UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie

Kamila Pultarová

STANOVENÍ NIACINU A JEHO METABOLITŮ METODOU HPLC-MS

Determination of niacin and its metabolites by HPLC-MS

Diplomová práce

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Radomír Čabala, Dr.

Praha 2014

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne …….. ……

Podpis

Poděkování

Zde bych ráda poděkovala svému školiteli, panu doc. RNDr. Radomíru Čabalovi, Dr., a konzultantce, paní RNDr. Evě Tvrzické, CSc., dále panu RNDr. Marku Veckovi, Ph.D. a Mgr. Martinu Jechovi za odborné vedení, pomoc, ochotu, cenné rady a připomínky k mé práci a příjemnou spolupráci.

Děkuji svým rodičům a příteli Ing. Janu Žantovi, IWE za veškerou podporu při mém studiu.

Dále bych ráda poděkovala všem, kteří mě v práci podpořili a pomohli.

Abstrakt

Kyselina nikotinová je hypolipidemikum s příznivými účinky na plazmatické lipoproteiny. Léková forma se prodlouženým uvolňováním vede k pyrimidinovým metabolitům, které představují zvýšené riziko hepatotoxicity, proto je nutné jejich monitorování. Úkolem předkládané práce bylo vyvinout metodu HPLC-MS pro stanovení kyseliny nikotinové (NA), nikotinamidu (NAM), kyseliny nikotinurové (NUA), 1-methyl-nikotiamidu (MNA), nikotinamid-N-oxidu (NNO), 1-methyl-2-pyridon-5-karboxamidu (2-Pyr) a 1-methyl-4-pyridon-5-karboxamidu (4-Pyr) v krevní plazmě, která by byla dobře využitelná pro monitorování hypolipidemické léčby niacinem.

Byly srovnány kalibrační závislosti jednotlivých metabolitů na kolonách Hypercarb (grafitový uhlík) a Hypersil Silica (silikagel). Na obou kolonách byla zjištěna lineární kalibrační závislost každého analytu kromě MNA v koncentračním rozsahu 10-2000 ng/ml pro čisté látky; kalibrace v lidské krevní plazmě na koloně Hypersil Silica byla lineární v rozsahu 20-4000 ng/ml pro všechny analyty. Korelační koeficient se pohyboval v rozmezí 0,9400-0,9997. Délka analýzy byla 15 minut na koloně Hypercarb a 27 minut na koloně Hypersil Silica. Biologické vzorky byly extrahovány na pevné fázi se sulfonylovou skupinou. Reprodukovatelnost pro biologické vzorky se pohybovala od 0,06% do 19,97 %.

Abstract

Nicotinic acid (NA) is a hypolipidemic agent with pleiotropic effects on plasma lipoproteins. Its medicamentous form with delayed secretion leads to pyrimidine metabolites, which make increased risk of hepatotoxicity and should be monitored. The aim of the presented study was to introduce HPLC-MS method for the determination of NA, nicotinamide (NAM), nicotinuric acid (NUA), 1-methyl-nicotiamide (MNA), nicotinamid-N-oxide (NNO), 1-methyl-2-pyridon-5-carboxamide (2-Pyr) and 1-methyl-4-pyridon-5-carboxamide (4-Pyr) in blood plasma useful for the monitoring of hypolipidemic therapy.

We have compared calibration dependences of individual metabolites using two columns - Hypercarb (grapfite carbon) and Hypersil Silica (silicagel). Both columns revealed linear calibration dependences for all mentioned analytes except MNA in the concentration range 10-2000 ng/ml for chemical standards; calibration dependence in human blood plasma measured with the column Hypersil Silica was linear in the range 20-4000 ng/ml for all tested analytes. Correlation coefficient varied between the value 0,9400 and 0,9997. Analysis time was 15 min with the column Hypercarb and 27 min with Hypersil Silica. Biological samples were extracted using solid phase with sulphonyl group. Reproducibility of the results of biological samples varied between 0,06% and 19,97 %.

Obsah

Seznam použitých symbolů a zkratek……7

1. Úvod……9

2. Cíl práce……11

3. Teoretická část……12

3.1 Hmotnostní spektrometrie……12

3.2 Extrakce na pevné fázi……15

3.3 Niacin a jeho metabolity……17

4. Experimentální část……24

4.1 Použité chemikálie……24

4.2 Použité přístroje a zařízení……24

4.3 Pracovní postup……25

5. Výsledky a diskuze……29

5.1 Optimalizace pracovních podmínek na hmotnostním spektrometru……29

5.2 Optimalizace pracovních podmínek na HPLC……34

5.3 Měření reálných vzorků……55

6. Závěr……57

Literatura……58

Příloha……64

Seznam použitých symbolů a zkratek

2–pyr	N–methyl-2-pyridon-5-karboxamid
4-pyr	N-methyl-4-pyridon-5-karboxamid
α2–AP	alfa2-antiplasmin
ACN	acetonitril
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
apo	apolipoprotein
APPI	fotoinizace za atmosférického tlaku
ATP	adenosintrifosfát
c-AMP	cyklický adenosinmonofosfát
DGAT	diacylglycerol acyltransferáza
ESI	ionizace elektrosprejem
FA	kyselina mravenčí
FFA	volné mastné kyseliny
HDL	lipoproteiny o vysoké hustotě
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HSL	hormonálně senzitivní lipáza
IS	interní standard
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě
LOD	mez detekce (limit of detection)
LOQ	mez stanovitelnosti (limit of quantification)
Lp(a)	lipoprotein a
m/z	poměr hmotnost iontu a jeho náboje

MALDI	ionizace laserem za spoluúčasti matrice
MNA	1-methylnikotinamid
MS	hmotnostní spektrofotometrie (mass spectrometry)
NA	kyselina nikotinová, niacin
NAD	nikotinamid adenin dinukleotid
NADP	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NAM	nikotinamid
NNO	nikotinamid-N-oxid
NUA	nikotinurová kyselina
PAI-1	inhibitor-1 aktivátoru plasminogenu
PG	prostaglandin
R	korelační koeficient
RPM	označení jednotky otáčky/minuta
SIM	sledování vybraného iontu (selected-ion monitoring)
SPE	extrakce na pevné fázi (Solid Phase Extraction)
SR	specifický receptor
TG	triacylglyceroly
tPA	tkáňový aktivátor plasminogenu
U	stejnosměrné napětí
UV	ultrafialové záření
V	amplituda střídavého napětí
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustotě

1. Úvod

Kyselina nikotinová, zvaná též niacin (z anglického názvu NIcotinic ACid vitamIN), vitamin B3 nebo vitamin PP (z anglického Pellagra Preventive factor), je vitamin rozpustný ve vodě, který hraje důležitou roli v energetickém metabolizmu buňky. Jeho hypolipidemické účinky jsou známy již 50 let.[1,2] Byl popsán inhibiční účinek niacinu na lipolýzu tukové tkáně, kde se váže na specifický receptor.[3] Tato vazba vede k inhibici adenylát cyklázy, poklesu koncentrace cyklického adenosinmonofosfátu (c-AMP), který je spojen s desaktivací hormonálně senzitivní lipázu (HSL). V játrech dochází ke snížení syntézy triacylglycerolů jednak vzhledem k omezení dostupnosti substrátu, jednak v důsledku blokády jaterní isoformy diacylglycerol acyltransferázy (DGAT-2). Na snížené sekreci lipoproteinů o velmi nízké hustotě (VLDL) z jater se podílí také zpomalené sestavení částice VLDL z triacylglycerolů (TG) a apolipoproteinu B (apo B).[4] Niacin dále zpomaluje katabolizmus lipoproteinů o vysoké hustotě (HDL) v játrech blokádou jejich specifických receptorů, čímž se zvyšuje jejich koncentrace. Současně zvyšuje expresi transportéru ABCA-1, který je prvním z protagonistů zpětného transportu cholesterolu, a tím potencuje eflux cholesterolu z buněk.[2,4]

V poslední době byly popsány také extrahypolipidemické účinky niacinu, které zahrnují antioxidační působení, zvýšenou expresi PGD2 (který je metabolizován na PGJ2) s následnou aktivací PPAR-γ a sníženou expresi cytoadhezních proteinů a růstových faktorů.[3] Zvýšená exprese PGD2 zvyšuje prokrvení pokožky (flush) projevující se zrudnutím.[5] Preparát Tredaptive s řízeným uvolňováním niacinu obsahuje také inhibitor PGD2 syntházy, čímž je minimalizován tento nežádoucí účinek.[6,7]

Niacin zvyšuje koncentrace leptinu a adiponektinu. Pokles tendence k trombóze navozené podáváním niacinu je důsledkem snížení koncentrace lipoproteinu „a“ (Lp(a)), fibrinogenu, inhibitoru-1 aktivátoru plasminogenu (PAI-1), tkáňového aktivátoru plasminogenu (tPA) i α2-antiplasminu (α2-AP).[8,9] Zjištěny byly i protizánětlivé účinky niacinu v aterosklerotickém procesu.

Niacin je prekursorem dvou esenciálních koenzymů - nikotinamid adenin dinukleotidu (NAD) a nikotinamid adenin dinukleotid fosfátu (NADP), které

mohou být redukovány na NADH a NADPH. Účastní se oxidoredukčních reakcí, které jsou katalyzovány dehydrogenázami a oxidoreduktázami a ovlivňují tak četné metabolické procesy.[10]

Studium farmakokinetiky a farmakodynamiky NA vyžaduje adekvátní metody umožňující stanovení NA a výše uvedených metabolitů v biologickém materiálu. Zavedení metody značně komplikuje fakt, že metabolity niacinu se velmi liší ve fyzikálně-chemických vlastnostech (především polaritě). Spojení HPLC s hmotnostně spektrometrickou (MS) detekcí může odstranit některé nedostatky dřívějších přístupů.

2. Cíl práce

Kyselina nikotinová je hypolipidemikum s prokázanými příznivými účinky na plazmatické lipidy a lipoproteiny (snižuje koncentrace VLDL, mění profil LDL ve prospěch větších částic o nižší hustotě, zvyšuje koncentrace HDL a jako jediná snižuje koncentrace lipoproteinu Lpa). Léková forma se zpomaleným uvolňováním vede k pyrimidinovým metabolitům, které představují zvýšené riziko hepatotoxicity, proto je nutné jejich monitorování. Úkolem předkládané práce bylo vyvinout metodu HPLC-MS pro stanovení metabolitů kyseliny nikotinové v krevní plazmě, která by byla dobře využitelná pro monitorování hypolipidemické léčby niacinem.

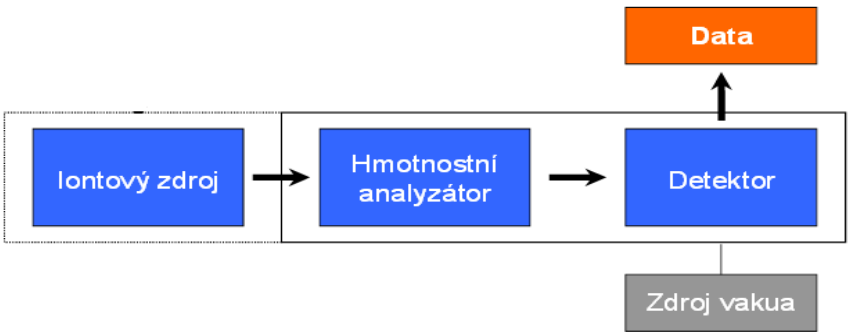
3. Teoretická část

Pro svou vysokou selektivitu a citlivost byl pro stanovení niacinu a jeho metabolitů vybrán systém HPLC–MS (vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí), což je časté spojení těchto dvou systémů. V teoretické části nebude systém HPLC rozebírán, jelikož jeho vysvětlení je dostupné v běžných učebnicích zabývajících se separačními metodami.

3.1 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně-chemická metoda, která stanovuje hmotnosti molekul a atomů po jejich převedení na ionty. Podstatou hmotnostní spektrometrie je separace iontů produkovaných v iontovém zdroji přístroje na základě jejich efektivní hmotnosti (m/z, m-hmotnost iontu a z-nábojové číslo) a jejich následná detekce. Všechny tyto procesy probíhají v uzavřeném prostoru, ve kterém je pomocí systému pump kontinuálně udržováno vakuum.[11]

Hmotnostní detektor slouží k zaznamenávání intenzity určitých iontů vznikajících v iontovém zdroji, a poté identifikuje analyty na základě jejich hmotnostních spekter, a proto se jedná se o univerzální, vysoce selektivní a citlivý detektor. Schéma hmotnostního detektoru znázorňuje obr. 1. [12]



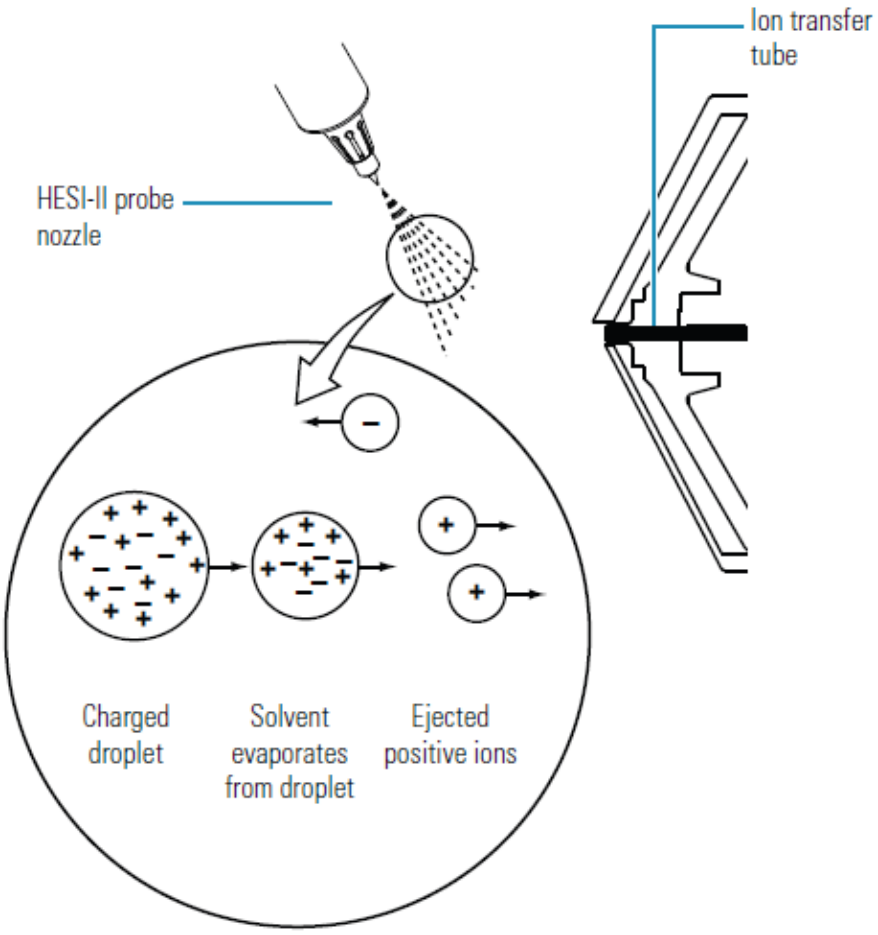
Obr. 1: Schéma hmotnostního detektoru.[12]

Ionizační techniky

Vhodná ionizační technika je vždy zvolena na základě typu stanovovaných molekul či sloučenin. Mezi nejznámější ionizační techniky patří ESI (ionizace elektrosprejem), APCI (chemická ionizace za atmosférického tlaku), APPI

(fotoinizace za atmosférického tlaku) a MALDI (ionizace za spoluúčasti matrice).[13] Teorii ionizace těmito technikami lze nalézt v učebnicích hmotnostní spektrometrie a pokročilých separačních metod.

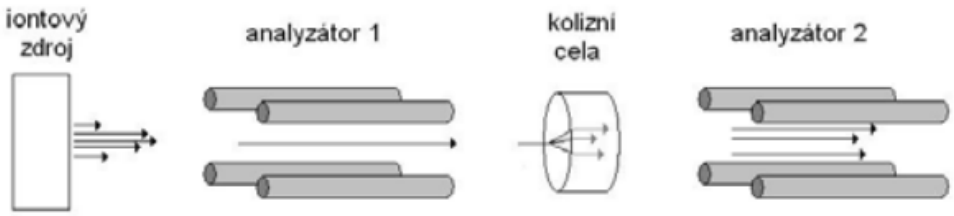
Při stanovování niacinu a jeho metabolitů byla použita HESI–II sonda (ESI typ ionizace), která může být použita v pozitivním či negativním módu (– bylo měřeno v pozitivním módu). Jedná se o elektrosprejovou ionizaci patřící mezi jemné ionizační techniky, která ionizuje a převádí analyty z polární kapalné fáze do fáze plynné. Při ESI ionizaci dochází ke sprejování rozpuštěného vzorku v kapalné fázi kapilárou, na kterou je vloženo vysoké napětí. Coulombickými explozemi a odpařováním rozpouštědla vznikají nabité kapky stále menšího průměru, až závěrem dochází k desorpci iontů do plynné fáze. Tato sonda je vhodná pro ionizaci středně polárních až polárních analytů v široké škále molekulových hmotností. K ionizaci je třeba použít alespoň částečně polární mobilní fáze sloužící jako donory protonů. Hmotnostní spektrum pak obsahuje převážně adukty s vodíkem nebo sodíkem a složitější klastry.[14, 15]



Obr. 2: Schéma procesu ionizace sondou HESI v pozitivním módu.[16]

Trojitý kvadrupólový analyzátor

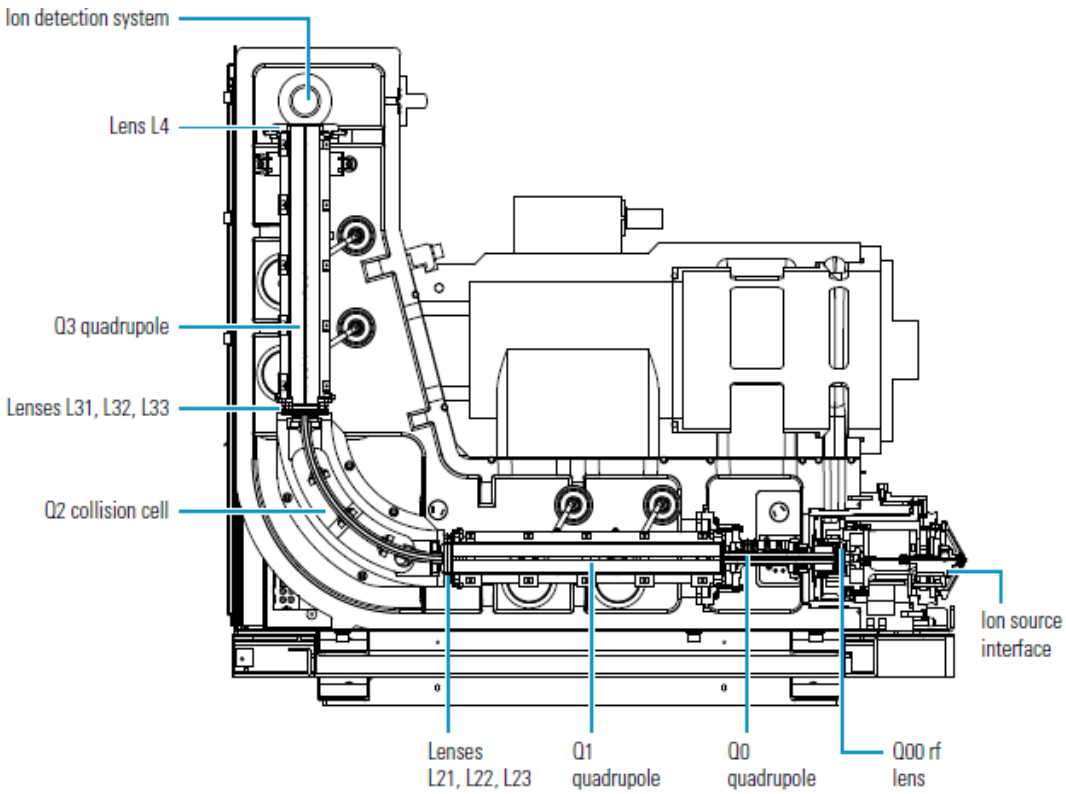
Kvadrupólový analyzátor představují čtyři stejné kovové tyče kruhového průměru, kde na dvě protilehlé tyče je vloženo kladné stejnosměrné napětí a na dvě zbývající je vloženo záporné stejnosměrné napětí. Na všechny čtyři tyče je superponováno střídavé vysokofrekvenční napětí. Ion, který je přiveden do středu osy kvadrupólu, začne oscilovat. Pro určitý poměr U/V (U - stejnosměrné napětí, V - amplituda střídavého napětí) jsou v daný časový okamžik oscilace stabilní jen pro ion s určitou hodnotou m/z. Tento ion projde kvadrupólem a dostane se na detektor, ostatní ionty jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu. Pakliže jsou postupně měněny hodnoty U a V (poměr zůstává zachován) jsou postupně na detektor propuštěny všechny ionty. [17]



Obr. 3: Schéma trojitého kvadrupólu. [18]

Trojitý kvadrupólový analyzátor jsou tři kvadrupóly řazeny za sebou, z nichž prostřední kvadrupól slouží jako kolizní cela, kde je zavedený kolizní plyn. Kolizní plyn způsobí kolizní excitaci určitých iontů kvadrupólovým analyzátorem Q1 a následně jejich fragmentaci. Tyto fragmenty jsou analyzovány pomocí kvadrupólového analyzátoru Q3. U trojitého kvadrupólového analyzátoru máme možnost měřit v různých módech: sken iontů prekurzoru, produktových iontů, iontových reakcí a neutrálních ztrát.[17] Výhodou trojitého kvadrupólu oproti jednoduchému je vyšší selektivita a citlivost.

