

## STANOVENÍ NIKOTINOVÉ KYSELINY A JEJÍCH METABOLITŮ POMOCÍ HPLC-MS/MS

KAMILA ŽANTOVÁ, EVA TVRZICKÁ,  
MAREK VECKA a ALEŠ ŽÁK

Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, 4. interní klinika, U Nemocnice 2, 128 08 Praha 2  
marek.vecka@lf1.cuni.cz

Došlo 4.12.14, přepracováno 4.6.15, přijato 18.6.15.

**Klíčová slova:** nikotinová kyselina, HPLC-MS, niacin, extrakce pevnou fází, metabolity niacinu

### Úvod

Nikotinová kyselina (NA), *synonymum* niacin (N*ic*otinic A*C*id vitamIN), nazývaná též vitamin B3 či PPF (pellagra preventive factor), se někdy zařazuje do skupiny vitamínu B. Nejedná se o vitamin *per se*, protože NA může být syntetizována z tryptofanu. Termín niacin zahrnuje nikotinovou kyselinu a nikotinamid se stejnou biologickou aktivitou<sup>1</sup>. Zdrojem NA jsou potraviny rostlinného i živočišného původu. Fyziologická potřeba NA nepřesahuje 20 mg/den (cit.<sup>2</sup>). Za nepřímý marker nutričního deficitu NA je považována snížená exkrece methylnikotinamidu a methyl-pyridonkarboxamidu močí. Nedostatek niacinu se vyskytuje endemicky zejména v populacích odkázaných na kukuřici a kukuřičné výrobky jako na hlavní zdroj výživy a projevuje se pelagrou (fotosenzitivní dermatitis, demence a průjmy). Ve vyspělých zemích se pelagra vyskytuje pouze u specifických skupin obyvatel (např. alkoholiků)<sup>1</sup>.

Niacin je prekurzorem nikotinamidadenindinukleotidu (NAD) a nikotinamidadenindinukleotid fosfátu (NADP), které se po redukci účastní řady oxidačně-redukčních reakcí spojených především se získáváním energie. Od poloviny 50. let se NA používá jako hypolipidemikum<sup>3,4</sup>. Nikotinová kyselina ovlivňuje metabolismus lipidů a lipoproteinů na různých úrovních<sup>5,6</sup>, významné jsou také její antioxidační, antitrombotické a protizánětlivé účinky<sup>7</sup>.

Niacin je metabolizován ve dvou metabolických dráhách. V první je NA konjugována s glycinem na kyselinu nikotinurovou, která může indukovat syntézu prostaglandinu D2 odpovědného za nežádoucí efekty (zvl. flush, zarudnutí kůže)<sup>8</sup> při užívání preparátů NA s bezprostředním nástupem účinku. V druhé dráze je NA sledem oxidačně-redukčních reakcí konvertována na nikotinamid (NAM) a pyridinové metabolity (1-methylnikotinamid, nikotina-

mid-*N*-oxid, 6-hydroxynikotinamid, *N*-methyl-2-pyridon-5-karboxamid a *N*-methyl-4-pyridon-5-karboxamid). Touto cestou jsou převážně metabolizovány preparáty NA s řízeným uvolňováním<sup>1,9</sup>. Riziko poškození jater je spojováno s metabolity druhé dráhy.

Studium farmakokinetiky a farmakodynamiky NA i jejich nežádoucích účinků vyžaduje adekvátní metody umožňující stanovení NA a jejich metabolitů v biologickém materiálu. Zavedení metody značně komplikuje fakt, že metabolity NA se významně liší fyzikálně-chemickými vlastnostmi (především polaritou). Cílem této práce bylo vyvinout metodu pro současné stanovení NA a všech jejích metabolitů pomocí HPLC-MS.

### Experimentální část

#### Používané chemikálie a standardy

Standardy nikotinové kyseliny (NA), nikotinamidu (NAM), nikotinurové kyseliny (NUA), 1-methylnikotinamidu (MNA), nikotinamid-*N*-oxidu (NNO) a vnitřního standardu 6-methylpyridin-3-karboxylové kyseliny byly dodány firmou Sigma-Aldrich (USA). Standardy *N*-methyl-2-pyridon-5-karboxamidu (2-Pyr, čistota 99 %) a *N*-methyl-4-pyridon-5-karboxamidu (4-Pyr, čistota 94 %) byly dodány firmou BDG synthesis (Nový Zéland). Ostatní chemikálie čistoty pro chromatografii dodala firma Chromservis (ČR).

