

Razvoj i validacija biokemijskih indikatora funkcije kožne barijere

Đapić, Irena

Doctoral thesis / Disertacija

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:774167>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Irena Đapić

**RAZVOJ I VALIDACIJA BIOKEMIJSKIH INDIKATORA
FUNKCIJE KOŽNE
BARIJERE**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2014



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Irena Đapić

**DEVELOPMENT AND VALIDATION OF
BIOCHEMICAL MARKERS OF THE SKIN BARRIER
FUNCTION**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2014



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Irena Đapić

Razvoj i validacija biokemijskih indikatora funkcije kožne barijere

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Izv. prof. dr. sc. Ivone Jakaša
Dr. sc. Renata Kobetić, znanstveni suradnik

Zagreb, 2014



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Irena Đapić

Development and validation of biochemical markers of the skin barrier function

DOCTORAL THESIS

Supervisors:

Ivone Jakaša, associate professor
Renata Kobetić, research associate

Zagreb, 2014

Ova disertacija izrađena je u Laboratoriju za analitičku kemiju Zavoda za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta i Laboratoriju za supramolekularnu i nukleozidnu kemiju Zavoda za organsku kemiju i biokemiju Instituta Ruđer Bošković. Dio rada izrađen je u Coronal Institute of Occupational Health, Academic Medical Center, University of Amsterdam, Nizozemska.

Najljepše se zahvaljujem svojim mentoricama izv. prof. dr. sc. Ivone Jakaša i dr. sc. Renati Kobetić, znan. sur. na vodstvu, mnogobrojnim stručnim i i praktičnim savjetima, uloženom trudu te stalnom poticaju tijekom izrade doktorske disertacije.

Želim se zahvaliti dr. sc. Sanji Kežić na savjetima, strpljivosti i potpori te vremenu koje je posvetila pomažući mi u izradi disertacije, ali i istovremeno motivirajući me da svakodnevno težim napredovati i stjecati nova iskustva.

Veliko hvala Lidiji Brkljačić, dipl. ing. na stručnoj i nesebičnoj pomoći pri eksperimentalnoj provedbi dijela disertacije.

Hvala dr. Arthuru Kammeyeru na konstruktivnim diskusijama i savjetima te dr. Maaïke Visser na suradnji i prijateljstvu tijekom boravka na Coronel Institute of Occupational Health. Također, iskreno hvala Florentine Calkoen na stručnoj pomoći i druženju.

Zahvaljujem se dr. Mareku Haftek i dr. Jacquesu Portoukalian na stručnoj pomoći i suradnji tijekom boravka na Faculté de Médecine et de Pharmacie u Lyonu.

Najljepše hvala izv. prof. dr. sc. Biserki Žinić na susretljivosti i poticajnoj atmosferi tijekom izrade dijela disertacije u Laboratoriju za supramolekularnu i nukleozidnu kemiju Instituta Ruđer Bošković. Zahvaljujem se Davorki Pevec Rak na iznimnoj ljubaznosti i stručnoj pomoći tijekom izvedbe eksperimenata te dr. sc. Dijani Saftić i Josipi Matić, dipl. ing. na pomoći i ugodnom druženju.

Zahvaljujem se članovima Povjerenstva za ocjenu i obranu disertacije na konstruktivnim primjedbama i savjetima.

Hvala svim mojim prijateljima na diskusijama, podršci i druženju tijekom svih ovih godina.

Mojim roditeljima i sestri Dijani, veliko hvala na ljubavi i potpori koja me je pratila tijekom cijelog školovanja pa tako i pri izradi ovog rada.

Hvala mojem Vladi na iznimnom razumijevanju, ljubavi i vjeri u moj uspjeh.

Zagreb, 2014.

Irena Đapić

Sadržaj

SAŽETAK.....	IX
ABSTRACT.....	X
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	4
2.1. Građa i funkcija kožne barijere.....	5
2.2. Analitičke metode za određivanje NMF-a i lipida u koži.....	13
2.2.1. Analitičke metode za određivanje komponenata NMF-a u koži.....	14
2.2.2. Određivanje masnih kiselina i ceramida.....	17
2.2.3. Višestruke tranzicijske reakcije pri analizi masnih kiselina i ceramida	19
2.2.4. Utjecaj matrice.....	23
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	26
3.1. Kemikalije.....	27
3.2. Razvoj i validacija LC metode za određivanje komponenata NMF-a	29
3.2.1. Priprema standardnih otopina.....	29
3.2.2. Uzorkovanje rožnatog sloja kože	29
3.2.3. Ekstrakcija komponenata NMF-a	29
3.2.4. Ekstrakcijski i evaporacijski povrat.....	30
3.2.5. Usporedba različitih adhezivnih vrpca za uzorkovanje komponenata NMF-a.....	30
3.2.6. Usporedba različitih otapala za ekstrakciju komponenata NMF-a	31
3.2.7. Određivanje količine uzorkovanog rožnatog sloja.....	31
3.2.8. Kromatografski uvjeti	31
3.2.9. Određivanje validacijskih parametara LC-UV metode	32
3.2.10. Primjena metode za određivanje komponenata NMF-a.....	33
3.3. Razvoj i validacija LC-ESI-MS metode za određivanje slobodnih masnih kiselina.....	34
3.3.1. Sinteza derivatizacijskih reagensa, 2-brom-N-metilpiridinij jodida i 3-hidroksimetil-N-metilpiridinij jodida	34
3.3.3. Ekstrakcija slobodnih masnih kiselina.....	36
3.3.4. Derivatizacija slobodnih masnih kiselina	37
3.3.5. Optimiranje derivatizacijskih uvjeta	39
3.3.6. Određivanje faktora odgovora.....	39
3.3.7. Utjecaj sastava matrice.....	40

3.3.9. Ekstrakcijski povrat.....	42
3.3.10. Određivanje validacijskih parametara LC-ESI-MS metode za određivanje slobodnih masnih kiselina	43
3.4. Izolacija i karakterizacija ceramida.....	44
3.4.1. Ekstrakcija pojedinih lipidnih klasa iz humanog epidermisa	44
3.4.2. Ekstrakcija pojedinih lipidnih klasa s adhezivne vrpce	44
3.4.3. Karakterizacija i separacija izoliranih lipidnih klasa primjenom tankoslojne kromatografije...	45
3.4.4. Razdvajanje pojedinih lipidnih klasa ekstrakcijom na čvrstoj fazi	47
3.4.5. Karakterizacija ceramida III, IIIB i VI primjenom LC-ESI-MS tehnike.....	48
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA.....	49
4.1. Razvoj i validacija LC metode za određivanje komponenata NMF-a	51
4.1.1. Kromatografska analiza.....	51
4.1.2. Ekstrakcija komponenata NMF-a	55
4.1.3. Određivanje količine izuzetog rožnatog sloja	58
4.2. Utjecaj različitih adhezivnih vrpce na uzorkovanje komponenata NMF-a	61
4.3. Primjena razvijene RP-LC-UV metode za određivanje komponenata NMF-a	62
4.3.1. Utjecaj unutarnjih faktora na razinu komponenata NMF-a u rožnom sloju kože	62
4.3.2. Utjecaj alkalnih reagensa na razinu komponenata NMF-a u rožnom sloju kože.....	64
4.3.3. Utjecaj ultraljubičastog zračenja na razinu trans- i cis-UCA u rožnom sloju kože i međustaničnoj tekućini.....	66
4.4. Određivanje slobodnih masnih kiselina u rožnom sloju kože	68
4.4.1. Derivatizacija masnih kiselina i optimizacija radnih uvjeta.....	69
4.4.2. Ispitivanje utjecaja kromatografskih kolona pri razvoju LC-ESI-MS metode	79
4.4.3. Ispitivanje utjecaja sastava mobilne faze pri razvoju LC-ESI-MS metode	84
4.4.4. Ispitivanje utjecaja količine BMP, CMP i TEA na analizu derivata masnih kiselina.....	92
4.5. Kvantifikacija slobodnih masnih kiselina primjenom „surogat“ analita	94
4.6. Primjena LC-ESI-MS metode za određivanje masnih kiselina	105
4.7. Ceramidi u rožnom sloju kože	106
4.7.1. Ekstrakcijski postupci izolacije ceramida iz humanog epidermisa i adhezivne vrpce.....	106
4.8. Karakterizacija ceramida III, IIIB i VI	109
§ 5. ZAKLJUČAK.....	114
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	116
§ 7. LITERATURNI IZVORI	119
§ 8. DODATAK.....	XVII
§ 9. ŽIVOTOPIS.....	XXXIII



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

Razvoj i validacija biokemijskih indikatora funkcije kožne barijere

Irena Đapić
Laboratorij za analitičku kemiju
Zavod za kemiju i biokemiju
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilište u Zagrebu

U održanju funkcije kožne barijere važnu ulogu imaju prirodni čimbenici zadržavanja vlage (engl. *natural moisturizing factors*, NMF) koji sudjeluju u regulaciji pH i hidrataciji rožnatog sloja kože te međustanični lipidi koji predstavljaju barijeru pri transportu tvari kroz kožu. Cilj ovog rada bio je razviti pouzdane i selektivne LC-UV i LC-MS metode za određivanje biokemijskih indikatora za procjenu funkcije kožne barijere, slobodnih masnih kiselina, aminokiselina i ceramida u rožnom sloju izuzetom adhezivnim vrpčama.

Razvijena je RP-LC-UV metoda za određivanje komponenata NMF-a, histidina, piroglutaminske kiseline, *trans*- i *cis*-urokanske kiseline i tirozina u rožnom sloju kože te međustaničnoj tekućini. Ekstrakcija komponenata NMF-a s amonijakom u odnosu na tradicionalnu ekstrakciju jakim bazama omogućila je kraće vrijeme obrade uzorka zaobilazeći dodatni korak neutralizacije s jakim kiselinom.

Analitička metoda za određivanje slobodnih masnih kiselina u rožnom sloju kože temelji se na detekciji 3-aciloksimetil-*N*-metilpiridinij jodid (NMP) derivata primjenom RP-LC-ESI-MS i praćenju višestrukih tranzicijskih reakcija. Utjecaj matrice na analizu slobodnih masnih kiselina minimiziran je kvantifikacijom uz zamjenski ("surogat") analit i unutarnju standardizaciju izotopno obilježenim NMP derivatom C19:0. Sadržaj slobodnih masnih kiselina oslobođenih iz adhezivne vrpce procijenjen je iz korelacije s C12:0 koji nije detektiran u rožnom sloju.

Razvijene analitičke metode pokazale su se dovoljno osjetljive i reproducibilne za istovremeno određivanje NMF-a odnosno slobodnih masnih kiselina dugih i vrlo dugih lanaca u normalnoj koži i koži oštećenoj uslijed djelovanja unutarnjih i okolišnih faktora.

Ceramidne klase izolirane su iz humanog epidermisa optimiranim višestrukim ekstrakcijskim postupcima. Sintetski ceramidi III, IIIB i VI okarakterizirani su primjenom LC-ESI-MS tehnike.

(130 stranica, 34 slike, 18 tablica, 213 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102A, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: biokemijski indikatori funkcije kožne barijere / kožna barijera / LC-ESI-MS / LC-UV / NMF / slobodne masne kiseline / "surogat" analit

Mentorice: Izv. prof. dr. sc. Ivone Jakaša, PBF
Dr. sc. Renata Kobetić, zn. sur., IRB

Ocjenitelji: Izv. prof. dr. sc. Snežana Miljanić, PMF
Izv. prof. dr. sc. Ivone Jakaša, PBF
Dr. sc. Renata Kobetić, zn. sur., IRB
Izv. prof. dr. sc. Branka Marinović, MF
Doc. dr. sc. Sanda Rončević, PMF

Rad prihvaćen: 05. studenog 2014.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

Development and validation of biochemical markers of the skin barrier function

Irena Đapić
Laboratory for Analytical Chemistry
Department of Chemistry and Biochemistry
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University of Zagreb

Natural moisturizing factors (NMF) play important role in the regulation of pH and hydration of the stratum corneum and the intercellular lipids form a barrier to transport of substances through the skin. The primary aim of this thesis was to develop reliable and selective LC-UV and LC-MS methods for the determination of biomarkers of skin barrier function including free amino acids, free fatty acids and ceramides obtained by tape stripping technique.

Sensitive and robust RP-LC-UV method for determination of NMF components, histidine, pyroglutamic acid, *trans*- and *cis*-urocanic acid and tyrosine in the stratum corneum and interstitial fluid was developed. Extraction of NMF components with ammonia avoids a time consuming neutralization step as required with extraction procedures using strong base or acid.

The method for determination of free fatty acids (FFAs) in the stratum corneum is based on detection of 3-acyloxymethyl-1-methylpyridinium iodide (NMP) derivatives in positive ionization mode using RP-LC-ESI-MS and multiple reactions monitoring. To overcome the matrix effect, FFAs in the human stratum corneum were quantified by "surrogate" analyte method and internal standardization using isotope labelled derivatives of FFAs. The content of FFAs originated from the adhesive tape was calculated from the correlation with C12:0 signal not detected in the stratum corneum.

Developed LC-UV and LC-ESI-MS methods showed to be reproducible and sensitive enough for simultaneous detection and quantification of NMF or eight long and very long chain FFAs in the normal and compromised human stratum corneum.

Ceramide classes were isolated from human epidermis by multiple extraction steps. Synthetic ceramides III, IIIB and VI were characterized by LC-ESI-MS technique.

(130 pages, 34 figures, 18 tables, 213 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: biomarkers of the skin barrier function / free fatty acids / LC-ESI-MS / LC-UV / NMF / skin barrier / surrogate analyte

Supervisors: Dr. Ivone Jakaša, associate professor, PBF
Dr. Renata Kobetić, research associate, IRB

Reviewers: Dr. Snežana Miljanić, associate professor, PMF
Dr. Ivone Jakaša, associate professor, PBF
Dr. Renata Kobetić, research associate, IRB
Dr. Branka Marinović, associate professor, MF
Dr. Sanda Rončević, assistant professor, PMF

Thesis accepted: 5th November 2014

§ 1. UVOD

Koža čini primarnu granicu između organizma i okoliša te ima niz zaštitnih i komunikacijskih funkcija pri čemu sprječava ulazak patogenih organizama i prodiranje kemikalija u organizam, apsorbira okolišno zračenje, sudjeluje u termičkoj regulaciji organizma, pohranjuje hranjive tvari, regulira izmjenu tvari između organizma i okoliša i dr.

Koža može biti oštećena uslijed djelovanja vanjskih, iritacijskih reagensa i sunčevog zračenja, ili unutarnjih faktora (npr. kod bolesnika s atopijskim dermatitisom, AD).¹⁻³ Vanjski, rožnati sloj kože kojeg čine korneociti unutar kojih se nalaze prirodni čimbenici zadržavanja vlage (engl. *natural moisturizing factors*, NMF) te lipidi koji ispunjavaju međustanični prostor, u izravnom je dodiru s okolinom te se smatra iznimno važnim za očuvanje funkcije kože.¹ Komponente NMF-a sudjeluju u regulaciji hidratacije i pH vrijednosti kože, dok lipidi imaju važnu ulogu u očuvanju nepropusnosti kožne barijere. Dosadašnje metode istraživanja komponenata rožnatog sloja kože obuhvaćale su uporabu više analitičkih tehnika kao što su tekućinska kromatografija u sprezi sa spektrometrijom masa (LC-MS), tankoslojna kromatografija (HPTLC), infracrvena spektroskopija (IR), Ramanova spektroskopija, rentgenska difrakcija pod malim kutom i dr.²⁻⁷ u cilju boljeg uvida u njegovu morfologiju i biokemijski sastav. Najveći izazov u razvoju LC metode je pronalaženje otapala za kvantitativnu ekstrakciju komponenata NMF-a, a koje je istodobno pogodno i za kromatografsku analizu. Isto tako veliki broj faktora značajno utječe na dobivene rezultate o sastavu lipida, ceramida i masnih kiselina u rožnom sloju kože, kao što su ekstrakcijski postupci i izbor otapala, uvjeti separacije i detekcije.⁸ U odnosu na HPTLC, LC-MS predstavlja korak naprijed u separaciji i karakterizaciji lipidnih klasa, iako zbog njihovog velikog broja i raznovrsnosti te velike varijacije u rožnom sloju, optimiranje uvjeta pripreme uzorka, separacije i ionizacije još uvijek predstavlja veliki izazov u istraživanju ovih klasa spojeva.⁹

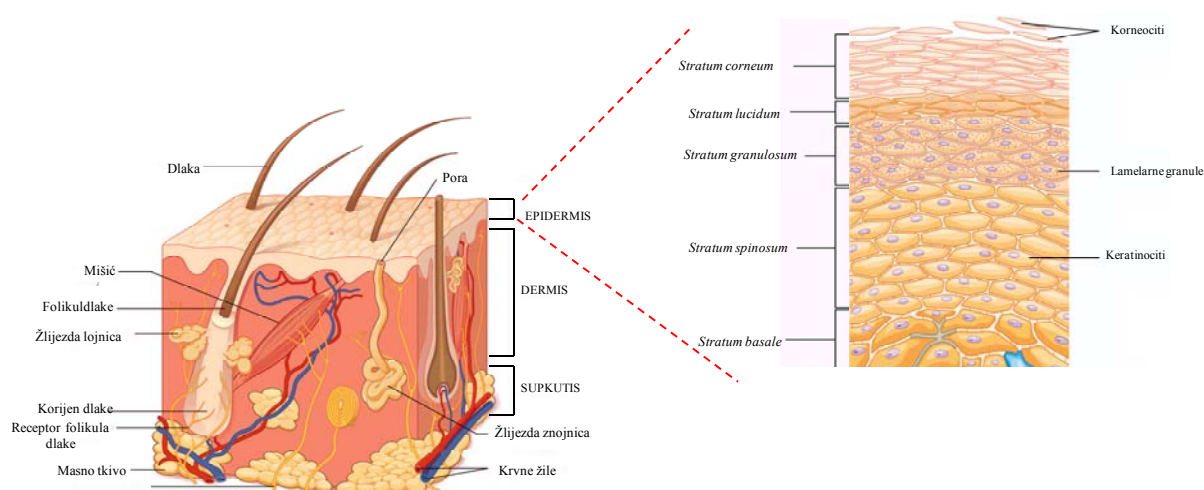
Ovaj rad dio je šireg multidisciplinarnog istraživanja uloge kožne barijere u razvoju lokalne i sistemske toksičnosti. Cilj ovog rada bio je razviti pouzdane i selektivne LC-UV i LC-MS metode za određivanje biokemijskih indikatora za procjenu funkcije kožne barijere, slobodnih masnih kiselina, slobodnih aminokiselina i ceramida u rožnom sloju izuzetom adhezivnim vrpčama. Prva faza rada bila je usmjerena na razvoj i validaciju LC-UV metode za određivanje sastava slobodnih aminokiselina i njihovih derivata u različitim slojevima rožnatog sloja kože i međustaničnoj tekućini (engl. *interstitial fluid*, ISF). U tu svrhu ispitala

se prikladnost dviju adhezivnih vrpce za izuzimanje uzoraka koje se često koriste u kliničkim ispitivanjima, prikladnost dviju metoda za određivanje ukupnih proteina kao normalizacijskog faktora količine izuzetog materijala, ekstrakcijskih otapala, uvjeti separacije te sastav mobilne faze. Za određivanje lipidnih klasa, slobodnih masnih kiselina i ceramida optimirali su se ekstrakcijski postupci, kromatografski uvjeti i detekcija. S obzirom na kompleksnost matrice kao što je rožnati sloj kože ispitani su alternativni pristupi određivanju slobodnih masnih kiselina uključujući derivatizaciju, kvantifikaciju zamjenskim analitom („surogat“ analitom) te procjenu količine slobodnih masnih kiselina oslobođenih iz adhezivne vrpce. Osim masnih kiselina, ispitana je i druga skupina lipida, ceramidi koji su ekstrakcijskim postupcima izolirani iz humanog epidermisa. Primjenom LC-ESI-MS tehnike okarakterizirani su ceramidi III, IIIB i VI.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Građa i funkcija kožne barijere

Koža je najveći ljudski organ čija je primarna funkcija zaštita organizma od vanjskih utjecaja, sprječavanje ulaska patogenih organizama i alergena u organizam, regulacija tjelesne temperature te izmjena tvari i vode između organizma i okoliša. Kompleksna funkcija kože rezultat je njezine jedinstvene strukture organizirane u nekoliko morfološki različitih slojeva: supkutisa (potkožno masno tkivo), dermisa (korij) i epidermisa (površinski sloj). Supkutis, koji se sastoji od potkožnog masnog tkiva i veziva, povezuje kožu s mišićima i kostima, a dermis čini vezivno tkivo koje sadrži kapilare, živce i osjetilna tjelešca za osjet topline i dodira te koži daje čvrstoću i elastičnost. Epidermis, vanjski sloj kože, predstavlja biokemijsku, fizikalnu i imunološku barijeru između organizma i okoliša (Slika 1.).



Slika 1. Građa kože i slojevita struktura epidermisa¹⁰

Približno 90 % epidermisa čine keratinociti čija proliferacija započinje u najdubljem, bazalnom sloju (*stratum basale*) epidermisa. Tijekom migracije keratinocita prema vanjskim slojevima epidermisa dolazi do njihove diferencijacije uslijed koje prolaze kroz niz morfoloških i biokemijskih procesa. U površinskom spinoznom sloju unutar keratinocita nastaju male organele, poznate kao lamelarne granule koje sadrže prekursore lipida (uglavnom fosfolipidi, glikolipidi i kolesterol) i hidrolitičke enzime.¹¹ U zadnjem stadiju diferencijacije na granici između granularnog (*stratum granulosum*) i rožnatog sloja (*stratum corneum*) protein filagrin veže agregirane filamente keratina pri čemu dolazi do razgradnje komponenata stanica kao što su jezgra i organele, te nastaju spljoštene i izdužene stanice, korneociti.¹² Tijekom egzocitoze dolazi do izbacivanja granularnog sadržaja u međustanični

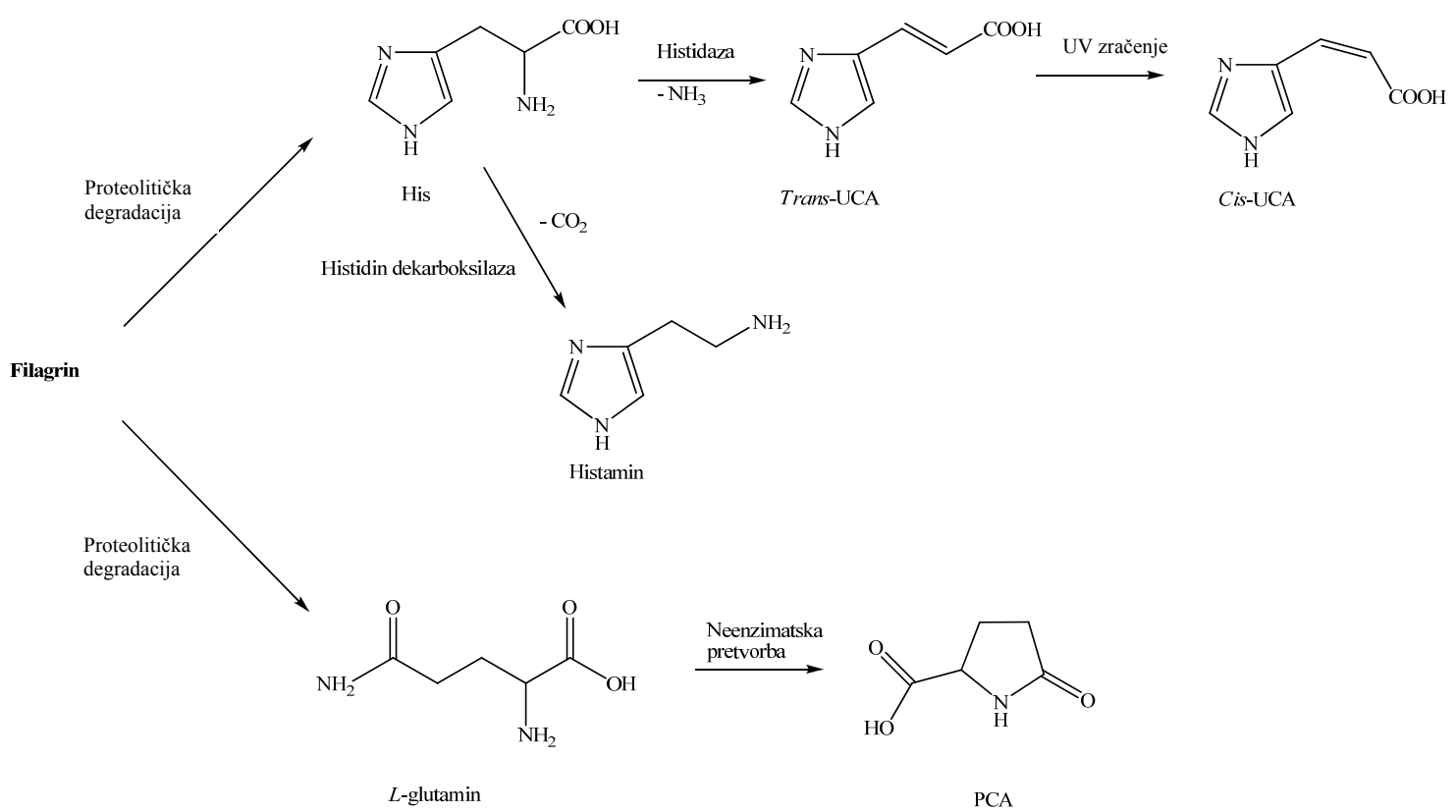
prostor, a enzimatskim djelovanjem nastaju lipidne klase (smjese ceramida, slobodnih masnih kiselina i kolesterola) koje formiraju lamelarne slojeve koji okružuju korneocite.¹² Unutrašnjost korneocita, ispunjena keratinskim filamentima, okružena je slojem visoko umreženih strukturnih proteina koji doprinose njihovoj fleksibilnosti i mehaničkoj otpornosti. Na proteine su kovalentno vezani ω -hidroksiceramidi koji sadrže izrazito duge lance masnih kiselina ($> C30$) te zajedno čine tzv. “cornified cell envelope”.¹³ Kako korneociti migriraju prema površinskim slojevima rožnatog sloja dolazi do razgradnje korneodezmosoma, skupine proteina koji povezuju korneocite, smanjuje se kohezija rožnatog sloja što rezultira deskvamacijom, odnosno gubitkom površinskog sloja korneocita i zamjene s novim slojem.