Na obr. 4 je znázorněno schéma systému MS, který byl použit v této práci.



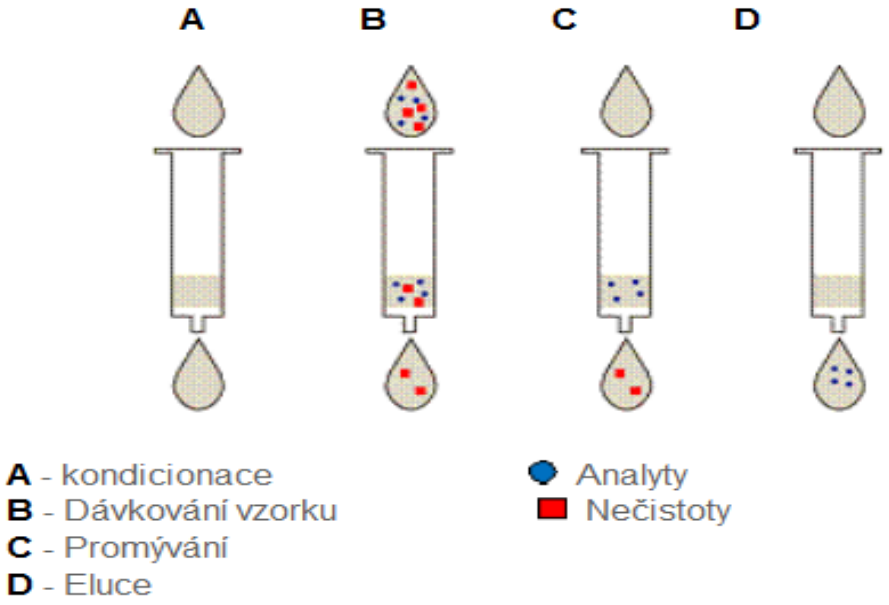
Obr. 4: Schéma hmotnostního spektrometru TSQ Quantum Access Max. [19]

3.2 Extrakce na pevné fázi

Extrakce na pevné fázi, neboli extrakce pevným sorbentem (SPE – Solid Phase Extraction)[20], představuje široce používanou moderní metodu izolace a čištění analyzovaných látek.

Princip

Principem je zakoncentrování analytů, které spočívá v jejich účinné sorpci ze vzorku na pevném sorbentu. Ostatní komponenty vzorku by měly být zachycovány co nejméně. Zachycené analyty jsou následně uvolněny z pevného sorbentu elucí vhodným rozpouštědlem, které má výrazné solvatační schopnosti pro sledované analyty. [21,22]



Obr. 5: Schéma procesu zakoncentrování analytů. [22]

Využití SPE techniky

Technika SPE se využívá k čištění extraktů, které spočívá v odstranění nežádoucích komponent ze vzorku, či jiného analytu zachycením na pevné fázi. Cílem je minimalizovat sorpci stanovovaných analytů, které projdou přes SPE kolonku a jsou jímány pro další zpracování a konečnou analýzu.[21,22] Možný je i obrácený přístup, kdy dochází k zachycení matrice, a kdy projdou jen žádané analyty (např. selektivní odstranění fosfolipidů z lyzátů buněk).

Dále je možno techniku využít k transportu analytů, kvůli potlačení degradace některých analytů vzorku, kontaminace nebo jiných nežádoucích procesů. V takovém případě se provádí extrakce již na místě odběru. SPE kolonky jsou následně transportovány do laboratoře a zpracovány.[22]

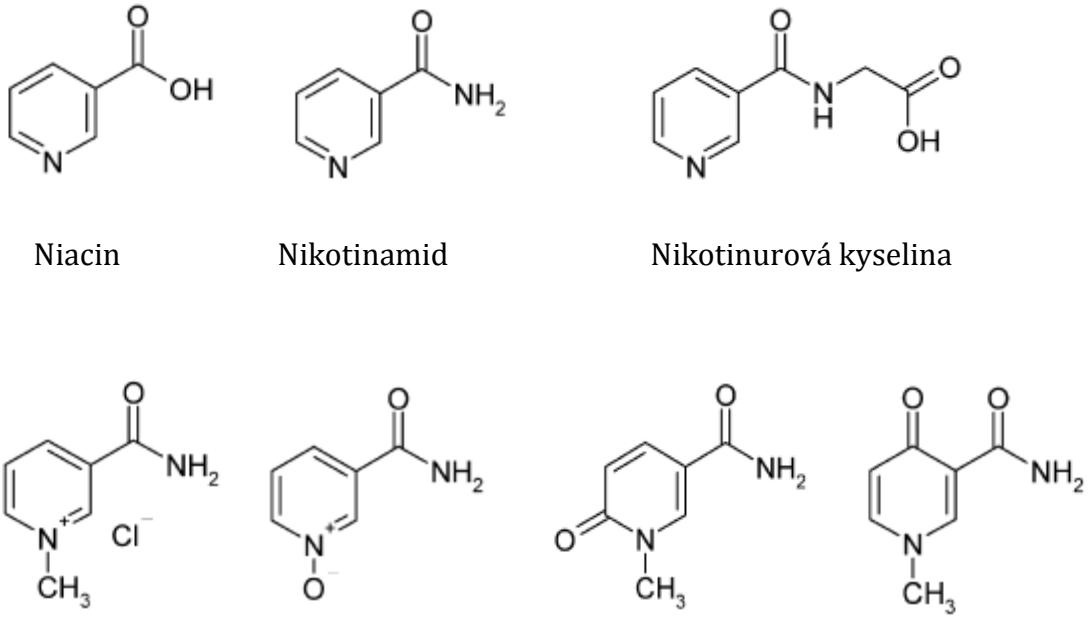
Extrakce niacinu a jeho metabolitů ze vzorku plazmy

Niacin a jeho metabolity jsou látky bazického charakteru, které se z okyseleného biologického vzorku zadrží na SPE kolonce obsahující katex. Alkalickým roztokem (hydroxid amonný v acetonitrilu) se z kolonky uvolní složky, které jsou přítomny ve formě volné báze, tj. všechny kromě MNA, který je ve formě kvarterního aminu. Ten je eluován hydroxidem amonným v methanolu s přídavkem chloridu sodného ke zvýšení iontové síly na iontovýměnném principu.[23]

3.3 Niacin a jeho metabolity

Chemická struktura

Kyselina nikotinová (niacin) je v organizmu metabolizována na 2 základní metabolity – kyselinu nikotinurovou a nikotinamid. Ten je dále metabolizován na několik derivátů, z nichž některé jsou hepatotoxické.[1] Přehled strukturních vzorců jednotlivých metabolitů ukazuje následující obrázek:



Obr. 6: Struktura niacinu a jeho metabolitů[23]

Niacin

Niacin, nazývaný také jako kyselina nikotinová (někde je pod pojmem niacin zařazen i nikotinamid[24,25]), je monokarboxylová kyselina odvozená od pyridinu. Někdy je zařazován do skupiny vitaminu B. Ve skutečnosti však není niacin "pravým" vitaminem, jelikož se i syntetizuje *in vivo* z esenciální aminokyseliny tryptofanu. K syntéze 1 mg niacinu se spotřebuje přibližně 60 mg tryptofanu.[1]

Výskyt a příjem

Niacin je v přírodě hojně rozšířený. Nikotinamid nalezneme především v živočišných produktech, zatímco kyselinu nikotinovou v rostlinných zdrojích. Vysoký obsah niacinu najdeme v játrech, kvasnicích, drůbeži, libovém mase, ořechách a zelenině. Nižší obsah je v mléčných produktech a zelené listové zelenině. Kyselina nikotinová v obilovinách je nevyužitelná, jelikož je vázána na komponenty, u kterých se může biologická využitelnost zvýšit specifickými technologickými procesy. Provitaminem niacinu je tryptofan.[25,26]

Denní příjem niacinu je přibližně 10-20 mg. S věkem se však nároky na příjem niacinu zvyšují, přičemž vyšší jsou u žen v laktaci a u mužů.[1] Vstřebává se v žaludku a v tenkém střevě.[26]

Projevy nedostatku

Mezi první projevy nedostatku niacinu patří žaludeční a střevní potíže, změny v ústní dutině (červený vyhlazený jazyk), ale také například anorexie.[25, 26]

V populacích, kde je hlavním zdrojem potravy kukuřice (např. jihoamerický venkov, Mexiko, Afrika), se objevuje karence niacinu, což se projevuje pelagrou – nemocí vznikající z avitaminózy niacinu. Pelagra se projevuje: 1. fotosenzitivní dermatitidou na místech mechanického otlaku (lokty, kolena,…) a na místech vystavených slunečnímu záření; 2. v pokročilém stádiu demencí nebo depresivní psychózou; 3. průjmy. Neléčená nemoc často končí během 4-5 let smrtí. Dále je nemoc spojená s alkoholismem, léčbou antituberkulotiky, antiparkinsoniky a chronickým onemocněním trávicího traktu. [1,25, 27]

Toxicita

Nadbytek nikotinové kyseliny vede k vazodilataci cév a k přechodnému poklesu krevního tlaku.[26] Podávání kyseliny nikotinové v podobě léku může být příčinou hyperurikémie. [28]

Metabolizmem niacinu vzniká kyselina nikotinurová a ta indukuje syntézu a uvolňování prostaglandinu PG D_2. Tento prostaglandin je odpovědný za nepříjemné kožní příznaky (pocity horka a zarudnutí).[1]

Niacin, jenž je obsažen v preparátech s postupným uvolňováním, je metabolizován druhou metabolickou drahou (viz. metabolizmus), kde vznikají sloučeniny s potenciálně hepatotoxickým účinkem. Dochází k depleci methylových skupin v játrech a ke snížení jaterní koncentrace S-adenosyl-methioninu, čemuž se dá zabránit podáním ekvimolárního množství betainu či S-adenosyl-methioninu.[1, 29, 30]

Stabilita

Niacin je stabilní vůči světlu, teplu, kyslíku a zásaditému prostředí, a to jak v roztoku tak i suchém stavu. Nikotinamid se může hydrolyzovat na kyselinu v silně zásaditých či kyselých roztocích. [25]

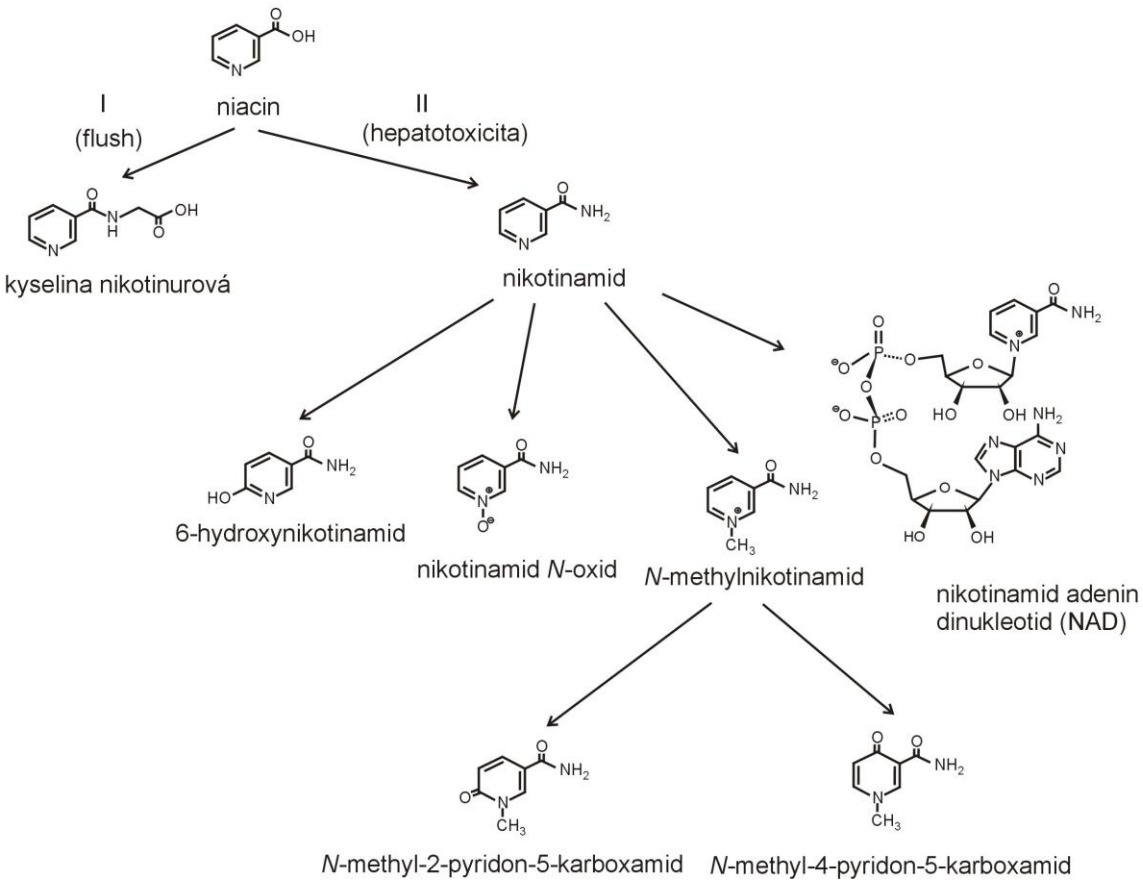
Funkce

Niacin se jako součást koenzymu účastní metabolizmu tuků, sacharidů a bílkovin. [25]

Pomocí enzymů přítomných v cytosolu většiny buněk se syntetizuje na NAD^+ a $NADP^+$ (tzv. "aktivní niacin") ve formě nikotinátu. Nikotinamid přijatý z potravy musí být proto nejprve deaminován. Nikotinát je přeměněn v cytosolu na desamido-NAD^+ reakcí s 5-fosforibosyl-1-difosfátem a následně adenylován pomocí ATP. K vytvoření koenzymu NAD^+ je využita amidoskupina z glutaminu. NAD^+ pak může být fosforylován na $NADP^+$. [24]

Metabolizmus

Metabolizmus niacinu probíhá dvěma drahami. V první dráze (I) se niacin konjuguje s glycinem a vzniká kyselina nikotinurová. Ve druhé dráze (II) vzniká sledem redoxních reakcí nikotinamid a následně řada pyrimidinových metabolitů. Metabolická dráha I má nízkou afinitu a vysokou kapacitu a uplatňuje se, jakmile je nasycená dráha II, která je naopak vysokoafinitní a nízkokapacitní. [1]



Obr. 7: Metabolizmus niacinu.[1]

Hypolipidemické účinky

Kyselina nikotinová je doporučována k terapii hyperlipoproteinémie (zvýšené množství lipoproteinů v krvi[31]). Přesný mechanizmus hypolipidemického účinku není dosud znám. Pravděpodobně se však jedná o mnohočetný zásah na různých úrovních metabolizmu lipidů a lipoproteinů.[1]

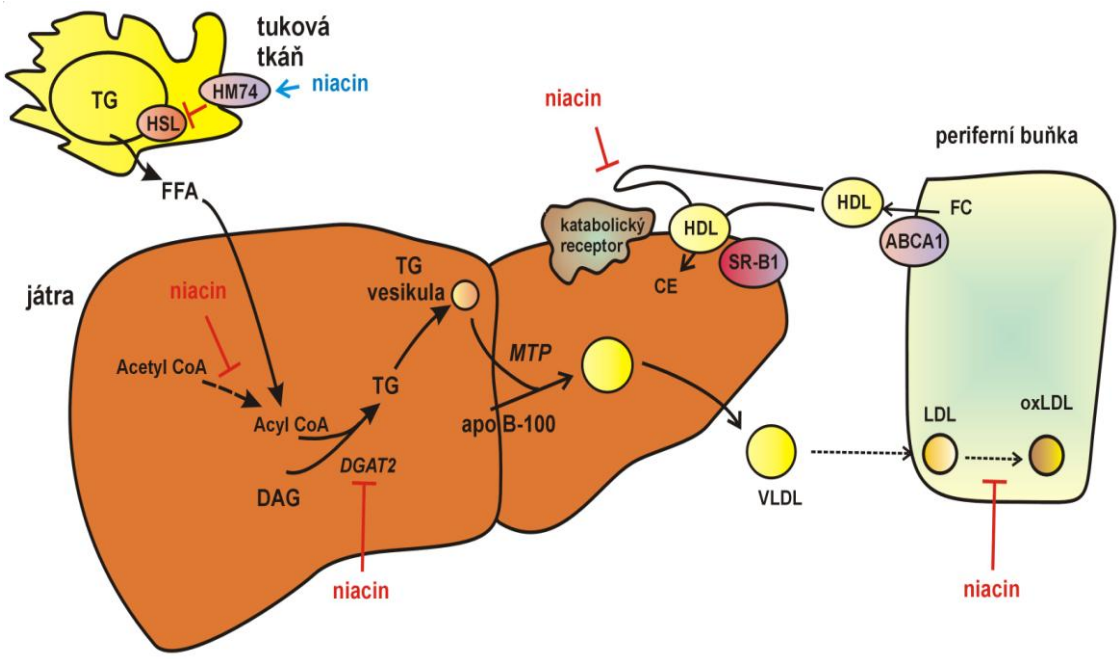
Již v roce 1962 bylo zjištěno snížení koncentrace volných mastných kyselin v plazmě po léčbě niacinem, což bylo důsledkem inhibice lipolýzy v tukové tkáni. Dochází k vazbě na specifický receptor v tukové tkáni (HM74), který je spřažen s G-proteiny. Touto vazbou dojde k inhibici adenylát cyklázy a následnému snížení koncentrace c-AMP, důsledkem je desaktivace hormonálně senzitivní lipázy (HSL). [3, 32]

Niacin také mění profil LDL ve prospěch větších částic o nižší hustotě a jako jediný snižuje koncentraci LP(a), jehož fyziologická funkce není úplně známá,

ale předpokládá se, že jeho vysoká hladina přispívá ke vzniku kardiovaskulárních chorob. [2, 3]

V játrech dochází ke snížení syntézy TG, což je způsobeno omezenou dostupností substrátu (snížení koncentrace FFA) a inhibicí syntézy TG blokádou jaterní izoformy diacylglycerol acyltransferázy (DGAT-2). Dále je snížena dostupnost apo B v hepatocytu, vzhledem k jeho snížené translokaci přes endoplasmatické retikulum nebo zvýšené degradaci. Dochází ke snížené syntéze VLDL a jejich sekrece do oběhu. Lipoproteiny VLDL transportují endogenní lipidy. Snížená syntéza VLDL je následkem zpomaleného sestavování částice VLDL z TG a apo B. Všechny lipoproteiny obsahující ve své struktuře apo B jsou v důsledku těchto dějů syntetizovány v hepatocytech v nižší míře. [4]

Další významný účinek niacinu spočívá ve zvýšení koncentrace HDL. Prvním krokem k aktivaci reverzního transportu cholesterolu je zvýšení exprese transportéru ABCA-1. V játrech dochází ke snížení katabolizmu HDL v důsledku blokace specifických katabolických receptorů. Částice HDL jsou důležité pro transport cholesterolu z tkání do jater přes specifický receptor SR-B1. Cholesterol v částicích HDL bývá nazýván "hodný cholesterol", jeho vyšší koncentrace jsou asociovány s nižším rizikem aterosklerózy.[2, 4, 32, 33]



Obr. 8: Mechanizmy hypolipidemického účinku niacinu.[1]

Stanovení niacinu a jeho metabolitů

Pro biomedicínské studie je třeba stanovit vedle sebe kyselinu nikotinovou a její metabolity v různém biologickém materiálu, nejčastěji v krevní plazmě a moči. Nejstarší analytické metody spadají do 50-60. let minulého století a využívají převážně techniku papírové chromatografie;[34, 35] v pozdější době (70.-80. léta) se využívalo plynové chromatografie[36] a častěji HPLC s UV nebo fluorimetrickou detekcí. [37, 38, 39, 40, 41] Nevýhodou těchto metodik je náročná preanalytická fáze a fakt, že metabolity niacinu se velmi liší ve fyzikálně-chemických vlastnostech (především polaritě). Současné stanovení metabolitů při složité preanalytické fázi se tím značně komplikuje.

Spojení HPLC s hmotnostně spektrometrickou (MS) detekcí může odstranit některé nedostatky dřívějších přístupů. Během posledních 10 let popsalo stanovení kyseliny nikotinové a jejích metabolitů metodou HPLC-MS několik autorů: Inamadugu et al.[42] stanovili NA, NAM, NUA a 2-pyr v plazmě na koloně Hypersil BDS izokratickou metodou s mobilní fází 10 mM NH4Ac:ACN 20:80, jako vnitřní standard sloužil nevirapin. Jednotlivé složky byly eluovány v pořadí NA, NAM, NUA, 2-Pyr a IS. Kalibrační závislosti byly lineární v rozsahu 100-20000 ng/mL pro NA; 10-1600 ng/mL pro NUA a NAM a 50-5000 ng/mL pro 2-Pyr, s průměrným korelačním koeficientem ≥ 0.99 pro každý analyt. Doba analýzy byla cca 2 min. Szafarz et al.[43] stanovili NA, NAM, MNA, 2-pyr a 4-pyr v plazmě na koloně Spherisorb CNRP s gradientem mobilní fáze ACN-voda s 0,1% FA, vnitřním standardem byl 6-chloronikotinamid. Eluční pořadí jednotlivých složek bylo 2-Pyr, IS, 4-Pyr, NA, NAM, MNA, celková doba analýzy 15 min. Pfuhl et al.[44] stanovili NA, NAM a NUA v plazmě na koloně Hypersil CPS s izokratickou mobilní fází ACN:MeOH:voda:FA (700:190:110:1), jako vnitřní standard použili chinolin-3-karboxylovou kyselinu. Složky byly eluovány v pořadí IS, NA, NAM, NUA, kalibrační závislosti byly lineární v rozsahu 50-750 ng/ml plazmy. Hsieh a Chen[45] stanovili NA, NAM a NUA na koloně Hypersil silica s dvousložkovým gradientem (A-voda, B-MeoH s 0,1% FA) a vnitřním standardem 6-methyl-nikotinovou kyselinou. Eluční pořadí bylo NA, NUA, NAM, IS, přičemž NAM a IS tvoří kritický pár s minimálním rozdílem v elučním čase. Celková doba analýzy byla cca 5 min. Catz et al.[46] stanovili NA, NAM a myristyl nikotinát na koloně Spherisorb Cyano s

izokratickou mobilní fází ACN:voda:FA (56:44:0,1). Vnitřními standardy byly odpovídající deuterované sloučeniny. Kalibrační závislosti byly lineární v rozsahu 2-1000 ng/ml pro myristyl nikotinát, 8-1000 ng/ml pro NA, a 75-1000 ng/ml pro NAM. Li et al.[23] stanovili niacin a jeho 6 metabolitů na koloně Hypersil silica s gradientem mobilní fáze ACN:voda:FA s pořadím eluce 2-pyr, 4-pyr, NNO, NA, NUA, NAM a MNA. Kritický pár tvořený 4-Pyr a NNO byl rozlišen na základě SIM; doba analýzy byla cca 1 min.

