平测定结果见表4。

表4 2组受试者维生素D水平测定结果($\bar{x} \pm s$)

组别	n	25(OH)D 平均血药 浓度,ng/ml	维生素D 缺乏(<12 ng/ml) 例数(比例,%)	维生素D不足 (12~<20 ng/ml) 例数(比例,%)	维生素D充足 (≥20 ng/ml) 例数(比例,%)
对照组	78	21.53±6.33	4(5.1)	30(38.5)	44(56.4)
患者组	98	8.84±4.05*	82(83.7)*	14(14.3)	2(2.0)*

注:与对照组比较,* $P < 0.01$

Note:vs. control group,* $P < 0.01$

3 讨论

维生素D是人体必须的物质之一,体内含量较低,尤其对于结核病患者等特殊人群。为了提高检测方法的灵敏度,本试验采用了梯度洗脱,在增加灵敏度的同时,也提高了分离效率并减小了峰展宽,使目标峰峰形更佳,方法的特异性和精确度也得到提升。另外,样品经氮气吹干后,用50%甲醇水溶液50 μl复溶,与初始200 μl的样品体积相比浓缩了4倍,大大提高了检测的灵敏度。

维生素D是内源性物质,健康人体血浆中因含有维生素D故不能作为空白基质。现有的维生素D测定方法大多是以纯水作为溶剂,但与血浆成分差异较大,同时也忽略了血浆蛋白沉淀对测定所产生的影响。血浆中的水份占90%~92%,剩余的主要成分为白蛋白,浓度约为5%,故本方法采用5% BSA溶液替代空白血浆,作为标准曲线、定量下限及质控样品的替代基质,使方法学考察所用的样品组成更接近于血浆。由回收率试验结果可知,分别以5% BSA溶液、去离子水为溶剂的质控样品的相对回收率差别不大,但绝对回收率均较低,推测可能是由于样品中部分维生素D与蛋白结合,在血浆样品处理过程中有一定的损失所致。

在研究过程中,笔者将受试者的血浆样品经蛋白沉淀后直接进样检测,发现其基质效应过强且灵敏度较低,在增加氮气吹干浓缩步骤并再次离心后,检测发现虽灵敏度有所提高,但样品处理时间过长,以致延长了单次检测所需的时间。因此,本试验最终采用了液-液萃取法处理血浆样品,使得样品前处理时间缩短且基质效应更低。此外,内标d3-25(OH)D₃最主要的离子碎片为 m/z 386.3,但在检测过程中发现,此质谱条件下,目标峰后0.5 min处有1个较明显的杂质峰,更换流动相条件也无法消除,严重干扰样品的定量分析。因此,将该内标的

子离子调整为 m/z 368.2,以排除杂质的干扰。

目前,有多种方法用于25(OH)D的检测,包括竞争性蛋白结合分析法、竞争性酶免疫法、高效液相色谱(HPLC)法和LC-MS/MS法等,临床最常使用的免疫化学分析方法具有方便快捷、成本较低等特点,但由于抗体之间的交叉反应使该方法的特异性较差,检测结果易出现假阳性;而HPLC法通常需要对待测物进行衍生后再用荧光检测器进行检测,操作复杂且灵敏度低于LC-MS/MS法^[8]。相比之下,LC-MS/MS法具有灵敏度高、特异性强等特点,适用于体内微量物质的检测。本试验建立的UPLC-MS/MS法,以氘代维生素D为内标,采用梯度洗脱,与HPLC相比,所需样品量更少、测定时间更短^[9];与液质联用(LC-MS)法相比,准确度和精确度更高,定量下限和检测下限更低^[10]。另外,本方法进行了完整的方法学考察,包括线性、特异性、定量下限和检测下限、精密度和准确度、回收率、基质效应、稳定性等试验,保证了该法的准确、可靠。

综上所述,本试验所建立并验证的UPLC-MS/MS法,快速、可靠,灵敏度高,适用于临床检测人血浆中25(OH)D的浓度,为评价机体维生素D的水平提供了依据,也为深入研究维生素D水平与结核病的相关性提供了参考。

参考文献

- [1] Karczmarewicz E, Czekuć-Kryśkiewicz E, Płudowski P. Effect of vitamin D status on pharmacological treatment efficiency: impact on cost-effective management in medicine[J]. *Dermatoendocrinol*, 2013,5(1):1.
- [2] Dowling GB, Thomas EW, Wallace HJ. Lupus vulgaris treated with calciferol[J]. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1946,5(39):225.
- [3] Charpy J, Dowling GB. Vitamin D in cutaneous tuberculosis[J]. *Lancet*, 1947,2(6472):398.
- [4] Mastala Y, Nyangulu P, Banda RV, et al. Vitamin D deficiency in medical patients at a central hospital in Malawi: a comparison with TB patients from a previous study[J]. *PLoS one*, 2013,doi:10.1371/journal.pone.0059017.
- [5] Sudfeld CR, Giovannucci EL, Isanaka S, et al. Vitamin D status and incidence of pulmonary tuberculosis, opportunistic infections, and wasting among HIV-infected tanzanian adults initiating antiretroviral therapy[J]. *J Infect Dis*, 2013,207(3):378.
- [6] 牟金金,杨敏,柳汝明,等.维生素D辅助治疗肺结核的系统评价[J]. *中国药房*,2011,22(28):2658.
- [7] Su Z, Narla SN, Zhu Y. 25-hydroxyvitamin D: analysis and clinical application[J]. *Clin Chim Acta*, 2014,doi:10.1016/j.cca.2014.03.022.
- [8] 廖祥鹏,张增利,张红红,等.维生素D与成年人骨骼健康应用指南:2014年简化版[J]. *中国骨质疏松杂志*,2014,20(6):718.
- [9] Granado-Lorenzo F, Olmedilla-Alonso B, Herrero-Barbudo C, et al. Simultaneous determination of vitamins A, E and 25-OH-vitamin D: application in clinical assessments[J]. *Clin Biochem*, 2006,39(2):180.
- [10] 曾义.高效液相色谱-质谱法检测血清中维生素D含量[J]. *中国药业*,2013,22(20):17.

(收稿日期:2015-10-30 修回日期:2016-01-22)

(编辑:张元媛)