Rožnati sloj kože predstavlja primarnu fizikalno-kemijsku barijeru od štetnih utjecaja iz okoline i gubitka vode. Jedinstvena morfologija rožnatog sloja opisana je široko prihvaćenim “brick and mortar” modelom, prema kojem se rožnati sloj kože sastoji od korneocita (“bricks”) ugrađenih u lipidni (“mortar”) sloj.¹ Adekvatni sastav i struktura korneocita i lipida rožnatog sloja kože neophodni su za njegovu normalnu funkciju. Korneociti, spljoštene mrtve stanice, ispunjene su keratinom, vodom i prirodnim čimbenicima zadržavanja vlage (engl. *natural moisturizing factors*, NMF) koji su ključni čimbenici u zadržavanju vode i održavanju hidratacije kože.¹⁴⁻¹⁶ Regulacijom sadržaja vode u rožnatom sloju NMF utječe na regulaciju aktivnosti enzima koji su ključni za homeostazu kožne barijere. Aminokiseline i njihovi derivati koji doprinose više od 50 % ukupnom sadržaju NMF-a (kompleksnoj smjesi higroskopnih spojeva kao što su aminokiseline, šećeri, soli i ioni) nastaju najvećim dijelom proteolitičkom razgradnjom proteina filagrina, strukturnog proteina bogatog histidinom i glutaminom, koji je odgovoran za stabilnost i integritet kože te ima ključnu ulogu u očuvanju epidermalne barijere (Tablica 1.).^{14,17-19}

Tablica 1. Kemijski sastav komponenata NMF-a rožnatog sloja kože¹⁴

Sastojak	Sastav (%)
Slobodne aminokiseline	40
PCA	12
Laktati	12
Šećeri	8,5
Urea	7
Kloridi	6
Natrij	5
Kalij	4
Kalcij	1,5
Magnezij	1,5
Fosfati	0,5
Citrati i formijati	0,5
Amonijak, mokraćna kiselina, glukozamin i kreatinin	1,5

Piroglutaminska kiselina (PCA) predstavlja jednu od glavnih komponenata NMF-a (pridonosi oko 12 % ukupnoj količini NMF-a) i nastaje neenzimatskom deaminacijom glutamina (Slika 2.), ima veliki kapacitet vezanja atmosfere vode i često se uzima kao prediktor ukupnog sadržaja NMF-a u rožnom sloju kože.^{17,20} Za razliku od PCA, enzimatskom deaminacijom histidina nastaje polifunkcionalni metabolit, *trans*-urokanska kiselina (*trans*-UCA) čija je fiziološka uloga zaštita od ultraljubičastog zračenja čijom apsorpcijom prelazi u strukturni izomer *cis*-urokansku kiselinu (*cis*-UCA) koja ima imunoregulatornu ulogu u koži (Slika 2.).²¹⁻²² Pretpostavlja se da UCA također utječe na održavanje kisele sredine u rožnom sloju, međutim nedavna studija u miševima s reduciranim razinama filagrina i enzima histidaze dovodi u pitanje gornju pretpostavku s obzirom na činjenicu da snižena razina UCA nije utjecala na promjenu vrijednosti pH.²³ Važnost pH vrijednosti kože očituje se kroz regulaciju aktivnosti enzima (sinteza lipida, proteolitička degradacija filagrina, deskvamacija) čime izravno utječe na biokemijski sastav i morfologiju rožnog sloja kože.²⁴



Slika 2. Razgradnja filagrina i nastanak komponenata NMF-a

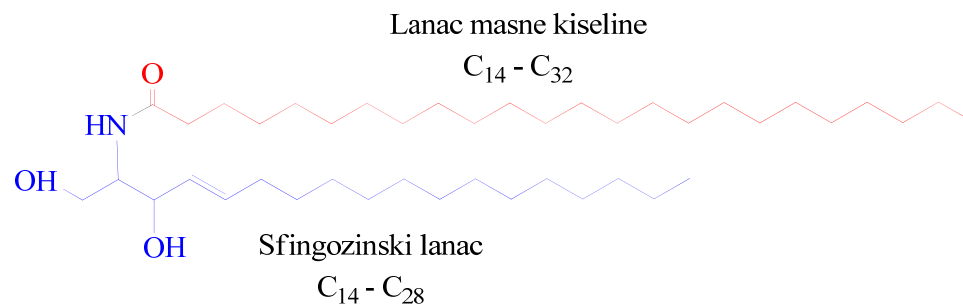
Nedavna otkrića, ukazuju na činjenicu da i druge komponente imaju važnu ulogu u pravilnom funkcioniranju kožne barijere te je primjećeno da razina tirozina ima visoku prediktivnu vrijednost za određivanje genotipa na visokopolimorfnom genu za filagrin pri čemu su mutacije na genu za filagrin (*FLG*) glavni faktori rizika za razvoj atopijskog dermatitisa (AD).²⁵⁻²⁶

Međustanični prostor rožnatog sloja kože čine lipidi nastali izbacivanjem lamelarnih tijela iz diferencirajućih stanica keratinocita. Lipidi predstavljaju glavnu barijeru za gubitak vode i elektrolita iz organizma, difuziju tvari kroz kožu, ali i barijeru od UV zračenja. Iako spojevi imaju tri potencijalna puta za difuziju kroz rožnati sloj (kroz stanicu, između stanica kroz međustanični lipidni sloj ili kroz prostore koji se nalaze uz žlijezde lojnice i znojnice te folikule dlaka) široko je prihvaćena teza da difuzija kroz lipidni sloj ("outside-inside" barijera) predstavlja glavni put ulaska spojeva u organizam.²⁷ Regije ispunjene lipidima jedine su neprekinute strukture unutar rožnatog sloja zbog čega se smatraju izrazito važnima za normalnu funkciju kožne barijere.²⁸ Slobodne masne kiseline, ceramidi i kolesterol dominantne su klase lipida prisutne u rožnom sloju i nalaze se u približno ekvimolarnim odnosima.²⁸⁻²⁹

U rožnom sloju kože nalaze se slobodne masne kiseline čija duljina lanca varira od 16 do 36 ugljikovih atoma.²⁹⁻³⁰ Zasićene slobodne masne kiseline s duljinom lanca od 24 do 26 ugljikovih atoma dominantna su klasa masnih kiselina, iako su i mononezasićene slobodne masne kiseline te u nešto manjem opsegu i polinezasićene masne kiseline također prisutne u rožnom sloju.²⁹⁻³¹ Od nezasićenih masnih kiselina u koži najbrojnije su one s duljinom lanca od 16 i 18 ugljikovih atoma, dok su od hidroksi masnih kiselina najbrojnije one s duljinom lanca od 18 i 24 ugljikovih atoma.^{32,29,33}

Ceramidi, strukturno još heterogenija klasa lipida pripadaju skupini sfingolipida i sastoje se od dugolančanih sfingoidnih baza (sfingozin (S), dihidrosfingozin (dS), 6-hidroksisfingozin (H) ili fitosfingozin (P)) vezanih preko amidne veze na dugolančane masne kiseline (masne kiseline bez hidroksilne skupine (N), α -hidroksi masne kiseline (A) ili esterificirane ω -hidroksi masne kiseline (EO)). Strukturne varijacije masnih kiselina i sfingoidnih baza rezultiraju velikim brojem podklasa ceramida koje su prisutne u slobodnoj formi ili su vezane na proteine korneocita (Slika 3.).³⁴ Zasada je poznato 12 klasa ceramida u rožnom sloju, u kojima svaka klasa obuhvaća više desetaka pojedinih ceramida.³⁴⁻³⁶

Heterogenosti ceramida ne pridonose samo varijacije s obzirom na sfingoidne baze i masne kiseline, već i varijacije u duljini lanca kako masne kiseline tako i sfingoidne baze.³⁷⁻³⁸



Lanac masne kiseline Lanac sfingoidne baze	[N]	[A]	[EO]
[dS]	[NdS]	[AdS]	[EOdS]
[S]	[NS]	[AS]	[EOS]
[P]	[NP]	[AP]	[EOP]
[H]	[NH]	[AH]	[EOH]

Slika 3. 12 klasa ceramida (crveno - masna kiselina, plavo - sfingoidna baza, zeleno - ω -hidroksi masna kiselina)^{39,40}

Usporedbom duljine lanaca slobodnih masnih kiselina i masnih kiselina koje su sastavni dio ceramida pokazano je da postoji značajna korelacija između ove dvije veličine (korelacijski koeficijent 0,6).³² Visoke razine kratkolančanih masnih kiselina (< C23) pratile su povećane razine kratkolančanih ceramida (< C42), dok su povećane razine masnih kiselina lanaca većih od C23 korelirale s ceramidima lanaca većih od C42. Mogući zajednički metabolički put nastanka slobodnih masnih kiselina i ceramida mogao bi objasniti ove korelacije, stoga je jasno da osim slobodnih masnih kiselina, druga klasa lipida rožnatog sloja, ceramidi, imaju utjecaj na funkciju kože.⁴¹⁻⁴²

Do sada provedena istraživanja ukazuju da *FLG* mutacije, kao uzrok smanjene razine NMF-a, i promjene u sastavu lipida mogu imati ključnu ulogu kod oštećene kožne barijere.⁴³⁻⁴⁶ Osim genetskih varijacija, razina NMF-a može biti smanjena zbog štetnog utjecaja iz okoline kao npr. izloženost iritacijskim tvarima, UV zračenju ili smanjenoj vlažnosti zraka.

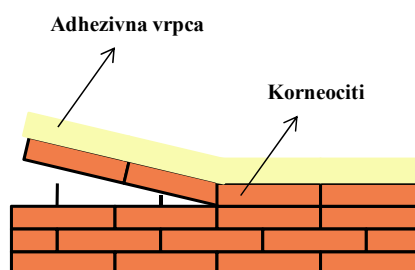
Oštećenje rožnatog sloja kože može voditi k povećanom gubitku vode (engl. *trans-epidermal water loss*, TEWL) odnosno dehidraciji, povećanju propusnosti barijere što za posljedicu ima veću apsorpciju ksenobiotika te većoj podložnosti infekcijama i iritacijama. Oštećenja izazivaju kemijske i biokemijske promjene kože pri čemu dolazi do promjene u sastavu i organizaciji lipida, aminokiselina, proteina i antioksidansa. Zbog široke uporabe u svakodnevnicima i svojih iritacijskih svojstava površinski aktivne tvari predmet su mnogih studija.⁴⁷⁻⁴⁹ Površinski aktivne tvari ili surfaktanti su amfipatske molekule koje se često koriste kao sastavni dio emulzija, sredstava za čišćenje, ovlaživača, sredstava za pjenjenje itd. Najčešće se kao model u iritacijskim studijama koristi anionski surfaktant natrijev lauril-sulfat (engl. *sodium lauryl sulfate*, SLS)^{47,50} koji se veže za proteine rožnatog sloja kože i dovodi do njihove denaturacije, uzrokuje promjene lipidnog sloja, smanjuje razinu NMF-a u koži i sposobnost zadržavanja vode.⁵¹

Osim iritacijskim reagensima, koža je svakodnevno izložena utjecaju sunčevog zračenja. Kromofori u epidermisu koji absorbiraju UV zračenje su *trans*-UCA, DNK, triptofan i membrane lipida epidermalnih stanica. Kako je već navedeno, *trans*-UCA apsorpcijom UV zračenja prelazi u *cis*-UCA za koju se smatra da posjeduje imunosupresijska svojstva iako mehanizam i način djelovanja nisu u potpunosti poznati. Studija na miševima je

pokazala da histidinemični miševi koji su imali smanjenu količinu *trans*-UCA imaju manju sposobnost apsorpcije UVB zračenja.⁵²

2.2. Analitičke metode za određivanje NMF-a i lipida u koži

Tijekom godina razvio se niz analitičkih metoda za određivanje komponenata NMF-a u koži gdje su najzastupljenije LC metode uz detekciju u UV-Vis području, a tek nedavno počela je primjena LC-MS/MS tehnike. S obzirom da se s vremenom prelazilo na neinvazivne metode uzorkovanja rožnatog sloja kože (npr. adhezivnim vrpcom, Slika 4.) razvitak metoda usmjeren je k analizi manje količine materijala i kraćem vremenu analize. Količina materijala uzorkovana adhezivnom vrpcom rezultat je više faktora kao što su vrsta adhezivne vrpce, hidratacija i kohezija kože.⁵³⁻⁵⁵ S obzirom da je razina analita određena iz adhezivne vrpce ovisna o masi izuzetog materijala potrebno je kvantificirati količinu rožnatog sloja uzetog pojedinom adhezivnom vrpcom.



Slika 4. Prikaz izuzimanja rožnatog sloja kože adhezivnom vrpcom

Količina materijala rožnatog sloja kože izuzetog adhezivnom vrpcom, među ostalima, najčešće se određuje spektrofotometrijski⁵⁶ određivanjem ukupnih proteina nakon ekstrakcije s adhezivne vrpce pogodnim otapalom ili određivanjem optičke gustoće uzorka mjerenjem apsorpcije u infracrvenom području pri valnoj duljini od 850 nm optičkim denzitometrom (D-Squame Scan 850A, Heiland electronic, Wetzlar, Germany).⁵⁷ Metoda za određivanje količine materijala optičkom denzitometrijom je validirana, a za razliku od standardne spektrofotometrijske metode određivanja ukupnih proteina, primjena uređaja je brza i jednostavna.⁵⁷⁻⁵⁸

2.2.1. Analitičke metode za određivanje komponenata NMF-a u koži

Metode opisane u literaturi za određivanje komponenata NMF-a najčešće obuhvaćaju primjenu tekućinske kromatografije, dok su plinska kromatografija i spektrometrija masa rjeđe zastupljene. Veliko zanimanje izaziva primjena Ramanove spektroskopije pri analizi NMF-a iako je zbog nedostupnosti tehnike njezina upotreba još uvijek iznimno ograničena.

Komponente NMF-a najčešće obuhvaćene analizom tekućinskom kromatografijom obrnutih faza su His, *trans*- i *cis*-UCA te rjeđe PCA koje se u većini publikacija izravno detektiraju UV detektorima bez prethodne derivatizacije. S obzirom na njihova kemijsko-fizikalna svojstva, His i PCA najčešće se određuju na približno 205 – 210 nm, a *trans*- i *cis*-UCA na približno 267 nm.⁵⁹⁻⁶³ Prednost ovog načina detekcije je izravna analiza bez derivatizacije analita čime se skraćuje vrijeme pripreme uzorka.

Osim izravnog određivanja komponenata NMF-a uz pomoć UV detektora, razvijeno je nekoliko kromatografskih metoda koje zahtijevaju prethodnu derivatizaciju analita. Tateda i sur.⁶⁴ nakon kromatografskog razdvajanja *cis*-UCA, *trans*-UCA, fenilalanina i triptofana i njihove detekcije pri 267 nm postkolumnski su derivatizirali ekstrakt rožnatog sloja kože *orto*-ftalaldehidom. Analiti koji su nakon derivatizacije pokazali signale su His i glutation te su fluorimetrijski detektirani pri 365 nm / 435 nm. U drugoj metodi, preko 20 aminokiselina ekstrahirano je destiliranom vodom iz ostruganog rožnatog sloja kože te derivatizirano dabsil-kloridom.⁶⁵ Aminokiseline su određene prilagođenom analitičkom metodom koju su razvili Lin i Chang⁶⁶ koja se temeljila na tekućinskoj kromatografiji obrnutih faza uz detekciju pri 436 nm. Iako je primjenom derivatizacije omogućena analiza niza aminokiselina u odnosu na LC-UV metode, vrijeme potrebno za derivatizaciju kao i duga retencijska vremena analita ograničavaju upotrebu ove metode. S druge strane, derivatizacija omogućava bolju osjetljivost za UCA, te su granice detekcije za *cis*-UCA i *trans*-UCA pri UV detekciji iznosile su približno 280 ng mL⁻¹ i 480 ng mL⁻¹,⁶⁴ dok su određene nakon derivatizacije sa dabsil-kloridom iznosile oko 14 ng mL⁻¹.⁶⁷

Osim uz tekućinsku kromatografiju, PCA i UCA je nakon derivatizacije sa *O*-metilhidroksilaminom i *N*-acetil-*N*-(trimetilsilil)-trifluoracetamidom moguće analizirati primjenom plinske kromatografije uz detektor koji mjeri vrijeme leta (engl. *gas chromatography- time of flight mass spectrometry*, GC-TOF-MS).⁶⁸ Metoda je prilagođena od Heazell i sur.⁶⁹⁻⁷⁰ te su

rezultati pokazali da sastav aminokiselina u rožnatom sloju kože utječe na njihov sastav u znoju i da ključnu ulogu u tome ima hidroliza filagrina.

Upotreba spektrometrije masa pri analizi komponenata NMF-a je oskudna te druga publikacija u kojoj je opisana njezina upotreba primjenjuje LC-ESI-MS metodu za određivanje PCA, *cis*-UCA i *trans*-UCA u pozitivnom načinu snimanja u kojem su analiti pokazivali protonirani molekulski ion $[M+H]^+$. Analiti su praćeni višestrukim tranzicijskim reakcijama, a kao interni standard upotrijebljen je izotopno obilježen *L*-prolin (*L*-prolin- $^{13}\text{C}_5^{15}\text{N}$).⁷¹ Analiti su eluirali unutar 5 minuta, a donja granica detekcije (engl. *lower limit of detection*, LLOD) iznosila je 0,1 – 0,2 ng mL⁻¹.

Osim kromatografskim metodama, His, *cis*-UCA i *trans*-UCA određeni su još kapilarnom elektroforezom detekcijom na 214 nm poradi određivanja bioloških markera izloženosti UV zračenju.⁶² Granica detekcije iznosila je 13,9 ng mL⁻¹ te je nađena značajna korelacija rezultata za His i *cis*-UCA s prijašnjom LC metodom⁶³, dok je slaganje za *trans*-UCA bilo slabije.

U novije vrijeme opisana je upotreba Ramanove spektroskopije koja se pokazala kao pouzdana metoda za *in vivo* određivanje vode i komponenata NMF-a u rožnatom sloju kože.⁷²⁻⁷⁵ Komponente NMF-a određuju se semi-kvantitativno u odnosu prema koncentracijama keratina (2910 – 2960 cm⁻¹). Pri kvantifikaciji obuhvaćeni su signali više aminokiselina kao što su PCA, UCA, alanin, citrulin, arginin, histidin, ornitin, glicin, fenilalanin te urea i laktat. No međutim, s obzirom na zastupljenost u NMF-u, PCA i UCA su ipak najčešće određivane komponente Ramanovom spektroskopijom. Iako Ramanova spektroskopija predstavlja brzu i neinvazivnu tehniku, kompleksnost i cijena potrebne opreme njezinu upotrebu često čine nedostupnom. Ramanovom spektroskopijom pokazano je da nosioci *FLG* mutacija imaju značajno snižene vrijednosti NMF-a što je u skladu s rezultatima dobivenim drugim metodama.⁴⁶ Osim toga, pokazano je da nosioci *FLG* mutacija imaju više vrijednosti tirozina u rožnatom sloju kože u odnosu na nenosiocce.²⁵ Mogućnost Ramanove spektroskopije da mjeri komponente NMF-a pri različitim dubinama rožnatog sloja kože upotrijebili su Teixeira i sur. te pokazali smanjenje količine komponenata NMF-a u dubljim slojevima rožnatog sloja kože.⁷⁶ Egawa i sur.⁷⁷ pokazali su Ramanovom spektroskopijom da nakon primjene UV zračenja dolazi do smanjenja *trans*- i povećanja *cis*-UCA u rožnatom

sloju kože što je u skladu s podacima dobivenim drugim metodama kao i rezultatima dobivenim u ovoj disertaciji primjenom tekućinske kromatografije (P.3.2.10.).

Ključni korak u analizi komponenata NMF-a je ekstrakcija koja se najčešće provodi jakim bazama kao što su natrijeva i kalijeva lužina koncentracije 0,1 ili 1 mol L⁻¹ nakon čega je prije kromatografske analize uzorke potrebno neutralizirati klorovodičnom⁶⁴, perkloratnom⁵⁹ ili fosfornom⁷⁸ kiselinom. Osim alkalne ekstrakcije moguća je ekstrakcija klorovodičnom⁷⁹ fosfornom⁷¹ ili perkloratnom kiselinom nakon čega slijedi neutralizacija uz boratni pufer⁸⁰ ili kalijev hidroksid.⁶¹ Glavni nedostatak ekstrakcije uz jaku kiselinu ili bazu je nastanak visokih koncentracija soli pri neutralizaciji prije kromatografske analize što uzrokuje fluktuacije bazne linije koje ometaju integraciju kromatografskih pikova. Osim toga, visoke koncentracije soli skraćuju vijek trajanja kolone, produljuju retencijska vremena i uzrokuju završno razvlačenje pikova ("peak tailing") te je ovaj način obrade uzorka nepogodan ukoliko se za analizu žele koristiti LC-MS sustavi.

Komponente NMF-a su polarni spojevi zbog čega analizom na klasičnim kolonama za kromatografiju obrnutim fazama (C18) često ne dolazi do zadovoljavajućeg međusobnog razdvajanja. Stoga se najčešće kao aditiv mobilnoj fazi dodaju anionski ili kationski reagensi za kromatografiju ionskih parova ("ion pairing" reagensi) koji omogućavaju veći afinitet analita za stacionarnu fazu kolone i time njihovo dulje zadržavanje. Najčešće korišten anionski "ion pairing" reagens je natrijev oktansulfonat^{63-64,78-79,81-82} pri čemu se koriste kisele mobilne faze dok su se uz upotrebu tetrabutilamonijeva hidroksida⁵⁹ i tetrabutilamonijevog sulfata⁸³ koristile bazične mobilne faze. Glavni nedostatak upotrebe "ion pairing" reagensa u mobilnim fazama je dugotrajno vrijeme potrebno za kondicioniranje kolona te nemogućnost njegovog potpunog uklanjanja iz kolone nakon upotrebe. U literaturno opisanim metodama komponente NMF-a najčešće su se razdvajale mobilnim fazama s većinskim udjelom vode i dodatkom modifikatora CH₃CN ili izopropanola^{63,78,84,85,86,82} no međutim opisana je i metoda za razdvajanje *trans*- i *cis*-UCA na kiralnoj koloni upotrebom mobilne faze sastava fosfatni pufer:CH₃CN (15:85 v/v) koja se pokazala robusna pri nizu ispitivanih temperatura (20 – 35 °C).⁶⁰

Dosadašnje metode razvijene za određivanje komponenata NMF-a u rožnom sloju kože većinom su analizirale His, *trans*- i *cis*-UCA, dok ih je nekoliko opisalo određivanje PCA.^{59,68} Međutim, nijedna metoda nije obuhvaćala His, PCA, *trans*- i *cis*-UCA te Tyr čija bi kvantifikacija u jednoj analizi mogla doprinijeti boljem razumijevanju metaboličkih procesa s obzirom da se povezuju s različitim ulogama u rožnom sloju kože. Osim toga, prethodne metode većinom obuhvaćaju korak neutralizacije nakon ekstrakcije što smanjuje kromatografsku učinkovitost i produljuje vrijeme analize.

2.2.2. Određivanje masnih kiselina i ceramida

Promjene sastava lipida utječu na sposobnost izvršavanja obrambene funkcije kože, stoga je očita potreba za njihovim kvantitativnim određivanjem u koži. Na rezultat analize lipida utječe nekoliko faktora kao što su izbor analitičke tehnike, ekstrakcijskog otapala i način uzorkovanja.⁸ Analiza masnih kiselina moguća je upotrebom kromatografije obrnutih ili normalnih faza pri čemu se često upotrebljavaju spregnuti LC-MS sustavi. Upotrebom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti može se povećati osjetljivost metode s obzirom da se upotrebljavaju čestice stacionarne faze manje od 2 µm čime se poboljšava rezolucija i osjetljivost.⁸⁷⁻⁸⁹

Ionizacija nederivatiziranih masnih kiselina u analitičkim metodama opisana je upotrebom ionske stupice,⁹⁰ "TurboIon spray" ionizacije⁹¹ i ionizacije pri atmosferskom tlaku (engl. *atmospheric pressure chemical ionization*, APCI)^{7,92} iako je uslijed svoje dostupnosti puno češće upotrebljavana ionizacija elektroraspršenjem (engl. *electrospray ionization*, ESI).^{87,89,93-95} Prednost ESI je blaga (tzv. "soft") ionizacija pri čemu se u spektrima najčešće opaža molekulski ion analita te najbolja svojstva pokazuje na analitima koji imaju lako ionizabilne kisele ili bazične funkcionalne skupine.⁹⁶ Upotrebom ionizacijskog izvora Jetstream ESI⁹⁷ postiže se veća efikasnost ionizacije i poboljšanje osjetljivosti u odnosu na klasični ESI. S obzirom na kemijska svojstva masne kiseline se uz ESI mogu određivati u negativnom ili nakon derivatizacije u pozitivnom načinu snimanja, a izbor polariteta ovisi o mogućnostima instrumenta i zahtjevima analize.

U negativnom načinu snimanja nederivatizirane masne kiseline često se određuju kao [M-H]⁻ kemijske vrste u kojima je došlo do deprotoniranja karboksilne skupine. Ovim načinom, masne kiseline mogu se odrediti u pikomolarnim koncentracijama, a ESI-MS/MS tehnikom moguće je dobiti strukturne informacije o duljini lanca i nezasićenosti masnih

kiselina.⁹³ Često je nemoguće u potpunosti izolirati masne kiseline od ostalih komponenata prisutnih u uzorku. Supresija ionizacije analita uslijed koeluirajućih komponenata sustava i aditiva mobilnih faza može dovesti do nezadovoljavajućih rezultata analize i nedovoljne osjetljivosti.⁹⁸ Osjetljivost nederivatiziranih masnih kiselina može se poboljšati postkolumnskim dodavanjem kloroforma (pri čemu nastaju adukti s kloridnim ionima) i određivanjem u negativnom^{7,99,100} ili dodatkom barijevih kationa i određivanjem u pozitivnom⁸⁸ načinu snimanja. Drugi mogući način povećanja osjetljivosti je modifikacijom kemijskih svojstava masnih kiselina njihovom derivatizacijom bazičnim funkcionalnim skupinama ili skupinama koje već nose naboj (npr. kvaterni amini) pri čemu se derivati uz ESI-MS određuju u pozitivnom načinu snimanja. Najčešće se derivatiziraju tercijarnim i kvaternim aminima u obliku derivata pirolidona, estera pikolina, benzofurana, piridina, kolina i dr.¹⁰¹⁻¹⁰⁵

Yang i sur. opisali su pripravu derivata masnih kiselina upotrebom sintetiziranih 2-brom-1-*N*-metilpiridinij jodid reagensa (BMP) i 3-hidroksimetil-*N*-metilpiridinij jodid reagensa (CMP) pri čemu su nastali odgovarajući 3-aciloksimetil-*N*-metilpiridinij jodid derivati (NMP) (Shema 4.).¹⁰⁵ Ova metoda derivatizacije upotrijebljena je za kromatografsku analizu masnih kiselina iz seruma upotrebom ESI-MS tehnike u pozitivnom načinu snimanja. Prednost ovog načina derivatizacije je mogućnost lake pripreve deuteriranih analoga derivatizacijskih reagensa (BMP-*d3* i CMP-*d3*) čijom upotrebom nastaju izotopno obilježeni derivati masnih kiselina, 3-aciloksimetil-*N*-trideuterometilpiridinij jodid (NMP-*d3*), koji su služili kao interni standardi pri kvantifikaciji. S obzirom na blagu ionizaciju uz ESI-MS praćene su tranzicije iz molekulskog iona u ione nastale njegovom fragmentacijom (u daljnjem tekstu: produkt ioni) nakon *O*-alkilnog odnosno *O*-acilnog cijepanja derivata masne kiseline (Shema 4., Tablica 10.). U publikaciji je još pokazano da se derivatizacijom osjetljivost povećala približno 2500 puta u odnosu na nederivatizirane masne kiseline, pri čemu su poboljšani signali derivata masnih kiselina srednje dugih, dugih i vrlo dugih lanaca (C10 do C24).