4. Experimentální část

4.1 Použité chemikálie

- Ultračistá voda 18,2 MΩ.cm
- Argon X50S čistoty 99.998%, Air Products, ČR
- Acetonitril pro LC-MS čistoty 99.95%, Biosolve BV, Nizozemsko
- Methanol pro LC-MS čistoty 99.95%, Biosolve BV, Nizozemsko
- Amoniak vodný 25-29% p.a., Penta, ČR
- Kyselina mravenčí čistoty eluent additive for LC-MS, Fluka (Sigma Aldrich), ČR
- Chlorid sodný čistoty 99.9% p.a., Penta, ČR
- Lidská plazma, sérum (spojené zbytky reálných vzorků)
- Standardy:
    - Kyselina nikotinová čistoty 99,5%, Fluka (Sigma Aldrich), ČR
    - Nikotinamid čistoty 99,5%, Fluka (Sigma Aldrich), ČR
    - Kyselina nikotinurová čistoty 98%, Fluka (Sigma Aldrich), ČR
    - 1-Methylnikotinamid chlorid čistoty 97,5%, Fluka (Sigma Aldrich), ČR
    - Nikotinamid-N-oxid čistoty 96%, Fluka (Sigma Aldrich), ČR
    - N–Methyl-2-pyridon-5-karboxamid čistoty 99,7%, BDG synthesis, Nový Zéland
    - N-Methyl-4-pyridon-5-karboxamid čistoty 94,2%, BDG synthesis, Nový Zéland
    - 6-Methylpyridine-3-karboxylová kyselina čistoty 99%, Fluka (Sigma Aldrich), ČR

4.2 Použité přístroje a zařízení

- Koncentrátor vzorků Thermovap TV10+, Ecom s.r.o., Praha, Česká republika
- Laboratorní úprava vody Direct Q 3 UV, Millipore, Praha, Česká republika
- Generátor dusíku Sirocco 5 V1, LNI Schmidlin SA, Švýcarsko

- SPE manifold Mevacs M20, Medist s.r.o., Slovenská republika
- Centrifuga Heraeus Megafuge 16R, ThemoFisher Scientific, Inc., Německo
- Sonikační lázeň Bransonic 3510E-MTH, Branson Ultrasonic Corporation, CT U.S.A.
- Analytické váhy Discovery 2150D, Ohaus Corporation, Švýcarsko
- Centrigufa Minispin Plus, Eppendorf AG, Německo
- Vortex MS2 Minishaker, IKA Works, Inc., NC U.S.A.
- HPLC sestava Dionex Ultimate 3000 (část pro rozpouštědla včetně degaséru SR-3000, kvartérní pumpa LPG-3400SD, část pro kolonu TCC-3000SD a autosampler WPS-3000TSL), Dionex Softron GmbH, Německo
- Hmotový spektrometr typu trojitého kvadrupólu TSQ Quantum Access Max se sondou H-ESI II. generace, ThermoFisher Scientific, Inc., CA U.S.A.
- Generátor dusíku NM32LA, Peak Scientific, Spojené Království Velké Británie a Severního Irska
- Automatické ruční pipety od Thermo Scientific různých objemů
- HPLC kolony:
    - Kinetex 5u C18 100A, rozměry: 150 x 2,10 mm
    - Thermo Scientific Hypersil Silica 5u 120A, rozměry: 50 x 4,60 mm
    - Thermo Scientific Hypercarb 5u 250A, rozměry: 50 x 2,10 mm
- SPE kolonky: Oasis MCX 60 µm
- Software: Thermo Xcalibur

4.3 Pracovní postup

Příprava standardních roztoků

Nejprve byly připraveny zásobní roztoky jednotlivých standardů (nikotinová kyselina, nikotinamid, nikotinamid-N-oxid, nikotinurová kyselina, N-methyl-nikotinamid chlorid, N-methyl-4-pyridon-3-karboxamid, N-methyl-2-pyridon-5-karboxamid) a vnitřních standardů (chloronikotinamid, 6-hydroxypyridin-3-karboxylová kyselina, 6-methylpyridin-3-karboxylová kyselina)

o koncentraci 1 mg/ml. Bylo naváženo přibližně 5 mg přesně jednotlivých standardních látek vytemperovaných na laboratorní teplotu do připravených zvážených zkumavek se šroubovacím uzávěrem. Do každé zkumavky s takto naváženou standardní látkou bylo napipetováno cca 5 ml předem připraveného roztoku ACN:H_2O (50:50, *v/v*), aby výsledná koncentrace byla 1 mg/ml. Všechny připravené roztoky standardních látek a vnitřních standardů byly promíchány laboratorním mixerem. Vzhledem k nesnadnému rozpouštění musely být roztoky nikotinamid-N-oxidu, nikotinurové kyseliny, N-methyl-nikotinamidu chloridu, 6-hydroxypyridinu-3-karboxylové kyseliny, 6-methylpyridinu-3-karboxylové kyseliny rozpuštěny pomocí ultrazvukové lázně po dobu 10 minut. Od každé látky byly 3 alikvoty po 1 ml uchovány při teplotě -80 °C . Zbylé 2 ml uloženy při teplotě -20 °C.

Příprava biologických vzorků

Biologické vzorky (moč, plazma, sérum) byly pro systém HPLC-MS připravovány pomocí SPE kolonek Oasis MCX 60 μm a vakuové odsávačky následným postupem:[23]

1. Kondicionace SPE kolonek:

   Do kolonky nasazené na vakuovou odsávačku bylo napipetováno 5 ml methanolu a necháno pomalu odkapávat, případně odsáno, když kolonky nekapaly samy. Přibližně v polovině odkapaného objemu methanolu bylo odkapávání na chvíli zastaveno a následně opět necháno pomalu odkapávat zbytek methanolu. Kolonky se zde nenechávají vyschnout, tudíž ihned po vsáknutí methanolu bylo do kolonek pipetováno 5 ml vody a necháno pomalu odkapat.
2. Dávkování vzorku:

   Vzorek byl ještě před aplikací na SPE kolonku upravován pomocí kyseliny chlorovodíkové následovně: 0,5 ml plazmy, séra či moče + 0,5 ml 0,2M HCl.

   Ihned po kondicionaci byl 1 ml upraveného vzorku pipetován do kolonky a necháván pomalu odkapat/odsát.
3. Propláchnutí SPE kolonky:

Po vsáknutí vzorku byly do kolonky přidány 2 ml vody a po odkapání vody byla kolonka nechána 30 minut sušit při vakuu.

Pro body 1., 2. a 3. platí, že eluát byl sbírán do odpadních zkumavek, které byly po 3. bodu vylity do odpadní lahve.

4. Sběr eluátu „A“:

   Pod SPE kolonku byla umístěna sběrná zkumavka „A“. Do kolonky bylo napipetováno 5 ml 5% NH_4OH v ACN a necháno pomalu odkapat do sběrné zkumavky. Za těchto podmínek z kolonky eluují všechny složky, které jsou přítomny ve formě volné báze, kromě MNA, který zůstal ve formě kvarterního aminu.

5. Sběr eluátu „B“:

   Pod SPE kolonku byla umístěna sběrná zkumavka „B“. Do kolonky bylo napipetováno 5 ml 5% NH_4OH methanol:2M NaCl (90:10, *v/v*) a necháno pomalu odkapat do sběrné zkumavky. Tím je eluován MNA iontovýměnným mechanismem.

6. Sušení eluátu „B“ v koncentrátoru vzorků pod dusíkem při 60 °C. Zkumavky s eluátem „A“ jsou zatím uchovány v lednici.

7. Rekonstituce eluátu „B“:

   Po usušení eluátu „B“ byl vzorek rekonstituován ve 2 ml ACN:methanol (80:20, *v/v*), následně promíchán pomocí vortexu, 10 minut nechán rozpouštět v ultrazvukové lázni a poté opět promíchán pomocí vortexu. Takto rekonstituovaný eluát „B“ byl stočen v centrifuze při 2000 rpm po dobu 5 minut. Veškerý supernatant „B“ je přidán do zkumavek k eluátu „A“.

8. Sušení směsi eluátu „A“ a supernatantu „B“ v koncentrátoru vzorků pod dusíkem při 60 °C.

9. Vysušená směs byla rekonstituována v 1 ml ACN, promíchána pomocí vortexu, 10 minut ponechána rozpouštět v ultrazvukové lázni a poté opět promíchána pomocí vortexu.

10. Centrifugace:

    Rekonstituovaný výsledný produkt byl centrifugován v plastových zkumavkách o objemu 1,5 ml při 3000 rpm po dobu 3 minut. Výsledný supernatant je vhodný pro použití do systému HPLC-MS.

Naladění hmotnostního spektrometru

Přístroj byl před použitím naladěn servisním technikem a uvedené hodnoty nastavených parametrů jsou uvedeny v následující tabulce:

Tab. 1:

Spray Voltage [V]	3200
Vaporizer Temperature [°C]	350
Sheath Gas Pressure [kPa]	30
Ion Sweep Gas Pressure [kPa]	2.0
Aux Gas Pressure [kPa]	8
Capillary Temperature [°C]	320
Capillary Offset [V]	35
Tube Lens Offset [V]	99
Acquisition	99
Skimmer Offset [V]	7

Výpočty

Limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ) byly zjištěny pomocí poměru signálu k šumu, který automaticky zjistil systém HPLC-MS. LOD byl přiřazen koncentraci jíž odpovídal poměr signál/šum hodnotě 3 a LOQ poměr rovný hodnotě 10.

Všechny ostatní výpočty byly provedeny pomocí Microsoft Office Excel 2007.

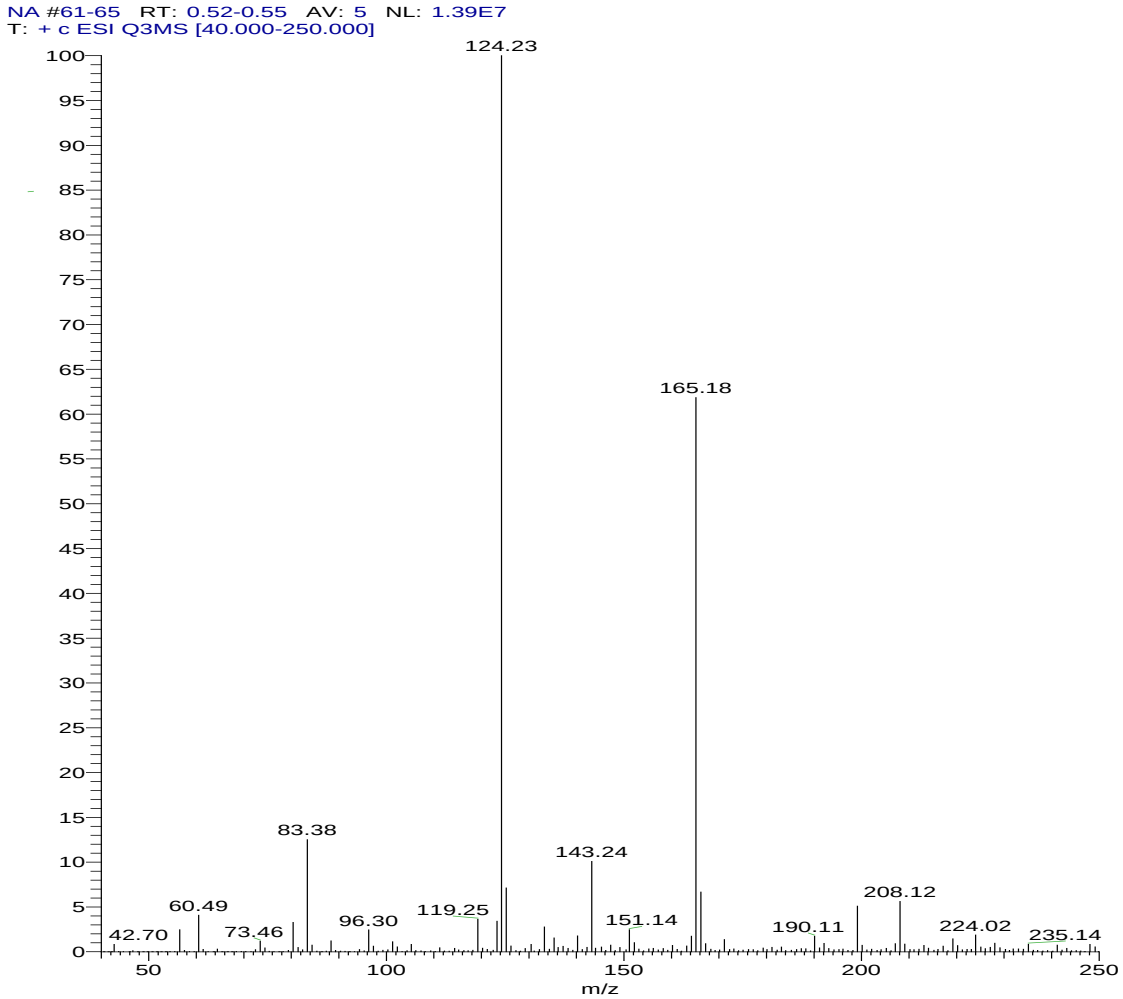
Pokud není uvedeno jinak, všechny hodnoty byly měřeny třikrát (n=3).

5. Výsledky a diskuze

Při práci byly nejprve optimalizovány podmínky na hmotnostním spektrometru a následně byly optimalizovány podmínky na HPLC. Poté byly měřeny kalibrace a reálné vzorky.

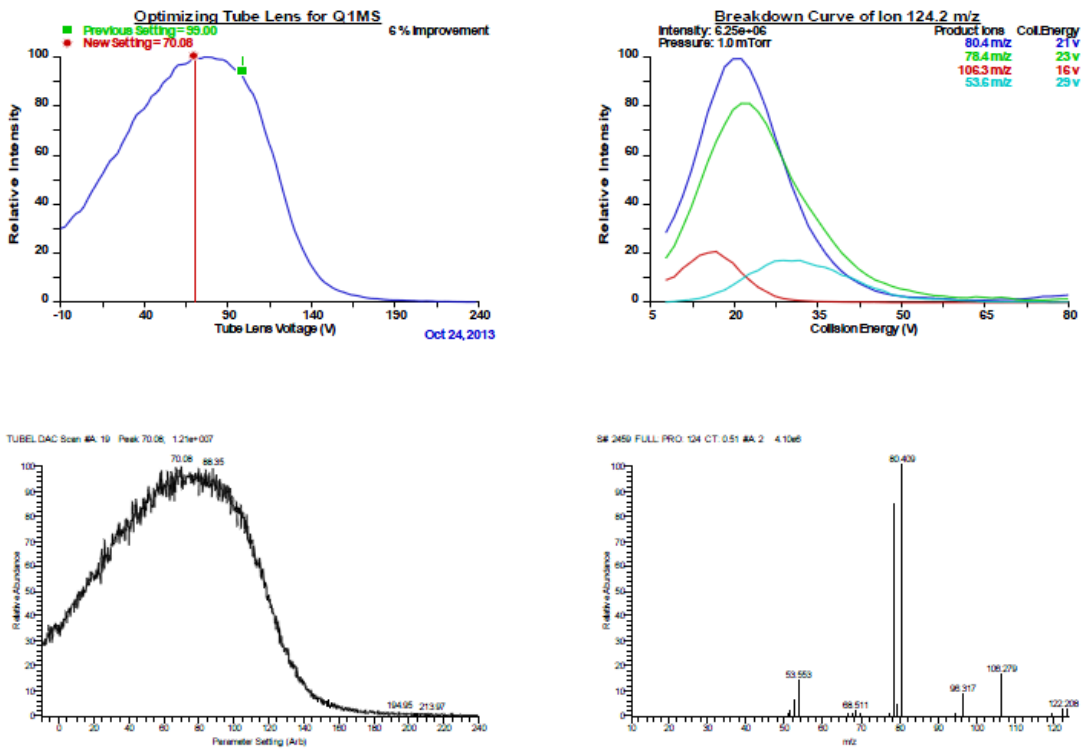
5.1 Optimalizace pracovních podmínek na hmotnostním spektrometru

Nejprve bylo zjištěno hmotnostní spektrum všech standardů mnou měřených látek (příklad takového spektra je uveden na obr. 9) a z tohoto spektra byly vybrány hodnoty m/z iontů, které mají nejvyšší intenzitu, ionty odpovídající těmto hodnotám m/z byly fragmentovány v kolizní cele srážkami s argonem na specifické produktové ionty/fragmenty, které byly měřeny v kvadrupólu Q3. U kyseliny nikotinové to tedy byly ionty s hodnotami m/z 124.23 ($M+H^+$) a 165.18 ($M+Na^+ + H_2O$).

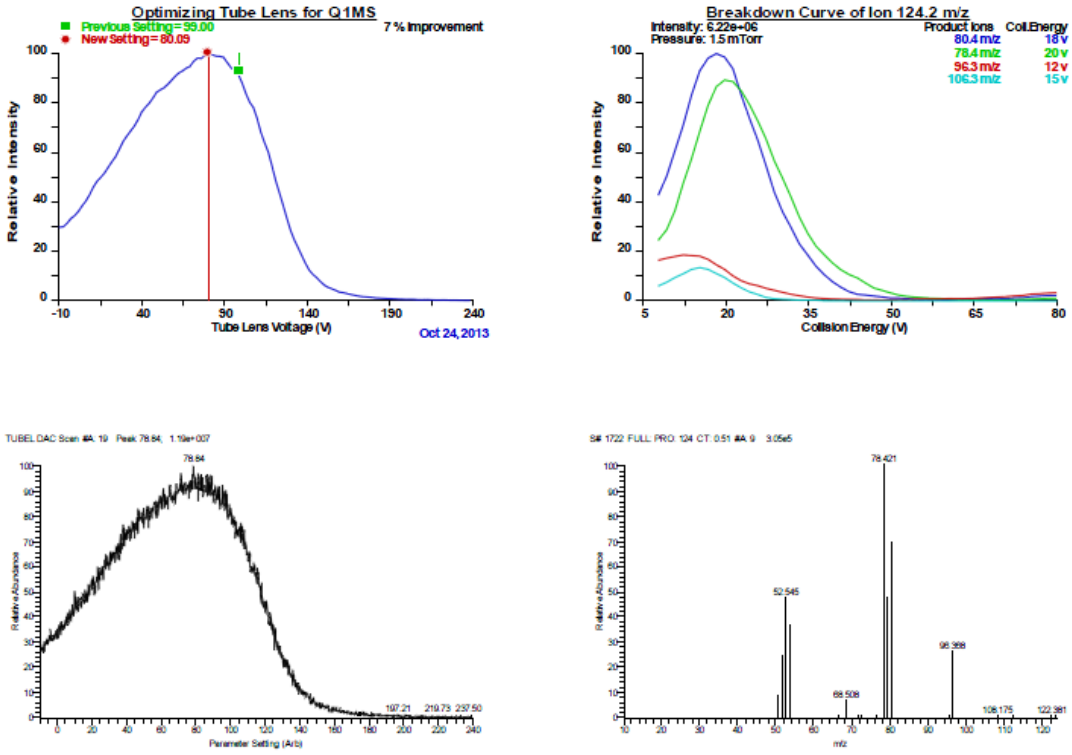


Obr. 9: Q1 MS spektrum standardu kyseliny nikotinové

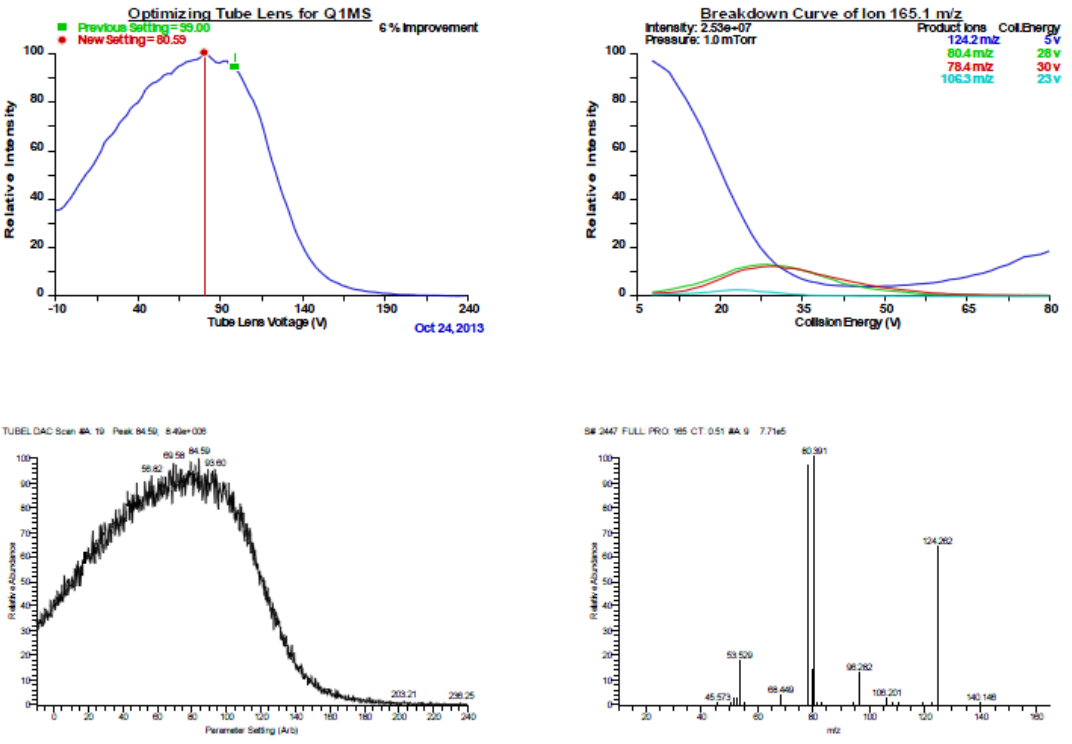
Při zjišťování produktových hmot byl zkoušen kolizní tlak argonu na druhém kvadrupólu (kolizní cele) 1,0 a 1,5 mTorr, kde se mateřský ion fragmentuje na produktové ionty. Pro citlivou detekci analytů bylo potřeba optimalizovat pracovní podmínky třetího kvadrupólu Q3. Optimalizace těchto podmínek je vidět na obr. 10-13 pro kyselinu nikotinovou. Nejdůležitější z obr. 10-13 jsou dva horní grafy, kde na obrázku 10 vlevo nahoře je vidět, že původní napětí čočky bylo z 99 změněno na 70, vpravo nahoře jsou vidět kolizní energie a hodnoty m/z produktových iontů. Produktové spektrum fragmentace iontu 124.23 je vidět na dolním pravém obrázku, kde je intenzivní iont 80.4. Podobně je postupováno pro ionty o m/z 124.23 při 1,5 mTorr a m/z 165.18 při 1,0 a 1,5 mTorr.



