

# 应用 UPLC-MS/MS 检测上海市成年健康人群 血清维生素 B6 和 B7 参考区间的建立

李爽爽<sup>1</sup>, 王志成<sup>2</sup>

(1. 苏州高新区人民医院检验科, 江苏苏州 215129; 2. 复旦大学附属华山医院检验科, 上海 200040)

**摘要:**目的 建立上海市健康成年人血清维生素 B6 和 B7 的参考区间。方法 选取 2021 年 9 月~2022 年 2 月上海市 1 059 例健康成年体检者作为研究对象, 其中男性 580 例、女性 479 例, 年龄 $\geq 18$  岁。将受试者按年龄分青年组(18~44 岁)、中年组(45~59 岁)和老年组( $\geq 60$  岁), 采用超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)建立维生素 B6 和 B7 的参考区间, 并对参考区间进行验证。结果 剔除 12 例离群值后, 1 047 例成年人血清维生素 B6 和 B7 水平均呈非正态分布(均 $P<0.01$ ); 血清维生素 B6[3.64 (2.76~5.15) ng/ml vs 3.34 (2.55~4.59) ng/ml] 和 B7[0.22 (0.14~0.34) ng/ml vs 0.20 (0.13~0.33) ng/ml] 水平在不同性别组间的差异有统计学意义( $Z=2.624$ ,  $P<0.01$ ;  $Z=2.196$ ,  $P<0.05$ ), 且男性均高于女性; 3 个年龄组间血清维生素 B6 和 B7 水平的差异均无统计学意义( $Z=0.345\sim 1.817$ , 均 $P>0.05$ )。因此, 合并年龄组后, 维生素 B6 参考区间为男性 1.50~19.78 ng/mL, 女性 1.47~20.31 ng/ml; 维生素 B7 参考区间为男性 0.03~1.25 ng/ml, 女性 0.03~1.41 ng/ml。对建立的参考区间进行验证, 结果均符合标准。结论 初步建立了上海市成年人血清维生素 B6 和 B7 参考区间, 各地区实验室应按不同年龄和不同性别建立适合本地区的参考区间。

**关键词:** 维生素 B6; 维生素 B7; 超高效液相色谱-串联质谱法; 上海地区; 健康成年人; 参考区间

**中图分类号:** R446.112 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2022) 06-140-04

**doi:**10.3969/j.issn.1671-7414.2022.06.026

## Establishment of Reference Intervals for Serum Vitamin B6 and B7 in Healthy Adults in Shanghai by UPLC-MS/MS

LI Shuang-shuang<sup>1</sup>, WANG Zhi-cheng<sup>2</sup>

(1. Department of Laboratory Medicine, People's Hospital of Suzhou High-tech Zone, Jiangsu Suzhou 215129, China;

2. Department of Laboratory Medicine, Huashan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200040, China)

**Abstract: Objective** To establish the reference interval of serum vitamin B6 and B7 in healthy adults in Shanghai. **Methods** This study selected 1 059 healthy adult physical examination subjects, including 580 males and 479 females, aged  $\geq 18$  years from September 2021 to February 2022 in Shanghai for research. They were divided into three groups according to age: youth group (18~44 years old), middle-aged group (45~59 years old) and elderly group ( $\geq 60$  years old), the reference intervals of vitamin B6 and B7 was established by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS), and the reference interval was verified. **Results** After excluding 12 outliers, the serum vitamin B6 and B7 levels of 1 047 adults showed non-normal Distribution ( $P<0.01$ ). There were significant differences in serum vitamin B6[3.64 (2.76~5.15) ng/ml vs 3.34 (2.55~4.59) ng/ml] and B7[0.22 (0.14~0.34) ng/ml vs 0.20 (0.13~0.33) ng/ml] levels between different sex groups ( $Z=2.624$ ,  $P<0.01$ ,  $Z=2.196$ ,  $P<0.05$ ), and both were higher in males than in females. there was no significant difference in serum vitamin B6 and B7 levels among the three age groups ( $Z=0.345\sim 1.817$ , all  $P>0.05$ ). Therefore, after combining the age groups, vitamin B6 reference interval was 1.50~19.78 ng/ml for men and 1.47~20.31 ng/ml for women. Vitamin B7 reference interval was 0.03~1.25 ng/ml for men and 0.03~1.41 ng/ml for women. The established reference intervals were verified and the results were in line with the standard. **Conclusion** The reference intervals for serum vitamin B6 and B7 of adults in Shanghai were preliminarily established, laboratories in each region should establish reference intervals suitable for their regions according to different ages and genders.