Napredak u analizi pojedinih masnih kiselina rožnatog sloja kože tek se nedavno očitovao identifikacijom i kvantifikacijom niza masnih kiselina od C14 – C36 primjenom NP-LC-APCI-MS.⁷ Primjenom ove metode dovedene su u vezu slobodne masne kiseline i ceramidi rožnatog sloja kože te je pokazano da u koži oštećenoj uslijed AD-a dolazi do promjene njihovog sastava.^{32,106}

Velik broj ceramidnih klasa iz ljudske kože otkriven je upotrebom tankoslojne kromatografije (HPTLC),¹⁰⁷⁻¹¹⁰ koja se zbog dostupnosti i jednostavne primjene još uvijek upotrebljava u njihovoj analizi.^{45,111-113} Upotrebom HPTLC tehnike otkriveno je 9 klasa ceramida dok su kasnije otkrivene još 3 klase LC-MS tehnikom. Prednosti LC-MS tehnike zbog kojih je moguće dobiti informacije o strukturi i sastavu ceramida unutar pojedine klase postaju sve više metoda izbora pri analizi ceramida.^{34,38,97,114-120}

Ceramide je moguće analizirati upotrebom normalnih ili obrnutih faza primjenom ESI^{97,121} ili APCI^{115,34} ionizacijskog izvora. Iako je ESI najčešće upotrebljavan u analizi ceramida, upotrebom nepolarne organske mobilne faze uz APCI potpomaže ionizaciju i dovodi do manje supresije iona. Osim toga, moguća je upotreba većih protoka mobilne faze čime se skraćuje vrijeme analize.^{38,122-123} Ceramide je moguće detektirati i analizirati u pozitivnom i negativnom načinu rada.^{34,37,124-126} Upotrebom tandemne spektrometrije masa okarakterizirane su građevne jedinice ceramida, derivati sfingozinske baze i masne kiseline.^{119,127}

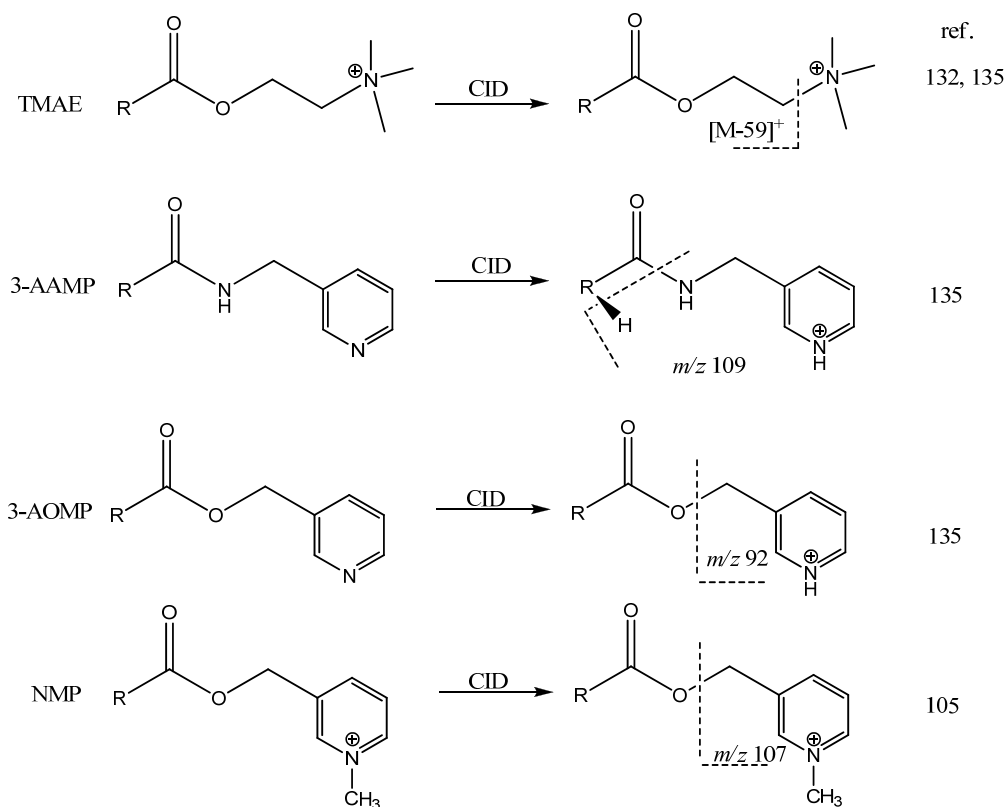
2.2.3. Višestruke tranzicijske reakcije pri analizi masnih kiselina i ceramida

Primjenom ESI, jednog od najčešćih načina ionizacije u vezanim sustavima LC-MS, analite je moguće određivati u pozitivnom i negativnom načinu snimanja. Najbolja detekcija postiže se kada se analiti nalaze u obliku iona u otopini ili kada dolazi do njihove “lake ionizacije” kiselinско-baznim reakcijama.¹²⁸ Blagom ionizacijom uz ESI analit može biti ioniziran reakcijom prijenosa protona pri čemu ako je analit dovoljno bazičan dolazi do primanja protona $M+H^+ \rightarrow [M+H]^+$ i tada se može detektirati u pozitivnom načinu snimanja pri masi $M+1$. Neki od takvih primjera su proteini ili peptidi koji sadržavaju amino skupine koji su dobri proton akceptor ($R-NH_2+H^+ \rightarrow R-NH_3^+$) te nakon ionizacije postaju nosioci pozitivnog naboja u molekuli. S druge strane, ukoliko analit posjeduje dovoljno kiselina svojstva dolazi do otpuštanja protona reakcijom $MH \rightarrow M^-+H^+$ i tada se može detektirati u negativnom načinu snimanja kao M^- pri masi $M-1$. Analiti kao što su saharidi ili oligonukleotidi sadržavaju karboksilne ili hidroksilne skupine koje lako gube protone ($R-COOH \rightarrow R-COO^-$; $R-OH \rightarrow R-O^-$) stoga se određuju pri negativnoj ionizaciji. Također, neki analiti već u otopini nose naboj, npr. kvaterni amini R_4N^+ , koji se u tom obliku analiziraju uz ESI-MS u pozitivnom načinu snimanja.

ESI je često u sprezi s analizatorom masa trostrukim kvadrupolom (engl. *triple quadrupole*, QQQ) koji predstavlja moćan alat današnjice pri kvantifikaciji masnih kiselina i ceramida. QQQ sadrži u seriji povezana tri kvadrupola gdje se u prvom kvadrupolu (Q1) filtrira odabrani m/z iona. Nakon Q1 ioni putuju u drugi kvadrupol (Q2) koji ujedno služi i kao kolizijska ćelija te se tamo fragmentiraju. Treći kvadrupol (Q3) filtrira odabrani m/z produkt iona iz Q2 te dobiveni maseni spektar prikazuje intenzitete jednog ili više odabranih produkt iona. Ukoliko se prati jedan produkt ion radi se o jednostrukoj tranzicijskoj reakciji (engl. *single reaction monitoring*, SRM), odnosno u slučaju praćenja više produkt iona o višestrukim tranzicijskim reakcijama (engl. *multiple reactions monitoring*, MRM).

Pri određivanju masnih kiselina QQQ je najčešće u sprezi s ESI ili APCI ionizacijskim izvorom. Fragmentacija nederivatiziranih masnih kiselina pri nižim kolizijskim energijama i detekcija u negativnom načinu snimanja uz ESI najčešće dovodi do nastanka produkt iona nakon odcjepljenja molekule CO₂ ili H₂O od karboksilne skupine masne kiseline.^{93,129} Nastali produkt ioni imaju m/z 44 ili 18 amu manji od molekulskog iona, a fragmentacija je često slaba što dovodi do niskih intenziteta signala produkt iona. Također, nespecifična fragmentacija uslijed gubitka CO₂ ili H₂O često nije dovoljno pouzdana za kvantifikaciju, posebice ukoliko se radi s kompleksnim matricama.¹³⁰ Nederivatizirane masne kiseline se uz ESI i APCI još često određuju bez fragmentacije molekulskog iona, praćenjem [M-H]⁻ iona (engl. *single ion monitoring*, SIM) nastalog nakon odcjepljenja vodika s karboksilne skupine.^{7,94,131} S druge strane, derivati masnih kiselina koji sadržavaju bazične funkcionalne skupine i/ili estersku vezu pokazuju jako dobre kemijske karakteristike za praćenje višestrukim tranzicijskim reakcijama pri pozitivnom načinu snimanja. U slučaju kada derivat sadržava kvaterni dušikov atom tada on postaje nosioc pozitivnog naboja prije same ionizacije. U suprotnom, ionizacijom uz ESI većinom dolazi do protoniranja molekulskog iona (najčešće dušika) čime cijela molekula postaje pozitivno nabijena (Shema 1.). Johnson i sur. razvili su brzu i osjetljivu metodu za određivanje masnih kiselina u serumu u obliku trimetil-aminoetil estera (TMAE). Nakon kolizijski inducirane disocijacije (engl. *collision induced dissociation*, CID) tranzicijskim reakcijama pratili su [M-C₃H₉N]⁺ produkt ione nastale odcjepljenjem trimetilamina.¹³²⁻¹³³ Metodu su prilagodili Petinella i sur. za određivanje masnih kiselina kod arteroskleroze.¹³⁴ Li i sur. pripravili su 3-acilaminometil-piridin derivate masnih kiselina (3-AAMP) čije su produkt ione nastale nakon cijepanja amidne veze pratili tranzicijskim reakcijama. Derivati su imali niže granice detekcije u

odnosu na odgovarajuće TMAE. Usporedbom 3-AAMP i 3-aciloksimetil-piridin derivata masnih kiselina (3-AOMP) pokazano je da 3-AOMP za *O*-acilno cijepanje zahtijevaju veće kolizijske energije od odgovarajućih 3-AAMP za cijepanje amidne veze¹³⁵ (Shema 1.).

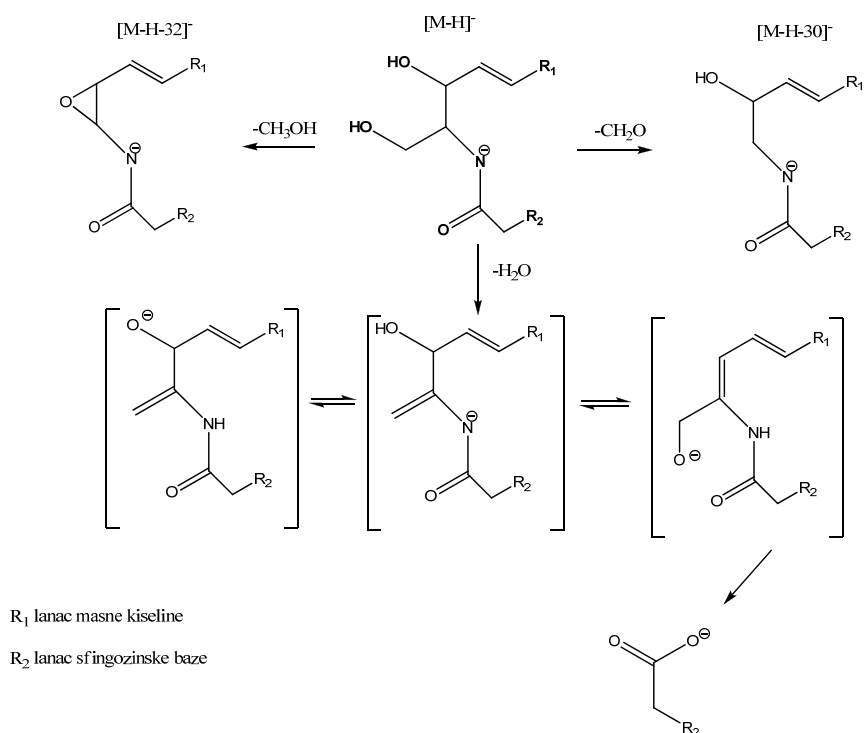


Shema 1. Prikaz nekih primjera derivata masnih kiselina i fragmentacije nakon CID-a

Kemijskom modifikacijom masnih kiselina i njihovim praćenjem u pozitivnom načinu snimanja često se pridonosi povećanju osjetljivost analitičke metode. U okviru ove disertacije masne kiseline su derivatizirane i praćene u pozitivnom načinu snimanja u obliku NMP derivata. Detaljniji opis fragmentacije i način praćenja produkt iona NMP derivata masnih kiselina višestrukim tranzicijskim reakcijama prikazan je u *P.4.4.*

Fragmentacija ceramida uz CID pri pozitivnom načinu snimanja uz ESI ili APCI daje karakteristične fragmente najčešće nakon pucanja amidne veze, odnosno odcjepljenja jedne ili više molekula vode. Produkt ioni koji tada nastaju i prate se višestrukim tranzicijskim reakcijama su $[M+H]^+$, $[M+H-nH_2O]^+$, $[M+H-RCO]^+$ odnosno $[M+H-RCO-nH_2O]^+$ gdje je

R alkilni lanac masne kiseline, a n jedna ili više odcjepljenih molekula vode.^{34,37,136-137} Karakteristične fragmentacije ceramida u pozitivnom načinu snimanja uz ESI-QQQ dobivene u okviru ove disertacije prikazane su i objašnjene u P.4.8. (Slika 32., Slika 33.) te njihova primjena za praćenje višestrukim tranzicijskim reakcijama na Slici 34. U negativnom načinu snimanja pri analizi ceramida uz ESI-MS opaža se $[M-H]^-$ koji odgovara deprotoniranom molekulskom ionu, a najznačajniji fragmenti su $[M-H-H_2O]^-$, $[CH_2CHNHCOR]^+$, $[CHOCH_2NHCOR]^+$ odnosno $[RCOO]^-$ koji odgovara acilnom lancu masne kiseline (Shema 2.).^{119,138} S obzirom na prethodno navedene fragmentacije, jasno je da produkt ioni nastali pri pozitivnom načinu snimanja daju informacije o strukturi derivata sfingozinske baze, dok se pri negativnom načinu snimanja daje uvid u strukturu vezane masne kiseline.



Shema 2. Neki karakteristični fragmenti deprotoniranog ceramida klase $[NH]$ nakon CID-a uz ESI^{119,138}

2.2.4. Utjecaj matrice

Matrice bioloških uzoraka su kompleksne smjese koje mogu sadržavati razne metabolite, proteine i soli koji utječu na ionizaciju samog analita, točnost, selektivnost i reproducibilnost analize.^{139,140} Ekstrakcijom rožnatog sloja kože prema Bligh i Dyer metodi¹⁴¹ osim slobodnih masnih kiselina ekstrakt sadržava ceramide, estere kolesterola, kolesterol-sulfat, alkane, gliceride, glukosfingolipide i dr.¹⁴² Poznato je da koeluirajuće komponente matrice često uzrokuju supresiju signala analita i otežavaju njegovu kvantifikaciju.^{122,139,143-147} Najčešći način kompenzacije varijacija signala je upotrebom internog standarda koji bi trebao imati slična kemijska svojstva kao analit. Najpovoljniji interni standardi su izotopno obilježeni analiti čija su kemijska svojstva slična onima analita, no međutim često se koriste kemijski spojevi strukturno slični analitu.¹⁴⁸⁻¹⁴⁹ U dosadašnjim metodama za određivanje masnih kiselina u koži kao interni standardi opisani su metilni ester C23:0²⁹ i metilni ester C17:0¹⁵⁰ pri analizi plinskom kromatografijom ili deuterirani analozi C18:0 i C24:0⁷ pri analizi s LC-APCI-MS. Prednost spektrometrije masa je mogućnost razlikovanja analita i izotopno obilježenog analita prilikom njihove koelucije, čime se najbolje kompenzira za varijacije signala.

Osim kompleksnog sastava matrice, prisutnost endogenih analita čini analizu još zahtjevnijom.^{144,151-152} Iako se pripravom kalibracijskih krivulja u čistom otapalu izbjegava utjecaj matrice, ovaj način kvantifikacije može dovesti do pogrešnih rezultata. Stoga, razvijeno je nekoliko pristupa u slučaju nedostupnosti matrice bez analita. Načini kojima se tada mogu odrediti analiti su metoda superpozicije¹⁵³⁻¹⁵⁴ te upotrebom zamjenskog ("surogat") analita^{149,152,155-156} ili zamjenske ("surogat") matrice¹⁵⁷⁻¹⁵⁸ čija složenost može varirati ovisno o kompleksnosti autentične matrice.

Nekada se željene matrice mogu pripremiti uklanjanjem interferirajućih endogenih analita, najčešće adsorpcijom na aktivnom ugljenu⁹¹. Nedostatak metode je velika varijabilnost uklonjenih endogenih analita te neselektivnost (uklanjanje drugih komponenata matrice osim analita). Ukoliko nije moguće naći zadovoljavajuću "surogat" matricu analiza se može provesti metodom superpozicije pri čemu se uzorak obogaćuje analitom na nekoliko koncentracijskih nivoa.^{154,159-160} Nedostaci metode su potreba za većom količinom uzorka i konstrukcija kalibracijske krivulje za svaki uzorak zasebno, utjecaj volumena dodanog

standarda za analizu te ekstrapolacija koncentracije analita u negativnom dijelu x-osi čime se utječe na točnost rezultata.

Primjena “surogat” analita u analizi je noviji pristup za kvantifikaciju endogenih komponenata. Među prvim analitičkim metodama koje su koristile “surogat” analit za kvantifikaciju je ona za analizu α -ketoizokaproične kiseline (KIC) u plazmi štakora iz 2003. god.¹⁴⁴ Pristup se razlikuje od onog u kojem se izotopno obilježeni standardi koriste kao interni standardi za kompenzaciju varijabilnosti pripreme uzorka i signal tijekom analize.

Upotrebom “surogat” analita uz upotrebu MS ili MS/MS tehnike endogeni analiti mogu se kvantificirati pripravom kalibracijske krivulje u matrici autentičnog analita. Prednost “surogat” analita je mogućnost pripreme nižih koncentracija u biološkoj matrici od onih endogenog analita čime se omogućavaju niže granice kvantifikacije metode.

“Surogat” analit najčešće je spoj strukturno sličan analitu ili izotopno obilježeni analit koji se dalje koristi pri izradi kalibracijske krivulje i kvantifikaciji autentičnog analita.^{152,156,161-162} Zbog sličnih fizikalno-kemijskih svojstava analita s njihovim izotopno obilježenim analogima često se izotopno obilježeni analiti koriste kao “surogat” analiti. Pri kvantifikaciji “surogat” analitom još se upotrebljava i interni standard koji također može biti spoj strukturno sličan analitu ili neki drugi izotopno obilježeni analog koji nije “surogat” analit. Kvantifikacija se vrši na osnovu omjera signala “surogat” analita i upotrijebljenog internog standarda. Primjenjivost ovog pristupa razvoju analitičkih metoda pokazana je u više publikacija gdje su najčešće kao „surogat“ analiti korišteni ^2H ili ^{13}C izotopno obilježeni analiti,^{149,155,162} dok se ^{15}N i ^{18}O izotopno obilježeni analiti rjeđe koriste.^{148,156} S obzirom da se kvantifikacija vrši strukturno sličnim kemijskim spojem, tijekom razvoja analitičke metode potrebno je ispitati moguće razlike u odgovoru detektora između autentičnog i „surogat“ analita pri jednakim koncentracijama.

Kako je navedeno, Li i sur.¹⁴⁴ su među prvima koristili ovaj pristup pri čemu su KIC kvantificirali pomoću „surogat“ analita, odnosno njegovog deuteriranog analoga, KIC-*d3* te strukturnog analoga ketokaproične kiseline (KC) koji je služio kao interni standard. U drugom slučaju, Jemal i sur.¹⁴⁹ za određivanje mevalonične kiseline (MVA) u plazmi upotrijebili su dva „surogat“ analita MVA-*d3* i MVA-*d4*, dok je MVA-*d7* služila kao interni standard. Kalibracijske krivulje MVA-*d3* i MVA-*d4* pripravljene su u plazmi te je MVA kvantificirana

uz ESI-MS pri negativnom načinu snimanja. Rezultati kvantifikacije uspoređeni su s onima gdje je upotrijebljena „surogat“ matrica pripravom kalibracijske krivulje MVA u vodi te nisu pokazali razlike između ova dva pristupa.

Prisutnost endogenih masnih kiselina pri analizi rožnatog sloja kože opisana je u malom broju publikacija. Norlen i sur.²⁹ masne kiseline < C20 pripisali su kontaminaciji i utvrdili da samo one vrlo dugih lanaca čine frakciju slobodnih masnih kiselina rožnatog sloja. S druge strane, van Smeden i sur.⁷ pokazali su prisutnost C16:0, C17:0, C18:0 i C18:1 u ekstraktima rožnatog sloja kože s adhezivne vrpce, no međutim također su potvrdili njihovu prisutnost u samom rožnatom sloju. U ovom slučaju sadržaj masnih kiselina oslobođenih iz adhezivne vrpce procijenjen je korelacijom s komponentama pri m/z 365,3 i 393,3 čiji identitet nije utvrđen.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije

Tablica 2. Popis kemikalija

Sustavni naziv prema IUPAC-ovoj nomenklaturi (čistoća)	Trivijalni naziv	Molekulska formula	Proizvođač	Kratika
1. Aminokiseline i njihovi derivati (analitički standardi)				
(<i>S</i>)-2-amino-3-(1 <i>H</i> -imidazol-4-il)propanska kiselina (≥ 99 %)	<i>L</i> -histidin	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂		His
5-oksopirolidin-2-karboksilna kiselina (≥ 99 %)	Piroglutaminska kiselina	C ₅ H ₇ NO ₃		PCA
(<i>E</i>)-3-(1 <i>H</i> -imidazol-4-il)akrilna kiselina (99 %)	<i>Trans</i> -urokanska kiselina	C ₆ H ₆ N ₂ O ₂	Sigma-Aldrich	<i>trans</i> -UCA
(<i>Z</i>)-3-(1 <i>H</i> -imidazol-4-il)akrilna kiselina (≥ 98 %)	<i>Cis</i> -urokanska kiselina	C ₆ H ₆ N ₂ O ₂		<i>cis</i> -UCA
(<i>S</i>)-2-amino-3-(4-hidroksifenil)propanska kiselina (≥ 98 %)	<i>L</i> - tirozin	C ₉ H ₁₁ NO ₃		Tyr
2. Masne kiseline (analitički standardi)				
Dodekanska kiselina (≥ 99,5 %)	Laurinska kiselina	C ₁₁ H ₂₃ COOH		C12:0
Heksadekanska kiselina (≥ 99,0 %)	Palmitinska kiselina	C ₁₅ H ₃₁ COOH		C16:0
Oktadekanska kiselina (≥ 99,5 %)	Stearinska kiselina	C ₁₇ H ₃₅ COOH		C18:0
9-oktadekanska kiselina (≥ 99,0 %)	Oleinska kiselina	C ₁₇ H ₃₃ COOH		C18:1
9, 12-oktadekadienska kiselina (≥ 98,5 %)	Linolna kiselina	C ₁₇ H ₃₂ COOH	Sigma-Aldrich	C18:2
Nonadekanska kiselina (≥ 99,5 %)	-	C ₁₈ H ₃₇ COOH		C19:0
Dokosanoinska kiselina (≥ 99,0 %)	Behenska kiselina	C ₂₁ H ₄₃ COOH		C22:0
*Tetrakosanoinska kiselina (≥ 99 %)	Lignocerinska kiselina	C ₂₃ H ₄₇ COOH		C24:0
*Heksakosanoinska kiselina (≥ 95 %)	Cerotinska kiselina	C ₂₅ H ₅₁ COOH		C26:0
*Oktakosanoinska kiselina (≥ 98 %)	Montanska kiselina	C ₂₇ H ₅₅ COOH		C28:0

Sustavni naziv prema IUPAC-ovoj nomenklaturi (čistoća)	Trivijalni naziv	Molekulska formula	Proizvođač	Kratika
3. Otapala				
Metilni cijanid (HPLC)	Acetonitril	CH ₃ CN	Panreac	CH ₃ CN
Metilni alkohol (HPLC)	Metanol	CH ₃ OH	Sigma-Aldrich	MeOH
2-propanon (tehnički, predestiliran)	Aceton	C ₃ H ₆ O	Kefo	-
Trietilamin	-	C ₆ H ₁₅ N	Sigma-Aldrich	TEA
MilliQ voda	-	H ₂ O	Milipore. Corp., Billerica	-
4. Ostale kemikalije				
Ceramid III (~ 95 %)	-	C ₃₆ H ₇₃ NO ₄		CER III
Ceramid IIIB (~ 95 %)	-	C ₃₆ H ₇₁ NO ₄	Evonik	CER IIIB
Ceramid VI (~ 95%)	-	C ₃₆ H ₇₃ NO ₅		CER VI
Natrijev oktansulfonat (~ 98 %)	-	NaC ₈ H ₁₇ SO ₃		-
Metil-jodid	Jodoform	CH ₃ I	Sigma-Aldrich	CH ₃ I
Trideuterometil-jodid (99,5 atom % D)	-	CD ₃ I		CD ₃ I
2-brom-piridin (98 %)	-	C ₅ H ₄ NBr	Fluka	Br-py
3-hidroksimetilpiridin	-	C ₆ H ₇ NO	Sigma-Aldrich	Carb-py
2-brom-1- <i>N</i> -metilpiridinij jodid	-	C ₆ H ₇ NBrI	sintetiziran	BMP
3-hidroksimetil- <i>N</i> -metilpiridinij jodid	-	C ₇ H ₁₀ NOI	sintetiziran	CMP
2-brom- <i>N</i> -trideuterometilpiridinij jodid	-	C ₆ H ₄ D ₃ NBrI	sintetiziran	BMP- <i>d</i> 3
3-hidroksimetil- <i>N</i> -trideuterometilpiridinij jodid	-	C ₇ H ₇ D ₃ NOI	sintetiziran	CMP- <i>d</i> 3

* nisu bili dostupni analitički standardi

3.2. Razvoj i validacija LC metode za određivanje komponenata NMF-a

3.2.1. Priprema standardnih otopina

Ishodne otopine individualnih komponenata NMF-a, His, PCA, *trans*-UCA, *cis*-UCA i Tyr pripravljene su otapanjem u MiliQ vodi te je njihova množinska koncentracija iznosila 10 mmol L⁻¹ osim otopine Tyr čija je koncentracija iznosila 2,5 mmol L⁻¹ zbog slabije topljivosti u vodi. Iz ishodnih otopina pripravljena je radna otopina koja je sadržavala $c(\text{His}) = 0,421 \text{ mmol L}^{-1}$, $c(\text{PCA}) = 1,053 \text{ mmol L}^{-1}$, $c(\text{trans-UCA}) = 0,526 \text{ mmol L}^{-1}$, $c(\text{cis-UCA}) = 0,526 \text{ mmol L}^{-1}$ i $c(\text{Tyr}) = 0,421 \text{ mmol L}^{-1}$. Kalibracijski standardi pripremljeni su razrjeđivanjem radne otopine (1,2 – 160 µL) u MilliQ vodi do ukupnog volumena od 500 µL. Kalibracijska krivulja konstruirana je za svaku komponentu NMF-a kao ovisnost površine ispod kromatografskog pika o poznatoj koncentraciji iste.

3.2.2. Uzorkovanje rožnatog sloja kože

Rožnati sloj kože uzorkovan je D-Squame (3,8 cm², D-Squame, Monaderm, Monako, Francuska) ili Corneofix (3,9 cm², Courage Khazaka electronic GmbH, Cologne, Njemačka) adhezivnim vrpčama koje su pričvršćene na površinu kože ispitanika. Adhezivna vrpca pritisnuta je uređajem za kontrolu pritiska pod stalnim pritiskom od 225 g cm⁻² (D500, CuDerm, Dallas, TX, USA) u trajanju od 10 sekundi radi smanjenja varijacije količine izuzetog materijala. Komponente NMF-a određene su u četvrtoj i petoj vrpci, dok su prve tri vrpce odbačene zbog moguće pogreške uslijed prisutnih onečišćenja na površini kože te zbog uzorkovanja slojeva u kojima je razina komponenata NMF-a konstantna.⁴⁶ Pojedinačne adhezivne vrpce s izuzetim slojem kože pohranjene su u mikroeprove od 2 mL (Sarstedt, Etten-leur, Nizozemska) tako da je površina vrpce koja je obložena adhezivnim ljepljivom okrenuta prema unutrašnjosti te je uzorkovani materijal pohranjen kod -20 °C do daljnje obrade.

3.2.3. Ekstrakcija komponenata NMF-a

Komponente NMF-a ekstrahirane su dodatkom 500 µL amonijaka (25 %, w/w) u mikroeprove s adhezivnom vrpcom s izuzetim rožnatim slojem i snažnim miješanjem na mješaču (IKA vibrax-VXR Model 2200, IKA-works Inc. Wilmington, NC, USA) tijekom 2 sata. Ekstrakti NMF-a prebačeni su u drugu mikroeprovu i upareni do suha pod sniženim tlakom kod 60 °C (Eppendorf Concentrator 5301, Eppendorf AG, Hamburg, Njemačka). Nakon ekstrakcije suhi ostatak otopljen je u 500 µL MilliQ vode, promiješan i filtriran

kroz PVDF membranu veličine pora od 0,2 µm (Grace Davison Discovery Science, Deerfield, IL, USA).

3.2.4. Ekstrakcijski i evaporacijski povrat

U svrhu ispitivanja ekstrakcijskog povrata rožnati sloj kože uzorkovan je na šest susjednih mjesta jedne podlaktice uz pretpostavku da je razina NMF-a na tako maloj površini za uzorkovanje približno jednaka. Komponente NMF-a ekstrahirane su dvjema uzastopnim ekstrakcijama s 500 µL amonijaka (25 %, w/w) tijekom 0,5, 1, 2, 4 i 6 sati uz snažno miješanje na mješaču. Oba ekstrakta prebačena su u novu mikroepruvetu od 2 mL i uparena do suha kod 60 °C. Ekstrakcijski povrat nakon prve ekstrakcije izračunat je prema izrazu:

$$\text{povrat iz 1. ekstrakcije (\%)} = \frac{\text{NMF}_{1.\text{ekstrakcija}}}{\text{NMF}_{1.\text{ekstrakcija}} + \text{NMF}_{2.\text{ekstrakcija}}} \quad (1)$$

Mogući gubitak komponenata NMF-a uslijed uparavanja pod sniženim tlakom kod 60 °C ispitan je dodatkom određene količine komponenata NMF-a na adhezivnu vrpцу i sušenjem na sobnoj temperaturi. Pojedinačne adhezivne vrpce s izuzetim slojem kože pohranjene su u mikroepruvete od 2 mL (Sarstedt, Etten-leur, Nizozemska) i komponente NMF-a ekstrahirane su i rekonstituirane u MilliQ vodi prema prethodno navedenom postupku (P.3.2.3.). Iste količine komponenata NMF-a dodane su u mikroepruvete od 20 mL te dopunjene MilliQ vodom do ukupnog volumena od 500 µL. Usporedbom visine kromatografskih pikova komponenata NMF-a ekstrahiranih s adhezivne vrpce i onih iz standardnih otopina izračunat je evaporacijski povrat.