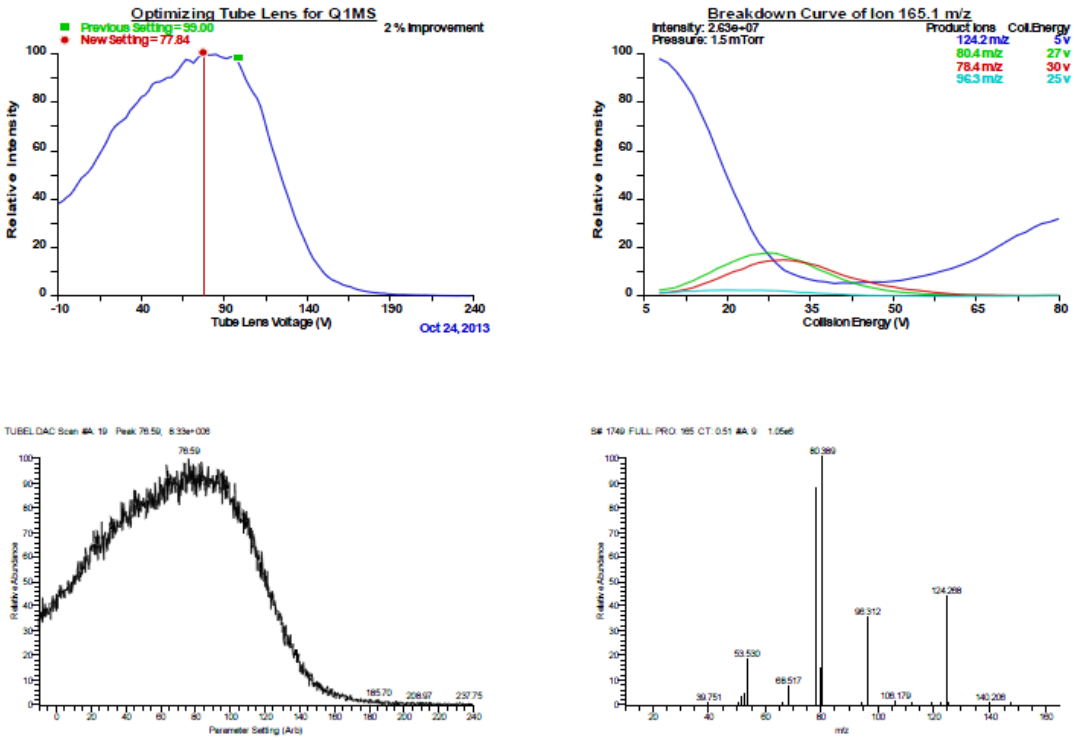
Obr. 10: Výstup procesu automatického ladění hmotnostního spektrometru pro stanovení kyseliny nikotinové z mateřského iontu kyseliny nikotinové s hodnotou m/z 124.23 při tlaku argonu v kolizní cele 1,0 mTorr



Obr. 11: Výstup procesu automatického ladění hmotnostního spektrometru pro stanovení kyseliny nikotinové z mateřského iontu kyseliny nikotinové s hodnotou m/z 124.23 při tlaku argonu v kolizní cele 1,5 mTorr



Obr. 12: Výstup procesu automatického ladění hmotnostního spektrometru pro stanovení kyseliny nikotinové z mateřského iontu kyseliny nikotinové s hodnotou m/z 165.18 při tlaku argonu v kolizní cele 1,0 mTorr



Obr. 13: Výstup procesu automatického ladění hmotnostního spektrometru pro stanovení kyseliny nikotinové z mateřského iontu kyseliny nikotinové s hodnotou m/z 165.18 při tlaku argonu v kolizní cele 1,5 mTorr

Z uvedených obrázků je patrno, že zvýšením tlaku kolizního plynu lze podpořit fragmentaci výchozích iontů ve prospěch iontů o nižších hodnotách m/z. Například u výchozích iontů kyseliny nikotinové 124.23 je vidět rozdíl intenzit hmot 80.4, 78.4, 96.3 a 106.3 při rozdílných tlacích argonu v kolizní cele.

Stejným způsobem byly optimalizovány podmínky i pro ostatní měřené látky. Optimální podmínky byly vloženy do datového souboru, který byl používán při měření. Vždy druhý nejintenzivnější ion byl klastr s vodou a sodíkem, což lze snadno ověřit výpočtem v následující tabulce. Kvůli odstranění klastrů byla nastavena fragmentace ve zdroji (Skimmer Offset) na hodnotu 7.

Tab. 2: Podmínky měření stanovovaných látek při kolizním tlaku 1,0 mTorr

Látka	Výchozí ion, m/z	Produktové ionty, m/z	Kolizní energie [V]
NA	**124.2**	**80,4**	**21**
		78,4	**23**
	165.2	*124.2*	*5*
		80.4	*28*
NAM	**123.2**	**80.4**	**19**
		78.4	**22**
	164.2	*123.2*	*5*
		80.4	*27*
NUA	**181.2**	**135.2**	**16**
		79.4	**38**
	222.2	*181.2*	*6*
		135.2	*22*
MNA	**137.2**	**94.3**	**20**
		92.3	**21**
NNO	**139.2**	**106.3**	**22**
		122.2	**16**
	180.2	*139.2*	*5*
		106.3	*28*
2-Pyr	**153.2**	**108.3**	**22**
		110.3	**20**
	194.2	*153.2*	*7*
		108.2	*28*
4-Pyr	**153.2**	**136.2**	**13**
		92.3	**22**
IS	**138.2**	**92.3**	**21**
		94.3	**20**
	179.2	*138.2*	*5*
		92.3	*29*

Pozn.: Tučně jsou vyznačeny hodnoty, které byly použity pro měření a kurzívou jsou vyznačeny hodnoty klastrů, které nebyly použity pro měření.

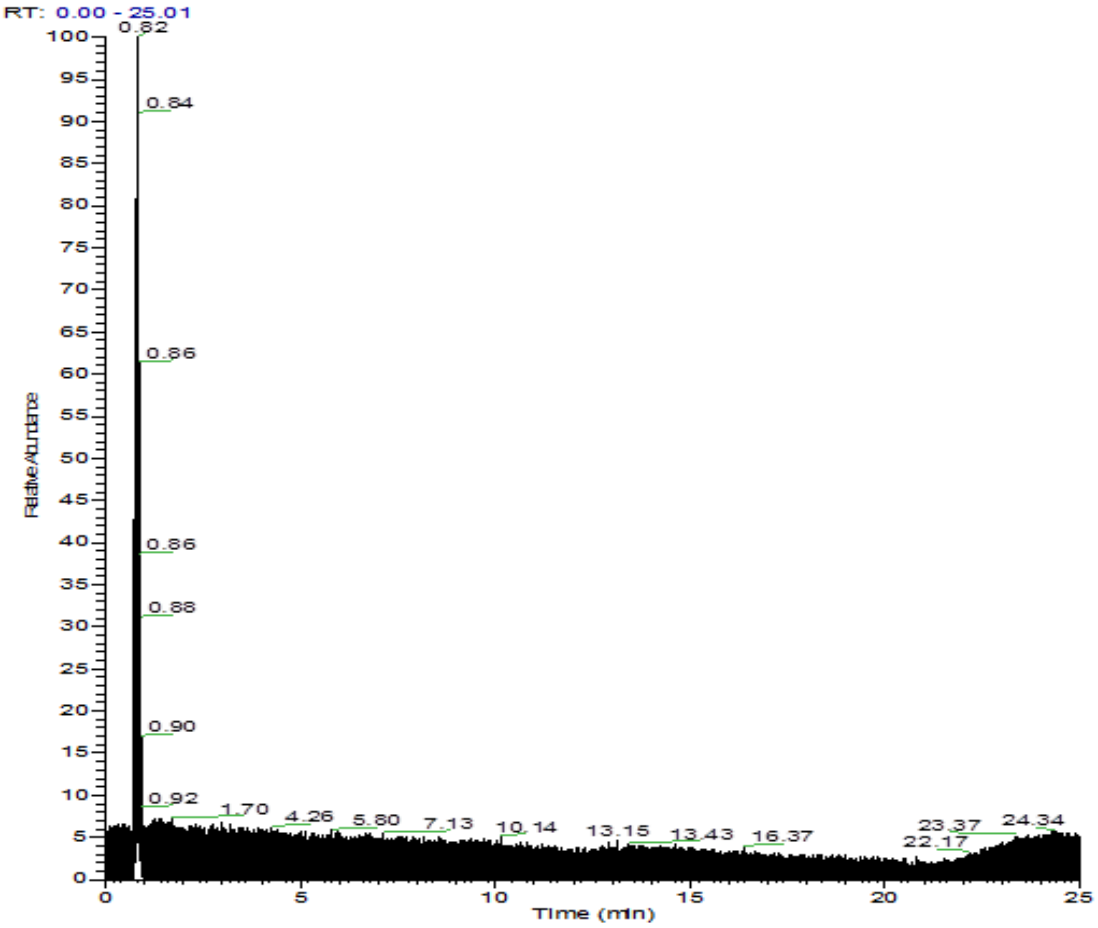
Z tabulky 2 je vidět, že všechny klastry jsou při použití vhodných parametrů (Skimmer Offset) rozbity na kvazimolekulární ionty ($M+H^+$). Rozbitím klastrů dojde k nárůstu intenzity kvazimolekulárních iontů a tím ke zvýšení citlivosti stanovení.

5.2 Optimalizace pracovních podmínek na HPLC

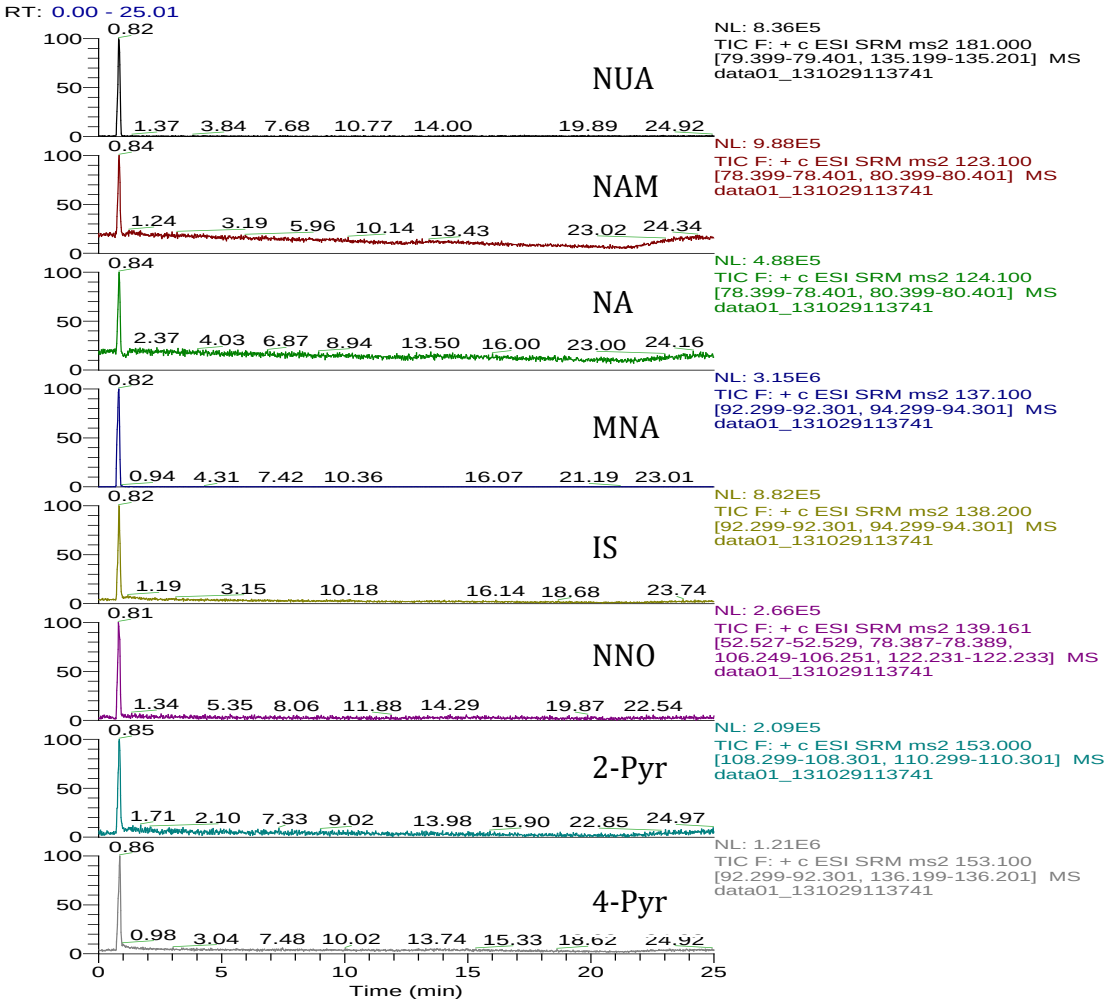
V první fázi práce byla k separaci analytů vyzkoušena kolona s reverzní fází C18, protože se jedná o nejčastěji používanou kolonu k separaci na HPLC. Dále byla vyzkoušena kolona Hypercarb a Hypersil Silica, jejichž výsledky jsou vidět dále.

Kolona C18

Na obr. 14 je vidět neúspěšný pokus o separaci vybraných analytů.



Obr. 14: Chromatogram analýzy směsi sledovaných standardů na koloně C18, průtoková rychlost 0,4 ml/min, gradient viz. tab. 3



Obr. 15: Chromatogramy SIM jednotlivých složek z obr. 14

Tab. 3: Použitý gradient mobilní fáze

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	10	90	400
1.00	10	90	400
7.00	20	80	400
19.00	75	25	400
21.00	10	90	400
27.00	10	90	400

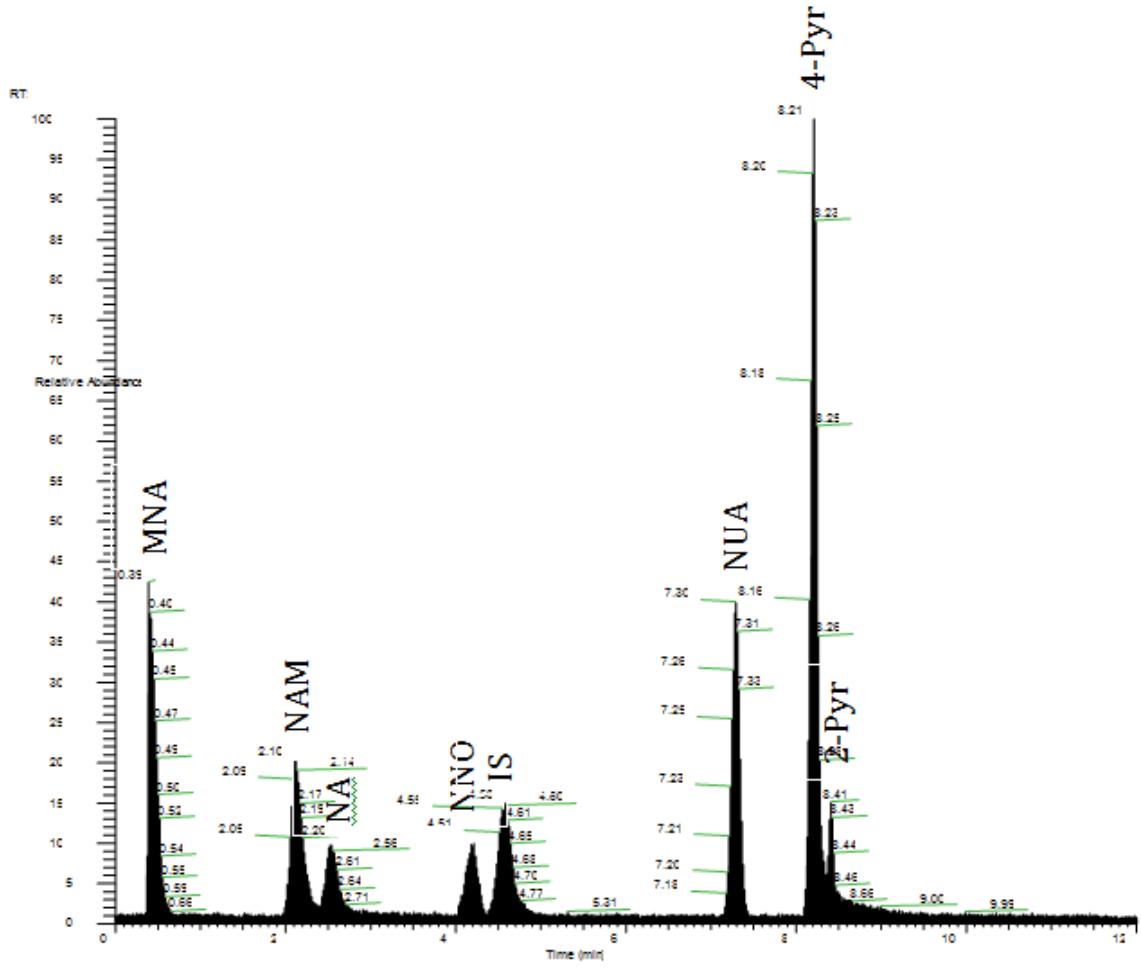
A – ACN 0,2% FA, B– voda 0,2% FA

Z obr. 14 a 15 je patrné, že kolona C18 neposkytuje dělení jednotlivých sledovaných látek, všechny složky jsou eluovány prakticky ihned po nástřiku (v mrtvém čase kolony). Ani použití znázornění v SIM módu nepomohlo k rozlišení, jelikož všechny látky eluují ve stejném čase. Podobné výsledky byly získány i u všech ostatních použitých gradientů, které jsou uvedeny v příloze na konci práce.