#### Používané přístroje a zařízení

Analýzy jsme prováděli na kapalinovém chromatografu LC systém Dionex 3000 (Thermo Scientific, USA), vybaveném kvartérní pumpou, autosamplerem a termostatem kolon, spojeném s hmotnostně spektrometrickým detektorem typu trojitého kvadrupolu TSQ Quantum Access Max (Thermo Scientific). Analýzy byly zpracovány pomocí SW Xcalibur (Thermo Scientific).

Testované kolony: Kinetex C18 150 × 2,10 mm, 5 μm (Chromservis s.r.o.), HyperCarb 50 × 2,1 mm, 3 μm (Thermo Scientific) a Hypersil Silica 50 × 4,6 mm, 5 μm (Thermo Scientific).

#### Pracovní postupy

Biologické vzorky byly připravovány pomocí kolonek Oasis MCX 60 μm (6 ml, 150 mg) (Waters, U.S.A.). Kolonka byla nejprve kondicionována 5 ml methanolu a 5 ml vody, pak byl nanesen vzorek (0,5 ml plazmy či moče + 0,5 ml 0,2M HCl) a kolonka byla propláchnuta 2 ml vody. Analyty byly eluovány 5 ml 5% NH<sub>3</sub> v acetonitrilu (eluát A). Pro eluci MNA je potřeba 5 ml směsi 5% NH<sub>3</sub> v methanolu a 2M NaCl (90:10) (eluát B). Eluát B byl vysušen pod proudem dusíku při 60 °C a rekonstituován ve 2 ml směsi acetonitril-methanol (80:20), přidán k eluátu A a směs byla vysušena pod proudem dusíku při 60 °C. Vysušená směs byla rekonstituována v 1 ml acetonitrilu.

Vzorky byly měřeny na LC-MS stanici za těchto podmínek: Kolony byly vyhřívány na 45 °C (HypersilSilica) nebo 40 °C (Hypercarb, Kinetex C18). Objemy nástřiku do kolon se pohybovaly v rozmezí 5–15  $\mu\text{l}$ . Vyhřívání HESI-II zdroj pro MS detektor byl provozován s nastavením těchto parametrů: sprejovací napětí +3200 V, vypařovací teplota 350 °C, tlak zmlžovacího plynu 30 arb.j., tlak pomocného plynu 8 arb.j., tlak plynu pro průtok přechodovou trubicí 2,0 arb.j., teplota na přechodové trubicí 320 °C, nastavení napětí na přechodové trubicí 35 V a nastavení napětí na vstupu 99 V. Napětí pro fragmentaci ve zdroji bylo nastaveno na 7 V. V HESI-II zdroji dochází při podmínkách analýzy ke tvorbě klastrů protonovaných molekul  $[M+H]^+$ , další pozorované klastry  $[M+ACN+H]^+$  poskytovaly nižší intenzitu (jejich rozpadové produkty vždy zahrnovaly i protonovanou molekulu), a proto byla nastavena fragmentace ve zdroji tak, aby docházelo ke zvýšení intenzity protonovaných molekul.

Naladění MS/MS přechodů pro jednotlivé látky se provedlo infúzí zkoumané látky o koncentraci 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  rychlostí 20  $\mu\text{l min}^{-1}$  k mobilní fázi (400  $\mu\text{l min}^{-1}$ ), kolizní tlak plynu v Q2 (Ar) byl optimalizován na 1,5 mTorr. Sledované MS/MS přechody byly vždy dva pro každou sledovanou látku: NA [výchozí ion 124,2  $\rightarrow$  produktové ionty 80,4 (kolizní energie odpovídající 21 V) a 78,4 (23)], NAM [123,2  $\rightarrow$  80,4 (19) a 78,4 (22)], NUA [181,2  $\rightarrow$  135,2 (16) a 79,4 (38)], MNA [137,2  $\rightarrow$  94,3 (20) a 92,3

(21)], NNO [139,2  $\rightarrow$  106,3 (22) a 122,2 (16)], 2-Pyr [153,2  $\rightarrow$  108,3 (22) a 110,3 (20)], 4-Pyr [153,2  $\rightarrow$  136,2 (13) a 92,3 (22)]. Jako vnitřní standard jsme použili 6-methylpyridin-3-karboxylovou kyselinu [138,2  $\rightarrow$  92,3 (21) a 94,3 (20)]. Deuterované standardy jsou sice dostupné pro všechny stanovované látky, jsou ale finančně nákladné, a proto jsme je nepoužívali. Vývoj metody bez použití deuterovaných standardů byl jedním ze záměrů této práce.