3.2.5. Usporedba različitih adhezivnih vrpca za uzorkovanje komponenata NMF-a

Rožnati sloj kože uzorkovan je sa četiri susjedna mjesta jedne podlaktice s D-Squame adhezivnom vrpcom, a s druge podlaktice s Corneofix adhezivnom vrpcom. Prije izuzimanja rožnatog sloja, adhezivne vrpce pritisnute su na površinu rožnatog sloja primjenom metalnog valjka (1 kg) radi smanjenja varijacije količine izuzetog materijala.

Komponente NMF-a ekstrahirane su i rekonstituirane u MilliQ vodi prema prethodno navedenoj proceduri (P.3.2.3.).

3.2.6. Usporedba različitih otapala za ekstrakciju komponenata NMF-a

U svrhu ispitivanja utjecaja različitih otapala na ekstrakciju komponenata NMF-a rožnati sloj kože uzorkovan je adhezivnim vrpčama s četiri susjedna mjesta s obje podlaktice. Prije izuzimanja rožnatog sloja, adhezivne vrpce pritisnute su na površinu rožnatog sloja primjenom metalnog valjka (1 kg) radi smanjenja varijacije količine izuzetog materijala. Komponente NMF-a ekstrahirane su s adhezivne vrpce s 500 μL amonijaka (25 %, w/w) i otopinom kalijeva hidroksida (KOH) koncentracije 0,1 mol L⁻¹ ili 1,0 mol L⁻¹ snažnim miješanjem na mješaču tijekom 2 sata.

Nakon ekstrakcije amonijakom (25 %, w/w), ekstrakti su upareni do suha pod sniženim tlakom kod 60 °C te je nakon uparavanja suhi ostatak otopljen u 200 μL MilliQ vode. Nakon ekstrakcije s KOH, ekstrakti su neutralizirani dodatkom otopine klorovodične kiseline, koncentracija 0,1 mol L⁻¹ i 1,0 mol L⁻¹. Prije kromatografske analize svi uzorci razrijeđeni su u volumnom omjeru 1:1 s otopinom koja je sadržavala 8,6 mmol L⁻¹ klorovodične kiseline, 0,2 mmol L⁻¹ natrijeva oktansulfonata i 4 % CH₃CN (v/v).

3.2.7. Određivanje količine uzorkovanog rožnatog sloja

Prije pohranjivanja, svakom izuzetom uzorku rožnatog sloja izmjerena je optička gustoća izuzetog materijala (D-Squame Scan 850 A, Monaderm, Monaco, Francuska) iz čega je izračunata količina proteina prisutna na svakoj adhezivnoj vrpci prema validiranoj metodi opisanoj u literaturi.^{57,163} Također, količina ukupnih proteina određena je i spektrofotometrijski kod 540 nm (Pierce Micro BCA protein assay kit, Thermo Fischer Scientific, Rockford, IL, SAD) standardizacijom uz protein albumin iz goveđeg seruma.¹⁶⁴

3.2.8. Kromatografski uvjeti

Za određivanje komponenata NMF-a korišten je tekućinski kromatograf opremljen Jasco UV-975 Intelligent UV/VIS detektorom i Jasco PU-980 HPLC (Jasco, Tokyo, Japan) pumpom. Odvajanje pojedinih komponenata NMF-a provedeno je na Semi Prep Security Guard Cartridge System (Phenomenex, Torrance, CA, USA) pretkoloni i 250 × 3 mm Synergi 4mm Polar-RP 80Å (Phenomenex, Torrance, CA, USA) kromatografskoj koloni pri protoku mobilne faze od 0,4 mL min⁻¹.

Mobilna faza za izokratično eluiranje komponenata NMF-a sastojala se od 4,3 mmol L⁻¹ klorovodične kiseline, 2 % CH₃CN (v/v) i 0,1 mmol L⁻¹ natrijeva

oktansulfonata. His i PCA detektirani su kod 205 nm, dok su *trans*-UCA i *cis*-UCA te Tyr detektirani kod 267 nm. Za injektiranje uzoraka korišten je Shimadzu SIL-20A autosystem, a za obradu podataka LC solution analysis software (Shimadzu Corp., Tokyo, Japan).

Za određivanje pogodne valne duljine za detekciju i ispitivanje čistoće kromatografskih pikova komponenata NMF-a u uzorcima korišten je HP-1090 tekućinski kromatograf opremljen detektorom s nizom dioda (engl. *diode array detector*, DAD), a podaci su obrađeni programom Chemstation (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA).

3.2.9. Određivanje validacijskih parametara LC-UV metode

U svrhu validacije analitičke metode za određivanje komponenata NMF-a određeni su linearni raspon, granica detekcije, granica kvantifikacije i preciznost.

Kalibracijski standardi za određivanje validacijskih parametara analitičke metode pripremljeni su prema P.3.2.1.

Za određivanje granice detekcije (engl. *limit of detection*, LOD) i granice kvantifikacije (engl. *limit of quantitation*, LOQ) konstruirani su baždarni dijagrami u niskom koncentracijskom rasponu u blizini očekivane granice detekcije (odnosno granice kvantifikacije) u četiri različita dana. U tu svrhu određeni volumen (1,0 do 10 µL) radne otopine (P.3.2.1.) otpipetiran je na D-Squame adhezivne vrpce koje su nakon sušenja na sobnoj temperaturi analizirane prema prethodno opisanom postupku (P.3.2.3.; 3.2.8.). Granica detekcije i granica kvantifikacije izračunate su na temelju podataka za rezidualnu standardnu devijaciju (SD_{res}) i nagiba kalibracijske krivulje iz slijedećih izraza:

$$LOD = 3 \times \frac{SD_{\text{res}}}{\text{nagib pravca}} \quad (2)$$

$$LOQ = 10 \times \frac{SD_{\text{res}}}{\text{nagib pravca}} \quad (3)$$

Preciznost metode (izražena kao relativna standardna devijacija, *RSD*) određena je za svaku komponentu NMF-a na način da je određeni volumen radne otopine (P.3.2.1.) otpipetiran na D-Squame adhezivne vrpce koje su nakon sušenja na sobnoj temperaturi analizirane prema prethodno opisanom postupku (P.3.2.3.; 3.2.8.).

Ponovljivost unutar dana određena je analizom 8 individualno pripremljenih replikata na dvije koncentracijske razine, a preciznost između dana analizom 8 replikata (ukupno 32 replikata pripremljenih kroz četiri dana) na jednoj koncentracijskoj razini.

3.2.10. Primjena metode za određivanje komponenata NMF-a

Razvijena metoda uspješno je primijenjena za određivanje komponenata NMF-a kao bioindikatora funkcije kožne barijere uslijed utjecaja unutarnjih i okolišnih faktora. Komponente NMF-a u rožnatom sloju kože određene su prema prethodno opisanom postupku (P.3.2.3.; 3.2.8.).

Uzorci normalne i oštećene kože te međustanične tekućine dobiveni su od europskih partnera u okviru European Cooperation in Scientific and Technical Research (COST) projekta (naziv projekta: Skin Barrier and Atopic Diseases, SKINBAD; broj projekta: BM0903).

Primjenjivost odabranih biokemijskih indikatora testirala se na slijedećim modelima normalne i oštećene kože:

1. Uzorci kože oštećene uslijed atopijskog dermatitisa (AD) dobiveni od partnera s University of Lübeck, Lübeck, Njemačka i University of Amsterdam, Amsterdam, Nizozemska.

2. Uzorci normalne i oštećene kože nakon iritacije kemijskim reagensima dobiveni od partnera s University of Lübeck, Lübeck, Njemačka i University of Amsterdam, Amsterdam, Nizozemska.

3. Uzorci normalne i oštećene kože i međustanične tekućine prije i nakon primjene UV zračenja dobiveni od partnera s University of Osnabrück, Osnabrück, Njemačka i University of Amsterdam, Amsterdam, Nizozemska.

Odobrenje za izuzimanje i korištenje uzoraka dobiveno je od nadležnih (lokalnih) etičkih povjerenstava.

Koncentracija komponenata NMF-a izražena je kao mmol NMF-a po gramu proteina (mmol g^{-1}). Za statističku obradu podataka korišten je Prism 5 program (Graph-Pad, San Diego, CA, USA).

3.3. Razvoj i validacija LC-ESI-MS metode za određivanje slobodnih masnih kiselina

3.3.1. Sinteza derivatizacijskih reagensa, 2-brom-*N*-metilpiridinij jodida i 3-hidroksimetil-*N*-metilpiridinij jodida

- Sinteza 2-brom-*N*-metilpiridinij jodida (BMP)

Neprestanim miješanjem 475 μL (4,98 mmol) 2-brom-piridina i 340 μL (5 mmol) metil-jodida pri sobnoj temperaturi u okrugloj tikvici tijekom 24 sata sintetiziran je 2-brom-*N*-metilpiridinij jodid (BMP) prema kemijskoj reakciji prikazanoj na Shemi 4. Sintetizirani BMP ispiran je malim količinama hladnog suhog acetona, izoliran iz matičnice te osušen pod sniženim tlakom kod sobne temperature tijekom 3 – 4 sata. Nakon izolacije i sušenja BMP je pohranjen kod +4 °C do daljnje upotrebe. Produkt je okarakteriziran primjenom nuklearne magnetske rezonancije ^1H NMR (DMSO-*d*6): δ 9,2 – 9,3 (d, 1H, C(6)H), δ 8,48 – 8,54 (d, 1H, C(3)H), δ 8,40 – 8,47 (t, 1H, C(4)H), δ 8,08 – 8,17 (m, 1H, C(5)H), δ 4,35 – 4,38 (s, 3H, NCH₃) i ^{13}C NMR (DMSO-*d*6): δ 146,5 (C(6)), δ 144,4 (C(2)), δ 140,5 (C(4)), δ 133,9 (C(5)), δ 127 (C(3)), 50,8 (NCH₃) (Bruker AV-300) (Prilog 1., Prilog 3.) i IR (KBr pastila, cm⁻¹): 781 (C–Br, s), 1430 (N–CH₃, s), 1615 (C=C, s), 2918 (–C–H, w), 3020 (=C–H, s).

- Sinteza 3-hidroksimetil-*N*-metilpiridinij jodida (CMP)

Neprestanim miješanjem 485 μL (5 mmol) 3-hidroksimetilpiridina i 340 μL (5 mmol) metil-jodida pri sobnoj temperaturi u okrugloj tikvici tijekom 24 sata sintetiziran je 3-hidroksimetil-*N*-metilpiridinij jodid (CMP) prema kemijskoj reakciji na Shemi 4. Sintetizirani CMP ispiran je malim količinama hladnog suhog acetona, izoliran iz matičnice te osušen pod sniženim tlakom kod sobne temperature tijekom 3 – 4 sata. Nakon izolacije i sušenja CMP je pohranjen kod +4 °C do daljnje upotrebe. Produkt je okarakteriziran primjenom nuklearne magnetske rezonancije ^1H NMR (DMSO-*d*6): δ 8,91 – 8,95 (s, 1H, C(2)H), δ 8,85 – 8,90 (d, 1H, C(6)H), δ 8,44 – 8,49 (d, 1H, C(4)H), δ 8,05 – 8,13 (t, 1H, C(5)H), δ 5,84 – 5,88 (t, 1H, –OH), δ 4,70 – 4,74 (d, 2H, C(7)H), δ 4,34 – 4,37 (s, 3H, NCH₃) i ^{13}C NMR (DMSO-*d*6): δ 144,4 (C(2)), δ 143,5 (C(6)), δ 143,3 (C(3)), δ 142,9 (C(4)), δ 127,6 (C(5)), δ 59,9 (C(7)), 48,4 (NCH₃) (Prilog 3., Prilog 6.) i IR (KBr pastila, cm⁻¹): 1056 (C – O, s), 1475 (N–CH₃, s), 1638 (C=C, s), 2920 (–C–H, w), 3053 (=C–H, s), 3600 – 3200 (O – H, w).

- Sinteza 2-brom-*N*-trideuterometilpiridinij jodida (BMP-*d*3) i 3-hidroksimetil-*N*-trideuterometilpiridinij jodida (CMP-*d*3)

Za sintezu deuteriranih derivatizacijskih reagensa primijenjen je gore navedeni postupak uz upotrebu trideuterometil jodida (Shema 4.).

2-Brom-*N*-trideuterometilpiridinij jodid (BMP-*d*3) okarakteriziran je primjenom nuklearne magnetske rezonancije ^1H NMR (DMSO-*d*6): δ 9,20 – 9,25 (d, 1H, C(6)H), δ 8,48 – 8,52 (d, 1H, C(3)H), δ 8,41 – 8,47 (t, 1H, C(4)H), δ 8,08 – 8,16 (m, 1H, C(5)H) i ^{13}C NMR (DMSO-*d*6): δ 146,0 (C(6)), δ 143,9 (C(2)), δ 133,4 (C(5)H), δ 126,5 (C(3)H). (Prilog 2., Prilog 4.).

3-Hidroksimetil-*N*-trideuterometilpiridinij jodid (CMP-*d*3) okarakteriziran je primjenom nuklearne magnetske rezonancije ^1H NMR (DMSO-*d*6): δ 8,91 – 8,94 (s, 1H, C(2)H), δ 8,86 – 8,89 (d, 1H, C(6)H), δ 8,45 – 8,49 (d, 1H, C(4)H), δ 8,07 – 8,11 (t, 1H, C(5)H), δ 5,80 – 5,84 (t, 1H, – OH), δ 4,70 – 4,74 (d, 2H, C(7)H) i ^{13}C NMR (DMSO-*d*6): δ 144,4 (C(2)), δ 143,5 (C(6)), δ 143,3 (C(3)), δ 142,9 (C(4)), δ 127,6 (C(5)), δ 59,8 (C(7)). (Prilog 8., Prilog 9.).

3.3.2. Priprema otopina masnih kiselina

Ishodne otopine pojedinih masnih kiselina pripremljene su otapanjem u 5 ili 10 mL suhog acetona ovisno o topljivosti masne kiseline (Tablica 3.). Radna otopina smjese masnih kiselina pripremljena je razrjeđivanjem ishodnih otopina pojedinih masnih kiselina na ukupni volumen od 1 mL suhog acetona (Tablica 3.)

Tablica 3. Koncentracije otopina masnih kiselina

Analit	$c(\text{ishodna otopina})/\text{mmol L}^{-1}$	$c(\text{radna otopina})/\text{mmol L}^{-1}$
C12:0	6,39	0,127
C16:0	4,87	0,779
C18:0	4,46	0,446
C18:1	9,84	0,984
C18:2	7,91	0,791
C22:0	5,75	0,144
C24:0	1,45	0,218
C26:0	4,08	0,612
C28:0	1,22	0,122

3.3.3. Ekstrakcija slobodnih masnih kiselina

Rožnati sloj kože uzorkovan je D-Squame (3,8 cm², D-Squame, Monaderm, Monako, Francuska) adhezivnim vrpčama prema postupku opisanom u P.3.2.2.

a) Ekstrakcija slobodnih masnih kiselina iz rožnatog sloja kože

Slobodne masne kiseline iz rožnatog sloja kože ekstrahirane primjenom postupka prema Bligh i Dyeru.¹⁴¹

Ekstrakcijski postupak 1:

U mikroepruvetu s adhezivnom vrpcom dodano je 125 µL destilirane vode i 750 µL smjese MeOH:CHCl₃ (2:1, v/v). Smjesa je tijekom 1 sata snažno miješana na mješaču (IKA vibrax-VXR Model 2200, IKA-works Inc. Wilmington, NC, USA) nakon čega je dodano 250 µL CHCl₃. Smjesa je ponovo snažno miješana na mješaču tijekom 1 sata, centrifugirana (1 minuta) i prebačena u novu mikroepruvetu. Nakon dodatka 250 µL destilirane vode smjesa je miješana tijekom 10 minuta i centrifugirana (1 minuta) radi odvajanja vodene i organske faze. 400 µL organske (donje) faze prebačeno je u novu mikroepruvetu. Druga ekstrakcija je provedena dodatkom 500 µL CHCl₃ u vodenu fazu te je nakon miješanja na mješaču (10 minuta) i centrifugiranja (1 minuta) 400 µL organske faze spojeno s prvim izoliranim ekstraktom. Spojeni ekstrakti upareni su do suha pod sniženim tlakom kod 30 °C (Labconco, Centrivap Concentrator), a suhi ostatak pohranjen je kod –20 °C do daljnje analize.

Ekstrakcijski postupak 2:

Slobodne masne kiseline ekstrahirane su smjesom otapala CHCl₃:MeOH:H₂O (1:2:0,5, v/v/v) ukupnog volumena 1 mL tijekom 1 sata uz snažno miješanje na mješaču (IKA vibrax-VXR Model 2200, IKA-works Inc. Wilmington, NC, USA). Nakon ekstrakcije adhezivna vrpca izvađena je iz mikroepruvete i ekstrakt je uparen do suha pod sniženim tlakom kod 30 °C (Centrivap Concentrator, Labconco), a suhi ostatak pohranjen je kod –20 °C do daljnje analize.

b) Ekstrakcija endogenih masnih kiselina iz adhezivne vrpce

Za određivanje prisutnosti endogenih masnih kiselina u adhezivnim vrpčama za uzorkovanje rožnatog sloja kože, slobodne masne kiseline ekstrahirane su s adhezivne vrpce

prema prethodno opisanom postupku za ekstrakciju masnih kiselina iz rožnatog sloja kože. Suhi ostatak pohranjen je kod $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do instrumentalne analize.

3.3.4. Derivatizacija slobodnih masnih kiselina

a) Derivatizacija slobodnih masnih kiselina iz rožnatog sloja kože

Neposredno prije derivatizacije pripremljene su otopine derivatizacijskih reagensa, $c(\text{BMP}) = 50\text{ }\mu\text{mol mL}^{-1}$ i $c(\text{CMP}) = 200\text{ }\mu\text{mol mL}^{-1}$ u suhom CH_3CN . Suhi ostatak nakon ekstrakcije rožnatog sloja (P.3.3.3.) temperiran je na sobnu temperaturu i rekonstituiran u $100\text{ }\mu\text{L}$ suhog acetona.

Slobodne masne kiseline derivatizirane su dodatkom $200\text{ }\mu\text{L}$ BMP i $200\text{ }\mu\text{L}$ CMP te $1\text{ }\mu\text{L}$ TEA prema kemijskoj reakciji prikazanoj na Shemi 4. Reakcijska smjesa je homogenizirana i inkubirana kod $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ tijekom 40 minuta. Nakon derivatizacije reakcijska smjesa s derivatima masnih kiselina ohlađena je na sobnu temperaturu i pohranjena kod $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ do instrumentalne analize.

Derivatizacijom masnih kiselina nastali su NMP derivati masnih kiselina, odnosno deuterirani analozi, NMP-*d*3 derivati masnih kiselina (Shema 4.). Imena pojedinih derivata masnih kiselina prikazana su u Tablici 4.

Tablica 4. Nazivlje derivata masnih kiselina

Masna kiselina	*Derivat masne kiseline	**Deuterirani analog derivata masne kiseline
C12:0	C12:0-NMP	C12:0-NMP- <i>d</i> 3
C16:0	C16:0-NMP	C16:0-NMP- <i>d</i> 3
C18:0	C18:0-NMP	C18:0-NMP- <i>d</i> 3
C18:1	C18:1-NMP	C18:1-NMP- <i>d</i> 3
C18:2	C18:2-NMP	C18:2-NMP- <i>d</i> 3
C19:0	C19:0-NMP	C19:0-NMP- <i>d</i> 3
C22:0	C22:0-NMP	C22:0-NMP- <i>d</i> 3
C24:0	C24:0-NMP	C24:0-NMP- <i>d</i> 3
C26:0	C26:0-NMP	C26:0-NMP- <i>d</i> 3
C28:0	C28:0-NMP	C28:0-NMP- <i>d</i> 3

*pripremljen derivatizacijom BMP i CMP derivatizacijskim reagensima

**pripremljen derivatizacijom BMP-*d*3 i CMP-*d*3 derivatizacijskim reagensima

b) Derivatizacija standardnih otopina masnih kiselina

Neposredno prije derivatizacije pripremljene su otopine deuteriranih analoga derivatizacijskih reagensa, $c(\text{BMP}) = 50 \mu\text{mol mL}^{-1}$ i $c(\text{CMP}) = 200 \mu\text{mol mL}^{-1}$ u suhom CH_3CN . Za derivatizaciju masnih kiselina u $100 \mu\text{L}$ radne otopine (ST 100) dodano je $200 \mu\text{L}$ $\text{BMP-}d_3$, $200 \mu\text{L}$ $\text{CMP-}d_3$ i $1 \mu\text{L}$ TEA (Shema 4.). Reakcijska smjesa je homogenizirana i inkubirana kod 50°C tijekom 40 minuta. Nakon derivatizacije reakcijska smjesa s derivatima masnih kiselina ohlađena je na sobnu temperaturu i pohranjena kod $+4^\circ\text{C}$ do instrumentalne analize.

c) Priprema kalibracijskih standarda masnih kiselina

Niz otopina različitih koncentracija deuteriranih derivata pripremljen je sukcesivnim razrjeđivanjem ST 100 s CH_3CN u volumenom omjeru 1:1 na ukupni volumen od $400 \mu\text{L}$. Za pripremu otopine matrice uzorkovan je rožnati sloj kože s 15 adhezivnih vrpce. Nakon uzorkovanja rožnatog sloja D-Squame adhezivnim vrpcoma (P.3.2.2.) i ekstrakcije (P.3.3.3.), suhi ostatak rekonstituiran je u $100 \mu\text{L}$ suhog acetona. Dobiveni ekstrakti rožnatog sloja spojeni su i homogenizirani. Uzeto je $100 \mu\text{L}$ rekonstituiranog ekstrakta i derivatizirano prema opisanom postupku u P.3.3.4.a. Kalibracijski standardi pripremljeni su dodatkom $20 \mu\text{L}$ otopina različitih koncentracija deuteriranih derivata masnih kiselina u $380 \mu\text{L}$ matrice nakon derivatizacije.

U svaki pripremljeni uzorak i kalibracijski standard dodano je $50 \mu\text{L}$ otopine deuteriranog derivata nonadekanske kiseline ($\text{C19:0-NMP-}d_3$) kao internog standarda. Otopina internog standarda pripremljena je derivatizacijom $100 \mu\text{L}$ otopine C19:0 pripremljene u suhom acetonu ($c(\text{C19:0}) = 0,0972 \text{ mmol L}^{-1}$) prema P.3.3.4.b. U otopine uzorka i kalibracijskih standarda dodano je $50 \mu\text{L}$ internog standarda $c(\text{C19:0-NMP-}d_3) = 0,972 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Kalibracijska krivulja konstruirana je za svaku masnu kiselinu kao ovisnost omjera površina ispod kromatografskog pika derivata masne kiseline i internog standarda o poznatoj koncentraciji iste.

3.3.5. Optimiranje derivatizacijskih uvjeta

a) Optimiranje količine dodanog TEA

Zasebno je derivatizirano 100 μL ishodne otopine C16:0 i 100 μL ishodne otopine C18:0 dodatkom 200 μL BMP ($c(\text{BMP}) = 50 \mu\text{mol mL}^{-1}$), 200 μL CMP ($c(\text{CMP}) = 200 \mu\text{mol mL}^{-1}$) te 1 μL , 5 μL ili 10 μL TEA. Smjese su homogenizirane i inkubirane kod 50 °C tijekom 40 minuta. Nakon derivatizacije produkti su pohranjeni kod +4 °C do instrumentalne analize. Prije instrumentalne analize pomiješano je 40 μL C16:0 i 40 μL C18:0 otopina derivatiziranih masnih kiselina, dodano je 300 μL CH_3CN i otopina je homogenizirana prije LC-ESI-MS analize.

b) Optimiranje količine dodanog BMP i CMP

ST 100 derivatiziran je dodatkom 1 μL TEA te varijabilnim volumenima BMP ($c(\text{BMP}) = 50 \mu\text{mol mL}^{-1}$) i CMP ($c(\text{CMP}) = 200 \mu\text{mol mL}^{-1}$): (a) 50 μL BMP i 50 μL CMP, (b) 100 μL BMP i 100 μL CMP, (c) 150 μL BMP i 150 μL CMP i (d) 200 μL BMP i 200 μL CMP. U smjesu je dodan CH_3CN do konačnog volumena od 500 μL , smjesa je homogenizirana i inkubirana kod 50 °C tijekom 40 minuta. Nakon derivatizacije reakcijska smjesa s derivatima masnih kiselina pohranjena je kod +4 °C do instrumentalne analize. Za LC-ESI-MS analizu 50 μL derivatizirane smjese masnih kiselina (nakon temperiranja na sobnu temperaturu) razrijeđeno je s CH_3CN do konačnog volumena od 1000 μL .

3.3.6. Određivanje faktora odgovora

Za određivanje faktora odgovora (engl. *response factor*, RF) deuteriranih i nedeuteriranih derivata masnih kiselina provedena je derivatizacija niza koncentracija radne otopine masnih kiselina dodatkom 200 μL BMP ($c(\text{BMP}) = 50 \mu\text{mol mL}^{-1}$), 200 μL CMP ($c(\text{CMP}) = 200 \mu\text{mol mL}^{-1}$) i 1 μL TEA te dodatkom 200 μL BMP-*d*3 ($c(\text{BMP-}d3) = 50 \mu\text{mol mL}^{-1}$), 200 μL CMP-*d*3 ($c(\text{CMP-}d3) = 200 \mu\text{mol mL}^{-1}$) i 1 μL TEA. Reakcijske smjese dopunjene su s CH_3CN do volumena od 500 μL . Smjese (pripremljene u triplicatu) homogenizirane su i inkubirane kod 50 °C tijekom 40 minuta. Reakcijske smjese s derivatima masnih kiselina pohranjene su kod +4 °C do LC-ESI-MS analize.

Prije LC-ESI-MS analize pomiješano je 20 μL reakcijske smjese s derivatima masnih kiselina, 20 μL reakcijske smjese s deuteriranim analozima derivata masnih kiselina (na svakoj pripremljenoj koncentracijskoj razini), 50 μL internog standarda

$c(\text{C19:0-}d3) = 0,0972 \text{ mmol L}^{-1}$ i dodano je $360 \text{ }\mu\text{L CH}_3\text{CN}$ te su pripremljene otopine podvrgnute LC-ESI-MS analizi.

3.3.7. Utjecaj sastava matrice

Utjecaj sastava matrice ispitan je dodatkom različitih koncentracija razrijeđene radne otopine u ekstrakt rožnatog sloja kože dobiven od 3 različita donora. Rožnati sloj kože za analizu masnih kiselina uzorkovan je upotrebom D-Squame adhezivnih vrpca prema postupku opisanom u P.3.2.2. i ekstrahiran prema postupku opisanom u P.3.3.3.a. Spojene otopine suhog ostatka svakog donora posebno podijeljene su na 11 jednakih volumena od $100 \text{ }\mu\text{L}$ u koje je dodano $100 \text{ }\mu\text{L}$ razrijeđene radne otopine različitih koncentracija te je provedena derivatizacija prema postupku opisanom u P.3.3.4.a. Reakcijske smjese s derivatima masnih kiselina pohranjene su kod $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ do LC-ESI-MS analize.