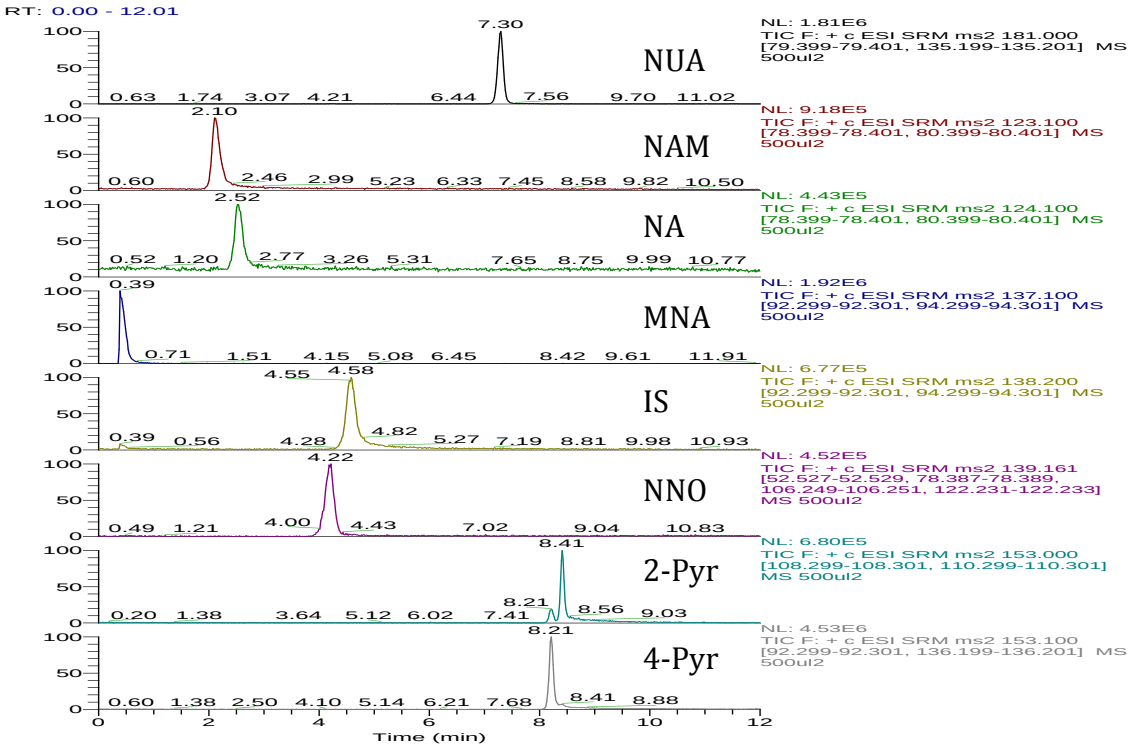
Stacionární fáze C18 má na základní nosič (SiO_2) chemicky navázané uhlovodíkové řetězce (C18); vzhledem k jejímu nepolárnímu charakteru k ní mají vyšší afinitu méně polární analyty. Po nanesení vzorku se zachytí na koloně hydrofobními skupinami a eluují z kolony s postupně rostoucím gradientem organického rozpouštědla. Polární analyty, jako je niacin a jeho metabolity, mají afinitu k materiálu kolony velmi malou, a proto jsou eluovány prakticky v mrtvém objemu kolony.

Kolona Hypercarb

Další byla testována kolona Hypercarb, jejíž stacionární fázi tvoří uhlík, a která má široké pracovní rozmezí pH mobilní fáze (1-14).



Obr. 16: Chromatogram analýzy směsi sledovaných standardů na koloně Hypercarb, průtoková rychlost 0,4 ml/min, gradient viz. tab. 4



Obr. 17: Chromatogramy SIM jednotlivých složek z obr. 16

Z vyzkoušených gradientů v příloze se jako nejvhodnější ukázal gradient uvedený v tab. 4 (G5). Byla také zkoušena koncentrace kyseliny mravenčí (FA) v mobilní fázi v rozsahu 0,1-1,0%, kde se jako nejvhodnější ukázala koncentrace FA v mobilní fázi 0,2%.

Tab. 4: Použitý gradient mobilní fáze

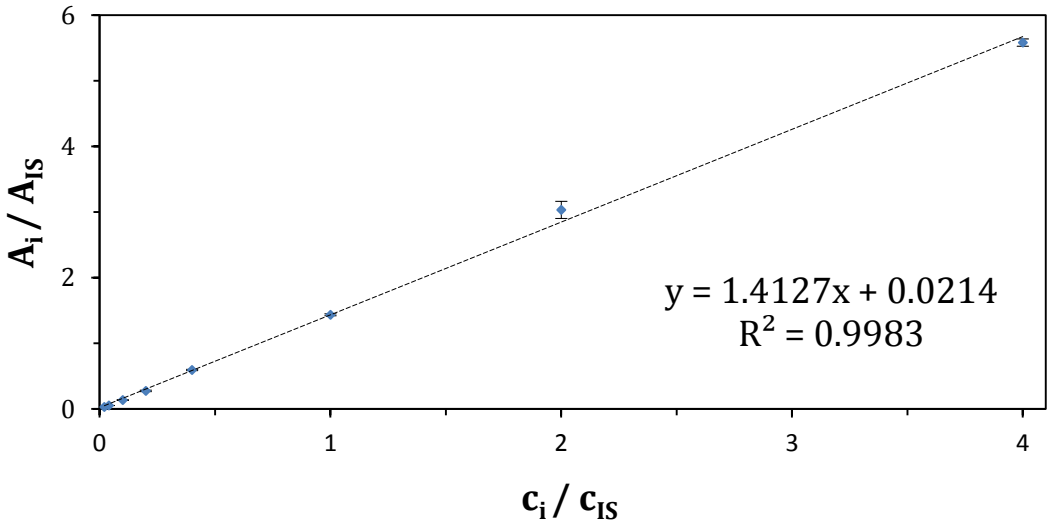
čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	5	95	400
2.00	5	95	400
6.00	15	85	400
8.00	35	65	400
10.00	100	0	400
12.00	100	0	400
12.01	5	95	400
16.00	5	95	400

A – ACN 0.2% FA, B– voda 0.2% FA

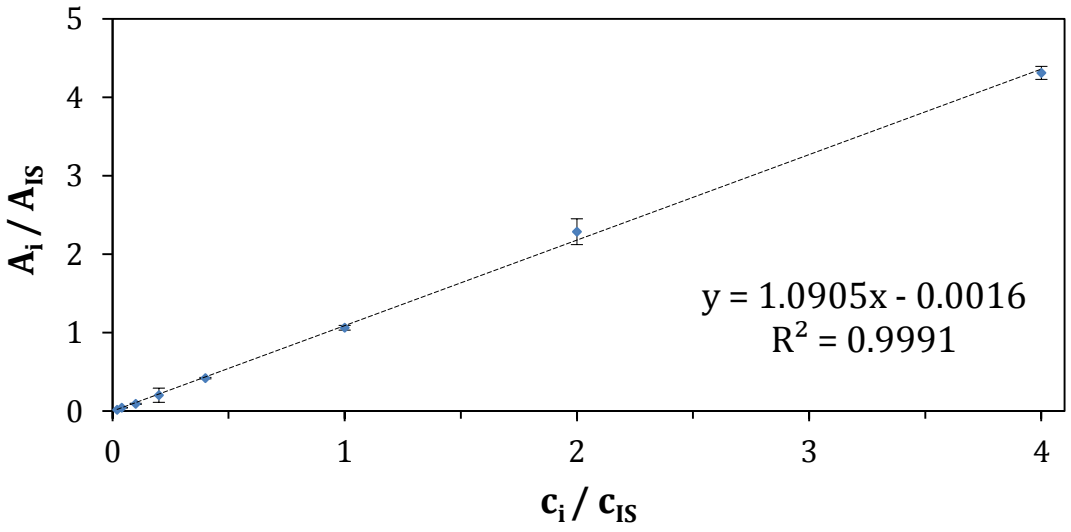
Kolona Hypercarb poskytuje uspokojivé dělení všech sledovaných složek, jak ukazuje obr. 16, pouze složky 4-Pyr a 2-Pyr tvoří kritický pár. Pokud by obsah 2-Pyr byl výrazně větší nežli je zobrazen na obrázku, mohlo by dojít k značnému překryvu obou píků a k neúplnému rozdělení obou látek, ale pomocí chromatogramů v SIM módu je tento efekt kompenzován (viz obr. 17). Mrtvý čas kolony byl 0,35 min., což je velmi blízké retenčnímu času složky MNA. Mrtvý čas byl stanoven nástřikem vody.

Kalibrace

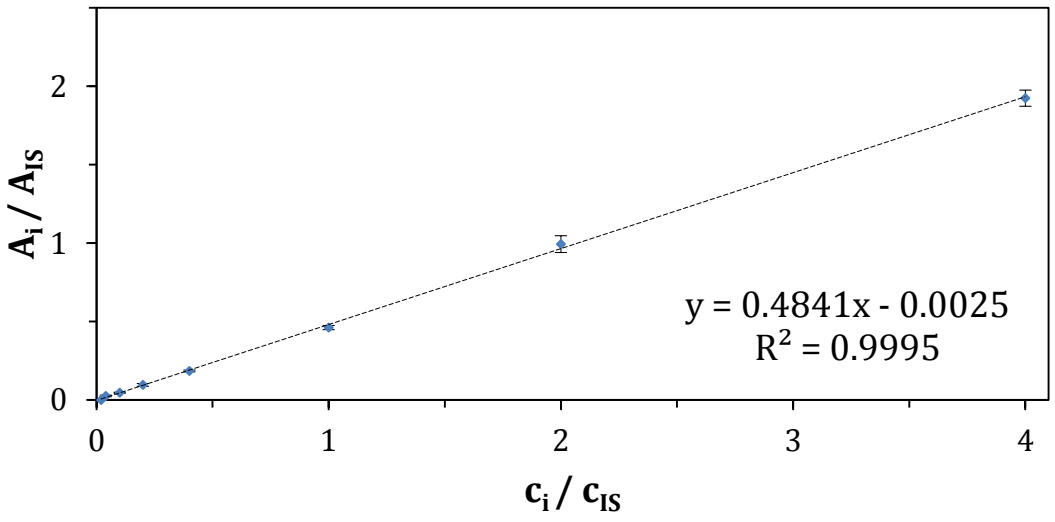
Byla sledována kalibrační závislost pro jednotlivé složky v koncentračním rozmezí 10-2000 ng/ml. Jako vnitřní standard sloužila 6-methylpyridin-3-karboxylová kyselina (IS) o koncentraci 500 ng/ml. Bylo pracováno s čistými látkami bez přítomnosti biologického materiálu. Jednotlivé kalibrační závislosti ukazují obr. 18-24



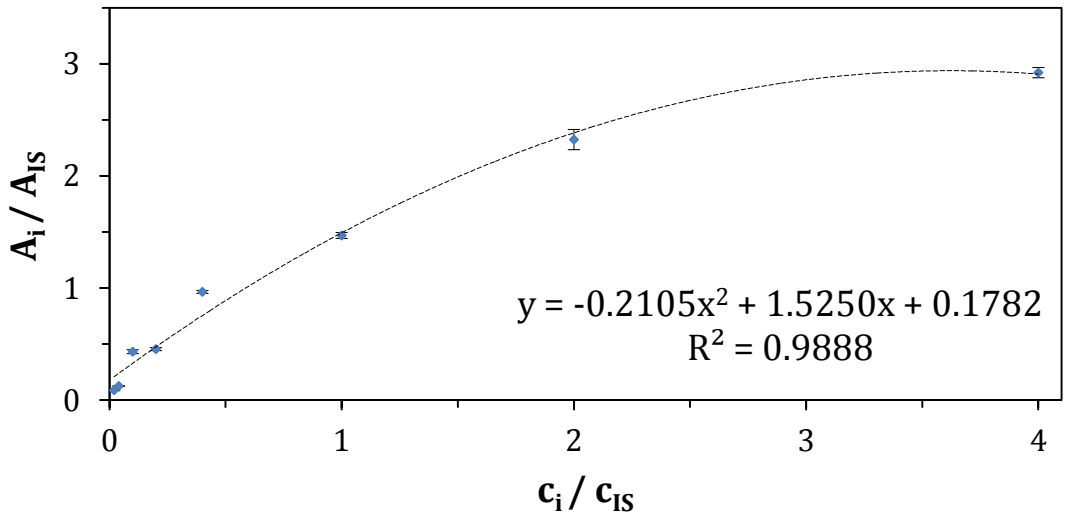
Obr. 18: Kalibrační závislost kyseliny nikotinurové v rozsahu 10 – 2000 ng/ml; koncentrace IS byla 500 ng/ml, HPLC kolona – Hypercarb, rozměry: 50 x 2,10 mm, velikost částic 5 µm, průtoková rychlost mobilní fáze (ACN 0.2% FA : voda 0.2% FA) byla 0,4 ml/min



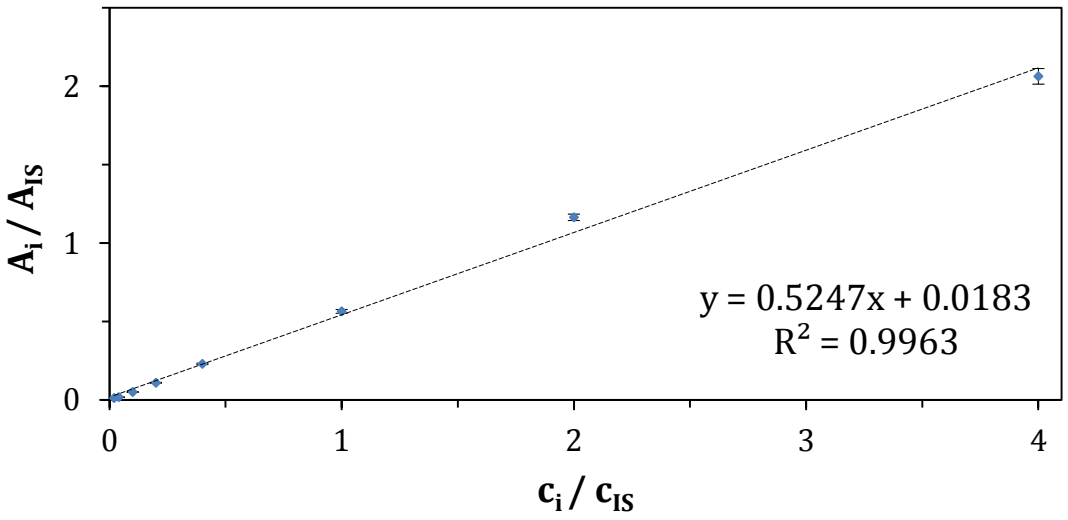
Obr. 19: Kalibrační závislost nikotinamidu v rozsahu 10 – 2000 ng/ml; koncentrace IS byla 500 ng/ml; experimentální podmínky viz obr. 18



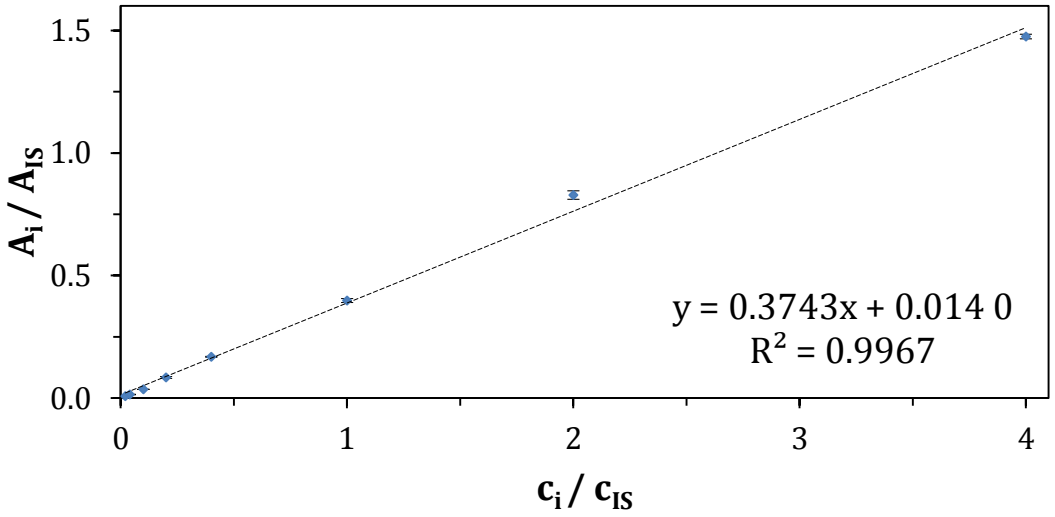
Obr. 20: Kalibrační závislost kyseliny nikotinové v rozsahu 10 – 2000 ng/ml; koncentrace IS byla 500 ng/ml; experimentální podmínky viz obr. 18



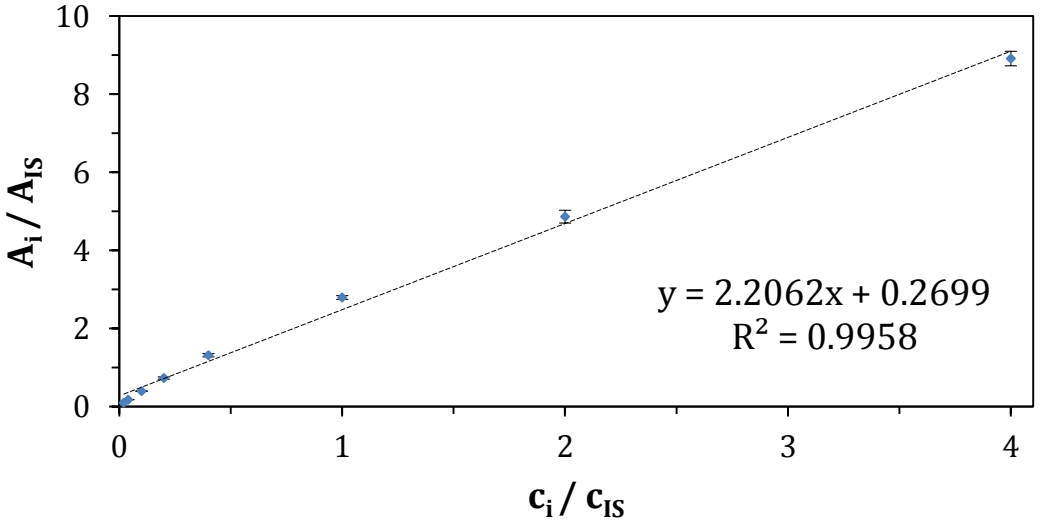
Obr. 21: Kalibrační závislost 1-methyl nikotinamid chloridu v rozsahu 10 – 2000 ng/ml; koncentrace IS byla 500 ng/ml; experimentální podmínky viz obr. 18



Obr. 22: Kalibrační závislost nikotinamid-N-oxidu v rozsahu 10 – 2000 ng/ml; koncentrace IS byla 500 ng/ml; experimentální podmínky viz obr. 18



Obr. 23: Kalibrační závislost 1-methyl-2-pyridon-5 karboxamidu v rozsahu 10 – 2000 ng/ml; koncentrace IS byla 500 ng/ml; experimentální podmínky viz obr. 18



Obr. 24: Kalibrační závislost 1-methyl-4-pyridon-5 karboxamidu v rozsahu 10 – 2000 ng/ml; koncentrace IS byla 500 ng/ml; experimentální podmínky viz obr. 18

Všechny kalibrační závislosti byly lineární v celém koncentračním rozsahu kromě MNA, kde závislosti odpovídal polynom 2. stupně. Nicméně u sloučeniny 4-Pyr lze pozorovat odklon od vypočtené závislost u prvních 3 bodů, kde se nabízí proložení počátkem. Při velmi nízkých koncentracích není proložení kalibračních křivek ideální, takže by mohlo dojít ke zkreslení hodnot.

Tab. 5: Přehled kalibračních parametrů

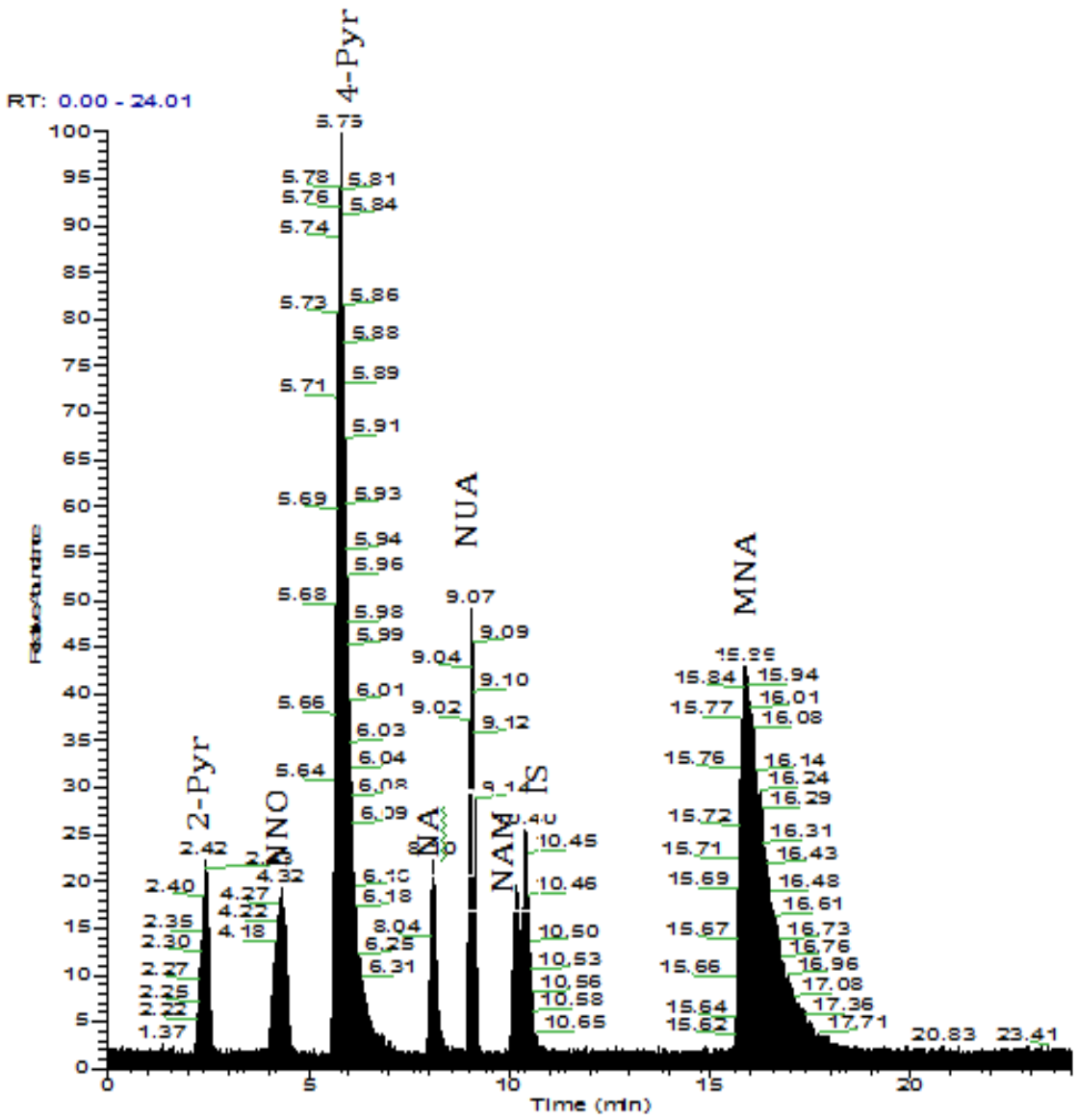
Složka	Eluční čas (min)	Kalibrační závislost	R^2
MNA	0,40	$y = -0.2105x^2 + 1.5250x + 0.1782$	0.9888
NAM	2,09	$y = 1.0905x - 0.0016$	0,9991
NA	2,52	$y = 0.4841x - 0.0025$	0.9995
NNO	4,20	$y = 0.5247x + 0.0183$	0.9963
NUA	7,27	$y = 1.4127x + 0.0214$	0.9983
4-pyr	8,20	$y = 2.2062x + 0.2699$	0.9958
2-pyr	8,40	$y = 0.3743x + 0.0140$	0.9967

Na základě hodnot směrnic z kalibračních závislotí lze určit pořadí analytů s klesající citlivostí metody, které je 4-pyr, NUA, MNA, NAM, NNO, NA, 2-pyr.