**Keywords:** vitamin B6; vitamin B7; UPLC-MS/MS; Shanghai area; healthy adults; reference interval

维生素 B6 和 B7 是水溶性 B 族维生素成员之一, 是人体不可缺少的营养元素。维生素 B6 不仅

作者简介: 李爽爽(1992-), 女, 硕士, 主管检验师, 主要从事质谱方法学建立工作, E-mail: li118595@163.com。

通讯作者: 王志成(1975-), 男, 博士, 副研究员, 主要从事质谱项目研发与临床应用研究。

与糖尿病<sup>[1]</sup>、炎症<sup>[2]</sup>、癌症<sup>[1,3]</sup>和新冠肺炎病<sup>[4]</sup>的预后密切相关,同时还是一种有效的抗氧化剂<sup>[5]</sup>。维生素B7在维持大脑功能和神经系统方面至关重要<sup>[6]</sup>,同时还可以改善脱发和脂溢性皮炎<sup>[7]</sup>。超高效液相色谱-串联质谱法(ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)是检测维生素水平的最新技术,具有高准确性和重现性,且操作简单<sup>[8]</sup>。准确可靠的参考区间对于检验项目结果的解释以及临床决策至关重要,然而多数医院使用试剂说明书提供的参考区间,忽略了不同地区、年龄、性别和检测方法等差异的影响。目前关于维生素B6和B7参考区间的调查和建立研究尚少,本研究根据美国临床实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)和国际临床化学联合会(International Federation of Clinical Chemistry, IFCC)共同发布的EP28-A3c指南<sup>[9]</sup>,采用UPLC-MS/MS方法建立上海地区成年人血清维生素B6和B7的参考区间,以期为本地区的维生素B6和B7的合理应用提供判断标准。

## 1 材料和方法

1.1 研究对象 选取2021年9月~2022年2月在复旦大学附属华山医院检验科进行健康体检的成年人1 059例,其中男性580例,女性479例。纳入标准:身体健康,饮食正常,1个月内未服用维生素B6和B7补充剂,未接受手术或药物治疗,无急、慢性病史。参照世界卫生组织(WHO)年龄划分标准,将1 059例成年人分为三组:18~44岁为青年组,45~59岁为中年组,≥60岁为老年组。

### 1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器:超高效液相色谱质谱联用仪(Waters公司,型号:ACQUITY I-S),医用高速冷冻离心机(eppendorf公司,型号:5804R),涡旋混合仪(Kylin-Bell公司,型号:Vortex-5)和可移液枪(Thermo Scientific公司)等。

1.2.2 试剂:标准品、标准品稀释液、质控品、内标、复溶液、提取液、流动相A及流动相B均购自英盛生物技术有限公司,实验用水为屈臣氏蒸馏水。

### 1.3 方法

1.3.1 色谱条件:Waters ACQUITY UPLC BEH C18色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm),柱温40℃,进样量5 μl,用流动相A和B进行梯度洗脱,见表1。

1.3.2 质谱条件:电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI),多反应监测模式(multiple reaction monitor, MRM);采集离子对:维生素B6质荷比为184.1→148.0,维生素B7质荷比为245.1→227.0。

1.3.3 标准品准备与处理:分别取适量标准品,用标准品稀释液定容,然后用蒸馏水配制一定浓度的混合标准品,稀释后维生素B6浓度为0.781, 1.563, 3.125, 6.25, 12.5, 25.0和50.0 ng/ml,维生素B7浓度为0.156, 0.313, 0.625, 1.25, 2.5, 5.0和10.0 ng/ml。准确移取60 μl各浓度标准品于EP管中,加入60 μl维生素B6和B7混合内标液,在涡旋仪上充分涡旋5 min,然后在高速离心机中12 000 r/min离心10 min,取上清液70 μl至96孔板中,正压过滤1 min,静置5 min,加入750 μl提取液,正压收集1 min,再次加入750 μl提取液,正压收集1 min,氮吹20 min,加入100 μl复溶液震荡2 min后移至进样板。

表1 流动相梯度洗脱程序

时间	流速(ml/min)	流动相A:B(%)
1second	0.5	99:1
1.0 min	0.5	99:1
1.5 min	0.5	72:28
3.8 min	0.5	72:28
4.0 min	0.5	5:95
5.0 min	0.5	5:95
7.0 min	0.5	99:1