3.3.8. Optimiranje kromatografskih uvjeta

Za analizu derivata masnih kiselina upotrijebljen je HPLC Agilent 1200 Series tekućinski kromatograf u sprezi sa Agilent 6410 spektrometrom mase s trostrukim kvadrupolom (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, USA). Spektri masa snimljeni su pri ionizaciji elektroraspršenjem u pozitivnom načinu rada. Napon kapilare bio je oko 4000 V , temperatura dušika $350 \text{ }^\circ\text{C}$, protok dušika 6 L min^{-1} , „dwell time“ 10, tlak raspršivača 13 psi, m/z raspon 10 – 1000.

Pri razvoju analitičke metode ispitani su kromatografski uvjeti na Synergy Hydro-RP (Phenomenex, Torrance, CA, USA), Zorbax Eclipse XDB-C8 (Agilent, Santa Clara, CA, USA) i Hypersil Gold (Thermo Scientific, MA, USA) kromatografskim kolonama uz upotrebu Eclipse XDB-C18 pretkolone (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Također, optimiran je sastav i gradijent mobilne faze te je ispitan utjecaj dodatka mravlje kiseline i alkohola (MeOH, EtOH) u mobilnu fazu.

Nadalje, optimiran je napon fragmentora i energija sudara za višestruke tranzicijske reakcije te su odabrane vrijednosti prikazane u Tablici 5. korištene pri razvoju i validaciji analitičke metode.

Tablica 5. Uvjeti fragmentacije derivata masnih kiselina

Derivati masnih kiselina	Prekursor ion	Produkt ion	Napon fragmentora/V	Energija sudara/eV
C12:0-NMP	306	124	175	30
		107		40
C12:0-NMP- <i>d3</i>	309	127	125	30
		110		40
C16:0-NMP	362	124	175	35
		107		50
C16:0-NMP- <i>d3</i>	365	127	125	35
		110		50
C18:0-NMP	390	124	175	45
		107		45
C18:0-NMP- <i>d3</i>	393	127	175	45
		110		45
C18:1-NMP	388	124	200	35
		107		45
C18:1-NMP- <i>d3</i>	391	127	150	45
		110		50
C18:2-NMP	386	124	200	35
		107		45
C18:2-NMP- <i>d3</i>	389	127	150	35
		110		45
C19:0-NMP	404	124	200	35
		107		45
C19:0-NMP- <i>d3</i>	407	127	125	45
		110		55
C22:0-NMP	446	124	250	45
		107		55
C22:0-NMP- <i>d3</i>	449	127	200	45
		110		55
C24:0-NMP	474	124	175	60
		107		60
C24:0-NMP- <i>d3</i>	477	127	150	50
		110		60
C26:0-NMP	502	124	175	60
		107		60
C26:0-NMP- <i>d3</i>	505	127	175	50
		110		60
C28:0-NMP	530	124	175	60
		107		60
C28:0-NMP- <i>d3</i>	533	127	175	60
		110		60

Nakon optimizacije mobilne faze razvoj i validacija analitičke metode te analiza uzoraka rožnatog sloja kože provedeni su gradijentnom eluacijom mobilne faze A (MilliQ voda i 0,1 % HCOOH) i mobilne faze B (CH₃CN, 0,1 % HCOOH i 40 % MeOH) prema Tablici 6.

Tablica 6. Uvjeti gradijentnog eluiranja mobilne faze

t/min	% B	protok/mL min ⁻¹
0	75	0,30
2	90	0,30
4	90	0,45
5	100	0,45
20	100	0,45
21	75	0,30
30	75	0,30

3.3.9. Ekstrakcijski povrat

Ekstrakcijski povrat određen je u sedmoj i osmoj vrpce kojima su izuzeti uzorci rožnatog sloja na susjednim mjestima podlaktice primjenom Ekstrakcijskog postupka 1 i Ekstrakcijskog postupka 2 (P.3.3.3.).

Ekstrakcijski povrat 1:

Pola adhezivne vrpce ekstrahirano je direktno prema Ekstrakcijskom postupku 1. Drugoj polovici dodana je smjesa otapala CHCl₃:MeOH:H₂O (1:2:0,5, v/v/v) i 100 µL radnog standarda masnih kiselina 8 puta manje koncentracije od ST 100 (ST 12,5) te je ekstrakcija provedena isto prema Ekstrakcijskom postupku 1. Nakon otapanja suhog ostatka u 100 µL suhog acetona slobodne masne kiseline derivatizirane prema postupku opisanom u P.3.3.4.a. Reakcijske smjese s derivatima masnih kiselina pohranjene su kod +4 °C do LC-ESI-MS analize.

Ekstrakcijski povrat 2:

Pola adhezivne vrpce ekstrahirano je direktno prema Ekstrakcijskom postupku 2. Drugoj polovici dodana je smjesa otapala CHCl₃:MeOH:H₂O (1:2:0,5, v/v/v) i 100 µL radnog standarda masnih kiselina 8 puta manje koncentracije od ST 100 (ST 12,5) te je ekstrakcija provedena isto prema Ekstrakcijskom postupku 2. Nakon otapanja suhog ostatka u 100 µL

suhog acetona slobodne masne kiseline derivatizirane prema postupku opisanom u *P.3.3.4.a*. Reakcijske smjese s derivatima masnih kiselina pohranjene su kod +4 °C do LC-ESI-MS analize.

3.3.10. Određivanje validacijskih parametara LC-ESI-MS metode za određivanje slobodnih masnih kiselina

U svrhu validacije analitičke metode za određivanje slobodnih masnih kiselina određeni su linearni raspon, granica detekcije, granica kvantifikacije, preciznost i točnost.

Kalibracijski standardi za određivanje validacijskih parametara analitičke metode pripremljeni su prema *P.3.3.4.b*; *3.3.4.c*.

Za određivanje LOD i LOQ konstruirani su baždarni dijagrami u niskom koncentracijskom rasponu u blizini očekivane granice detekcije (odnosno kvantifikacije) u tri različita dana. Baždarni dijagram pripremljen je prema *P.3.3.4.b*; *3.3.4.c*; te su LOD i LOQ izračunati prema numeričkim izrazima (2) i (3).

Preciznost metode (izražena kao relativna standardna devijacija, *RSD*) određena je za sve masne kiseline. Ponovljivost unutar dana određena je analizom 6 individualno pripremljenih replikata na dvije koncentracijske razine, a ponovljivost između dana analizom 18 replikata (ukupno 18 replikata pripremljenih kroz tri dana) na dvije koncentracijske razine. Točnost metode (stupanj podudaranja rezultata ispitivanja i prihvaćene referentne vrijednosti izražen u %) određena je analizom 18 individualno pripremljenih replikata na dvije koncentracijske razine.

3.4. Izolacija i karakterizacija ceramida

3.4.1. Ekstrakcija pojedinih lipidnih klasa iz humanog epidermisa

Humani epidermis mase 0,5 g usitnjen je i ekstrahiran s približno 10 mL smjese otapala CHCl_3 :MeOH (2:1 v/v) tijekom 3 sata laganim miješanjem na magnetskoj mješalici. Nakon ekstrakcije epidermis je filtriranjem odvojen od matičnice te je ekstrakcija epidermisa ponovljena još jedanput. Ekstrakti dviju uzastopnih ekstrakcija spojeni su i upareni do suha zagrijavanjem na vodenoj kupelji kod 50 °C. Suhi ostatak rekonstituiran je dodatkom 3 mL smjese otapala CHCl_3 :MeOH (1:1 v/v), sadržaj je snažno promiješan tijekom 15 s i centrifugiran tijekom 15 min pri 3500 g. Supernatant je prenesen u novu epruvetu i dodan je fosfatni pufer (engl. *phosphate buffered solution*, PBS) tako da se konačna smjesa otapala sastojala od CHCl_3 :MeOH:PBS (1:1:0,7 v/v/v). Nakon miješanja i razdvajanja organskog i vodenog sloja, organska faza prenesena je u drugu epruvetu. Nakon toga, provedena je još jedna ekstrakcija organske faze smjesom otapala CHCl_3 :MeOH:PBS (1:1:0,7 v/v/v). Spojeni ekstrakti organske faze iz dviju ekstrakcija upareni su do suha zagrijavanjem na vodenoj kupelji kod 50 °C. Nakon uparavanja suhi ostatak otopljen je u smjesi otapala CHCl_3 :MeOH (2:1 v/v).

Na filtrat epidermisa koji je ostao nakon izdvajanja od matičnice dodana je otopina NaOH, $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ u MeOH:H₂O (10:1 v/v) te je epidermis ekstrahiran uz stalno miješanje kod 50 °C tijekom 1 sata. Nakon ekstrakcije epidermis je profiltriran i nekoliko puta ispran s malim količinama MeOH. Ekstrakti su spojeni i preneseni u epruvete te su dodani CHCl_3 i voda tako da se konačna smjesa otapala sastojala od MeOH: CHCl_3 :H₂O (3:3:1 v/v/v). Sadržaj je centrifugiran i organska faza je prenesena u novu epruvetu i na nju je dodano 1 mL MeOH. Izdvojena organska faza uparena je zagrijavanjem na vodenoj kupelji kod 50 °C te je suhi ostatak otopljen u 1 mL smjese otapala CHCl_3 :MeOH (2:1 v/v).

3.4.2. Ekstrakcija pojedinih lipidnih klasa s adhezivne vrpce

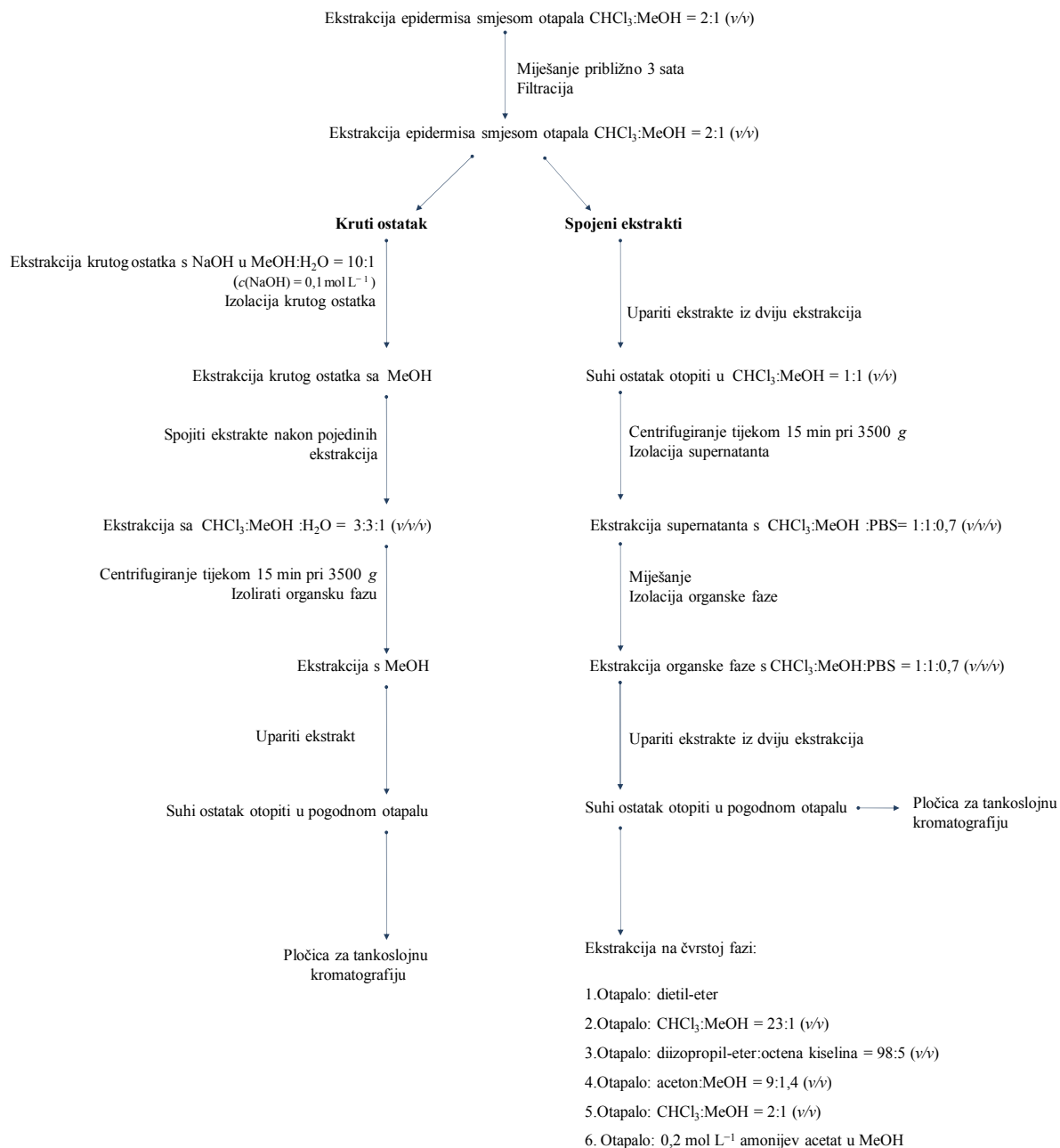
Rožnati sloj kože uzorkovan je Scotch Magic adhezivnom vrpcom ($7 \times 1 \text{ cm}^2$ Scotch[®] Magic[™] tape; 3M, Cergy-pontoise, France) koja je pričvršćena na kožu ispitanika. Rožnati sloj kože ekstrahiran je s adhezivne vrpce kod sobne temperature tijekom 5 minuta sa približno 10 mL heksana upotrebom sonikatora (Branson 220 bath sonicator, Branson, Pariz, Francuska). Nakon uklanjanja adhezivne vrpce matičnica je centrifugirana tijekom 15 min pri 3500 g. Supernatant je uklonjen i kruti ostatak (korneociti) ekstrahiran je dvjema ekstrakcijama sa

6 mL smjese otapala CHCl_3 :MeOH:PBS (1:1:0,7 v/v/v) tijekom 1 sata uz miješanje magnetskom mješalicom. Matičnica je centrifugirana tijekom 15 min pri 3500 g. Izdvojene su organske faze i prebačene u novu epruvetu. Nadalje, kruti ostatak ponovno je ekstrahiran s MeOH (3. ekstrakcija). Ekstrakti nakon pojedinih evaporacijskih koraka spojeni su i upareni zagrijavanjem na vodenoj kupelji kod 50 °C te je suhi ostatak rekonstituiran u smjesi otapala CHCl_3 :MeOH (2:1 v/v).

Na kruti ostatak u epruveti, nakon ekstrakcije slobodnih lipida, dodana je otopina NaOH, $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ u MeOH:H₂O (10:1 v/v) te je ekstrahiran tijekom 1 sat kod 50 °C. Nakon toga dodan je CHCl_3 pri čemu je nastala smjesa otapala CHCl_3 :MeOH (1:1 v/v). Sadržaj je centrifugiran tijekom 5 min pri 3500 g te je supernatant izdvojen u drugu epruvetu. Kruti ostatak nakon izdvajanja matičice su proteini koji se mogu odrediti spektrofotometrijski. Na supernatant dodana je voda te je konačna smjesa otapala iznosila CHCl_3 :MeOH:H₂O (1:1:0,7 v/v/v). Sadržaj je centrifugiran tijekom 3 minute na 3500 g te je matičnica izdvojena. Organska faza uparena je zagrijavanjem na vodenoj kupelji kod 50 °C te je suhi ostatak otopljen u smjesi otapala CHCl_3 :MeOH (2:1 v/v).

3.4.3. *Karakterizacija i separacija izoliranih lipidnih klasa primjenom tankoslojne kromatografije*

Čistoća pojedine frakcije koja je sadržavala slobodne ili vezane lipide provjerena je primjenom tankoslojne kromatografije upotrebom silikagel pločice (Merck, Darmstadt, Njemačka). Kapilarom su referentna otopina lipida i ekstrakti nanjeni na silikagel pločicu. U komoru za razvijanje dodan je CHCl_3 te je u elucijsko otapalo položena silikagel pločica nakon čega je došlo do putovanja kolesterola i slobodnih masnih kiselina. Nakon toga u komoru za razvijanje dodan je MeOH tako je konačan omjer CHCl_3 :MeOH (50:3 v/v) pri čemu dolazi do putovanja ceramida. Nakon razvijanja silikagel pločica je osušena te je prisutnost i separacija lipidnih klasa provjerena u komori sa I₂. Silikagel pločica vizualizirana je s 3 %-tnom otopinom $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COOH})_2$ u 8 %-tnoj H₃PO₄ (w/w) i inkubacijom tijekom 5 minuta kod 143 °C. Pojavom smeđih mrlja i usporedbom s komponentama iz referentne otopine utvrdila se prisutnost lipidnih klasa.



Shema 3. Izolacija pojedinih lipidnih klasa iz humanog epidermisa

3.4.4. Razdvajanje pojedinih lipidnih klasa ekstrakcijom na čvrstoj fazi

Pojedine klase lipida nakon izolacije iz humanog epidermisa separirane su ekstrakcijom na čvrstoj fazi uz upotrebu LC-NH₂ kolona volumena 3 mL (Supelco, SupelcleanTM LC-NH₂ SPE tube, 500 mg). Ekstrakti slobodnih lipida koji su bili otopljeni u CHCl₃:MeOH (2:1 v/v) upareni su zagrijavanjem na vodenoj kupelji kod 50 °C te je suhi ostatak rekonstituiran u 0,5 mL dietil-etera.

Prije upotrebe kolone su kondicionirane dodatkom 3 mL heksana. Ekstrakti lipida otopljeni u dietil-eteru nanoseni su na kolonu. Nakon adsorpcije uzorka dodano je 500 µL dietil-etera. Dodatkom novih 500 µL dietil-etera eluirali su neutralni lipidi.

Nadalje, na kolonu je nanosena dva puta po 2 mL smjese otapala CHCl₃:MeOH (23:1 v/v) pri čemu su eluirali ceramidi. Izolirana frakcija ceramida uparena je zagrijavanjem na vodenoj kupelji kod 50 °C te je suhi ostatak rekonstituiran u CHCl₃.

Nakon toga, na kolonu je nanoseno 7,5 mL smjese otapala diizopropil-eter:octena kiselina (98:5 v/v) pri čemu su eluirale masne kiseline. Izolirana frakcija masnih kiselina evaporirana je zagrijavanjem na vodenoj kupelji kod 50 °C te je suhi ostatak rekonstituiran u CHCl₃.

Četvrti eluens sastojao se od smjese otapala aceton:MeOH (9:1,4 v/v) i nanosen je dva puta po 2 mL na kolonu pri čemu su eluirali glikolipidi. Izolirana frakcija glikolipida uparena je zagrijavanjem na vodenoj kupelji kod 50 °C te je suhi ostatak otopljen u CHCl₃:MeOH (2:1 v/v).

Peti eluens sastojao se od smjese otapala CHCl₃:MeOH (2:1 v/v) i nanosen je dva puta po 2 mL pri čemu su eluirali fosfolipidi. Izolirana frakcija uparena je zagrijavanjem na vodenoj kupelji kod 50 °C te je suhi ostatak otopljen u CHCl₃:MeOH (2:1 v/v).

Šesti eluens činio je 0,2 mol L⁻¹ amonijev acetat u MeOH koji je nanosen dva puta po 1,5 mL te su eluirani anionski lipidi. U eluat koji je sadržavao anionske lipide dodano je 3 mL vode te je zagrijavan na vodenoj kupelji kod 50 °C kako bi se uklonili mogući ostaci CHCl₃. Nakon toga eluat anionskih lipida pročišćen je od soli na kopolimernoj koloni (Supelco, SupelcleanTM EnviTM-Chrom P SPE tube). Kolona je kondicionirana dodatkom 3 mL PBS-a te je nakon toga nanosen eluat anionskih lipida. Anionski lipidi eluirani su dodatkom 15 mL vode, 6 mL MeOH i 3 mL smjese otapala CHCl₃:MeOH (2:1 v/v).

3.4.5. Karakterizacija ceramida III, IIIB i VI primjenom LC-ESI-MS tehnike

Ceramidi III, IIIB i VI (Evonik Industries, Essen, North Rhine-Westphalia, Njemačka) analizirani su na HPLC Agilent 1200 Series tekućinskom kromatografu u sprezi sa Agilent 6410 spektrometrom masa s trostrukim kvadrupolom (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, USA). Spektri masa snimljeni su pri ionizaciji elektroraspršenjem u pozitivnom načinu rada. Napon kapilare iznosio je oko 2500 V, temperatura dušika 350 °C, protok dušika 6 L min⁻¹, tlak raspršivača 15 psi, *m/z* raspon 10 – 1000.

Optimiran je napon fragmentora i energija sudara za višestruke tranzicijske reakcije za CER III, CER IIIB i CER VI te su vrijednosti prikazane u Tablici 7.

Tablica 7. Uvjeti fragmentacije ceramida

Ceramid	Prekursor ion	Produkt ion	Napon fragmentora/V	Energija sudara/eV
CER III	584	282	135	20
		566		20
CER IIIB	582	282	135	20
		564		20
CER VI	600	282	135	20
		582		20

Ispitani su kromatografski uvjeti pri separaciji ceramida III, IIIB i VI na kromatografskoj koloni Synergi Hydro-RP (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Ceramidi su analizirani upotrebom gradijenta mobilne faze A (MilliQ voda i 0,1 % HCOOH) i mobilne faze B (MeOH) prema Tablici 8.

Tablica 8. Gradijent mobilne faze tijekom analize ceramida III, IIIB i VI na kromatografskoj koloni Synergi Hydro-RP

<i>t</i> /min	% B	protok/mL min ⁻¹
0	95	0,5
5	100	0,5
27	100	0,5
27,1	95	0,5
30	95	0,5

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

Koža, barijera između organizma i okoliša, kompleksnim mehanizmom zaštite i regulacijom mnogobrojnih biokemijskih funkcija doprinosi očuvanju homeostaze organizma. Rožnati sloj kože, vanjski sloj epidermisa, tvori tzv. „outside-inside“ i „inside-outside“ barijeru organizma, a ukratko se može prikazati „brick and mortar“ modelom gdje su stanice korneocita ugrađene u neprekidne lipidne dvosloje.¹⁶⁵⁻¹⁶⁶ Aminokiseline i njihovi derivati koji doprinose više od 50 % ukupnom sadržaju prirodnih čimbenika zadržavanja vlage (NMF) nastaju najvećim dijelom proteolitičkom razgradnjom proteina filagrina, strukturnog proteina bogatog histidinom (His) i glutaminom, koji je odgovoran za stabilnost i integritet kože te ima ključnu ulogu u očuvanju epidermalne barijere.^{14,20,25} NMF, ključni čimbenik u održavanju hidratacije kože²⁵⁻²⁶ također je nedavno predložen i kao fenotipski indikator tzv. „loss-of-function“ mutacija na genu za filagrin (*FLG*) koji su glavni faktor rizika za razvoj atopijskog dermatitisa (AD).²⁵⁻²⁶ Do sada provedena istraživanja ukazuju da *FLG* mutacije, kao uzrok smanjene razine NMF-a, i promjene u sastavu lipida mogu imati ključnu ulogu kod oštećene kožne barijere.^{7,29,34,97} Osim genetskih varijacija, razina NMF-a može biti uzrokovana štetnim utjecajima iz okoline kao npr. izloženost iritacijskim tvarima, UV zračenju ili smanjenoj vlažnosti zraka. Lipide rožnatog sloja kože čine kolesterol, slobodne masne kiseline i ceramidi u približno ekvimolarnim odnosima što je važno za očuvanje funkcije kožne barijere.¹⁶⁷ Promjene sastava lipida rožnatog sloja kože i smanjenje duljine lanaca dovodi do promjene lipidne organizacije te oštećene kožne barijere.^{20,168}

Više analitičkih postupaka razvijeno je za određivanje pojedinačnih komponenata NMF-a, histidina (His), piroglutaminske kiseline (PCA) i strukturnih izomera urokanse kiseline (UCA) u rožnatom sloju kao potencijalnih biokemijskih indikatora *FLG* mutacija, no međutim nijedna metoda nije uključivala istovremenu analizu His, *trans*- i *cis*-UCA, PCA i tirozina (Tyr) što daje širi uvid u njihovu ulogu u održavanju funkcije kože.^{62-64,71,81} Informacije o sastavu ceramida i masnih kiselina u rožnatom sloju relativno su ograničene i u većini slučajeva dobivene primjenom tankoslojne kromatografije,^{8,29,109,169} međutim potreba za njihovom detaljnijom karakterizacijom u većem broju uzoraka dovela je do ubrzanog razvoja metoda temeljenih na LC-MS.^{34,114,116} Iako LC-MS predstavlja korak naprijed, zbog njihovog velikog broja i raznovrsnosti te varijacije lipida rožnatog sloja kože optimiranje uvjeta pripreme uzorka, separacije i ionizacije još uvijek predstavlja veliki izazov u istraživanju ovih klasa spojeva.^{7,106,167,170}

Ovaj rad dio je šireg multidisciplinarnog istraživanja uloge kožne barijere u razvoju lokalne i sistemske toksičnosti. S obzirom na važnost i značenje NMF-a i lipida u rožnom sloju kože cilj ovog rada bio je razviti brze, pouzdane i selektivne LC-UV i LC-MS metode za njihovo određivanje u velikom broju uzoraka u svrhu procjene funkcije kožne barijere. Primjenjivost odabranih biokemijskih indikatora, napose NMF-a, testirana je na modelima normalne kože i kože oštećene uslijed unutarnjih i okolišnih faktora kao što su iritacija kemijskim reagensima, UV zračenja ili AD-a.

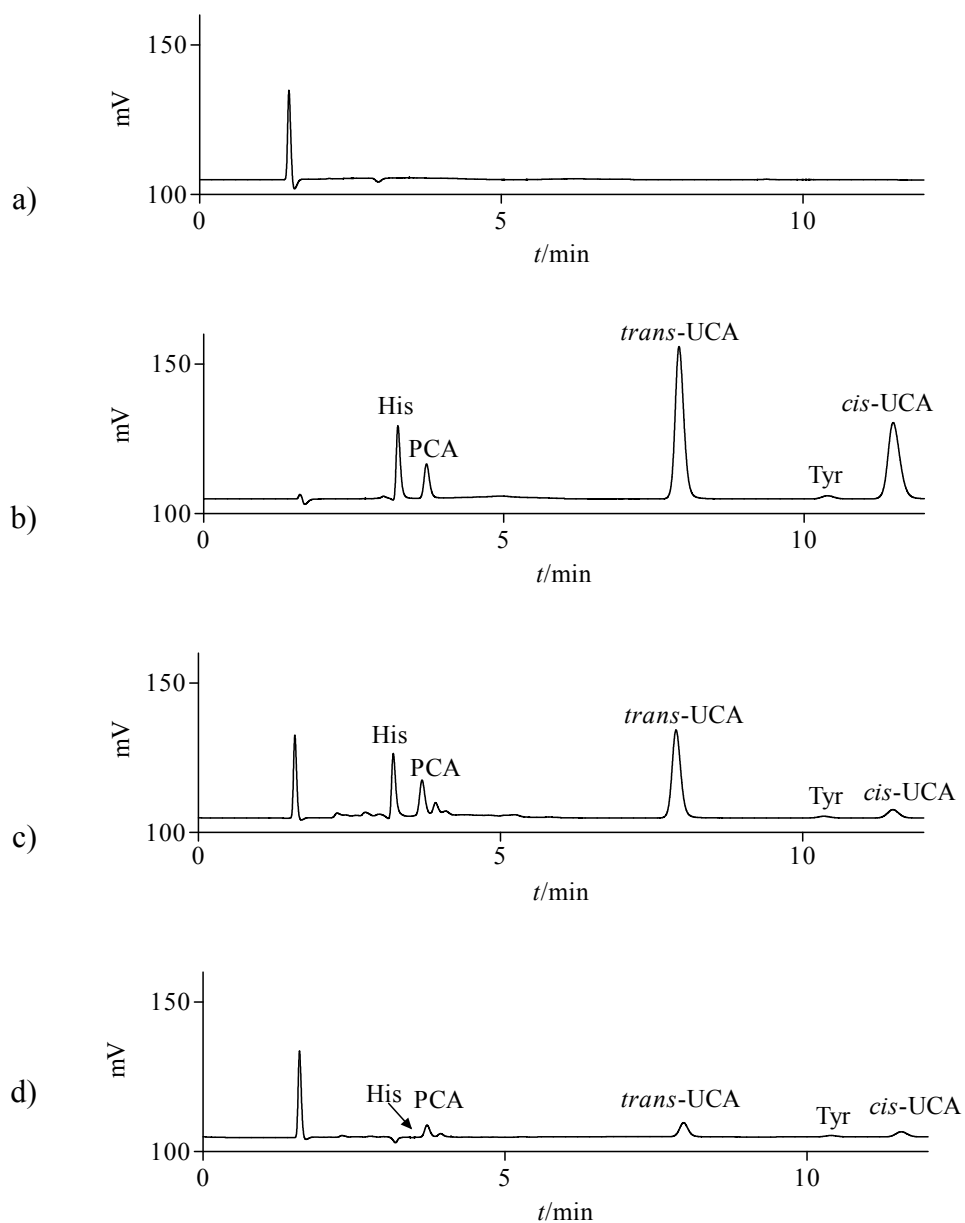
4.1. Razvoj i validacija LC metode za određivanje komponenata NMF-a

U okviru ove disertacije razvijena je RP-LC-UV metoda za istovremeno određivanje His, PCA, *trans*- i *cis*-UCA te Tyr u rožnom sloju kože. Ovih 5 komponenata NMF-a doprinose preko 50 % ukupnoj količini aminokiselina i njihovih derivata nastalih proteolitičkom degradacijom filagrina. S obzirom na zajednički prekursor, filagrin, te metaboličku međusobnu povezanost komponenata (His i UCA), važno je njihovo istovremeno određivanje u rožnom sloju kože kako bi se dobio bolji uvid u njihovu razinu s obzirom na status kožne barijere.