## Výsledky a diskuse

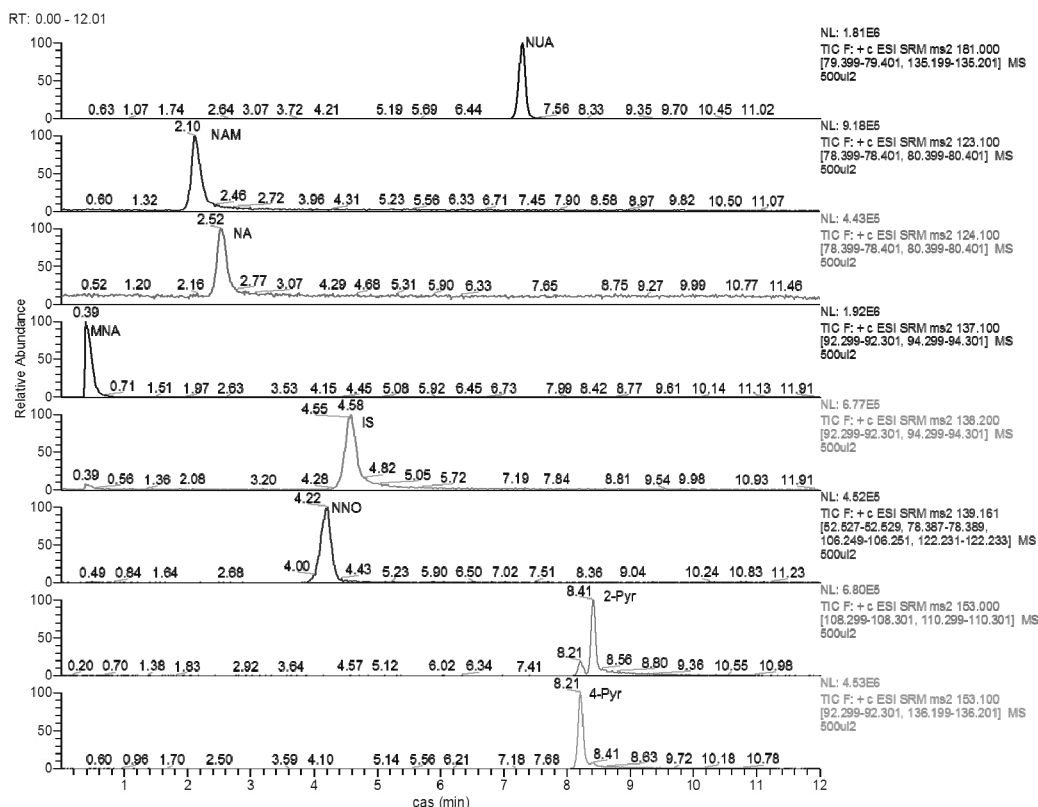
### Porovnání jednotlivých kolon

#### Kolona Kinetex C18

Kolona C18 nedělí jednotlivé sledované látky, všechny složky jsou eluovány prakticky ihned po nástřiku. Polární analyty, jako je niacin a jeho metabolity, mají afinitu k materiálu kolony velmi malou, a proto jsou eluovány prakticky v mrtvém objemu kolony. Tuto kolonu jsme dále pro vývoj metody nepoužívali.

#### Kolona Hypercarb

Dále byla testována kolona Hypercarb, jejíž stacionární fázi tvoří uhlík, a která má široké pracovní rozmezí pH mobilní fáze (1–14). Jako mobilní fáze byla zvolena směs



Obr. 1. Chromatogramy SRM pro směs jednotlivých složek (500  $\text{ng ml}^{-1}$ ) na koloně Hypercarb, průtoková rychlost 0,4  $\text{ml min}^{-1}$ , gradient viz Výsledky a diskuse

Tabulka I  
Přehled kalibračních parametrů pro čisté látky na koloně Hypercarb

Složka	Eluční čas [min]	Kalibrační závislost	R <sup>2</sup>
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