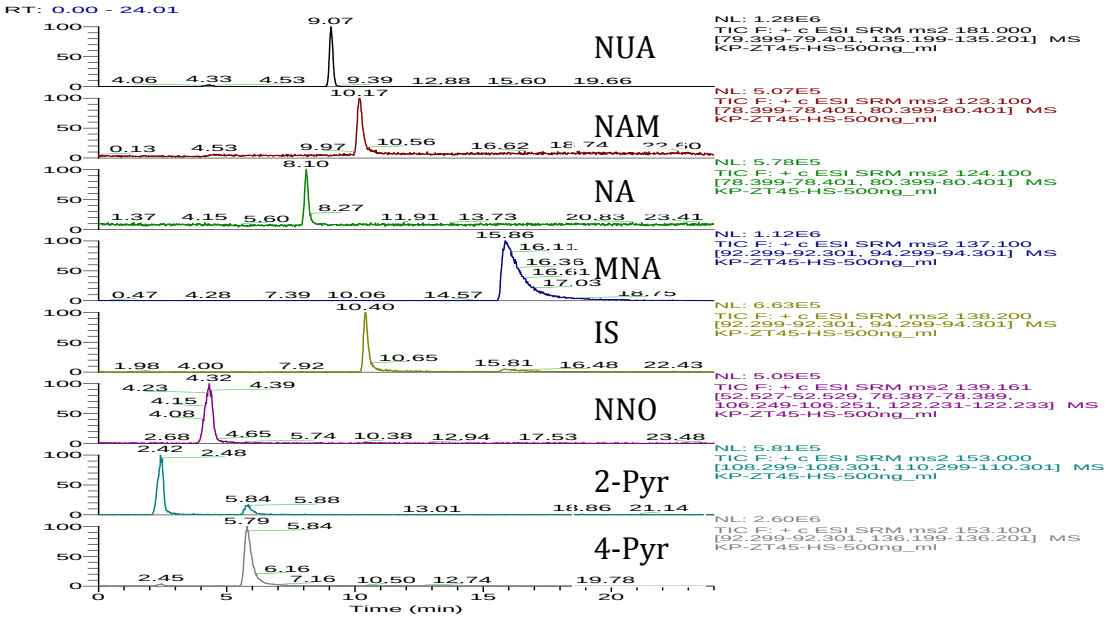
Rozlišení pro jednotlivé páry v TIC zobrazení je následující: MNA-NAM 5,26, NAM-NA 1,15, NA-NNO 4,86, NNO-IS 0,80, IS-NUA 6,04, NUA-4-Pyr 2,80, 4-Pyr-2-Pyr 0,89. Zde je vidět, že kritické páry tvoří dvojice NAM-NA, NNO-IS, 4-Pyr-2-Pyr.

Kolona Hypersil Silica

Další testovanou kolonou byla kolona plněná silikagelem Hypersil Silica. Tato kolona má poněkud užší pracovní rozmezí pH mobilní fáze (2-8).



Obr. 25: Chromatogram analýzy směsi sledovaných standardů na koloně Hypersil Silica, průtoková rychlost 0,4 ml/min, gradient viz. tab. 6



Obr. 26: Chromatogramy SIM jednotlivých složek z obr. 25

Z vyzkoušených gradientů v příloze se jako nejvhodnější ukázal gradient (G1) uvedený v tab. 6. Zkoušena byla i koncentrace kyseliny mravenčí (FA) v mobilní fázi v rozsahu 0,1-1,0%, kde se jako nejvhodnější ukázala koncentrace FA v mobilní fázi 0,75%.

Gradient mobilní fáze je uveden v Tab. 6

Tab. 6: Gradient mobilní fáze pro kolonu Hypersil Silica

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	90	10	400
1.00	90	10	400
7.00	50	50	400
13.00	30	70	400
15.00	30	70	400
19.00	25	75	400
20.00	30	70	400
22.00	90	10	400
27.00	90	10	400

A – ACN (0.75 % FA), B – voda (0.75 % FA)

Kolona Hypersil Silica poskytuje rovněž uspokojivé dělení všech sledovaných složek, jak ukazuje obr. 25, kritický pár však tvoří NAM a IS. To může být považováno za určitý nedostatek, ale pomocí chromatogramů v SIM módu je tento efekt kompenzován(viz obr. 26). Mrtvý čas se zde nepodařilo určit, lze však předpokládat z analýzy biologických vzorků, že první složka 2-Pyr je eluována později.

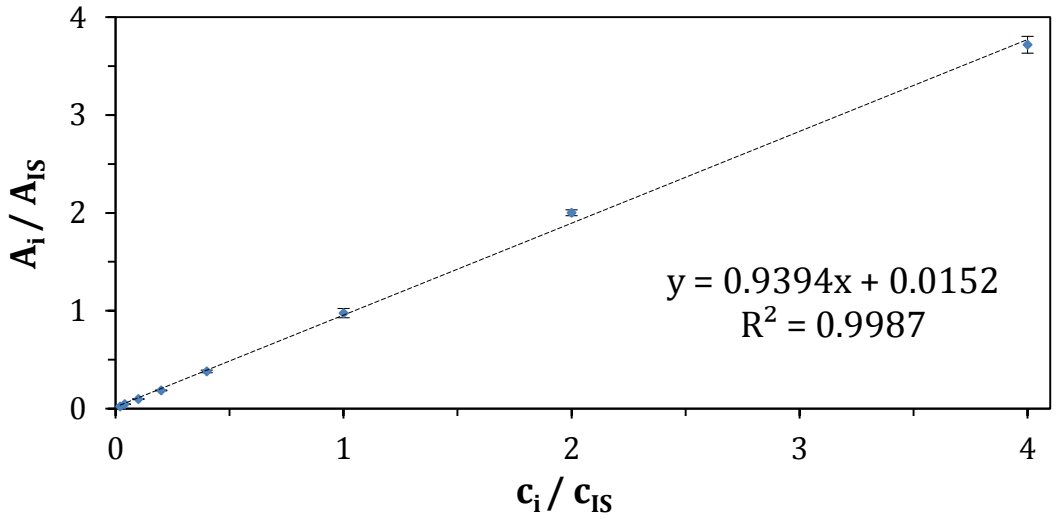
Ve srovnání s kolonou Hypercarb nejsou píky zcela symetrické, což bylo pozorováno i dalšími autory.[2] Tento fakt však neměl vliv na tvar kalibrační závislosti. Záznam analýzy všech složek je uveden na obr. 25, SIM je uveden na obr. 26.

Kalibrace

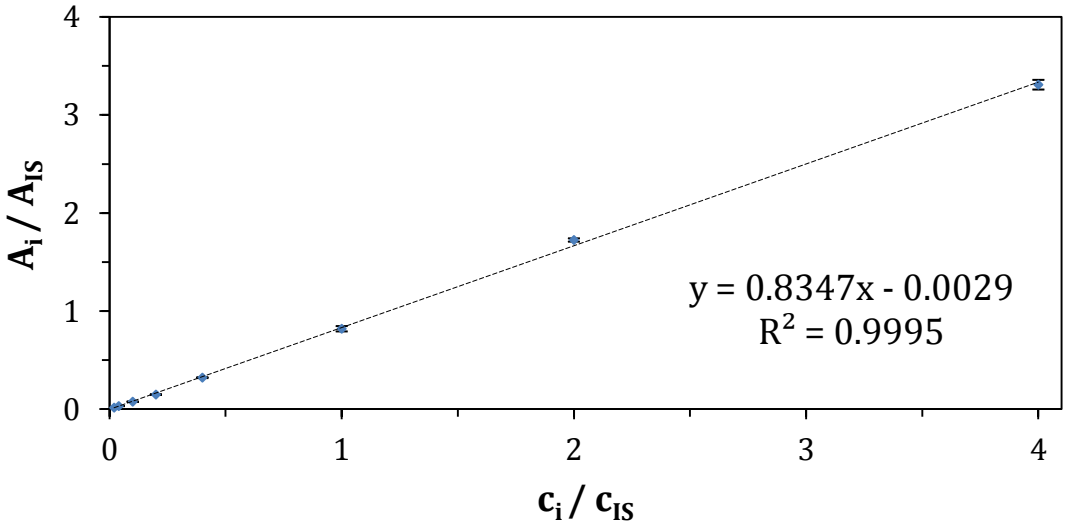
Na koloně Hypersil Silica byly měřeny kalibrační závislosti nejprve pomocí čistých látek, potom i v krevní plazmě. Kalibrační vzorky byly zpracovány stejně jako biologický materiál pomocí SPE kolonek.

Kalibrace pomocí čistých látek

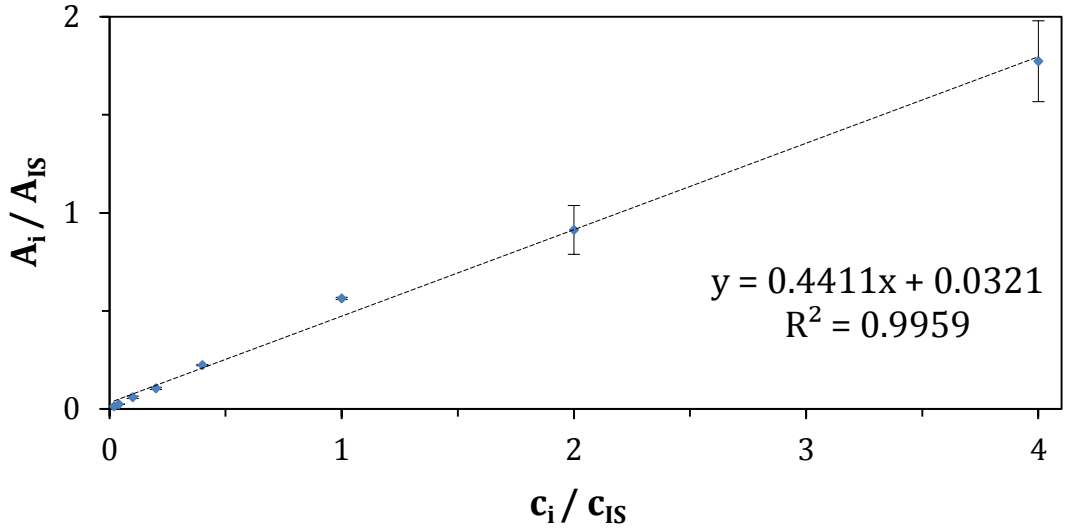
Kalibrační závislosti jednotlivých stanovovaných látek jsou znázorněny na obr. 27-33. Regresní rovnice a korelační koeficienty udává tab. 7.



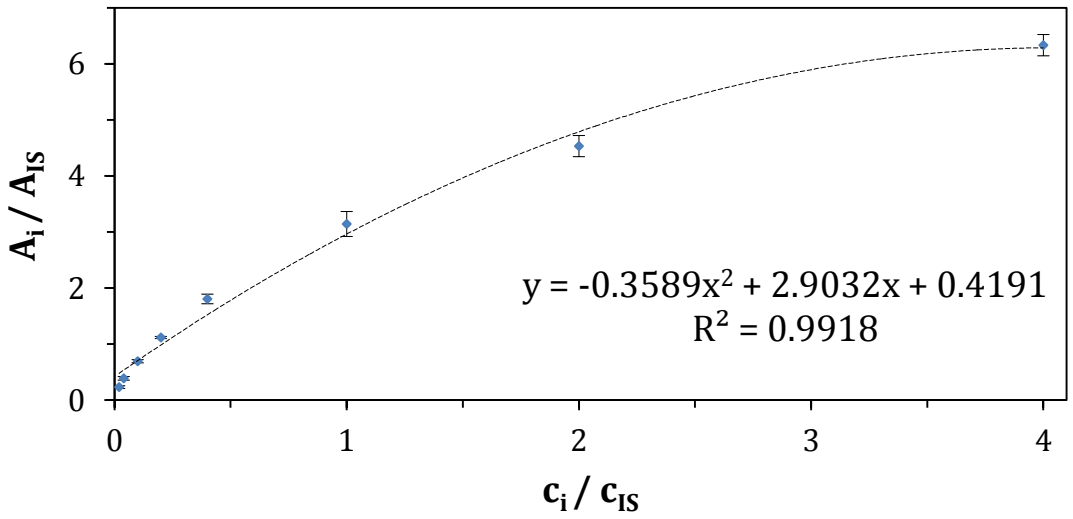
Obr. 27: Kalibrační závislost kyseliny nikotinurové v rozsahu 10 – 2000 ng/ml; koncentrace IS byla 500 ng/ml, HPLC kolona – Hypersil Silica, rozměry: 50 x 4,60 mm, velikost částic 5 µm, průtoková rychlost mobilní fáze (ACN 0.75% FA : voda 0.75% FA) byla 0,4 ml/min



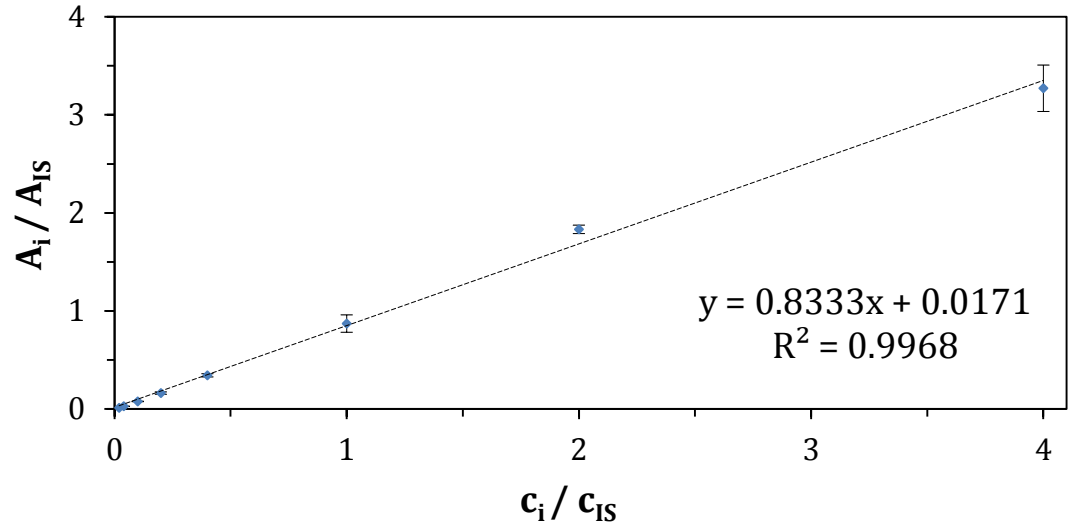
Obr. 28: Kalibrační závislost nikotinamidu v rozsahu 10 – 2000 ng/ml; koncentrace IS byla 500 ng/ml; experimentální podmínky viz obr. 27



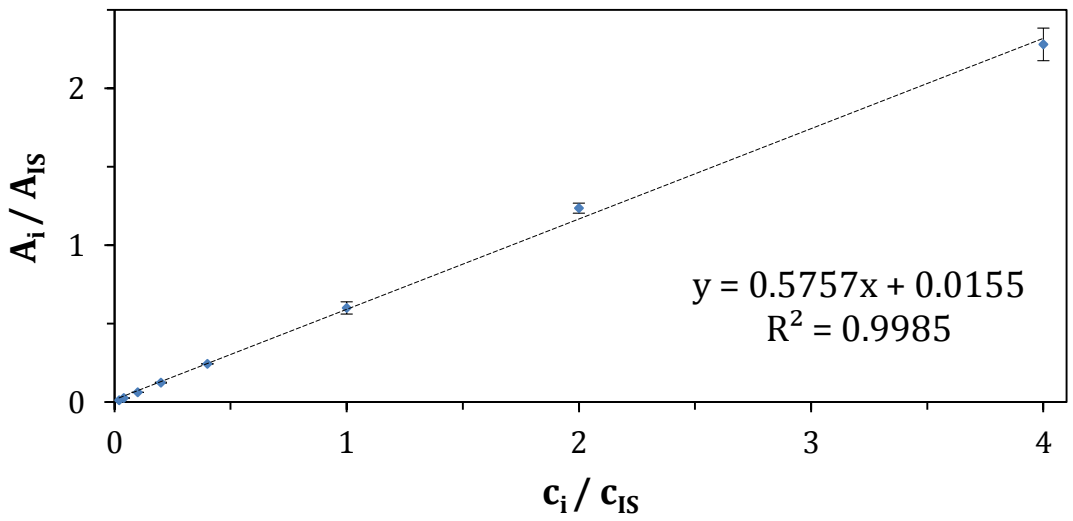
Obr. 29: Kalibrační závislost kyseliny nikotinové v rozsahu 10 – 2000 ng/ml; koncentrace IS byla 500 ng/ml; experimentální podmínky viz obr. 27



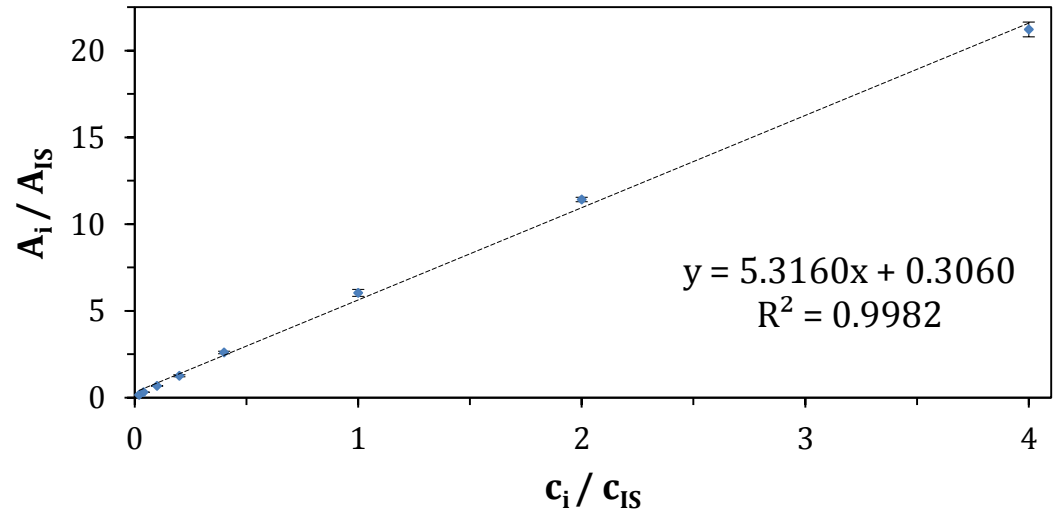
Obr. 30: Kalibrační závislost 1-methyl nikotinamid chloridu v rozsahu 10 – 2000 ng/ml; koncentrace IS byla 500 ng/ml; experimentální podmínky viz obr. 27



Obr. 31: Kalibrační závislost nikotinamid-N-oxidu v rozsahu 10 – 2000 ng/ml; koncentrace IS byla 500 ng/ml; experimentální podmínky viz obr. 27



Obr. 32: Kalibrační závislost 1-methyl-2-pyridon-5 karboxamidu v rozsahu 10 – 2000 ng/ml; koncentrace IS byla 500 ng/ml; experimentální podmínky viz obr. 27



Obr. 33: Kalibrační závislost 1-methyl-4-pyridon-5 karboxamidu v rozsahu 10 – 2000 ng/ml; koncentrace IS byla 500 ng/ml; experimentální podmínky viz obr. 27

Tab. 7: Přehled kalibračních parametrů

Složka	Eluční čas (min)	Kalibrační závislost	R^2	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
2-pyr	2,45	y = 0,5757x + 0,0155	0,9985	3	10
NNO	4,21	y = 0,8333x + 0,0171	0,9968	10	20
4-pyr	5,65	y = 5.3160x + 0.3060	0,9982	2	6
NA	7,88	y = 0,4411x + 0,0321	0,9959	20	60
NUA	8,86	y = 0,9394x + 0,0152	0,9987	1	3
NAM	8,87	y = 0,8346x - 0,0028	0,9995	20	64
MNA	15,16	$y = -0,3589x^2 + 2,9032x + 0,4191$	0,9918	1	2

Na základě hodnot směrnic z kalibračních závislotí lze určit pořadí analytů s klesající citlivostí metody, které je 4-pyr, MNA, NUA, NAM, NNO, 2-pyr, NA.

Rozlišení pro jednotlivé páry je následující: 2-Pyr-NNO 3,68, NNO-4-Pyr 1,84, 4-Pyr-NA 3,08, NA-NUA 2,43, NUA-NAM 3,67, NAM-IS 0,66, IS-MNA 3,90. Zde je vidět, že jediný kritický pár tvoří dvojice NAM-IS.