Tijekom razvoja i validacije metode za određivanje komponenata NMF-a ispitan je utjecaj nekoliko mobilnih faza te prikladnost nekoliko otapala za ekstrakciju komponenata NMF-a i proteina, s obzirom na važnost ekstrakcijskog postupka na rezultate analize. Dodatno je ispitana prikladnost adhezivnih vrpca dvaju proizvođača koji se široko koriste u kliničkim ispitivanjima, (D-Squame i Corneofix) kako za uzorkovanje rožnog sloja kože tako i za ekstrakciju proteina i komponenata NMF-a. Razvijena i validirana metoda uspješno je primijenjena u nekoliko kliničkih studija u kojima je ispitan utjecaj iritacijskih reagensa, UV zračenja i AD-a na razine NMF-a u rožnom sloju kože.

4.1.1. Kromatografska analiza

Komponente NMF-a uspješno su razdvojene unutar 12 minuta pri izokratičnim uvjetima elucije s mobilnom fazom koja je sadržavala natrijev oktansulfonat kao reagens za kromatografiju ionskih parova („ion-pairing“ reagens) kod vrijednosti pH = 2,1 (Slika 5.). S obzirom na nepolarnu stacionarnu fazu, kiselu mobilnu fazu i polarnost analita jasno je da će doći do njihovog kratkog zadržavanja na samoj koloni pri čemu ne dolazi do zadovoljavajuće međusobne separacije.



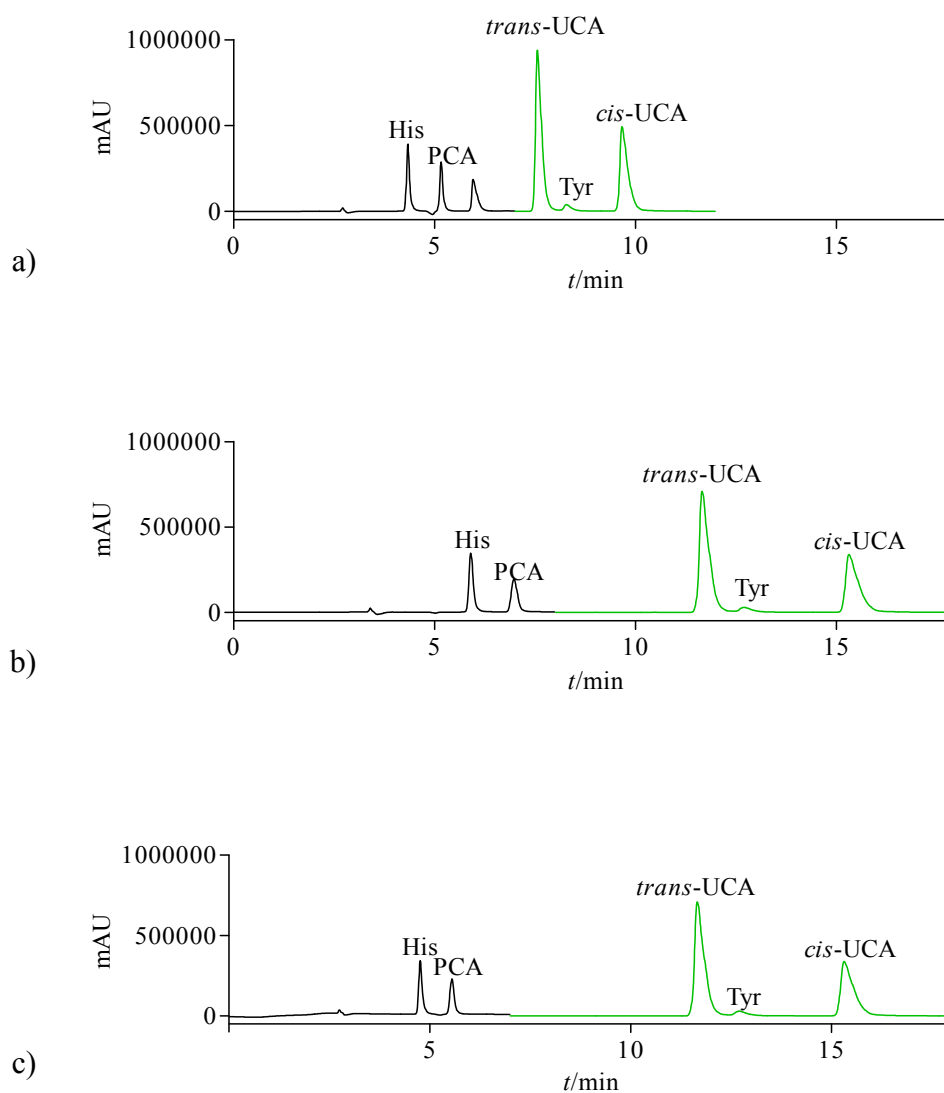
Slika 5. Prikaz kromatograma komponenata NMF-a u: a) adhezivnoj vrpce, b) standardnoj otopini, c) rožnatom sloju kože osobe koja nije nosioc mutacija gena za filagrin, d) rožnatom sloju kože osobe koja je nosioc dviju mutacija gena za filagrin. Mobilna faza sadržavala je 4,3 mmol L⁻¹ klorovodične kiseline, 2 % CH₃CN (v/v) i 0,1 mmol L⁻¹ natrijeva oktansulfonata, brzina protoka od 0,4 mL min⁻¹, λ = 205 nm (0 – 7 min), λ = 267 nm (7 – 12 min), Jasco HPLC sustav

Dodatak natrijeva oktansulfonata kao reagensa za kromatografiju ionskih parova („ion pairing“ reagens) omogućava veći afinitet analita za stacionarnu fazu kolone pri čemu se produljuje vrijeme zadržavanja, a ujedno dolazi i do boljeg međusobnog razdvajanja. pH vrijednost mobilne faze iznosila je 2,1 te s obzirom na pK_a vrijednosti His (1,8; 9,3 i 6,1), PCA (3,5), UCA (3,5; 5,8) i Tyr (2,20; 9,2 i 10,5) za očekivati je da će His imati kraće vrijeme zadržavanja na stacionarnoj fazi u odnosu na PCA, UCA i Tyr što je i potvrđeno retencijskim vremenima (Slika 5.). Komponente iz adhezivne vrpce nisu interferirale s analitima kako je prikazano analizom adhezivne vrpce bez rožnatog sloja kože (Slika 5. a). Izokratičnom elucijom mobilne faze kromatografski pikovi analita razdvojeni su do bazne linije.

Rožnati sloj kože predstavlja izrazito kompleksnu matricu koja može biti izvor normalno prisutnih interferentata (npr. mliječna kiselina, citrulin, arginin, aspartanska kiselina, serin). Utjecaj mogućih interferenata određen je ispitivanjem čistoće kromatografskih pikova u rožnatom sloju osoba s visokom i niskom koncentracijom komponenata NMF-a na HPLC sustavu HP1090 s DAD i programom Chemstation. Eksperimentalni rezultati pokazali su da je doprinos interferenata manji od 5 %.

Ispitani su kromatografski uvjeti s modificiranom organskom fazom gdje je umjesto acetonitrila (CH_3CN) upotrijebljen metanol (MeOH) (Slika 6.). Zamjena CH_3CN s MeOH uzrokovala je smanjenje intenziteta kromatografskih pikova, pri čemu je najveći utjecaj MeOH na smanjenje kromatografskog pika uočen za PCA (približno 34 %), a najmanji za His (približno 11 %). Mogućnost kvantifikacije pojedinih komponenata NMF-a prisutnih u niskim koncentracijama u uzorcima posebno je važno zbog njihove smanjene razine u nosiocima mutacija gena za filagrin. MeOH je također uzrokovao produljene kromatografske analize s 12 na 18 minuta, te je uslijed toga došlo i do proširenja kromatografskih pikova, posebno za *cis*-UCA. Također je uočeno nešto izraženije završno razvlačenje pikova („peak tailing“) kod *cis*-UCA (Slika 6. b).

Neovisno o izboru CH_3CN ili MeOH kao organske faze u mobilnoj fazi pri analizi dolazi do pojave negativnog kromatografskog pika ($t_{R-\text{CH}_3\text{CN}} = 4,94$ min i $t_{R-\text{MeOH}} = 5,02$ min, Slika 6. a i Slika 6. b koji u slučaju CH_3CN nije dovoljno razlučen od kromatografskog pika PCA.



Slika 6. Prikaz kromatograma komponenata NMF-a uz mobilnu fazu koja se sastojala od: a) $4,2 \text{ mmol L}^{-1}$ klorovodične kiseline, 2 % CH_3CN (v/v) i $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ natrijeva oktansulfonata, b) $4,2 \text{ mmol L}^{-1}$ klorovodične kiseline, 1 % MeOH (v/v) i $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ natrijeva oktansulfonata i c) $4,2 \text{ mmol L}^{-1}$ fosforne kiseline, 2 % CH_3CN (v/v) i $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ natrijeva oktansulfonata. Brzina protoka od $0,4 \text{ mL min}^{-1}$, $\lambda = 205 \text{ nm}$ (0 – 7 min), $\lambda = 267 \text{ nm}$ (7 – 12 min), HP1090-DAD sustav

S obzirom da upotrebom MeOH kao organske faze u mobilnoj fazi dolazi do pomicanja retencijskih vremena analita, u tom slučaju negativni pik ne smeta integraciji PCA. Međutim, razrjeđivanjem uzorka s otopinom koja sadržava 8,6 mmol L⁻¹ klorovodične kiseline, 4 % CH₃CN (v/v) i 0,2 mmol L⁻¹ natrijeva oktansulfonata u volumnom omjeru 1:1 smanjuje se njegov intenzitet, sužuje se širina pika čime se minimizira i njegovo interferiranje s kromatografskim pikom PCA.

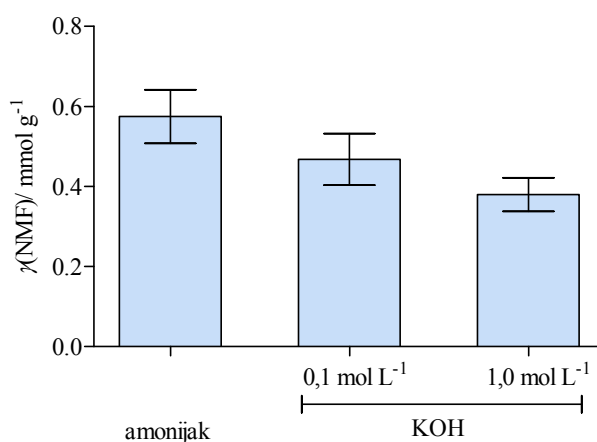
Tijekom razvoja kromatografske metode ispitana je razlika u razdvajanju komponenata NMF-a uz dodatak fosforne kiseline umjesto klorovodične kiseline u mobilnu fazu kod iste množinske koncentracije (4,3 mmol L⁻¹). Također, uočeno je da dodatak fosforne kiseline (Slika 6. c) produljuje vrijeme kromatografske analize, ali je za razliku od MeOH utjecaj fosforne kiseline nešto manje izražen. Zamjena klorovodične kiseline fosforom kiselinom ima veći utjecaj na retencijska vremena komponenata koje eluiraju kasnije, Tyr *trans*- i *cis*-UCA za razliku od MeOH koji utječe približno podjednako na sve komponente, što se može pripisati povišenoj pH vrijednosti mobilne faze uz dodatak fosforne kiseline (vrijednost pH ≈ 2,5).

S obzirom na sve navedeno kod validacije metode i za određivanje komponenata NMF-a korištena je mobilna faza koja je sadržavala 4,2 mmol L⁻¹ klorovodične kiseline, 2 % CH₃CN (v/v) i 0,1 mmol L⁻¹ natrijeva oktansulfonata.

4.1.2. Ekstrakcija komponenata NMF-a

Veliki izazov pri razvoju metode za određivanje komponenata NMF-a je izbor ekstrakcijskog otapala za kvantitativnu ekstrakciju komponenata s adhezivne vrpce, a koje je istodobno pogodno za kromatografsku analizu. Prema literaturnim podacima za ekstrakciju komponenata NMF-a koristile su se jake kiseline ili jake baze koje su zahtjevale dodatni korak neutralizacije uzorka prije same analize.^{59,61,64,78,171} Neutralizacija uzoraka dovodi do nastanka visoke koncentracije soli koja uzrokuje varijacije retencijskih vremena analize kao i smanjenu djelotvornost kromatografije. U potrazi za prikladnim otapalom za ekstrakciju komponenata NMF-a s adhezivne vrpce ispitani su amonijak (25%, w/w) i kalijev hidroksid (koncentracije 0,1 mol L⁻¹ i 1 mol L⁻¹). Nakon ekstrakcije uzoraka s kalijevim hidroksidom, a prije same kromatografske analize uzorci su neutralizirani klorovodičnom kiselinom do postizanja vrijednosti pH ≈ 7. Količina ekstrahiranih komponenata NMF-a veća je u slučaju

kada je kao ekstrakcijsko otapalo korišten amonijak u odnosu na KOH (na obje koncentracijske razine) iako razlika nije bila statistički značajna (ANOVA i Tukey post test) (Slika 7.). Prednost amonijaka kao ekstrakcijskog otapala naspram jakih baza, NaOH ili KOH koje se koriste za ekstrakciju rožnatog sloja proizlazi iz činjenice da se amonijak može upariti te nakon rekonstituiranja suhog ostatka u vodi nije potrebno uvoditi dodatni korak neutralizacije jakim kiselinom. To ne samo da skraćuje vrijeme pripreme uzoraka, već i doprinosi boljoj stabilnosti bazne linije, većoj djelotvornosti kromatografske kolone i njezinom duljem vijeku trajanja.



Slika 7. Razina komponenata NMF-a nakon ekstrakcije s amonijakom, 0,1 mol L⁻¹ KOH i 1 mol L⁻¹ KOH. Vrijednosti su normalizirane za količinu izuzetog rožnatog sloja, odnosno proteina određenih primjenom optičke denzitometrije (srednja vrijednost ± standardna pogreška, $n = 8$; ANOVA i Tukey post test).

Rezultati su pokazali da optimalno vrijeme miješanja potrebno za ekstrakciju svih komponenata NMF-a iznosi 2 sata. Također, uparavanje do suha pod sniženim tlakom i temperaturi od 30 °C nije dovelo do gubitka komponenata NMF-a (evaporacijski povrat $\geq 93 \%$, Tablica 9.). Provedene su dvije sukcesivne ekstrakcije komponenata NMF-a iz rožnatog sloja izuzetog adhezivnom vrpcom da se utvrdi dostatnost jedne ekstrakcije za njihov potpuni povrat. Iz rezultata prikazanih u Tablici 9. jasno je da se oko 84 do 93 % količine komponenata NMF-a ekstrahira amonijakom nakon prve ekstrakcije. Nešto niži rezultat postiže se kada se kao ekstrakcijsko otapalo koristi KOH pri koncentraciji od 0,1 odnosno 1,0 mol L⁻¹ (Slika 7.).

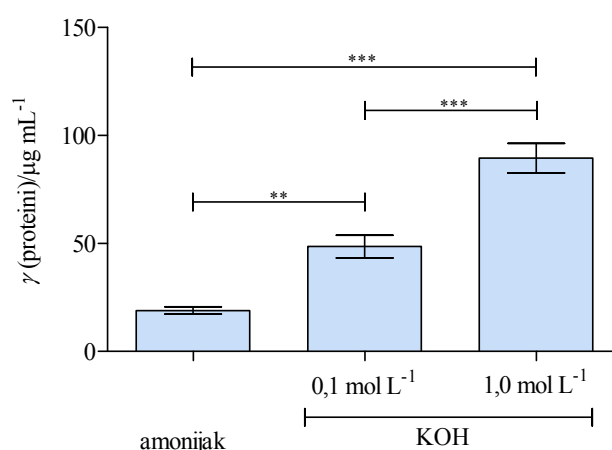
Validacijski parametri prikazani su u Tablici 9. Granica kvantifikacije iznosila je od 0,46 $\mu\text{mol L}^{-1}$ za *cis*-UCA do 1,57 $\mu\text{mol L}^{-1}$ za PCA. Ponovljivost metode iznosila je 5,8 % za His do 10,4 % za PCA na nižem koncentracijskom nivou, te od 4,2 % za *cis*-UCA do 4,9 % za His na višem koncentracijskom nivou. Ponovljivost metode kroz više dana iznosila je od 5,3% za His do 8,2 % za Tyr.

Tablica 9. Analitički parametri RP-LC-UV metode za određivanje komponenata NMF-a u rožnatom sloju

Analitički parametar	<i>N</i>	His	PCA	<i>trans</i> -UCA	<i>cis</i> -UCA	Tyr
Linearno područje ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	4	0,70 – 135	1,75 – 337	0,66 – 168	0,66 – 168	1,05 – 135
Granica kvantifikacije ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	4	0,68	1,57	0,58	0,46	1,18
Ponovljivost unutar dana (<i>RSD</i> , %)	8	5,8	10,4	7,4	8,0	8,1
Koncentracija ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		2,1	5,3	2,6	2,6	2,1
Ponovljivost unutar dana (<i>RSD</i> , %)	8	4,9	4,4	4,5	4,2	5,5
Koncentracija ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		33,7	84,2	42,1	42,1	33,7
Ponovljivost kroz više dana (<i>RSD</i> , %)	32	5,3	6,2	5,4	5,7	8,2
Koncentracija ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		33,7	84,2	42,1	42,1	33,7
Evaporacijski povrat (% $\pm$ <i>SD</i>)	5	93 $\pm$ 3,1	94 $\pm$ 3,9	95 $\pm$ 8,3	94 $\pm$ 9,3	95 $\pm$ 4,2
Ekstrakcijski povrat iz 1. ekstrakcije (% $\pm$ <i>SD</i>)	32	92,6 $\pm$ 8,7	83,7 $\pm$ 6,8	85,6 $\pm$ 6,3	87,2 $\pm$ 10,4	83,9 $\pm$ 12,6

4.1.3. Određivanje količine izuzetog rožnatog sloja

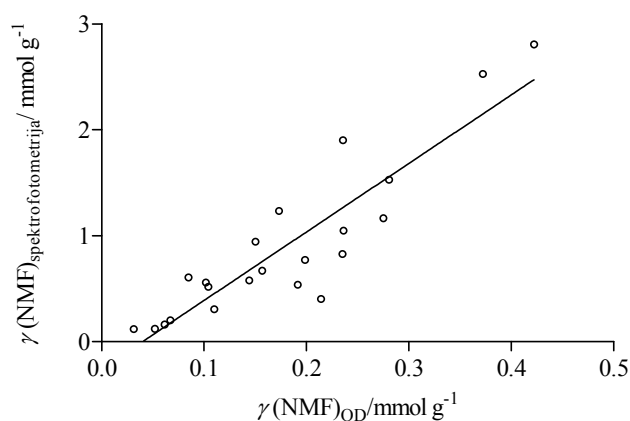
Uzorkovanje rožnatog sloja kože adhezivnim vrpcomu podložno je varijaciji količine izuzetog materijala ovisno o veličini adhezivne vrpce, koheziji rožnatog sloja kože, pritisku na vrpce, adhezivnom sredstvu, brzini izuzimanja vrpce itd.⁵⁶ stoga se količina komponenata NMF-a mora normalizirati za masu materijala izuzetog adhezivnom vrpcom. Više od 85 % mase rožnatoga sloja kože čine proteini,¹⁷² stoga je određivanje proteina najčešća aproksimacija količine izuzetog materijala. Količina ukupnih proteina najčešće se određuje primjenom spektrofotometrijskih metoda,⁵⁶ međutim potrebno je utvrditi je li otapalo odabrano za ekstrakciju komponenata NMF-a prikladno i za ekstrakciju izuzetog materijala, odnosno proteina. Iz rezultata prikazanih na Slici 8. može se vidjeti da amonijak, koji se pokazao kao najbolje ekstrakcijsko sredstvo za komponente NMF-a, ima slabiju ekstrakcijsku moć (provedena jedna ekstrakcija) u slučaju proteina u usporedbi s kalijevim hidroksidom. Količina ekstrahiranih proteina je otprilike 2,5 puta manja nego kada se kao ekstrakcijsko otapalo koristi 0,1 mol L⁻¹ KOH odnosno skoro 5 puta manja ako se ekstrakcija provodi s 1 mol L⁻¹ KOH. Slaba ekstrakcijska moć amonijaka očita je i iz podatka o koncentraciji proteina iz druge ekstrakcije (24,0 ± 11,7 mol L⁻¹) koja je bila slična koncentraciji proteina iz prve ekstrakcije (26,0 ± 10,5 mol L⁻¹).



Slika 8. Usporedba ekstrakcije proteina rožnatoga sloja kože uz različita otapala (srednja vrijednost ± standardna pogreška, $n = 8$), ANOVA i Tukey post test, ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

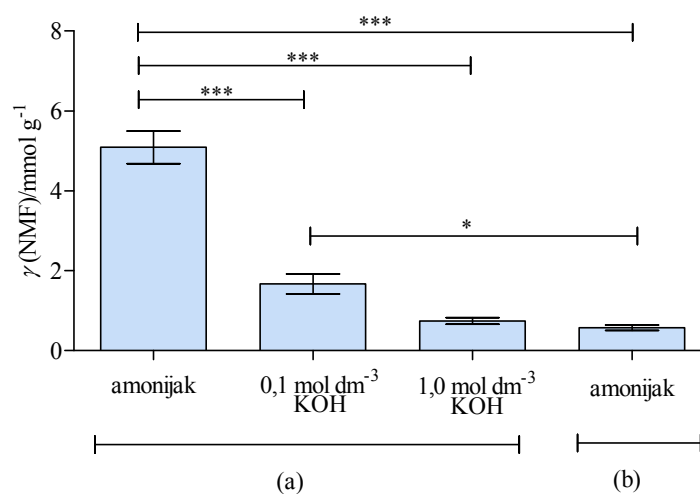
Nakon ekstrakcije adhezivne vrpce amonijakom vidljiv je ostatak materijala rožnatog sloja kože na adhezivnoj vrpci, neovisno o njezinoj vrsti (D-Squame ili Corneofix), koji upućuje na činjenicu da proteini nisu u potpunosti ekstrahirani. Stoga, očito je za određivanje proteina potrebno primijeniti drugi pristup ukoliko se amonijak koristi za ekstrakciju komponenata NMF-a. Druga mogućnost određivanja proteina je primjenom optičke denzitometrije (OD) pri čemu se mjeri apsorpcija rožnatog sloja kože izravno na adhezivnoj vrpki kod 850 nm, a rezultat mjerenja izravno je proporcionalan količini proteina. Metoda je opisana u literaturi, a količina proteina određena optičkom denzitometrijom pokazuje značajnu korelaciju s proteinima određenim spektrofotometrijski nakon ekstrakcije s NaOH.^{57-58,163}

Primjenjivost određivanja količine materijala rožnatog sloja optičkom denzitometrijom ispitana je korelacijom proteina određenih spektrofotometrijski nakon ekstrakcije amonijakom i onih izračunatih iz podataka dobivenih optičkom denzitometrijom (Slika 9.). S obzirom na vrijednost korelacijskog koeficijenta ($r_{\text{Pearson}} = 0,90$), optička denzitometrija pokazala se kao prikladna alternativa spektrofotometrijskim metodama kod koje određivana količina proteina nije ovisna o ekstrakcijskom otapalu.



Slika 9. Korelacija razina komponenata NMF-a normaliziranih za proteine određene optičkom denzitometrijom i spektrofotometrijski ($r_{\text{Pearson}} = 0,90$; $n = 22$).

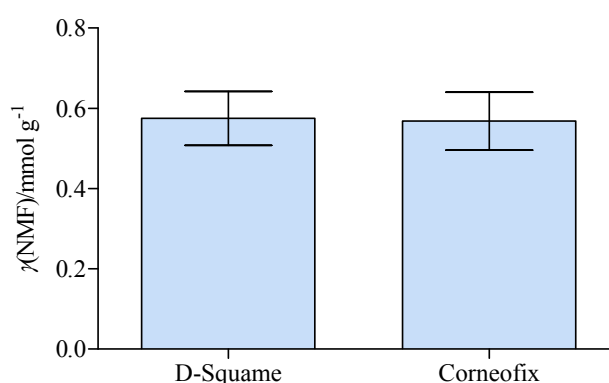
Izravna posljedica djelomičnog ekstrakcijskog povrata proteina iz prve ekstrakcije je 5 puta veća razina komponenata NMF-a normaliziranih za proteine (Slika 10.). Rezultati također ukazuju da $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KOH nema dostatnu moć za ekstrakciju proteina u usporedbi s količinom proteina određenih primjenom optičke denzitometrije, dok su jedino normalizirane razine komponentata NMF-a uz upotrebu 1 mol L^{-1} KOH kao ekstrakcijskog sredstva usporedive s onima normaliziranim za proteine određene primjenom OD-a.



Slika 10. Razine komponenata NMF-a ekstrahiranih s amonijakom ili KOH normaliziranih za proteine koji su određeni: a) spektrofotometrijski i b) primjenom OD-a (srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška, $n = 8$; ANOVA i Tukey post test, * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$)

4.2. Utjecaj različitih adhezivnih vrpca na uzorkovanje komponenata NMF-a

Uzorkovanje rožnatog sloja kože moguće je uz više komercijalno dostupnih adhezivnih vrpca te je pokazano da uzorkovanje rožnatog sloja kože može varirati ovisno o upotrijebljenoj vrsti adhezivne vrpce i proizvođaču.^{54,173-174} U kliničkim studijama najčešće se koriste D-Squame i Corneofix adhezivne vrpce, stoga su ispitane njihove moguće razlike u uzorkovanju rožnatog sloja kože i ekstrakciji komponenata NMF-a primjenom razvijene RP-LC-UV metode (Slika 11.).



Slika 11. Razine komponenata NMF-a nakon ekstrakcije amonijakom normalizirane za proteine određene primjenom OD-a u izuzetom rožnatom sloju pomoću D-Squame i Corneofix adhezivnih vrpca (srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška, $n = 8$), Studentov t -test; $P = 0,3$.

Eksperimentalni podaci pokazali su da nema značajne razlike između dviju adhezivnih vrpca s obzirom na količinu izuzetog rožnatog sloja određenu primjenom optičke denzitometrije (D-Squame, $173,9 \pm 42,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ i Corneofix, $180,1 \pm 38,6 \mu\text{g mL}^{-1}$), odnosno spektrofotometrijski nakon ekstrakcije amonijakom (D-Squame, $18,9 \pm 4,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ i Corneofix, $22,5 \pm 6,2 \mu\text{g mL}^{-1}$). Također, pokazalo se da nema razlike u razinama komponenata NMF-a ekstrahiranih amonijakom (D-Squame, $100,5 \pm 43,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ i Corneofix, $105,6 \pm 51,3 \mu\text{mol L}^{-1}$).