$y$  = poměr plochy stanované látky/plochy vnitřního standardu;  $x$  = poměr koncentrací stanované látky (ng ml<sup>-1</sup>)/koncentrace vnitřního standardu (ng ml<sup>-1</sup>); NA = niacin; NAM = nikotinamid; NUA = kyselina nikotinurová; 2-pyr = *N*-methyl-2-pyridon-5-karboxamid; 4-pyr = *N*-methyl-4-pyridon-5-karboxamid; MNA = 1-methylnikotinamid; NNO = nikotinamid-*N*-oxid; R = korelační koeficient; kalibrační rozmezí 20–4000 ng ml<sup>-1</sup>, koncentrace IS 500 ng ml<sup>-1</sup>

acetonitrilu (fáze A) a vody (fáze B) obsahující kyselinu mravenčí (0,2 %), přičemž analyty byly eluovány postupně snižujícím se obsahem vody. Počáteční složení směsi (5 % fáze A) bylo ponecháno 2 min, pak byl postupně obsah fáze A zvyšován na 15 % (6. minuta), 35 % (8. minuta) a v 10. minutě protékala systémem pouze fáze A (do 12. minuty). Ekvilibrace kolony byla 4 min. Průtok mobilní fáze kolonou byl po celou dobu analýzy 400 μl min<sup>-1</sup>.

Tato kolona poskytuje dobré dělení všech sledovaných složek, jak ukazuje obr. 1, pouze izobarické složky 4-Pyr a 2-Pyr nejsou uspokojivě rozděleny. Mrtvý čas kolony byl 0,35 min, což je velmi blízké retenčnímu času složky MNA. Mrtvý čas byl stanoven nástřikem vody.

Kalibrační závislost pro jednotlivé složky byla sledována v koncentračním rozmezí 10–2000 ng ml<sup>-1</sup>. Jako vnitřní standard sloužila 6-methylpyridin-3-karboxylová kyselina (IS) o koncentraci 500 ng ml<sup>-1</sup>. Data jsou uvedena v tab. I.

Všechny kalibrační závislosti byly lineární v celém koncentračním rozsahu kromě MNA, kde závislosti odpovídal polynom 2. stupně. Pro velmi nízké koncentrace není proložení kalibračních křivek ideální, vhodnější je proložení prvních 2 bodů s počátkem. Na základě hodnot směrnice z kalibračních závislostí lze určit pořadí analytů s klesající citlivostí metody: 4-pyr, NUA, MNA, NAM, NNO, NA, 2-pyr.

#### Kolona Hypersil Silica

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

Jako mobilní fáze byla zvolena kombinace acetonitrilu (fáze A) a vody (fáze B) obsahující kyselinu mravenčí (0,75 %). Zastoupení kyseliny mravenčí v mobilní fázi bylo optimalizováno v rozmezí 0,1–1,0 %. Nejlepší hodnoty signálu při přijatelném šumu poskytl složení mobilní fáze s 0,75 % kyseliny mravenčí. Analyty byly vzhledem

k jejich povaze a vlastnostem kolony eluovány postupně zvyšujícím se obsahem vody. Obsah vody v průběhu gradientu byl měněn různými způsoby, hlavně jsme se zaměřili na posunutí eluce NNO a 2-pyr od mrtvého času, oddělení izobarických sloučenin 2-pyr/4-pyr a také na snížení asymetrie píků (hlavně MNA). Počáteční složení směsi (10 % fáze A) bylo ponecháno 1 min, pak byl postupně obsah fáze A snižován na 50 % (7. minuta), 25 % (13. až 15. minuta) a v 19. minutě protékala systémem směs fází A/B 25/75 v/v (do 20. minuty). V 22. minutě se kolona ekvilibrovala po dobu 7 min. Průtok mobilní fáze kolonou byl po celou dobu analýzy 400 μl min<sup>-1</sup>.

Kolona Hypersil Silica poskytuje rovněž uspokojivé dělení všech sledovaných složek, jak ukazuje obr. 2, až na pár NAM a IS, který ovšem není izobarický, a tak při detekci pomocí SRM přechodů tato koeluce nevádí.