1.3.4 血清样本的处理:采集健康体检者空腹静脉血3 ml,置于分离胶促凝管中,4 000 r/min离心10 min,收集血清于-80℃保存,溶血、脂血样本需重新采集,样本的前处理严格按照实验室标准操作规程执行,后续操作步骤同标准品。

1.3.5 数据分析:通过7个浓度的标准品计算标准曲线,然后将样品中维生素B6和B7峰面积与相应的内标峰面积的比值带入标准曲线,计算出样品中维生素B6和B7浓度。每批次实验室检测的室内质控均在控,每年参加国家卫生健康委临床检验中心室间质评成绩均合格。

1.4 统计学分析 实验数据采用SPSS 26.0软件进行统计学分析。采用箱式图法剔除离群值,所有数据分组比较均用K-S检验(One sample Kolmogorov-Smirnov Test)作正态性验证,呈非正态分布数据用中位数和四分位数表示。所有组间比较的数据均采用两独立样本的非参数检验(Mann-Whitney U Test),采用Spearman相关系数对数据相关性进行分析。以参考分布的2.5%和97.5%百分位数为参考下限和上限,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 数据分布 剔除12例离群值后,最终有效统计数据为1 047例,男性573例,女性474例,平均年龄为48.2岁。按年龄分为三组,青年组387例,中年组516例,老年组144例,经K-S检验显

示血清维生素 B6 和 B7 水平均呈非正态分布 (均  $P < 0.01$ )。

2.2 不同性别、不同年龄组间健康成年人血清维生素 B6 和 B7 水平的比较 健康成年男女血清维生素 B6 水平分别为 3.64(2.76~5.15), 3.34(2.55~4.59) 和 B7 水平分别为 0.22(0.14~0.34)ng/ml, 0.20(0.13~0.33)ng/ml, 差异有统计学意义 ( $Z=2.624$ ,  $P < 0.01$ ;  $Z=2.196$ ,  $P < 0.05$ ), 且男性均高于女性。为了考察年龄对血清维生素 B6 和 B7 水平的影响, 将 1 047 例健康成年人按年龄分为三组, 各年龄组间

表 2 不同年龄组间健康成年人血清维生素 B6 和 B7 水平比较

组别	n	维生素 B6 (ng/ml)			维生素 B7 (ng/ml)		
		M (P <sub>25</sub> ~P <sub>75</sub> )	Z	P	M (P <sub>25</sub> ~P <sub>75</sub> )	Z	P
青年组	387	3.35 (2.56~4.76)	1.542	0.123 <sup>a</sup>	0.20 (0.12~0.32)	1.817	0.069 <sup>a</sup>
中年组	516	3.56 (2.72~5.08)	0.670	0.503 <sup>b</sup>	0.22 (0.14~0.33)	0.345	0.730 <sup>b</sup>
老年组	144	3.74 (2.88~4.86)	1.752	0.080 <sup>c</sup>	0.22 (0.13~0.35)	0.800	0.424 <sup>c</sup>

注: a: 青年组 vs 中年组, b: 中年组 vs 老年组, c: 青年组 vs 老年组。

2.4 参考区间的验证 纳入 2022 年 3~4 月在复旦大学附属华山医院检验科进行健康体检的成年男、女性各 20 例, 分别检测血清维生素 B6 和 B7 水平, 若超出参考区间的数据低于 2 个 (10%), 则通过验证; 反之, 验证不通过。鉴于验证的结果均分布在相应的参考区间之内, 本研究所建立的参考区间具有实际意义, 可以在临床使用和推广。

### 3 讨论

维生素 B6 和 B7 在维持生命活动诸如机体代谢、生理以及发育中发挥着关键作用, 临床上血清维生素水平的监测亦受到更多的重视<sup>[6,10]</sup>。参考区间是解释患者检验结果的基本工具, 建立参考区间应基于健康人群, 并对性别、年龄和种族等关键因素进行分析, 每组应不少于 120 例样本<sup>[9]</sup>。本研究 1 047 例健康成年体检者中男、女性比例为 1.2 : 1, 每组样本量均大于 120 例, 符合建立参考区间的标准。血清维生素 B6 和 B7 水平在不同性别间的差异有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ), 且男性均高于女性。已有研究表明维生素 B6 水平存在性别差异<sup>[11-12]</sup>, 可能是因为男性和女性的饮食习惯、激素水平以及代谢水平不同有关。三个年龄组间血清维生素 B6 和 B7 水平的差异无统计学意义 (均  $P > 0.05$ ), 且与年龄之间没有相关性, 但是已有研究表明维生素 B6 水平和年龄呈负相关, 且需要对年龄进行分组<sup>[11-12]</sup>, 这可能与不同地区和不同种族有关。目前尚未见有研究表明成年人维生素 B7 水平与性别和年龄相关。最终将维生素 B6 按性别分为两组参考区间, 男性为 1.50~19.78 ng/ml, 女性