Sličnost u koncentracijama NMF-a nakon uzorkovanja dvjema adhezivnim vrpcama moguća je zbog sličnih fizikalno-kemijskih svojstava adhezivnog sredstva uslijed kojih bi

D-Squame i Corneofix mogli približno jednako zadržavati komponente NMF-a pri ekstrakciji amonijakom.

4.3. Primjena razvijene RP-LC-UV metode za određivanje komponenata NMF-a

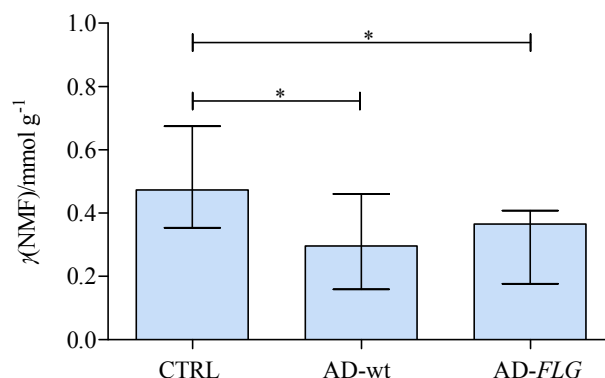
Kao što je već napomenuto, komponente NMF-a uključene su u hidrataciju, regulaciju pH, biokemijskih reakcija i aktivnosti enzima, očuvanje antimikrobne zaštite organizma te druge važne funkcije za održanje epidermalne homeostaze. Njihova kompleksna uloga u održanju funkcije kožne barijere zahtjeva mogućnost određivanja pojedinih komponenata NMF-a zbog ispitivanja utjecaja unutarnjih i okolišnih faktora na njihovu razinu u rožnom sloju.

Razvijena RP-LC-UV metoda pokazala se dovoljno osjetljivom za detekciju svih pet komponenata NMF-a i to ne samo u osobama s normalnom razinom NMF-a već i u osobama koje imaju smanjenu razinu NMF-a uslijed utjecaja unutarnjih (npr. AD i mutacije na genu za filagrin), ali i vanjskih faktora kao što su deterdženti, jake baze ili UV zračenje. Kliničke studije provedene u zadnjih tridesetak godina pokazale su da je glavni izvor aminokiselina i njihovih metabolitičkih produkata protein filagrin, čija ekspresija u koži, a posljedično i razina komponenata NMF-a, ovisi o genetskim i okolišnim faktorima.¹⁷⁵

4.3.1. Utjecaj unutarnjih faktora na razinu komponenata NMF-a u rožnom sloju kože

Poznato je da osobe koje imaju AD imaju oštećenu kožnu barijeru i na mjestima gdje se bolest vizualno ne manifestira što je, između ostalog, pokazano povećanim gubitkom vode (engl. *trans-epidermal water loss*, TEWL) te apsorpcijom lipofilnih i hidrofilnih molekula kao što su organska bojila, SLS i polietilenglikol različitih molekulskih masa.¹⁷⁶⁻¹⁷⁹ Nedavne studije pokazale su da mutacije na genu za filagrin koje uzrokuju smanjenje razine filagrina u rožnom sloju kože predstavljaju jedan od glavnih faktora rizika za razvoj AD-a, a 20 – 30 % pacijenata s AD-om također su i nosioci mutacija na genu za filagrin što doprinosi još većem smanjenju razine NMF-a u rožnom sloju kože.^{25-26,180}

Rezultati ovog rada pokazali su da pacijenti s AD-om imaju približno 20 – 30 % nižu razinu komponenata NMF-a u odnosu na zdrave osobe (Slika 12.)¹⁸¹⁻¹⁸² što je u skladu s objavljenim literaturnim podacima studija u različitim populacijama, ali i onih dobivenim primjenom drugih metoda za određivanje NMF-a, kao što je Ramanova spektroskopija.^{46,183-185}



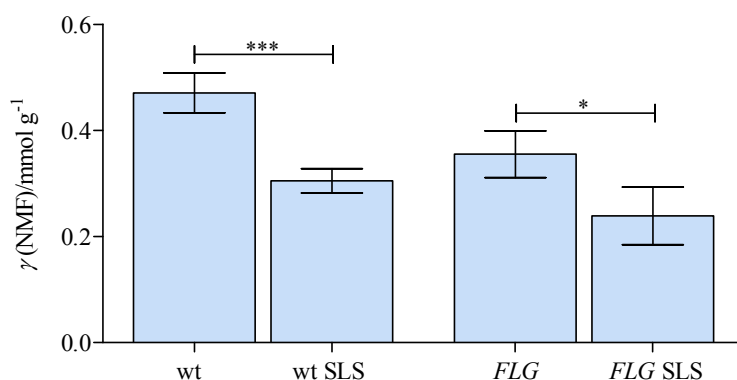
Slika 12. Razine komponenata NMF-a u rožnatom sloju ispitanika u normalnoj koži (CTRL), ispitanika s AD-om koji nisu nosioci *FLG* mutacija (AD-wt) i ispitanika s AD-om koji su nosioci *FLG* mutacija (AD-*FLG*) (medijan s interkvartilima, Kruskal-Wallis test i Dunn post test); * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,0001$ ¹⁸²

Gore navedeni rezultati mogli su se uočiti već tijekom same kromatografske analize koji su se očitovali smanjenim intenzitetima kromatografskih pikova komponenata NMF-a rožnatog sloja osoba s *FLG* mutacijama (Slika 5. c i d) što je u skladu s literaturnim podacima.^{25,46,59} U prilog hipotezi da se His, PCA, *trans*- i *cis*-UCA mogu smatrati bioindikatorima razine NMF-a ide doprinosi činjenica da je u studiji Thawer-Esmail i sur.¹⁸⁵ utvrđena značajna korelacija ukupne razine His, PCA i UCA s razinom ukupnih aminokiselina i njihovih metaboličkih produkata u rožnatom sloju kože ($P < 0,0001$, $r_{\text{Pearson}} > 0,94$; $n = 136$; neobjavljeni podaci).

4.3.2. Utjecaj alkalnih reagensa na razinu komponenata NMF-a u rožnom sloju kože

Rožnati sloj kože svojom zaštitnom ulogom sprječava prodiranje stranih tvari u unutrašnjost organizma. Svakodnevna upotreba preparata za osobnu higijenu i sredstava za čišćenje koji sadržavaju površinski aktivne tvari i iritacijske reagensa (npr. SLS) dovodi do česte iritacije kože. Izlaganje iritacijskim reagensima kao što je SLS oštećuje kožnu barijeru i može dovesti do razvoja iritacijskog kontaktnog dermatitisa.^{47,186-187} Također, SLS se upotrebljava kao najčešći model u iritacijskim testovima kože primjenom tzv. „patch testing“ tehnike pri raznim koncentracijama SLS-a.¹⁸⁸

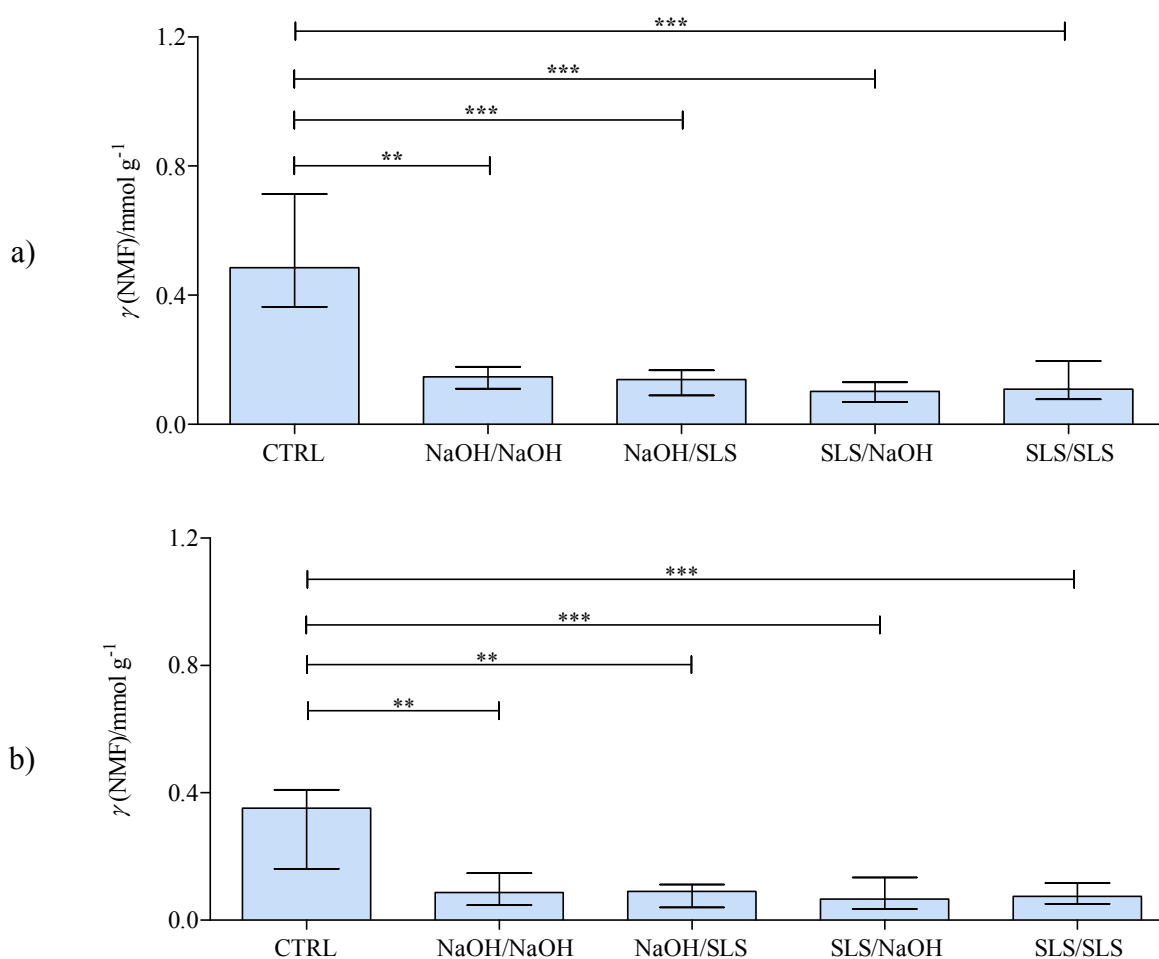
Razvijena RP-LC-UV metoda primijenjena je za određivanje utjecaja alkalnih reagensa, SLS-a i NaOH, na komponente NMF-a u rožnom sloju kože uzorkovanog adhezivnim vrpčama prije i nakon iritacije. Neovisno o prisutnosti *FLG* mutacija izloženost SLS-u (0,5 %-tna vodena otopina, w/v) kroz 4 sata uzrokovala je značajno smanjenje razine NMF-a (Slika 13.).



Slika 13. Razina komponenata NMF-a prije i nakon iritacije rožnatog sloja kože otopinom SLS-a u ispitanicima koji nisu nosioci mutacija (wt) i nosiocima mutacija za filagrin (*FLG*) normalizirane za proteine određene optičkom denzitometrijom (srednja vrijednost ± standardna pogreška). Razlike NMF-a prije i nakon SLS-a testirane su jednostranim Studentovim *t*-testom za zavisne uzorke; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ ¹⁸¹

U drugoj studiji utjecaja iritansa na funkciju kožne barijere, ispitan je utjecaj dvaju alkalijskih reagensa, SLS (0,5 % vodena otopina) i NaOH (0,15 % vodena otopina). Ispitanici (skupina s normalnom kožnom barijerom ili skupina s AD-om) bili su dva puta po 30 minuta tijekom 4 uzastopna dana izloženi slijedećim kombinacijama iritacijskih reagensa: NaOH/NaOH, NaOH/SLS, SLS/NaOH, SLS/SLS. Rezultati pokazuju da uzastopna iritacija

neovisno o upotrebi o SLS-a ili NaOH ili njihovoj kombinaciji uzrokuju značajno smanjenje razine komponenata NMF-a od približno 70 % u obje populacije (Slika 14.).¹⁸²



Slika 14. Razina komponenata NMF-a nakon uzastopne izloženosti SLS-u i NaOH kod: a) ispitanika s normalnom kožom prije (CTRL) i nakon izloženosti alkalijskim reagensima (NaOH/NaOH, NaOH/SLS, SLS/NaOH, SLS/SLS) (medijan s interkvartilima), b) ispitanika s AD-om prije (CTRL) i nakon izloženosti alkalijskim reagensima (NaOH/NaOH, NaOH/SLS, SLS/NaOH, SLS/SLS) (medijan s interkvartilima). ($n = 20$; Friedmanov test i Dunn post test, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,0001$).

Komponente NMF-a određivane su trećoj i četvrtoj uzorkovanoj adhezivnoj vrpici što odgovara dubini rožnatog sloja od otprilike 5 μm i navodi na zaključak da djelovanje alkalijskih reagensa, SLS-a i NaOH na razinu NMF-a nije ograničeno samo na površinski sloj već zadire i u dublje slojeve kožne barijere. NMF igra važnu ulogu u održavanju hidratacije kože, pa smanjenjem razine NMF-a i s druge strane povećanim gubitkom vode (povećan TEWL) rezultirat će gubitkom normalne funkcije kožne barijere. Drugim riječima, velika je vjerojatnost da će takvo stanje uzrokovati propusnost za alergene u kožu što može rezultirati nastajanjem iritacijskog dermatitisa.¹⁸⁹⁻¹⁹⁰

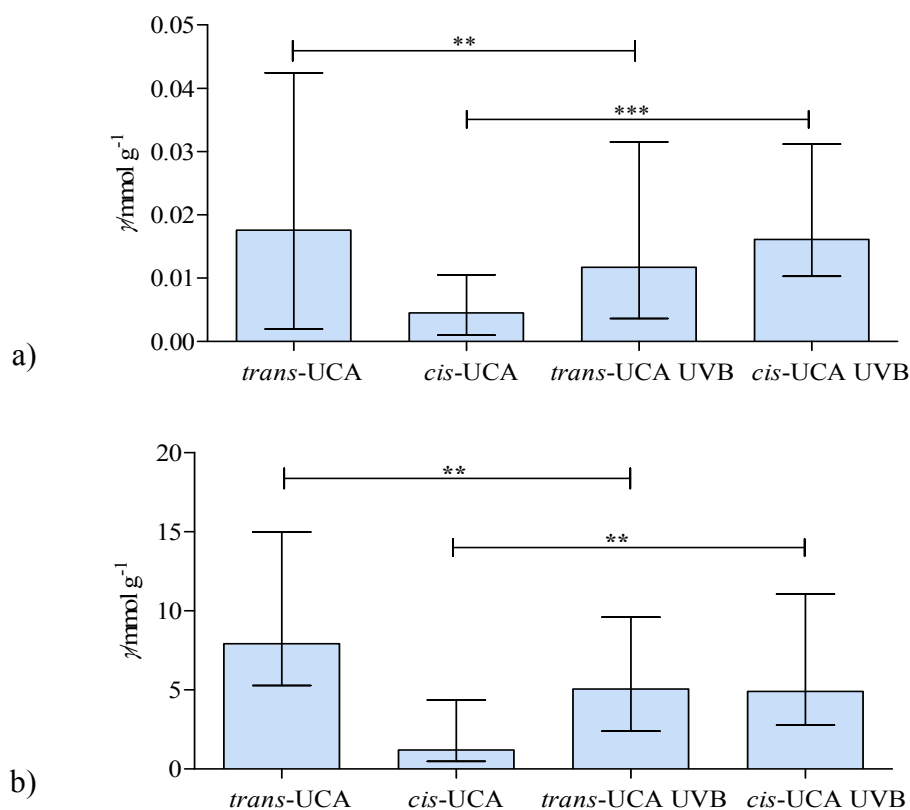
Mehanizmi kojima SLS i NaOH djeluju na smanjenje razine komponenata NMF-a u koži nisu sasvim razjašnjeni, no međutim moguće je da tijekom izloženosti dolazi do bubrenja korneocita uslijed apsorpcije vode te se uslijed promjene osmotskog tlaka mijenja permeabilnost membrane stanice, što dovodi do tzv. curenja NMF-a iz korneocita. S obzirom da je poznato da SLS reagira s membranskim proteinima korneocita moguće je da se na ovaj način stvaraju „propusniji“ korneociti.¹⁹¹⁻¹⁹³ Osim toga, SLS i NaOH kao alkalni reagensi povišuju pH kožne barijere te time mijenjaju aktivnost enzima uključenih u razgradnju profilagrina, prekursora filagrina ili pak na samu proteolitičku razgradnju filagrina u komponente NMF-a što uzrokuje smanjenje razine NMF-a.

4.3.3. Utjecaj ultraljubičastog zračenja na razinu *trans*- i *cis*-UCA u rožnom sloju kože i međustaničnoj tekućini

UV zračenje na izravan ili neizravan način uzrokuje mnogobrojne neželjene posljedice na organizam. U svrhu zaštite organizma od UV zračenja, epidermis sadržava više kromofora kao što su UCA, nukleinske kiseline, proteini, melanin itd. koji apsorbiraju UV zračenje. Apsorpcijom UV zračenja *trans*-UCA prelazi u *cis*-UCA čiji su imunosupresijski molekularni mehanizmi još uvijek predmet mnogih studija.¹⁹⁴⁻¹⁹⁶ *Trans*-UCA smatra se prirodnom zaštitom od UV zračenja te je pokazano da histidinemični miševi imaju slabiju zaštitu od UV zračenja.^{52,197-198}

RP-LC-UV metoda razvijena za određivanje komponenata NMF-a u okviru ove disertacije primijenjena je za ispitivanje utjecaja UVB zračenja na razinu *trans*- i *cis*-UCA u rožnom sloju kože i međustaničnoj tekućini. Rezultati pokazuju da je nakon primjene UVB

zračenja došlo do smanjenja razine *trans*-UCA što je rezultiralo povišenjem razine *cis*-UCA (Slika 15. a i Slika 15. b).



Slika 15. Razina *trans*- i *cis*-UCA prije i nakon UVB zračenja u: a) rožnatom sloju kože ispitanika s AD-om (medijan s interkvartilima, $n = 37$) i b) međustaničnoj tekućini epidermisa ispitanika s AD-om (medijan s interkvartilima, $n = 32$). (Wilcoxonov test usklađenih parova; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,0001$).

Topljivost UCA u vodenom mediju i oštećenje stanica uslijed apsorpcije UV zračenja mogla bi se povezati s prisustvom UCA u međustaničnoj tekućini. U više studija potvrđena je konverzija *trans*- u *cis*-UCA stoga navedeni rezultati ukazuju na mogućnost korištenja izomera UCA kao indikatora izloženosti rožnatog sloja kože UV zračenju.^{22,199-200}

4.4. Određivanje slobodnih masnih kiselina u rožnatom sloju kože

Sastav slobodnih masnih kiselina u rožnatom sloju kože prvotno se određivao upotrebom tankoslojne i plinske kromatografije^{29-30,107,150,201} u kojima su najčešće analizirane masne kiseline duljine lanca od 16 do 22 ugljikova atoma. O sastavu slobodnih masnih kiselina vrlo dugih lanaca (> C22) rožnatog sloja kože podataka je vrlo malo.^{7,29} van Smeden i sur. nedavno su razvili NP-LC-APCI-MS metodu pri negativnom načinu snimanja za određivanje masnih kiselina duljine lanaca do 36 ugljikovih atoma praćenjem signala adukata molekulskih iona s kloridnim ionima, a koju su kasnije i primijenili za njihovu karakterizaciju u oštećenoj koži.^{7,92}

U okviru ove disertacije razvijena je nova RP-LC-ESI-MS metoda koje se temeljila na derivatizaciji masnih kiselina i praćenju signala derivata višestrukim tranzicijskim reakcijama. U prvoj fazi istraživanja primijenjena je negativna ionizacija i detekcija masnih kiselina s ESI-MS. Nastanak produkata fragmentacije nederivatiziranih masnih kiselina ispitan je pri više kolizijskih energija i napona fragmentora instrumenta, no dobiveni su signali niskih intenziteta. Kako bi se povećala osjetljivost analitičke metode masne kiseline kemijski su modificirane derivatizacijom s BMP i CMP i nastali NMP derivati detektirani su u pozitivnom načinu snimanja. Tijekom razvoja analitičke metode ispitan je utjecaj nekoliko stacionarnih i mobilnih faza te količine reagensa dodanog tijekom reakcije derivatizacije na kromatografsko određivanje masnih kiselina. Razvijenom metodom analizirane su zasićene masne kiseline (C12, C14 - C28) i nezasićene masne kiseline (C18:1, C18:2) te je metoda primijenjena za njihovo određivanje u ekstraktu rožnatog sloja kože.

Polazna točka u razvoju analitičke metode bila je prilagodba derivatizacijske reakcije iz opisane metode¹⁰⁵ koja je razvijena za određivanje C10:0 do C24:0 u serumu esterifikacijom masnih kiselina s BMP i CMP uz TEA kao katalizatorom. U publikaciji je pokazano da se osjetljivost analitičke metode povećala oko 2500 puta nakon pripreve NMP derivata masnih kiselina u odnosu na nederivatizirane masne kiseline. Derivati su analizirani na LC-ESI-MS u pozitivnom načinu snimanja te je za razdvajanje upotrijebljena TFA Vydac (C4 Mass Spec, 4,6 mm × 250 mm) kromatografska kolona. Analiti su eluirali unutar 50 minuta primjenom gradijenta mobilne faze koja se sastojala od vode, CH₃CN i HCOOH.

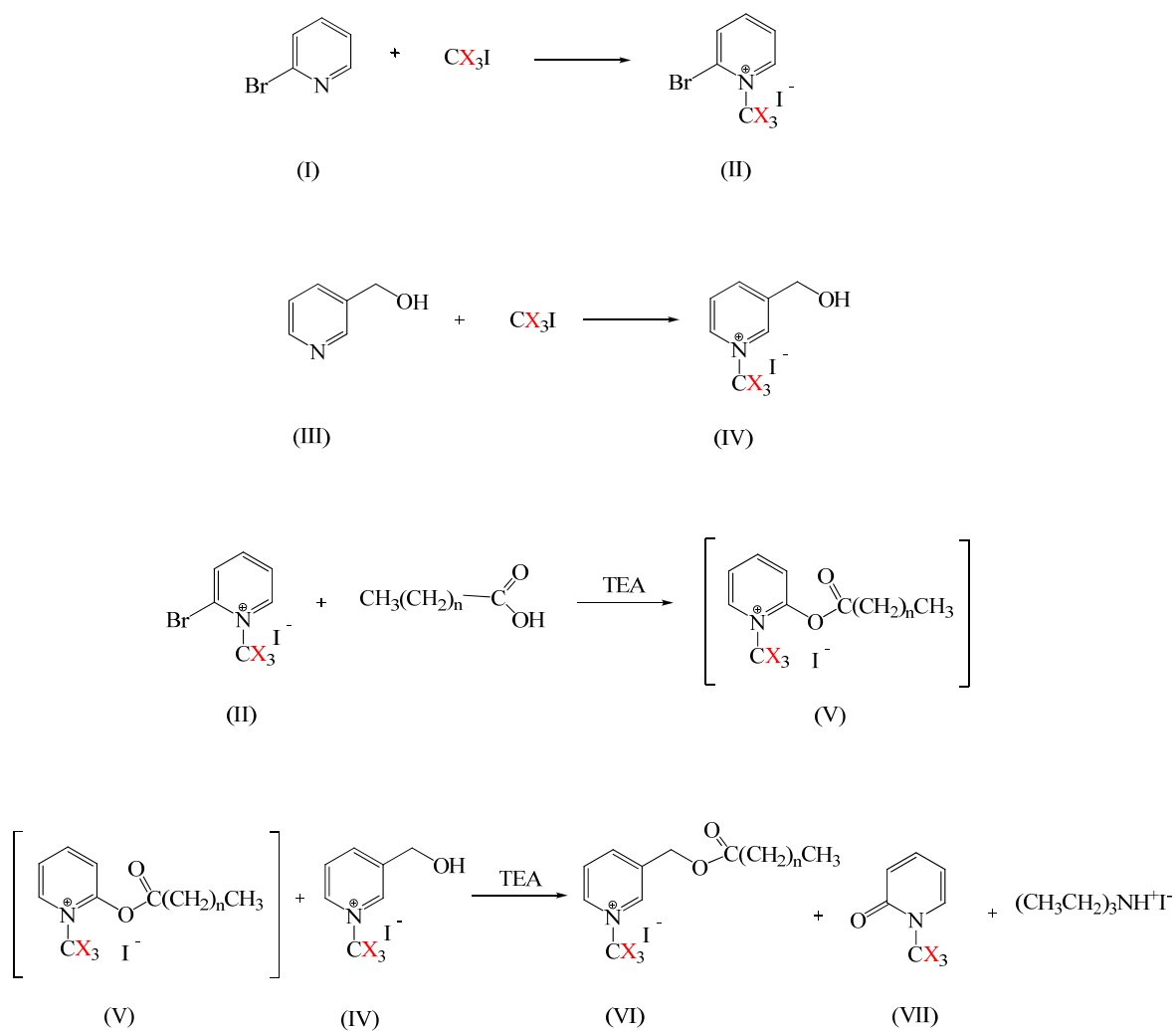
Sintezu i uvjete derivatizacije karboksilnih kiselina uz BMP i CMP opisali su prvi Mukaiyama i sur.²⁰² Derivatizaciju masnih kiselina pri čemu nastaju odgovarajući karboksilni esteri masnih kiselina među prvima je istražio Harvey te je njihova karakterizacija spektrometrijom masa opisana u nekoliko publikacija.¹⁹⁰⁻¹⁹³ Upotrebom deuteriranih analoga derivatizacijskih reagensa, BMP-*d3* i CMP-*d3*, nastali su izotopno obilježeni NMP-*d3* derivati. Fragmentacijom derivata masnih kiselina i njihovih deuteriranih analoga uz ESI-MS dolazi do *O*-alkilnog, odnosno *O*-acilnog cijepanja veze pri čemu se nastali produkt ioni prate višestrukim tranzicijskim reakcijama.

Razvijena metoda primijenjena je za određivanje slobodnih masnih kiselina u rožnatom sloju kože izuzetom adhezivnim vrpčama. Izazov pri razvoju analitičke metode predstavljala je varijabilna ekstrakcija masnih kiselina iz same adhezivne vrpce te procjena njihovog doprinosa ukupnoj količini određenih slobodnih masnih kiselina. Također, kompleksnost matrice i njezin utjecaj na rezultate analize bili su razlogom drugačijeg pristupa određivanja slobodnih masnih kiselina od onih opisanih u literaturi.

4.4.1. Derivatizacija masnih kiselina i optimizacija radnih uvjeta

Reakcijom 2-brom piridina (I) s metil-jodidom, odnosno trideuterometil-jodidom, nastaje BMP odnosno BMP-*d3* koji su prikazani na Shemi 4. kao produkt (II). Pri reakciji 3-hidroksimetil piridina (III) s metil-jodidom, odnosno trideuterometil-jodidom, nastaje CMP odnosno CMP-*d3* koji su prikazani na Shemi 4. kao produkt (IV).

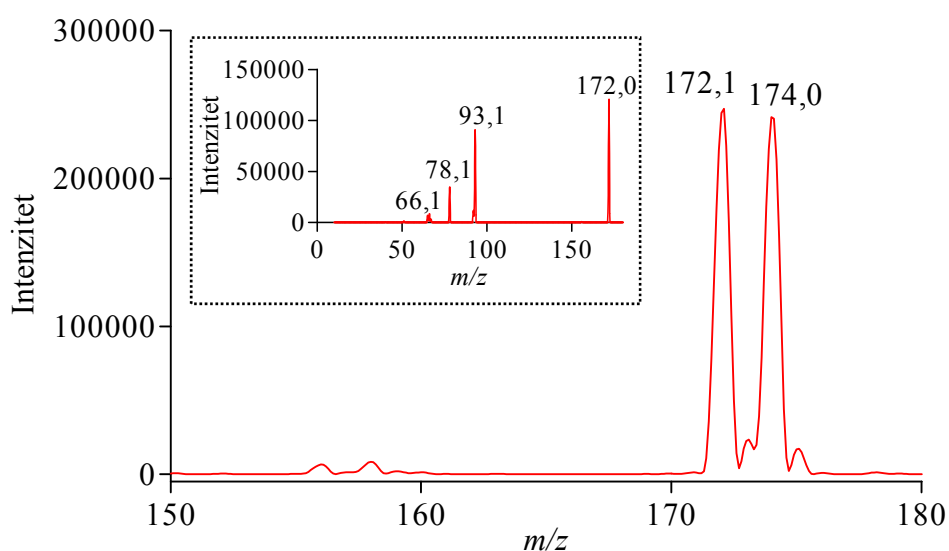
Derivatizacijom masnih kiselina s (II) i (IV) uz TEA nastaju 3-aciloksimetil-*N*-metilpiridinij jodid (NMP), odnosno 3-aciloksimetil-*N*-trideuterometilpiridinij jodid (NMP-*d3*) derivati masnih kiselina koji su prikazani na Shemi 4. kao produkt (VI). U reakciji derivatizacije masnih kiselina kao nusprodukti nastaju *N*-metil-2-piridon (VII) i trietilamonijev jodid (TEA).