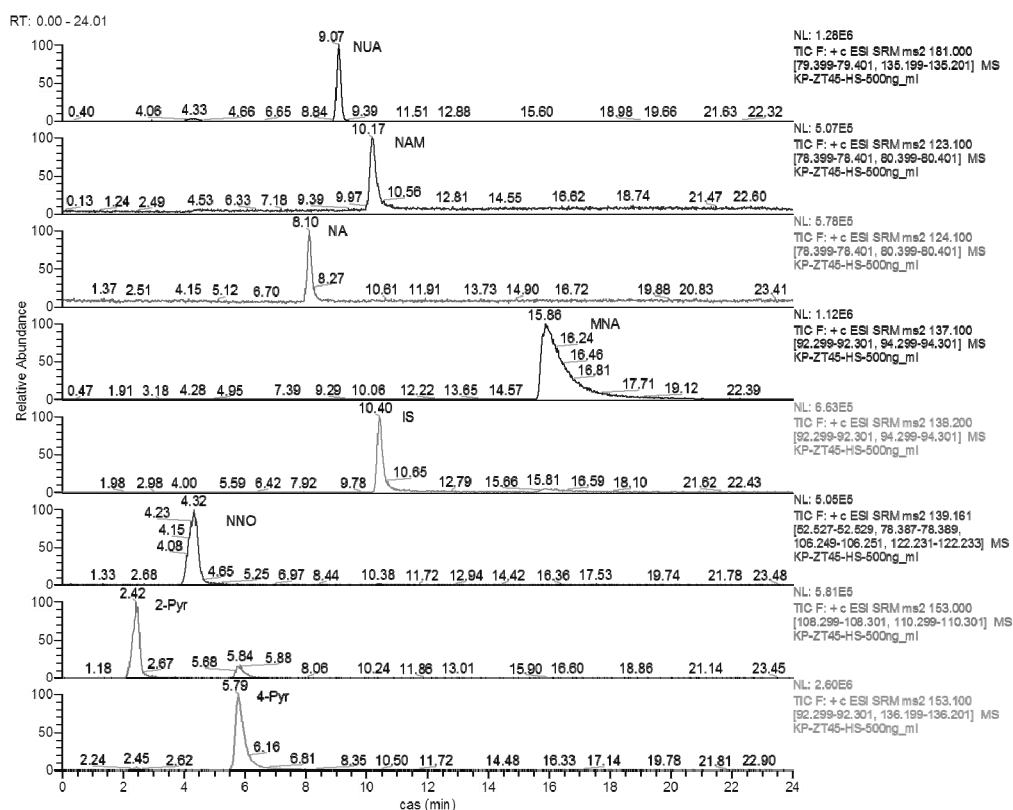
Ve srovnání s kolonou Hypercarb nejsou píky zcela symetrické, což bylo pozorováno i dalšími autory<sup>3</sup>. Tento fakt však neměl vliv na tvar kalibrační závislosti.

#### Kalibrace

Na koloně Hypersil Silica byly měřeny kalibrační závislosti nejprve pomocí čistých látek, potom i v krevní plazmě a moči. Kalibrační vzorky byly zpracovány stejně jako biologický materiál pomocí SPE kolonek. Výťažnost kroku SPE pro všechny sledované látky se pohybovala v rozmezí 75–110 % při RSD pod 10 % pro sledované koncentrační hladiny 500 a 50 ng ml<sup>-1</sup>. Všechny vzorky byly měřeny v tripletech ( $n = 3$ ). Hodnoty LOQ a LOD byly získány automaticky softwarem vyhodnocujícím signál a šum (LOD byl přiřazen koncentraci, jíž odpovídal poměr signál/šum rovný hodnotě 3 a LOQ poměr rovný hodnotě 10).

#### Kalibrace pomocí čistých látek

Kalibrační závislost byla sledována pro stejné koncentrační rozmezí jako na koloně Hypercarb. Data jsou



Obr. 2. Chromatogramy SRM pro směs jednotlivých složek ( $500 \text{ ng ml}^{-1}$ ) na koloně Hypersil Silica, průtoková rychlost  $0,4 \text{ ml min}^{-1}$ , gradient viz Výsledky a diskuse

Tabulka II  
Přehled kalibračních parametrů pro čisté látky na koloně Hypersil Silica

Složka	Eluční čas [min]	Kalibrační závislost	$R^2$	LOD [ng ml <sup>-1</sup> ]	LOQ [ng ml <sup>-1</sup> ]
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

Zkratky a vysvětlivky viz tabulka I; LOQ = mez stanovitelnosti; LOD = mez detekce. Horní mez kalibračního rozmezí byla  $4000 \text{ ng ml}^{-1}$

přehledně uvedena v tab. II. Na základě hodnot směrnice z kalibračních závislostí lze určit pořadí analytů s klesající citlivostí metody, které je 4-pyr, MNA, NUA, NAM, NNO, 2-pyr, NA.