Stejně jako na koloně Hypercarb byly všechny kalibrační závislosti lineární v celém koncentračním rozsahu kromě MNA, kde rovněž závislosti odpovídal polynom 2. stupně. Méně výrazný je rozdíl u sloučeniny 4-Pyr, kde lze rovněž pozorovat odklon od vypočtené závislosti u prvních 3 bodů. U velmi nízkých koncentrací by bylo vhodnější propojit tyto body s počátkem.

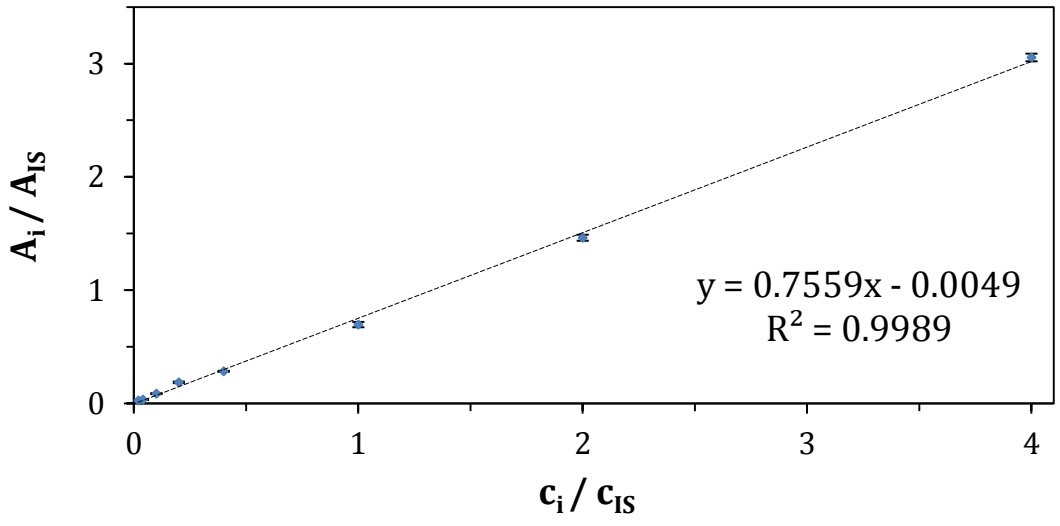
Obě sledované kolony se zásadně liší svou stacionární fází. Kolona Hypercarb obsahuje 100% porézní grafitový uhlík a výrobce ji deklaruje jako vhodnou pro separaci polárních sloučenin a izomerů. Oproti koloně Hypersil Silica zadržuje velmi polární složky. Kolona Hypersil Silica má na povrchu stacionární fáze velmi hydrofilní skupiny Si-OH, a je deklarována jako vhodná pro separaci mírně polárních sloučenin. Pořadí eluce je na obou kolonách téměř opačného charakteru. Sloučenina MNA (1-methyl-nikotinamid chlorid) je na koloně Hypercarb eluována první v pořadí, na koloně Hypersil Silica jako poslední; naopak sloučenina 2-Pyr je na koloně Hypercarb eluována poslední, na koloně Hypersil

Silica jako první. Ostatní složky se chovají obdobně, pouze pořadí není striktně protichůdné; uplatňuje se zřejmě rozdílná polarita složek i jejich afinita vůči stacionární fázi. Důležitou roli hraje i složení mobilní fáze, které by pořadí eluce mohlo rovněž ovlivnit.

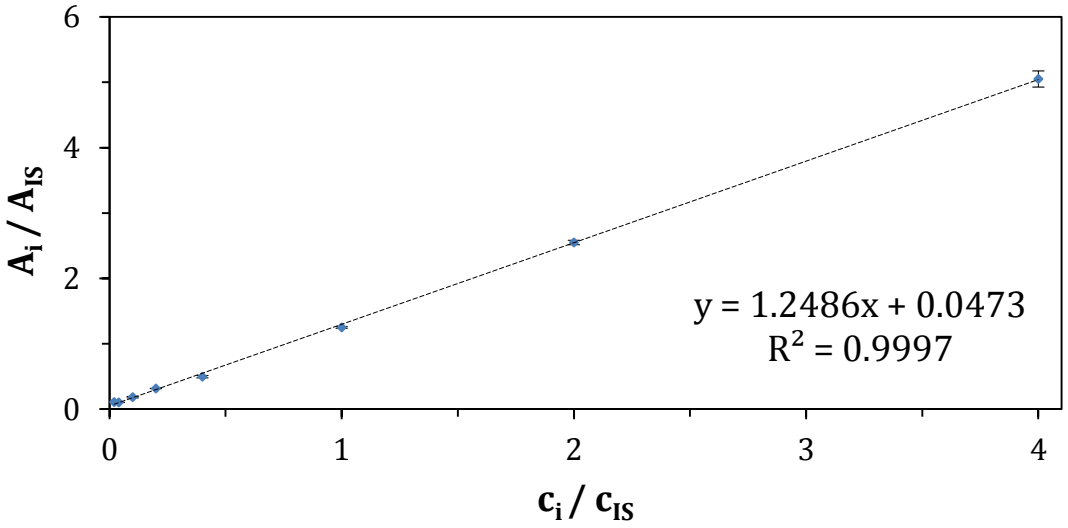
Pro obě kolony byly určeny i rovnice kalibračních závislostí, které se pro jednotlivé složky navzájem liší. Citlivost odezvy prakticky určuje směrnice kalibrační přímky, která byla pro část složek na koloně Hypercarb vyšší, pro část naopak nižší: 2-pyr – 65%, NNO – 63%, 4-pyr – 42%, NA – 110%, NUA – 150%, NAM – 131% a MNA – 53% ve srovnání se směrnicí na koloně Hypersil Silica (100%).

Kalibrace v plazmě

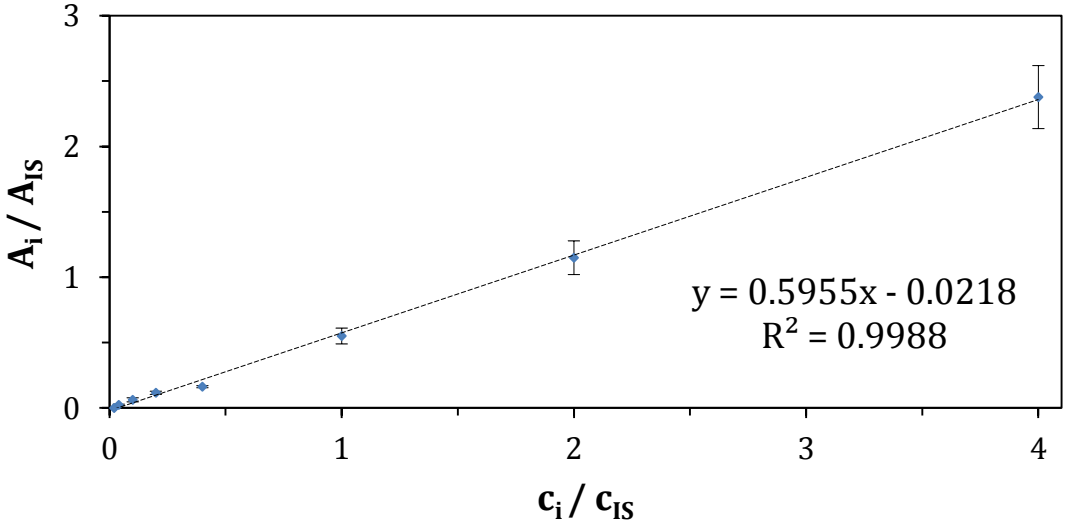
Ke kalibraci byla použita směsná plazma; do jednotlivých alikvotů byly přidány kalibrační roztoky s postupně rostoucí koncentrací stanovovaných složek. Vzorky byly poté zpracovány stejně jako biologický materiál. Kalibrační závislosti ukazují obr. 34-40.



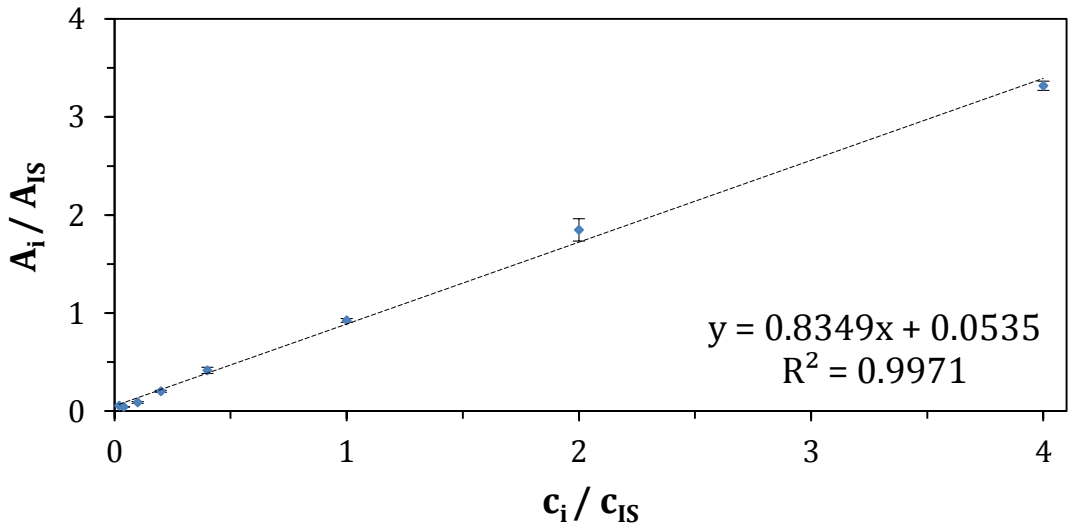
Obr. 34: Kalibrační závislost kyseliny nikotinurové v rozsahu 20 – 4000 ng/ml; koncentrace IS byla 1000 ng/ml, HPLC kolona – Hypersil Silica, rozměry: 50 x 4,60 mm, velikost částic 5 µm, průtoková rychlost mobilní fáze (ACN 0.75% FA : voda 0.75% FA) byla 0,4 ml/min



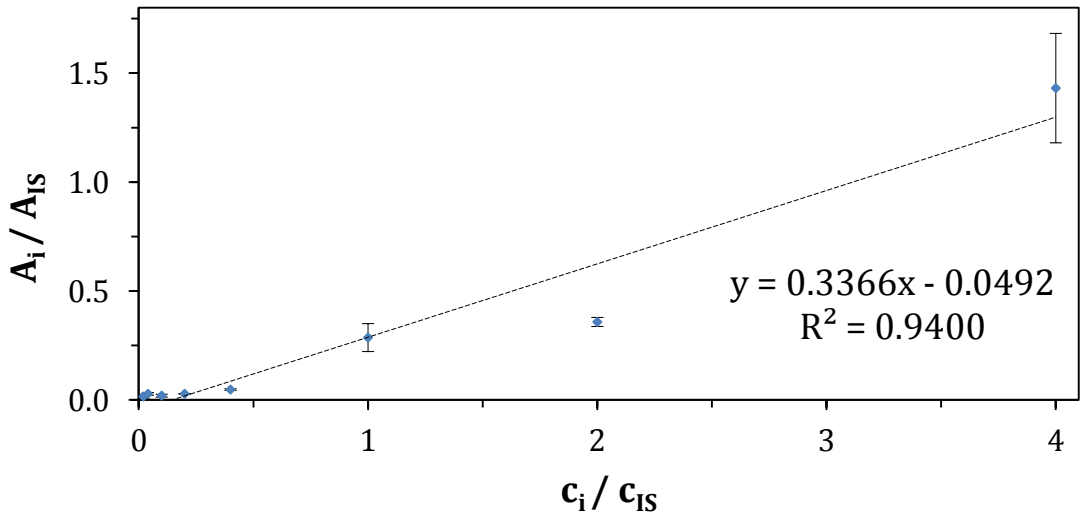
Obr. 35: Kalibrační závislost nikotinamidu v rozsahu 20 – 4000 ng/ml; koncentrace IS byla 1000 ng/ml; experimentální podmínky viz obr. 34



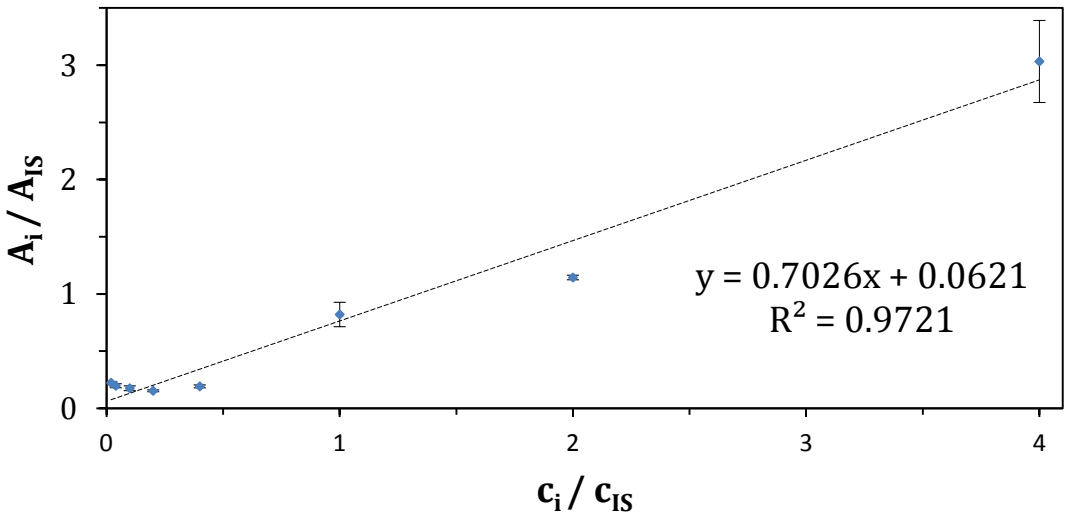
Obr. 36: Kalibrační závislost kyseliny nikotinové v rozsahu 20 – 4000 ng/ml; koncentrace IS byla 1000 ng/ml; experimentální podmínky viz obr. 34



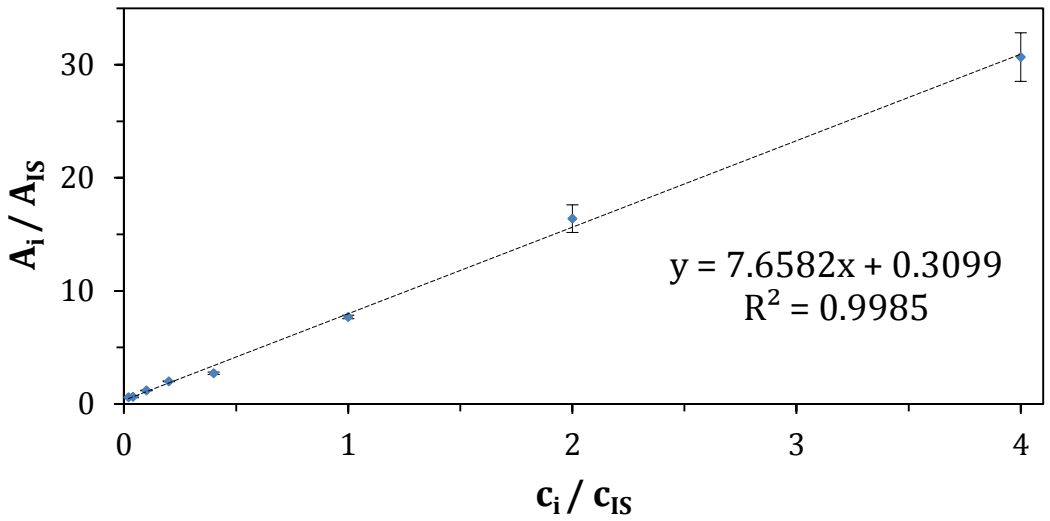
Obr. 37: Kalibrační závislost 1-methyl nikotinamid chloridu v rozsahu 20 – 4000 ng/ml; koncentrace IS byla 1000 ng/ml; experimentální podmínky viz obr. 34



Obr. 38: Kalibrační závislost nikotinamid-N-oxidu v rozsahu 20 – 4000 ng/ml; koncentrace IS byla 1000 ng/ml; experimentální podmínky viz obr. 34



Obr. 39: Kalibrační závislost 1-methyl-2-pyridon-5 karboxamidu v rozsahu 20 – 4000 ng/ml; koncentrace IS byla 1000 ng/ml; experimentální podmínky viz obr. 34



Obr. 40: Kalibrační závislost 1-methyl-4-pyridon-5 karboxamidu v rozsahu 20 – 4000 ng/ml; koncentrace IS byla 1000 ng/ml; experimentální podmínky viz obr. 34

Tab. 8: Přehled kalibračních parametrů

Složka	Eluční čas (min)	Kalibrační závislost	R^2	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
2-pyr	2,53	y = 0.7026x + 0.0621	0,9721	1	3
NNO	4,41	y = 0.3366x - 0.0492	0,9400	20	40
4-pyr	5,75	y = 7.6582x + 0.3099	0,9985	7	20
NA	7,57	y = 0.5955x - 0.0218	0,9988	40	60
NUA	8,47	y = 0.7559x - 0.0049	0.9989	20	40
NAM	9,36	y = 1.2486x + 0.0473	0,9997	20	40
MNA	14,03	y = 0.8349x + 0.0535	0,9971	3	10

Na základě hodnot směrnic z kalibračních závislotí lze určit pořadí analytů s klesající citlivostí metody, které je 4-pyr, NAM, MNA, NUA, 2-pyr, NA, NNO.

Kromě dvou látek byly kalibrační závislosti obdobné jako u čistých látek, tedy lineární v celém koncentračním rozsahu. Závislost MNA byla oproti kalibraci čistých látek rovněž lineární. U sloučenin NNO a 2-Pyr byly kalibrační závislosti poněkud deformované ve srovnání s čistými látkami. Pro tento efekt nemáme jednoznačné vysvětlení, nabízí se ovlivnění při zpracování biologického materiálu na SPE kolonkách. Tento efekt nebyl v literatuře popsán, pouze autoři Li et al[23]se zmiňují o interferencích po zpracování moči, které bylo kompenzováno díky detekci SIM. Jejich uspořádání pokusu bylo výrazně odlišné od mého – velmi krátká doba analýzy (cca 1 min), zpracování biologického materiálu na destičkách pokrytých stejným materiálem jako naše SPE kolonky. Při podobném pracovním postupu mají SPE kolonky výhodu v možnosti prokapání na rozdíl od destiček, které lze pouze vypláchnout. Dále lze na kolonkách zpracovat větší množství biologického materiálu (5x), a tudíž se méně uplatní případné nečistoty.

Pro obě kalibrační závislosti na koloně Hypersil Silica – z čistých látek i po jejich izolaci z plazmy na SPE kolonkách – byla srovnána i citlivost odezvy pro jednotlivé složky: 2-pyr – 122%, NNO – 40%, 4-pyr – 144%, NA – 135%, NUA – 80%, NAM – 150% a MNA – 29% ve srovnání s hodnotami získanými pro čisté látky. Pokles citlivosti u vzorků v plazmě vůči čistým látkám je běžně pozorovanou skutečností, zatímco nárůst citlivosti u vzorků v plazmě je neobvyklý a ukazuje pravděpodobně na synergický efekt při ionizaci.

5.3 Měření reálných vzorků

Byly analyzovány vzorky od anonymních pacientů z pokusné terapie lékem Tredaptive, který byl pacientům podán večer a odběr krve proběhl ráno. Výsledky jsou přehledně uvedeny v Tab. 9.

Tab. 9: Výsledky měření koncentrace niacinu a jeho metabolitů v lidské plazmě

vzorek	c_{NUA} [ng/ml]	c_{NAM} [ng/ml]	c_{NA} [ng/ml]	c_{MNA} [ng/ml]	c_{NNO} [ng/ml]	$c_{2\text{-}Pyr}$ [ng/ml]	$c_{4\text{-}Pyr}$ [µg/ml]
A	349 ± 21 (6.05%)	228 ± 5 (2.21%)	108 ± 5 (4.70%)	136 ± 1 (0.91%)	208 ± 21 (10.08%)	4366 ± 31 (0.70%)	588 ± 58 (9.93%)
B	58 ± 2 (4.22%)	308 ± 0 (0.06%)	< LOD	74 ± 9 (12.30%)	316 ± 16 (5.02%)	4190 ± 149 (3.56%)	516 ± 35 (6.71%)
C	60 ± 9 (15.28%)	1320 ± 36 (2.69%)	81 ± 2 (2.82%)	269 ± 9 (3.50%)	531 ± 19 (3.61%)	4761 ± 269 (5.65%)	559 ± 22 (3.88%)
D	< LOD	< LOQ	< LOD	< LOD	178 ± 2 (1.13%)	676 ± 21 (3.07%)	40 ± 4 (9.70%)
E	< LOQ	131 ± 6 (4.53%)	< LOD	216 ± 12 (5.56%)	195 ± 1 (0.72%)	786 ± 10 (1.24%)	68 ± 9 (12.79%)
F	< LOD	47 ± 3 (6.12%)	< LOD	< LOD	168 ± 34 (19.97%)	929 ± 34 (3.67%)	56 ± 1 (2.47%)
G	534 ± 10 (1.93%)	867 ± 15 (1.68%)	78 ± 2 (3.19%)	264 ± 7 (2.64%)	321 ± 26 (8.14%)	4400 ± 569 (12.92%)	502 ± 78 (15.45%)

Pozn.: Chyba měření vyjádřená jako SD, v závorce uvedena příslušná RSD% (n = 2);

Pozor! koncentrace 4-Pyr je v jednotkách v µg/ml narozdíl od ostatních, kde jsou koncentrace uvedeny v ng/ml.