血清维生素 B6 和 B7 水平的差异均无统计学意义 ( $Z=0.800$ ~1.817, 均  $P > 0.05$ ), 故无需划分年龄组, 见表 2。经 Spearman 相关性分析, 血清维生素 B6 和 B7 水平与年龄之间没有相关性 (均  $P > 0.05$ )。

2.3 参考区间的建立 采用百分位数法 (P<sub>2.5</sub>~P<sub>97.5</sub>) 确定血清维生素 B6 和 B7 参考区间, 以 2.5% 和 97.5% 百分位数为参考下限和上限, 血清维生素 B6 参考区间为男性 1.50~19.78 ng/ml, 女性 1.47~20.31 ng/ml; 血清维生素 B7 参考区间为男性 0.03~1.25 ng/ml, 女性 0.03~1.41 ng/ml。

为 1.47~20.31 ng/ml, 若以试剂说明书提供的参考区间 2.0~25.0 ng/ml 为标准, 阳性率为 7.2%; 以本研究的参考区间为标准, 则阳性率为 2.3%。维生素 B7 按性别分为两组参考区间, 男性为 0.03~1.25 ng/ml, 女性为 0.03~1.41 ng/ml, 若以试剂说明书提供的参考区间 0.2~3.0 ng/ml 为标准, 阳性率多达 43.1%; 以本研究的参考区间为标准, 阳性率为 1.7%, 明显降低了误诊率。卢美红等<sup>[13]</sup>在南通地区健康人群血清神经元特异性烯醇化酶参考区间的调查中也发现与试剂说明书提供的参考区间差异较大, 因此直接引用试剂说明书提供的参考区间可能并不适用于本地区人群。不同地区及不同人群的参考区间不完全一致, 有必要进一步研究和验证以获得可靠的参考区间, 有助于降低诊断的假阳性, 避免误诊给患者造成不必要的心理和经济负担。维生素 B6 和 B7 是水溶性维生素, 体内浓度高时可迅速从尿液排出, 几乎不产生毒性。但有报道长期、大量应用维生素 B6 可致严重的神经病变, 出现认知障碍、肢体无力和手足麻木等症状<sup>[14]</sup>。迄今尚未见有维生素 B7 中毒的报道, 但是长期、大量服用维生素 B7 会干扰肌钙蛋白 T 和甲状腺激素的检测结果, 导致急性心肌梗死漏诊和毒性弥漫性甲状腺肿误诊<sup>[15]</sup>。另外通过参考区间验证发现本参考区间适用于本地区临床, 但是只针对上海地区的成年人, 儿童和孕妇的参考区间还需进一步探讨。