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 isomerů. Oproti koloně Hypersil Silica zadržuje velmi polární složky. Kolona Hypersil Sili-

ca 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, jako standardní látka použit 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.

Pro obě kolony jsme určili 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 směrnici na koloně Hypersil Silica.

#### Kalibrace v plazmě a moči

Ke kalibraci byla použita směsná plazma/moč, příslušné kalibrační parametry jsou uvedeny v tab. III a IV. Na základě hodnot směrnice z kalibračních závislostí lze určit pořadí analytů s klesající citlivostí metody, které je 4-pyr, NAM, MNA, NUA, 2-pyr, NA, NNO pro plazmu a 4-pyr, NUA, MNA, NAM, NA, NNO, 2-pyr pro moč.

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 a spol.<sup>10</sup> se zmiňují o interferencích po zpracování moči, které bylo kompenzováno díky detekci v SRM módu.

Pro obě kalibrační závislosti na koloně Hypersil Silica – z čistých látek i po jejich izolaci z plazmy(moče) na SPE kolonkách – byla srovnána i citlivost odezvy pro jednotlivé

Tabulka III

Přehled kalibračních parametrů za přítomnosti biologického materiálu (krevní plazmy) na koloně Hypersil Silica

Složka	Eluční čas [min]	Kalibrační závislost	R <sup>2</sup>	LOD [ng ml <sup>-1</sup> ]	LOQ [ng ml <sup>-1</sup> ]
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

Zkratky viz tab. I a II. Horní mez kalibračního rozmezí byla 4000 ng ml<sup>-1</sup>

Tabulka IV

Přehled kalibračních parametrů za přítomnosti biologického materiálu (moč 10× ředěná) na koloně Hypersil Silica

Složka	Eluční čas [min]	Kalibrační závislost	R <sup>2</sup>	LOD [ng ml <sup>-1</sup> ]	LOQ [ng ml <sup>-1</sup> ]
2-pyr	2,52	$y = 0,9014x + 0,9814$	0,9906	1	3
NNO	4,42	$y = 1,0918x + 0,1640$	0,9919	10	40
4-pyr	5,77	$y = 6,0520x + 0,8507$	0,9984	1	3
NA	7,55	$y = 1,1016x + 0,0160$	0,9995	20	50
NUA	8,47	$y = 1,3661x - 0,0052$	0,9973	5	15
NAM	9,36	$y = 1,1668x + 0,0059$	0,9993	7	20
MNA	14,03	$y = -0,1094x^2 + 1,3427x + 0,2181$	0,9983	1	3

Zkratky viz tab. I a II. Horní mez kalibračního rozmezí byla 4000 ng ml<sup>-1</sup>

vé složky: 2-pyr – 122 % (157 %), NNO – 40 % (131 %), 4-pyr – 144 % (114 %), NA – 135 % (250 %), NUA – 80 % (145 %), NAM – 150 % (140 %) a MNA – 29 % (38 %) ve srovnání s hodnotami získanými pro čisté látky. Pokles citlivosti u vzorků v plazmě/moči vůči čistým látkám je běžně pozorovanou skutečností, zatímco nárůst citlivosti u vzorků plazmy/moče je neobvyklý a ukazuje pravděpodobně na synergický efekt při ionizaci. Během posledních 10 let popsalo stanovení nikotinové kyseliny a jejích metabolitů metodou HPLC-MS několik autorů. Většina prací se zabývá stanovením pouze některých metabolitů NA (cit.<sup>11–14</sup>); použití vnitřních deuterovaných standardů je popsáno v práci Catze a spol.<sup>15</sup>, jež se zabývá stanovením NA, NAM a myristyl nikotinátu. Li a spol.<sup>10</sup> 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. Jejich uspořádání pokusu bylo výrazně odlišné od našeho – 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 až 5× větší množství biologického materiálu, a tudíž se méně uplatní případné nečistoty.

Metody LC MS/MS bez použití izotopicky značených standardů jsou obecně méně robustní a při jejich vývoji je nutné věnovat pozornost možným interferencím, jež je nutné minimalizovat např. použitím přečištěného vzorku pomocí SPE. Nicméně moderní HPLC systémy a pokročilé techniky výroby stacionárních fází pro HPLC kolony dovolují tvorby metod s vysoce reprodukovatelnými retenčními časy, což dále snižuje možnost nečekaných interferencí. Navíc jsou metody bez izotopicky značených

vnitřních standardů méně nákladné. Jisté omezení naší metody oproti pracím<sup>10,11</sup> je poměrně nízký průtok mobilní fáze (0,4 ml min<sup>-1</sup>), který prodlužuje dobu analýzy.