Dobrovolníkům byla náhodně podána dávka niacinu 1-3 g za den a odebrané vzorky byly označeny anonymně; jednorázové podání, jak tomu bylo u sledovaných dobrovolníků, vede téměř k úplné absorpci. Maximální koncentrace NA (cca 300 mg/l) je dosaženo do 60 minut, z oběhu vymizí zpravidla do 6 hodin po podání. V oběhu přetrvávají delší dobu jeho metabolity.[1] Pacient D, který má ze všech 7 měřených analytů tři hodnoty koncentrace pod LOD a jednu pod LOQ, odpovídají jedny z nejnižších hodnot zbylých měřených metabolitů. Naměřené hodnoty v tab. 9 představují průměr ze 2 měření. Většinou relativní směrodatná odchylka nepřesahuje hodnotu 10 % (u 42 hodnot ze 49); u kalibračních závislostí byla tato hodnota nižší, vyjadřuje však rozdíl pouze chromatografické složky stanovení. K vyšším hodnotám u pacientských vzorků může kromě biologické variability přispívat i postup laboratorního zpracování.

6. Závěr

Byla optimalizována metoda stanovení kyseliny nikotinové a jejích metabolitů nikotinamidu, nikotinamidu-N-oxidu, nikotinurové kyseliny, N-methyl-nikotinamidu chloridu, N-methyl-4-pyridon-3-karboxamidu, N-methyl-2-pyridon-5-karboxamidu v biologickém materiálu.

Z hmotnostních spekter standardů měřených látek byly vybrány hodnoty m/z příslušných iontů a změřeny jejich produktové fragmenty.

Pro chromatografické stanovení byly otestovány 3 kolony s různými stacionárními fázemi – reverzní fáze oktadecylsilica (Kinetex C18), grafitový uhlík (Hypercarb) a silikagel (Hypersil Silica). Z těchto kolon poskytly uspokojivé dělení pouze Hypercarb a Hypersil Silica. Jako mobilní fáze sloužil gradient acetonitril-voda s obsahem 0,2 a 0,75% kyseliny mravenčí.

Pro jednotlivé látky byly změřeny kalibrační závislosti, které na obou kolonách měly kromě N-methyl-nikotinamidu chloridu lineární průběh. Pořadí eluce na obou kolonách reflektovalo polaritu stacionární fáze i jednotlivých stanovovaných složek.

Obě kolony se lišily také citlivostí odezvy jednotlivých složek, každá poskytovala citlivější odezvu pro jiné látky.

Metoda byla aplikována na stanovení sledovaných látek v lidské krevní plazmě dobrovolníků, kterým byla perorálně podaná kyselina nikotinová.

Literatura

1 Žák A., Zeman M., Vecka M., Tvrzická E.
Kyselina nikotinová: lék neprávem opomíjený
Časopis lékařů českých, 145, 2006, č. 11

2 Carlson L. A.
Nicotinic acid: the broad spectrum lipid drug, A 50th anniversary review
J. Inter. Med., 2005, 258, 94-114

3 Meyers C. D., Kamanna V. S., Kashyap M. L.
Niacin therapy in atherosclerosis
Curr. Opin. Lipidol., 2004, 15, 659-665

4 Ganji S. H., Kamanna V. S., Kashyap M. L.
Niacin and cholesterol: role in cardiovascular disease (Review)
J. Nutr. Biochem., 2003, 14, 298-305

5 Papaliodis D., Boucher W., Kempuraj D., Michaelian M., Wolfberg A.,House M., Theoharides T.C.
Niacin-induced "Flush" Involves Release of Prostaglandin D2 from Mast Cells and Serotonin from Platelets: Evidence from Human Cells in Vitro and an Animal Model
JPET, 2008, 327:665–672

6 Vogt A., Kassner U., Hostalek U., Steinhagen-Thiessen E.
Correction of low HDL cholesterol to reduce cardiovascular risk: practical considerations relating to the therapeutic use of prolonged-release nicotinic acid (Niaspan)
Int J Clin Pract, 2007, 61, 11, 1914–1921

7 Kamanna V. S., Ganji S.H., Kashyap M. L.
The mechanism and mitigation of niacin-induced flushing
Int J Clin Pract, 2009, 63, 1369-1377

[8] Gotto A. M., Pownall H.
Manual of Lipid Disorders, Lippincott Williams & Wilkins
Philadelphia, 2003

[9] Westphal S., Luley C.
Preferential increase in high-molecular weight adiponectin after niacin
Atherosclerosis, 2008, 198(1):179-83

[10] Bender D. A.
Nutritional Biochemistry of the vitamins
Cambridge University Press, Cambridge, 2003

[11] http://lem.ocol.cz/cs/info/hmotnostni-spektrometrie, staženo: 11.7.2014

[12] Cvačka J.
http://www.muj-web.cz/MC230P43/files/01_MC230P43_2014.pdf, staženo: 10.7.2014

[13] Cvačka J.
http://www.muj-web.cz/MC230P43/files/02_MC230P43_2014.pdf, staženo: 10.7.2014

[14] Šanda M.: www.uochb.cz/web/document/cms_library/978.pdf, staženo: 8.7.2014

[15]http://cs.wikipedia.org/wiki/Hmotnostn%C3%AD_spektrometrie#Technologie_iontov.C3.A9ho_zdroje, staženo: 8.7.2014

[16] Thermo Fisher Scientific Inc.
HESI-II Probe User Guide
USA, 2009

[17] http://holcapek.upce.cz/teaching/03_HmotnostniAnalyzatory.pdf, staženo: 8.7.2014

[18] Cvačka J.
http://www.muj-web.cz/MC230P43/files/03_MC230P43_2014.pdf, staženo: 8.7.2014

[19] Thermo Fisher Scientific Inc.
TSQ Series Hardware Manual
USA, 2010

[20] Opekar F., Jelínek I., Rychlovský P., Plzák Z.
Základní analytická chemie
Karolinum, Praha 2003

[21] Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta UK v Praze
Základní praktika z analytické chemie (verze 04.09.2013), Praha, 2004

[22] http://www.labicom.cz/spe-kolonky-81/, staženo: 1.7.2014

[23] Li A. C., Chen Y.-L., Junga H., Shou W. Z., Jiang X., Naidong W.
Separation of Nicotinic Acid and Six Matabolites within 60 Seconds Using High-Flow Gradient Chromatografy on Silica column with Tandem Mass Spectrometric Detection
Chromatographia, 2003, 58, 723-731

[24] Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W.
Harperova biochemie
Nakladatelství H+H, Jinočany 2002

[25] Čermáková M. a kolektiv autorů
Klinická biochemie – 2.díl.
Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, Brno 2005

[26] Zima T.
Laboratorní diagnostika
Galén, Praha, 2002

[27] http://cs.wikipedia.org/wiki/Pellagra, staženo: 30.6.2014

[28] Fölsch U. R., Kochsiek K., Schmidt R. F. a kolektiv
Patologická fyziologie
Grada Publishing a.s., Praha, 2003

[29] Talbert R. L.
Current recommendation for the treatment of dyslipidemia
Continuing Education Credits. P.T., 2004, 29, 104-112

[30] McCarty M. F.
Co-administration of equimolar doses of betaine may alleviate the hepatotoxicity risk associated with niacin therapy
Med. Hypotheses, 2000, 55, 189-194

[31] http://lekarske.slovniky.cz/lexikon-pojem/hyperlipoproteinemie-4, staženo: 8.7.2014

[32] Češka R.
Cholesterol a ateroskleróza
Maxdorf s.r.o., Praha, 1999

[33] Vokurka M., Hugo J.
Praktický slovník medicíny
Maxdorf s.r.o., Praha, 2000

[34] Kodkicek E., Reddi K. K.
Paper chromatography of nicotinic acid derivatives
Nature. 1951, 168(4272):475-7

[35] Quagliariello G., Guerritore D., Porcellati G.
Paper partition chromatography of nicotinic acid and nicotinamide
Boll Soc Ital Biol Sper., 1951, 27(12):1688-91

[36] Prosser A. R. , Sheppard A. J.
Gas-liquid chromatography of niacin and niacinamide
J Pharm Sci. 1968, 57(6):1004-6

[37] Katsumi S., Hiroko M.
Correlation between niacin equivalent intake and urinary excretion of its metabolites, N'-methylnicotinamide, *N'*- methyl-2-pyridone-5-carboxamide, and N'-methyl-4-pyridone-3-carboxamide, in humans consuming a self-selected

food
Am J Clin Nutr., USA, 1989, 50: 114-9

[38] Carter E.G. A.
Quantitation of urinary niacin metabolites by reversed-phase liquid chromatography
Am J Clin Nutr., USA, 1982, 36:926-930

[39] McKee R. W., Kang-Lee Y. A., Panaqua M., Swendseid M. E.
Determination of nicotinamide and metabolic products in urine by high performance liquid chromatography
Journal of Chromatography B, l982; 230:309-17

[40] Paul I. Creeke, Andrew J. Seal
Quantitation of the niacin metabolites 1-methylnicotinamide andl-methyl-2-pyridone-5-carboxamide in random spot urine samples, by ion-pairing reverse-phase HPLC with UV detection, and the implications for the use of spot urine samples in the assessment of niacin status
Journal of Chromatography B, 817, 2005, 247–253

[41] Somogyi A., Siebert D., Bochner F.
Determination of endogenous concentrations of N-1-methylnicotinamide in human plasma and urine by high-performance liquid-chromatography
Analytical Biochemistry, 1990, 187, 160-165

[42] Inamadugu J. K., Damaramadugu R., Mullangi R., Ponneri V.
Simultaneous determination of niacin and its metabolites nicotinamide, nicotinuric acid and *N*-methyl-2-pyridone-5-carboxamide in human plasma by LC-MS/MS and its application to a human pharmacokinetic study
Biomedicinal Chromatografy, 2010, 24: 1059–1074

[43] Szafarz M., Lomnicka M., Sternak M., Chlopicki S., Szymura-Oleksiak J.
Simultaneous determination of nicotinic acid and its four metabolites in rat plasma using high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection (LC/MS/MS)
Journal of Chromatography B, 2010, 878(11-12):895-902

[44] Pfuhl P., Kärcher U., Häring N., Baumeister A., Tawab MA, Schubert-Zsilavecz M.
Simultaneous determination of niacin, niacinamide and nicotinuric acid in human plasma
J Pharm Biomed Anal., 2005, 4;36(5):1045-52

[45] Hsieh Y., Chen J.
Simultaneous determination of nicotinic acid and its metabolites using hydrophilic interaction chromatography with tandem mass spectrometry
Rapid Commun. Mass Spectrom., 2005, 19: 3031–3036

[46] Catz P., Shinn W., Kapetanovic I. M., Kim H., Kim M., Jacobson E. L., Jacobson M. K., Green C. E.
Simultaneous determination of myristyl nicotinate, nicotinic acid, and nicotinamide in rabbit plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry using methyl ethyl ketone as a deproteinization solvent
Journal of Chromatography B, 2005, 829 123–135

Příloha

Přehled testovaných gradientů

Do všech mobilních fází byla přidána kyselina mravenčí v koncentračním rozmezí od 0.1% do 1.0% a to vždy ve stejném množství do ACN a vody.

G1

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	90	10	400
1.00	90	10	400
7.00	50	50	400
13.00	30	70	400
15.00	30	70	400
19.00	25	75	400
20.00	30	70	400
22.00	90	10	400
27.00	90	10	400
A – ACN, B– voda			

G2

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	90	10	400
2.50	90	10	400
7.00	60	40	400
13.00	40	60	400
15.00	25	75	400
19.00	35	65	400
20.00	55	45	400
21.00	90	10	400
27.00	90	10	400
A – ACN, B– voda			

G3

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	10	90	400
1.00	10	90	400
2.00	50	50	400
4.00	80	20	400
5.00	10	90	400
6.00	10	90	400
A – ACN, B– voda			

G4

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	10	90	400
1.00	10	90	400
2.00	40	60	400
4.00	80	20	400
5.00	10	90	400
6.00	10	90	400
A – ACN, B– voda			

G5

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	5	95	400
2.00	5	95	400
6.00	15	85	400
8.00	35	65	400
10.00	100	0	400
12.00	100	0	400
12.01	5	95	400
16.00	5	95	400
A – ACN, B– voda			

G6

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	5	95	300
2.00	5	95	300
6.00	15	85	350
8.00	35	65	400
10.00	100	0	400
12.00	100	0	400
12.01	5	95	300
16.00	5	95	300
A – ACN, B– voda			

G7

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	90	10	200
1.00	90	10	200
2.00	70	30	200
5.00	40	60	200
6.00	20	80	200
9.00	10	90	200
10.00	90	10	200
12.00	90	10	200
A – ACN, B– voda			

G8

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	90	10	400
1.00	90	10	400
7.00	65	35	400
13.00	45	55	400
15.00	35	65	400
19.00	35	65	400
21.00	90	10	400
27.00	90	10	400
A – ACN, B– voda			

G9

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	90	10	400
2.50	90	10	400
7.00	70	30	400
19.00	15	85	400
20.00	35	65	400
21.00	90	10	400
27.00	90	10	400
A – ACN, B– voda			

G10

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	90	10	400
1.00	90	10	400
7.00	50	50	400
15.00	30	70	400
19.00	15	85	400
21.00	90	10	400
27.00	90	10	400
A – ACN, B– voda			

G11

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	90	10	400
2.50	90	10	400
7.00	60	40	400
13.00	40	60	400
15.00	25	75	400
19.00	35	65	400
20.00	55	45	400
21.00	90	10	400
27.00	90	10	400
A – ACN, B– voda			

G12

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	90	10	400
1.00	90	10	400
7.00	55	45	400
13.00	30	70	400
15.00	30	70	400
19.00	50	50	400
20.00	60	40	400
22.00	90	10	400
25.00	90	10	400
A – ACN, B– voda			

G13

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	90	10	400
1.00	90	10	400
7.00	50	50	400
13.00	30	70	400
15.00	30	70	400
19.00	25	75	400
21.00	90	10	400
27.00	90	10	400
A – ACN, B– voda			

G14

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	90	10	400
2.50	90	10	400
7.00	60	40	400
13.00	40	60	400
15.00	35	65	400
20.00	25	75	400
21.00	90	10	400
25.00	90	10	400
A – ACN, B– voda			

G15

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	10	90	200
1.50	10	90	200
3.00	30	70	200
6.00	60	40	200
9.00	80	20	200
10.00	10	90	200
12.00	10	90	200
A – ACN, B– voda			

G16

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	90	10	400
1.00	90	10	400
7.00	60	40	400
15.00	35	65	400
21.00	25	75	400
22.00	90	10	400
25.00	90	10	400
A – ACN, B– voda			

G17

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	90	10	400
2.00	90	10	400
7.00	55	45	400
19.00	25	75	400
21.00	90	10	400
25.00	90	10	400
A – ACN, B– voda			

G18

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	90	10	400
2.50	90	10	400
7.00	70	30	400
19.00	25	75	400
21.00	90	10	400
25.00	90	10	400
A – ACN, B– voda			

G19

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	90	10	400
1.00	90	10	400
7.00	60	40	400
13.00	40	60	400
15.00	35	65	400
20.00	25	75	400
21.00	90	10	400
25.00	90	10	400
A – ACN, B– voda			

G20

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	90	10	400
1.00	90	10	400
7.00	55	45	400
13.00	30	70	400
15.00	25	75	400
20.00	15	85	400
22.00	90	10	400
25.00	90	10	400
A – ACN, B– voda			

G21

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	90	10	400
1.00	90	10	400
7.00	55	45	400
13.00	30	70	400
15.00	15	85	400
19.00	35	65	400
20.00	55	45	400
22.00	90	10	400
25.00	90	10	400
A – ACN, B– voda			

G22

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	90	10	400
1.00	90	10	400
7.00	65	35	400
13.00	45	55	400
15.00	35	65	400
19.00	45	55	400
20.00	65	35	400
22.00	90	10	400
25.00	90	10	400
A – ACN, B– voda			

G23

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	90	10	400
1.00	90	10	400
7.00	55	45	400
13.00	40	60	400
15.00	35	65	400
19.00	45	55	400
20.00	65	35	400
22.00	90	10	400
25.00	90	10	400
A – ACN, B– voda			

G24

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	90	10	400
1.00	90	10	400
7.00	65	35	400
13.00	45	55	400
15.00	35	65	400
19.00	35	65	400
20.00	45	55	400
22.00	90	10	400
25.00	90	10	400
A – ACN, B– voda			

G25

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	90	10	400
1.00	90	10	400
7.00	50	50	400
15.00	30	70	400
19.00	15	85	400
21.00	90	10	400
27.00	90	10	400
A – ACN, B– voda			

G26

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	90	10	400
1.00	90	10	400
7.00	80	20	400
15.00	55	45	400
19.00	15	85	400
21.00	90	10	400
25.00	90	10	400
A – ACN, B– voda			

G27

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	90	10	400
1.00	90	10	400
7.00	80	20	400
15.00	55	45	400
19.00	35	65	400
21.00	90	10	400
25.00	90	10	400
A – ACN, B– voda			

G28

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	90	10	400
1.00	90	10	400
7.00	80	20	400
15.00	55	45	400
19.00	25	75	400
21.00	90	10	400
25.00	90	10	400
A – ACN, B– voda			

G29

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	90	10	400
1.00	90	10	400
7.00	55	45	400
15.00	35	65	400
19.00	25	75	400
20.00	35	65	400
22.00	90	10	400
25.00	90	10	400
A – ACN, B– voda			

G30

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	90	10	400
1.00	90	10	400
7.00	65	35	400
15.00	45	55	400
19.00	35	65	400
20.00	45	55	400
22.00	90	10	400
25.00	90	10	400
A – ACN, B– voda			

G31

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	10	90	400
1.00	10	90	400
7.00	20	80	400
19.00	75	25	400
21.00	10	90	400
27.00	10	90	400
A – ACN, B– voda			

G32

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	90	10	100
1.00	90	10	100
7.00	80	20	100
19.00	25	75	100
21.00	90	10	100
27.00	90	10	100
A – ACN, B– voda			

G33

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	10	90	400
1.00	10	90	400
2.00	20	80	400
4.00	80	20	400
5.00	10	90	400
6.00	10	90	400
A – ACN, B– voda			

G34

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	10	90	400
1.00	10	90	400
2.00	60	40	400
4.00	90	10	400
5.00	10	90	400
6.00	10	90	400
A – ACN, B– voda			

G35

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	90	10	400
1.00	90	10	400
7.00	80	20	400
19.00	25	75	400
21.00	90	10	400
27.00	90	10	400
A – ACN, B– voda			

G36

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	90	10	400
1.00	90	10	400
7.00	80	20	400
19.00	25	75	400
21.00	90	10	400
25.00	90	10	400
A – ACN, B– voda			

G37

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	90	10	400
1.00	90	10	400
7.00	70	30	400
19.00	25	75	400
21.00	90	10	400
25.00	90	10	400
A – ACN, B– voda			

G38

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	10	90	400
1.00	10	90	400
2.00	40	60	400
4.00	90	10	400
5.00	10	90	400
6.00	10	90	400
A – ACN, B– voda			

G39

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	95	5	400
2.00	65	35	400
5.00	65	35	400
6.00	95	5	400
A – ACN, B– voda			

G40

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	90	10	400
2.00	60	40	400
5.00	60	40	400
6.00	90	10	400
A – ACN, B– voda			

G41

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	95	5	400
6.00	95	5	400
A – ACN, B– voda			

G42

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	90	10	400
6.00	90	10	400
A – ACN, B– voda			

G43

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	80	20	400
6.00	80	20	400
A – ACN, B– voda			

G44

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	70	30	400
6.00	70	30	400
A – ACN, B– voda			

G45

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	50	50	400
6.00	50	50	400
A – ACN, B– voda			

G46

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	10	90	400
6.00	10	90	400
A – ACN, B– voda			

G47

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	10	90	400
1.00	10	90	400
1.50	30	70	400
2.00	50	50	400
3.50	70	30	400
4.00	90	10	400
5.00	10	90	400
6.00	10	90	400
A – ACN, B– voda			

G48

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	10	90	400
1.00	10	90	400
1.50	30	70	400
2.00	50	50	400
3.50	80	20	400
4.00	30	70	400
5.00	10	90	400
6.00	10	90	400
A – ACN, B– voda			

G49

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	10	90	400
1.00	10	90	400
1.50	20	80	400
2.00	50	50	400
3.50	90	10	400
4.00	30	70	400
5.00	10	90	400
6.00	10	90	400
A – ACN, B– voda			

G50

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	10	90	400
1.00	10	90	400
1.50	20	80	400
2.00	40	60	400
3.50	60	40	400
4.00	80	20	400
5.00	10	90	400
6.00	10	90	400
A – ACN, B– voda			

G51

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	10	90	400
1.00	10	90	400
1.50	20	80	400
2.00	30	70	400
3.50	90	10	400
4.00	30	70	400
5.00	10	90	400
6.00	10	90	400
A – ACN, B– voda			

G52

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	10	90	400
1.00	10	90	400
1.50	20	80	400
2.00	30	70	400
3.50	70	30	400
4.00	30	70	400
5.00	10	90	400
6.00	10	90	400
A – ACN, B– voda			

G53

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	90	10	400
1.00	90	10	400
7.00	50	50	400
13.00	30	70	400
15.00	30	70	400
19.00	25	75	400
20.00	30	70	400
22.00	90	10	400
25.00	90	10	400
A – ACN, B– voda			

G54

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	30	70	400
6.00	30	70	400
A – ACN, B– voda			

G55

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	80	20	400
2.00	50	50	400
5.00	50	50	400
6.00	80	20	400
A – ACN, B– voda			

G56

čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (µl/ min)
0.00	10	90	400
1.00	10	90	400
2.00	80	20	400
4.00	90	10	400
5.00	10	90	400
6.00	10	90	400
A – ACN, B– voda			