综上所述, 本研究使用 UPLC-MS/MS 方法初步建立了上海市成年人血清维生素 B6 和 B7 的参考区间, 区域化的参考区间可进一步提高临床诊断



准确性,为今后开展维生素B6和B7代谢、膳食摄入或补充剂、以及与疾病关系的研究奠定基础。

#### 参考文献:

- [1] MERIGLIANO C, MASCOLO E, BURLA R, et al. The relationship between vitamin B6, diabetes and cancer [J]. *Front Genet*, 2018, 9: 388.
- [2] UELAND P M, MCCANN A, MIDTTUN Ø, et al. Inflammation, vitamin B6 and related pathways [J]. *Mol Aspects Med*, 2017, 53: 10-27.
- [3] MOCELLIN S, BRIARAVA M, PILATI P. Vitamin B6 and cancer risk: A field synopsis and meta-analysis [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2017, 109(3): 1-9.
- [4] KUMRUNGSEE T, ZHANG P, CHARTKUL M, et al. Potential role of vitamin B6 in ameliorating the severity of COVID-19 and its complications [J]. *Front Nutr*, 2020, 7: 562051.
- [5] DALTO D B, MATTE J J. Pyridoxine (Vitamin B6) and the glutathione peroxidase system; a link between one-carbon metabolism and antioxidation [J]. *Nutrients*, 2017, 9(3): 189.
- [6] LEON-DEL-RIO A. Biotin in metabolism, gene expression, and human disease [J]. *J Inherit Metab Dis*, 2019, 42(4): 647-654.
- [7] LIPNER S R. Rethinking biotin therapy for hair, nail, and skin disorders [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2018, 78(6): 1236-1238.
- [8] SEGER C, SALZMANN L. After another decade: LC-MS/MS became routine in clinical diagnostics [J]. *Clin Biochem*, 2020, 82: 2-11.
- [9] Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI EP28-A3C: Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory: approved guideline-third edition[S]. Wayne: PA, CLSI EP28-A3C, 2010.
- [10] STACH K, STACH W, AUGOFF K. Vitamin B6 in health and disease [J]. *Nutrients*, 2021, 13(9): 3229.
- [11] KUSHNIR M M, SONG Boya, YANG E, et al. Development and clinical evaluation of a high-throughput LC-MS/MS assay for vitamin B6 in human plasma and serum [J]. *J Appl Lab Med*, 2021, 6(3): 702-714.
- [12] SCHINI M, NICKLIN P, EASTELL R. Establishing race-, gender- and age-specific reference intervals for pyridoxal 5'-phosphate in the NHANES population to better identify adult hypophosphatasia [J]. *Bone*, 2020, 141: 115577.
- [13] 卢美红, 鞠少卿, 丛辉, 等. 南通地区健康人群血清NSE电化学发光法检测参考区间的调查 [J]. *现代检验医学杂志*, 2018, 33(04): 59-62.
- LU Meihong, JU Shaoqing, CONG Hui, et al. Investigation of serum NSE reference range of healthy people in Nantong with electrochemiluminescence[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2018, 33(4): 59-62.
- [14] MALET L, DAYOT L, MOUSSY M, et al. Peripheral neuropathy with hypervitaminosis B6 caused by self-medication [J]. *Rev Med Interne*, 2020, 41(2): 126-129.
- [15] 刘栋, 仝慧, 陈斌, 等. 外源性生物素对基于生物素-链霉素和素化学发光技术干扰的研究进展 [J]. *现代检验医学杂志*, 2021, 36(3): 161-164.
- LIU Dong, TONG Hui, CHEN Bin, et al. Research progress on exogenous biotin interference on chemiluminescence immunoassay based on biotin avidin system[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2021, 36(3): 161-164.
- 收稿日期: 2022-06-27  
修回日期: 2022-08-25
- 
- (上接第123页)
- [15] JOSHI R, WANNAMETHEE S G, ENGMANN J, et al. Triglyceride-containing lipoprotein sub-fractions and risk of coronary heart disease and stroke: A prospective analysis in 11 560 adults[J]. *European Journal of Preventive Cardiology*, 2020, 27(15): 1617-1626.
- [16] 孙阳阳, 隋萍, 刘晓红, 等. 急性冠脉综合征患者PCI术后1年发生不良心血管事件风险预测模型的构建及评价 [J]. *护理学报*, 2020, 27(19): 11-16.
- SUN Yangyang, SUI Ping, LIU Xiaohong, et al. Establishment and evaluation of risk prediction model of major adverse cardiac events in patients with acute coronary syndrome one year after percutaneous coronary intervention [J]. *Journal of Nursing(China)*, 2020, 27 (19):11-16.
- [17] DELAHUNT E, FARRELL G, BOYLAN A, et al. Mechanisms of acute ankle syndesmosis ligament injuries in professional male Rugby union players: a systematic visual video analysis[J]. *British Journal of Sports Medicine*, 2021, 55(12): 691-696.
- [18] WINDECKER S, LOPES R D, MASSARO T, et al. Antithrombotic therapy in patients with atrial fibrillation and acute coronary syndrome treated medically or with percutaneous coronary intervention or undergoing elective percutaneous coronary intervention: Insights from the AUGUSTUS trial[J]. *Circulation*, 2019, 140(23): 1921-1932.
- [19] 齐浠羽. 通过不同冠状动脉评分方法评估妊娠相关蛋白A与冠心病患者冠状动脉病变程度的关系 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2019.
- QI Xiyu. Assessment of the relationship between pregnancy-associated protein A and the severity of coronary artery disease in patients with coronary heart disease by different coronary artery scoring methods[D]. Shenyang: China Medical University, 2019.
- [20] SHURRAB M, DANON A, ALNASSER S, et al. Dual-Antithrombotic therapy with DOACs after acute coronary syndrome or percutaneous coronary intervention in atrial fibrillation: a meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *The Canadian Journal of Cardiology*, 2020, 36(1): 135-142.
- 收稿日期: 2022-04-19  
修回日期: 2022-06-22