#### Měření biologických vzorků

Vzorky pocházely od anonymních pacientů z pokusné terapie lékem Tredaptive, který byl pacientům podán večer a odběr krve proběhl ráno.

Dobrovolníci náhodně obdrželi dávku niacinu 1–3 g za den a příslušné označení vzorků je anonymní; jednorázové podání, jak tomu bylo u sledovaných dobrovolníků, vede téměř k úplné absorpci. Maximální koncentrace niacinu (cca 300 mg l<sup>-1</sup>) je dosaženo do 60 min, z oběhu vymizí zpravidla do 6 hodin po podání, přičemž v oběhu přetrvávají delší dobu jeho metabolity.

Opakovaná stanovení téhož vzorku poskytla hodnoty, jejichž relativní směrodatná odchylka nepřesahovala hodnotu 10 % (u 42 hodnot ze 49); u dalších 4 hodnot bylo RSD v intervalu (12–15 %), zbývající 3 hodnoty RSD patřily do rozmezí (15–20 %). Výsledky jsou přehledně uvedeny v tab. V.

#### Závěr

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

Pro chromatografické stanovení byly otestovány 3 kolony s různými stacionárními fázemi – reverzní fáze

Tabulka V  
Výsledky měření koncentrace niacinu a jeho metabolitů v lidské plazmě

Vzorek	c <sub>NUA</sub> [ng ml <sup>-1</sup> ]	c <sub>NAM</sub> [ng ml <sup>-1</sup> ]	c <sub>NA</sub> [ng ml <sup>-1</sup> ]	c <sub>MNA</sub> [ng ml <sup>-1</sup> ]	c <sub>NNO</sub> [ng ml <sup>-1</sup> ]	c <sub>2-Pyr</sub> [ng ml <sup>-1</sup> ]	c <sub>4-Pyr</sub> [μg ml <sup>-1</sup> ]
A	349 ± 21* (6,1)	228 ± 5 (2,2)	108 ± 5 (4,7)	136 ± 1 (0,9)	208 ± 21 (10,1)	4366 ± 31 (0,7)	588 ± 58 (9,9)
B	58 ± 2 (4,2)	308 ± 0 (< 0,5)	< LOD	74 ± 9 (12,3)	316 ± 16 (5,0)	4190 ± 149 (3,6)	516 ± 35 (6,7)
C	60 ± 9 (15)	1320 ± 36 (2,7)	81 ± 2 (2,8)	269 ± 9 (3,5)	531 ± 19 (3,6)	4761 ± 269 (5,6)	559 ± 22 (3,88)
D	< LOD	< LOQ	< LOD	< LOD	178 ± 2 (1,1)	676 ± 21 (3,1)	40 ± 4 (9,7)
E	< LOQ	131 ± 6 (4,5)	< LOD	216 ± 12 (5,6)	195 ± 1 (0,7)	786 ± 10 (1,2)	68 ± 9 (12,8)
F	< LOD	47 ± 3 (6,1)	< LOD	< LOD	168 ± 34 (20,0)	929 ± 34 (3,7)	56 ± 1 (2,5)
G	534 ± 10 (1,9)	867 ± 15 (1,7)	78 ± 2 (3,2)	264 ± 7 (2,6)	321 ± 26 (8,1)	4400 ± 569 (12,9)	502 ± 78 (15,5)

\* chyba měření vyjádřená jako SD, v závorce uvedena příslušná RSD (%; n = 2); Zkratky viz tabulky I a II

oktadecylsilica (Kinetex C18), grafitový uhlík (Hypercarb) a silikagel (Hypersil Silica). Z těchto kolon poskytl 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 změněny 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. Na obou kolonách je tzv. vysokoodezvovalou látkou 4-Pyr, na koloně Hypercarb lze další metabolity rozdělit na 2 skupiny: NUA, MNA a NAM se směrnici 1,1–1,5, a NNO,NA a 2-Pyr se směrnici 0,4–0,5. Na koloně Hypersil Silica citlivost jednotlivých složek postupně klesá, pořadí podle citlivosti se liší podle přítomnosti biologického materiálu. Pro další práci byla vybrána kolona Hypersil Silica, protože na koloně Hypercarb docházelo k časné eluci jedné složky a mez detekce byla obecně na této koloně vyšší.

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

*Podporováno výzkumným projekty MPO 2012005FR-TI4/638, RVO-VFN64165 a PRVOUK-P25/LF1/2.*

#### LITERATURA

- Žák A., Zeman M., Vecka M., Tvrzická E.: Čas. Lék. Česk. 145, 825 (2006).
- Bender D. A.: *Nutritional Biochemistry of the vitamins*. Cambridge University Press, Cambridge 2003.
- Carlson L. A.: J. Intern. Med. 258, 94 (2005).
- Lauring B., Taggart A. K. P., Tata J. R., Dunbar R., Caro L., Cheng K., Chin J., Colletti S. L., Cote J., Khalilieh S., Liu J., Luo W.-L., MacLean A. A., Peterson L. B., Polis A. B., Sirah W., Wu T.-J., Liu X., Jin L., Wu K., Douglas Boatman P., Semple G., Behan D. P., Connolly D. T., Lai E., Wagner J. A., Wright S. D., Cuffie C., Mitchel Y. B., Rader D. J., Paolini J. F., Gerard Waters M., Plump. A.: Sci. Transl. Med. 4, 148ra115 (2012).
- Ganji S. H., Kamanna V. S., Kashyap M. L.: J. Nutr. Biochem. 14, 298 (2003).
- Meyers C. D., Kamanna V. S., Kashyap M. L.: Curr. Opin. Lipidol. 15, 659 (2004).
- Lukasova M., Hanson J., Tunaru S., Offermanns S.: Trends Pharmacol. Sci. 32, 700 (2011).
- Kamanna V. S., Ganji S. H., Kashyap M. L.: Int. J. Clin. Pract. 63, 1369 (2009).
- Stern RH.: J. Clin. Lipidol. 1, 191 (2007).
- Li A. C., Chen Y.-L., Junga H., Shou W. Z., Jiang X., Naidong W.: Chromatographia 58, 723 (2003).
- Inamadugu J. K., Damaramadugu R., Mullangi R., Ponneri V.: Biomed. Chromatogr. 24, 1059 (2010).
- Szafarz M., Lomnicka M., Sternak M., Chlopicki S., Szymura-Oleksiak J.: J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 878, 895 (2010).
- Pfuhl P., Kärcher U., Häring N., Baumeister A., Tawab MA, Schubert-Zsilavecz M.: J. Pharm. Biomed. Anal. 36, 1045 (2005).
- Hsieh Y., Chen J.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 19, 3031 (2005).
- Catz P., Shinn W., Kapetanovic I. M., Kim H., Kim M., Jacobson E. L., Jacobson M. K., Green C. E.: J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 829, 123 (2005).

**K. Žantová, E. Tvrzická, M. Vecka, and A. Žák**  
(Internal Clinic 4, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague): **Analysis of Nicotinic Acid and Its Metabolites by HPLC-MS/MS**

Nicotinic acid is a hypolipidemic agent with pleiotropic effects. Its drug form with controlled release leads to pyridine metabolites associated with the risk of hepatotoxicity. The aim of the present study was to introduce a HPLC-MS method for the determination of nicotinic acid, nicotinamide, nicotinic acid, *N*-methylnicotinamide, nicotinamide 1-oxide, 1-methyl-2-oxo-1,2-dihydropyridine-5-carboxamide, and 1-methyl-4-oxo-1,4-dihydropyridine-5-carboxamide in blood plasma or urine. The method is useful for the monitoring in hypolipidemic therapy. We have compared calibration curves of individual metabolites using Hypercarb (graphite carbon) and Hypersil Silica (silicagel) columns. Both columns gave linear calibration curves for all the mentioned analytes (except for 1-methylnicotinamide) in the concentration range 10–2000 ng ml<sup>-1</sup>. The calibration curve in blood plasma and urine measured with the Hypersil Silica column was linear in the range 20–4000 ng ml<sup>-1</sup> for all the tested analytes. The analysis time was 15 min with the column Hypercarb and 27 min with Hypersil Silica. Biological samples were extracted with sulfonated copolymer *N*-vinylpyrrolidone – divinylbenzene. Reproducibility of the results for biological samples varied between 0.06 % and 19.97 %.