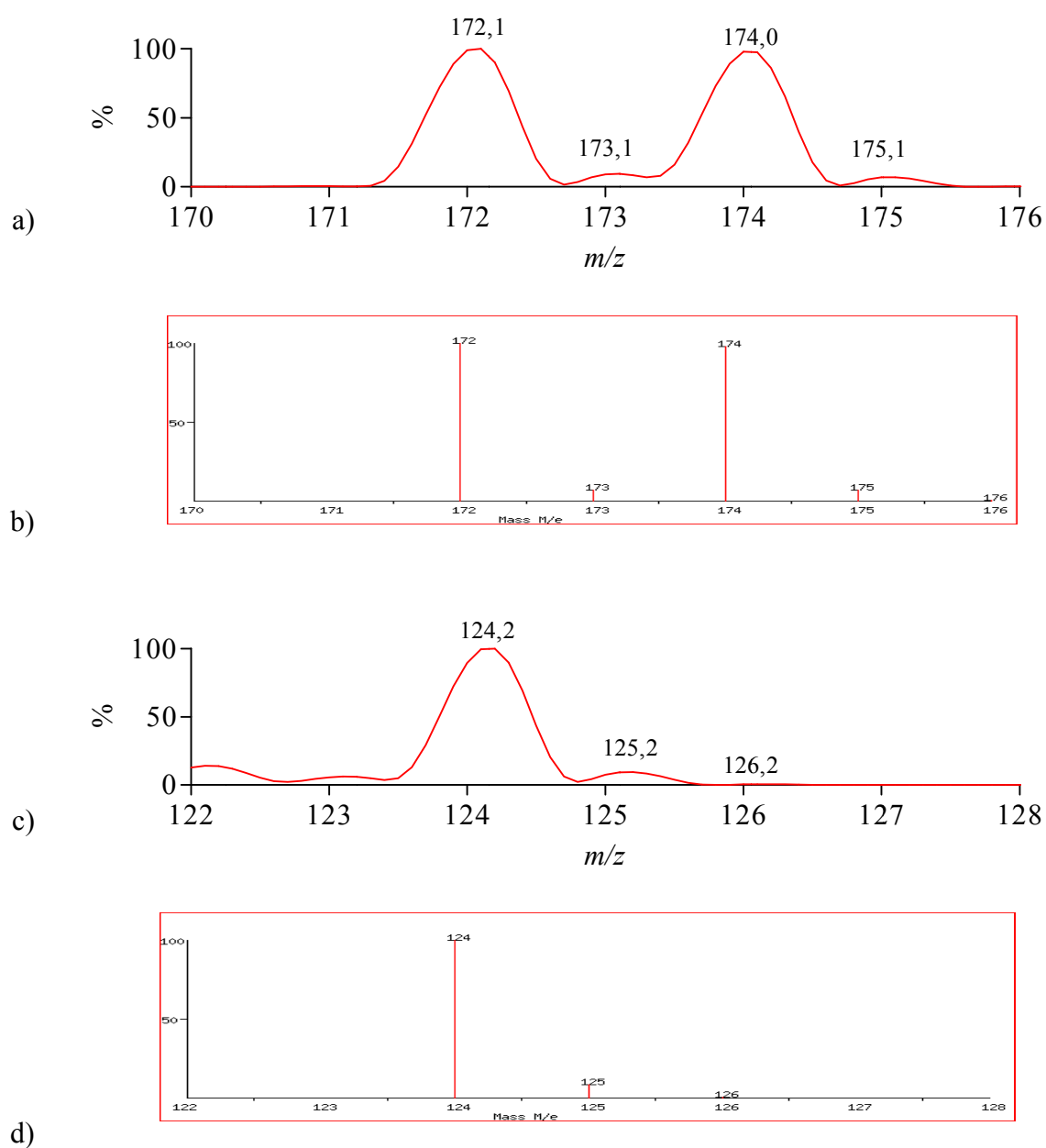
X = H ili D

Shema 4. Sinteza derivatizacijskih reagensa i derivatizacija masnih kiselina¹⁰⁵

Nakon sinteze derivatizacijski reagens BMP okarakteriziran je spektroskopskim tehnikama ^1H i ^{13}C NMR (Prilog 1. – 4.), IR (Prilog 5.) i spektrometrijom masa. Karakterizacijom BMP uz ESI-MS spektar ukupne ionske struje pokazuje roditeljski ion koji se pojavljuje pri m/z 172,1 i 174,1 asigniran kao molekulska formula $[\text{C}_6\text{H}_7\text{NBr}]^+$ (Slika 16.). Na Slici 17. a i b prikazana je usporedba eksperimentalne i teoretske izotopne raspodjele $[\text{C}_6\text{H}_7\text{NBr}]^+$.

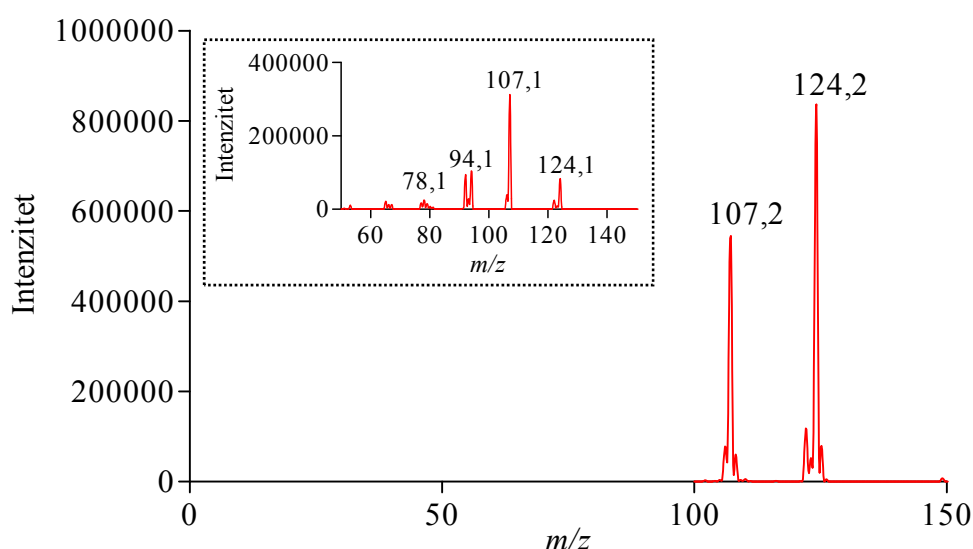


Slika 16. Kromatogram ukupne ionske struje (engl. *total ion current*, TIC) BMP (umetak: produkt ioni nastali cijepanjem m/z 172,1 asigniranog kao $[\text{C}_6\text{H}_7\text{NBr}]^+$); otapalo MeOH s 0,1 % HCOOH , napon fragmentora 135 V, energija sudara 20 eV; $c(\text{BMP}) = 25 \mu\text{mol mL}^{-1}$



Slika 17. Izotopna distribucija molekulskog iona derivatizacijskog reagensa: $[C_6H_7NBr]^+$ a) eksperimentalna, b) teoretska²⁰³; $[C_7H_{10}NO]^+$ c) eksperimentalna, d) teoretska²⁰³

Također, nakon sinteze derivatizacijski reagens CMP okarakteriziran je spektroskopskim tehnikama ^1H i ^{13}C NMR (Prilog 5. – 8.), IR (Prilog 10.) i spektrometrijom masa. Karakterizacijom CMP uz ESI-MS m/z spektar ukupne ionske struje pokazuje roditeljski ion koji se pojavljuje pri m/z 124,2 asigniran kao $[\text{C}_7\text{H}_{10}\text{NO}]^+$ (Slika 18.). Uspoređene vrijednosti eksperimentalne i teoretske izotopne raspodjele molekulskog iona $[\text{C}_7\text{H}_{10}\text{NO}]^+$ prikazane su na Slici 17. c i d.

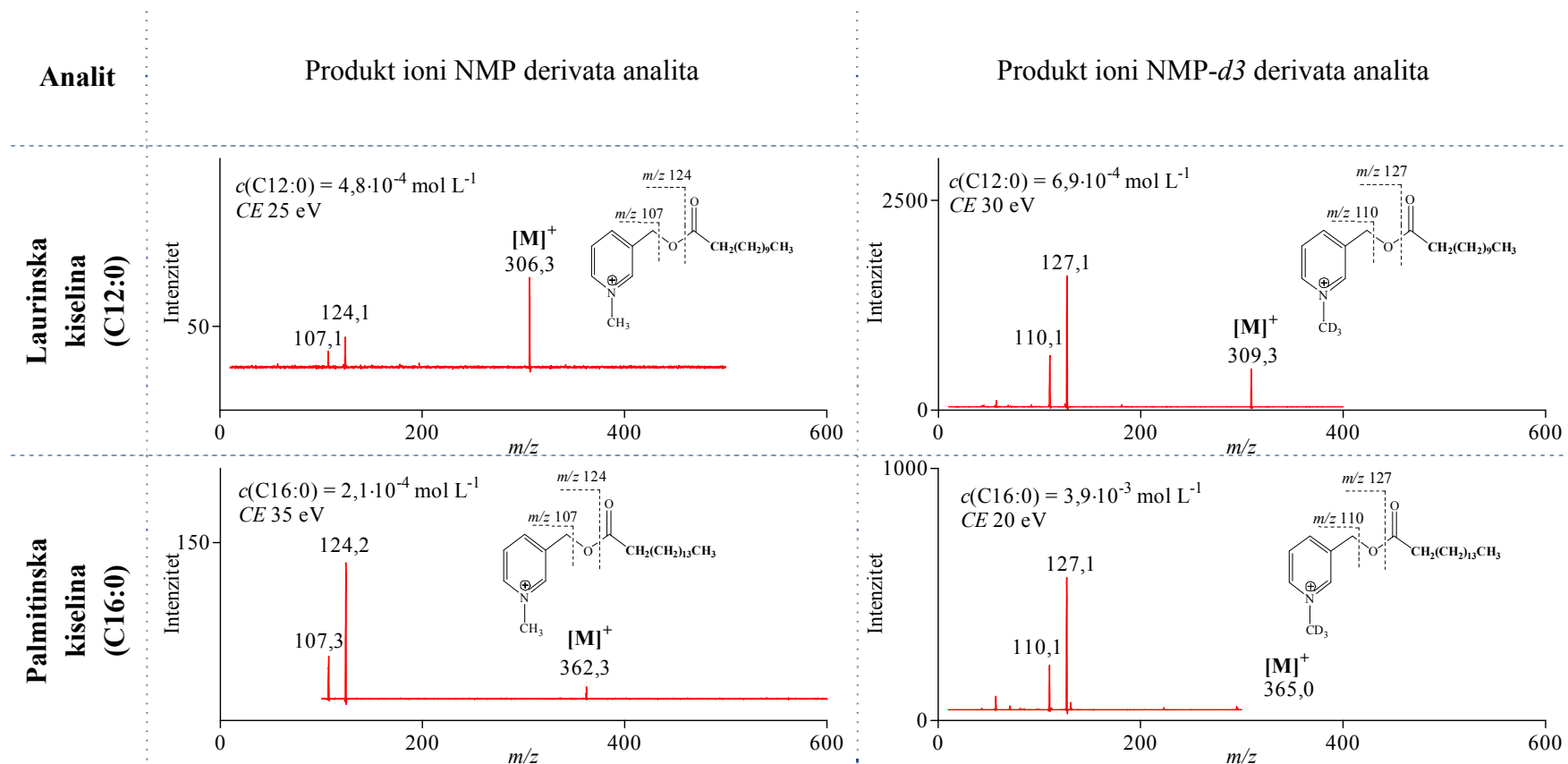


Slika 18. TIC spoja CMP (umetak: produkt ioni nastali cijepanjem signala kod m/z 124 asigniranog kao $[\text{C}_7\text{H}_{10}\text{NO}]^+$); otapalo MeOH sa 0,1 % HCOOH , napon fragmentora 135 V, energija sudara 25 eV; $c(\text{CMP}) = 100 \mu\text{mol mL}^{-1}$

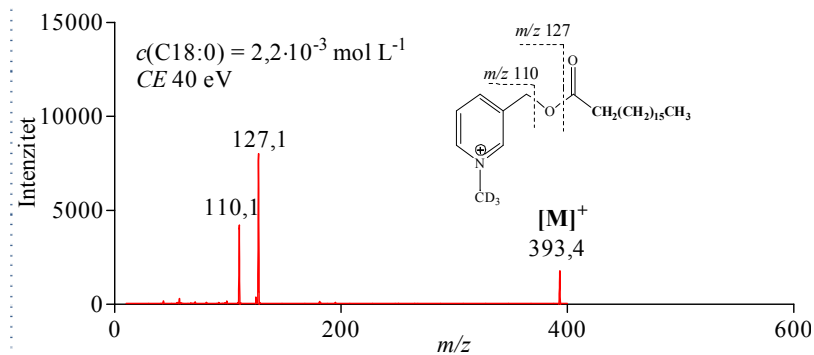
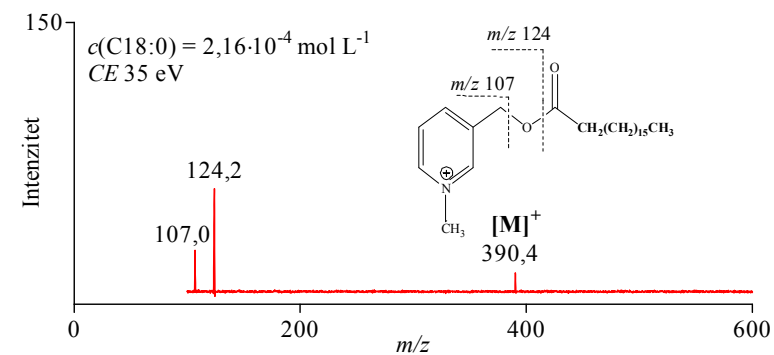
Derivatizacijom masnih kiselina uz derivatizacijske reagense (II) i (IV) nastaju NMP odnosno NMP- d_3 derivati masnih kiselina (VI). Nukleofilnim napadom karboksilne skupine masne kiseline na (II) uz TEA dolazi do odcjepljenja broma i nastaje odgovarajuća piridinijeva sol (V). Daljnjim nukleofilnim napadom (IV) na karbonilni ugljik piridinijeve soli (V) u prisutnosti TEA nastaje međuprodukt koji brzo prelazi u stabilni karboksilni ester odgovarajuće masne kiseline (VI) (Shema 4.). U literaturi je pokazano²⁰² da se ova derivatizacijska reakcija može provoditi u nizu otapala (toluen, diklormetan, dimetoksietan i piridin) u temperaturnom području od sobne temperature do temperature vrenja otapala. U okviru ove disertacije reakcija derivatizacije provedena je u suhom acetonitrilu kod 50 °C.

Derivatizacija masnih kiselina s BMP i CMP derivatizacijskim reagensima poboljšala je njihovu ionizaciju i detekciju u pozitivnom načinu snimanja uz upotrebu kisele mobilne faze potrebne za njihovu separaciju. Produkt ioni NMP derivata masnih kiselina nastali uslijed CID-a (Tablica 10.) pokazivali su zajednički fragmentacijski produkt pri m/z 107 koji odgovara *O*-alkilnom cijepanju, odnosno pri m/z 124 koji odgovara *O*-acilnom cijepanju. Analogno tome NMP-*d3* derivati masnih kiselina pokazivali su zajednički fragmentacijski produkt pri m/z 110 koji odgovara *O*-alkilnom cijepanju, odnosno pri m/z 127 koji odgovara *O*-acilnom cijepanju. Također, u spektrima produkt iona može se opaziti ion pri m/z 165 koji je rezultat McLaffertyjevog pregrađivanja (Tablica 10.).

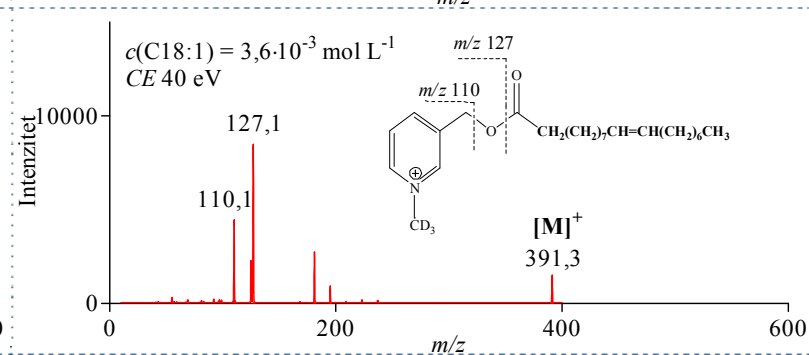
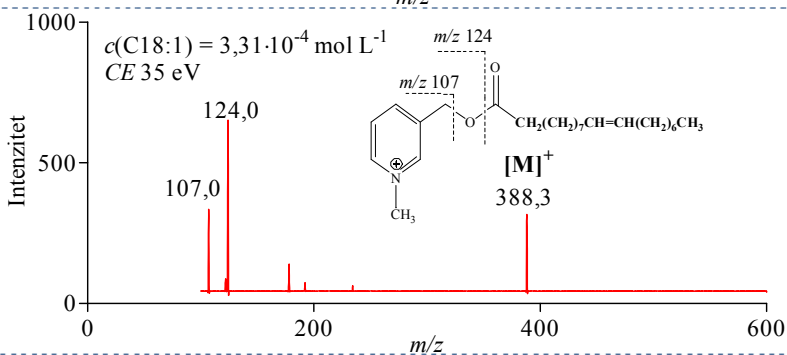
Produkt ioni nastali *O*-alkilnim, odnosno *O*-acilnim cijepanjem, pokazivali su najveće intenzitete (engl. *counts*) u fragmentacijskom spektru u odnosu na ostale produkt ione stoga su upotrijebljeni pri kvantifikaciji derivata masnih kiselina. Produkt ioni derivata masnih kiselina praćeni su višestrukim tranzicijskim reakcijama $[M]^+ \rightarrow 124$, $[M]^+ \rightarrow 107$, $[M]^+-d3 \rightarrow 127$ i $[M]^+-d3 \rightarrow 110$ gdje je $[M]^+$ roditeljski ion NMP derivata masne kiseline, a $[M]^+-d3$ roditeljski ion odgovarajućeg NMP-*d3* derivata masne kiseline. Prijelaz $[M]^+ \rightarrow 124$ pokazivao je signal višeg intenziteta stoga je upotrijebljen za kvantifikaciju, a prijelaz $[M]^+ \rightarrow 107$ za dodatnu potvrdu identifikacije analita. Analogno tome, $[M]^+-d3 \rightarrow 127$ pokazivao je signal višeg intenziteta stoga je upotrijebljen za kvantifikaciju, a prijelaz $[M]^+-d3 \rightarrow 110$ za dodatnu potvrdu identifikacije analita (Tablica 10.). Optimirane kolizijske energije kao i naponi fragmentora za pojedine tranzicijske reakcije upotrijebljeni pri razvoju metode prikazani su u Tablici 5.

Tablica 10. Produkt ioni NMP i NMP-*d*3 derivata masnih kiselina

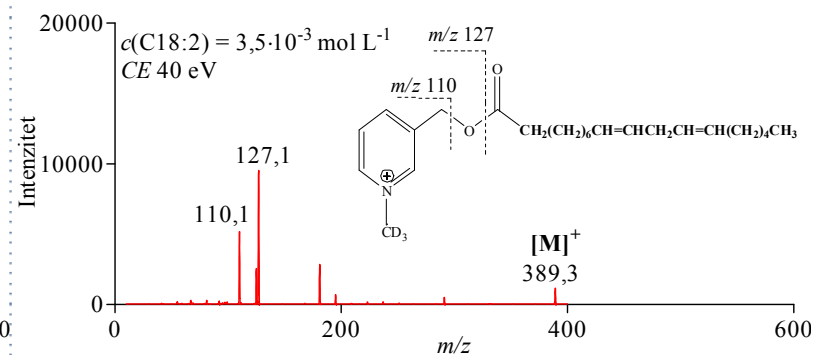
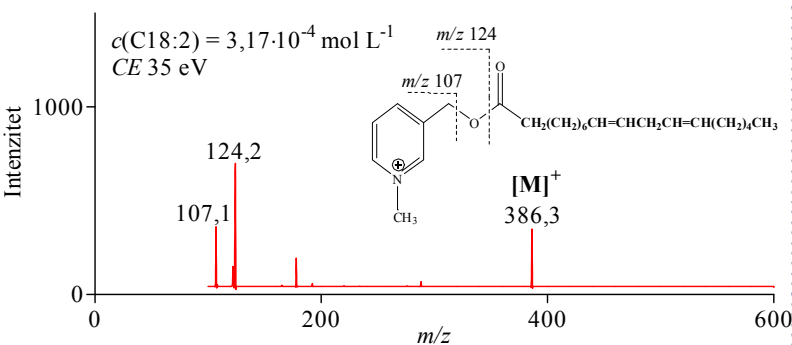
Stearinska kiselina (C18:0)



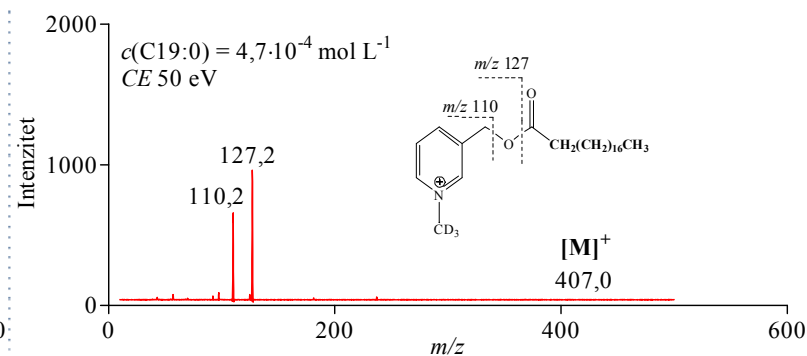
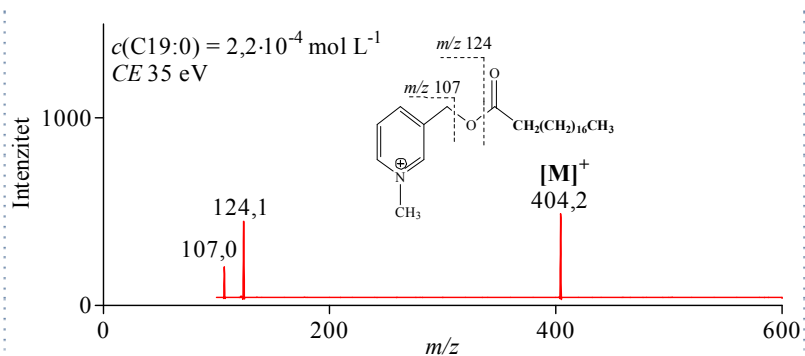
Oleinska kiselina (C18:1)



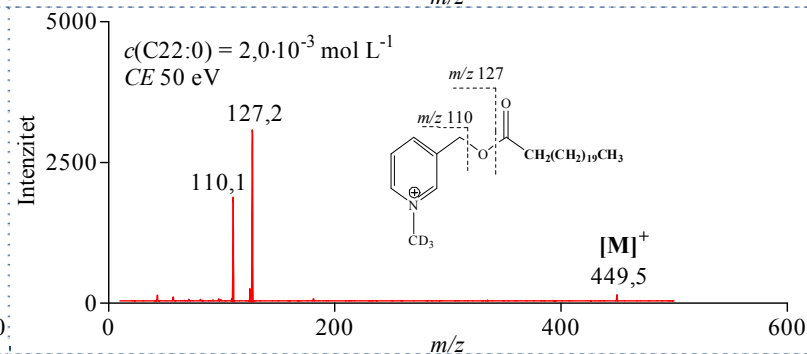
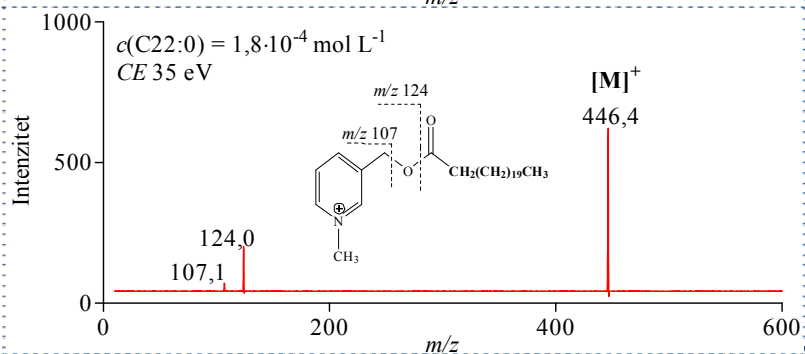
Linolna kiselina (C18:2)



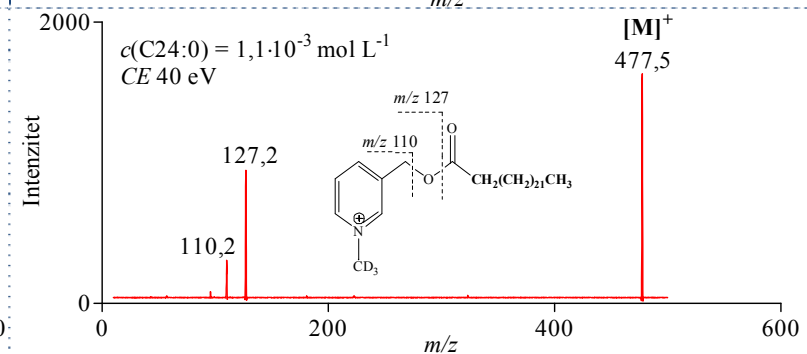
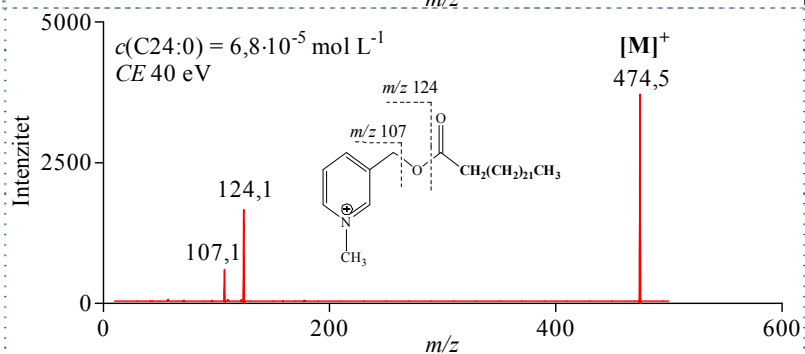
Nonadekanska

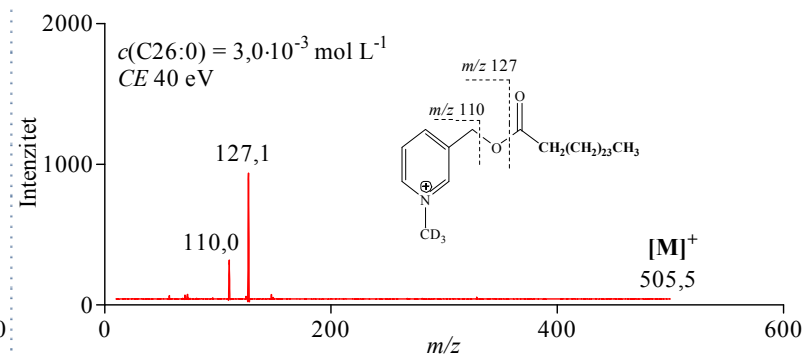
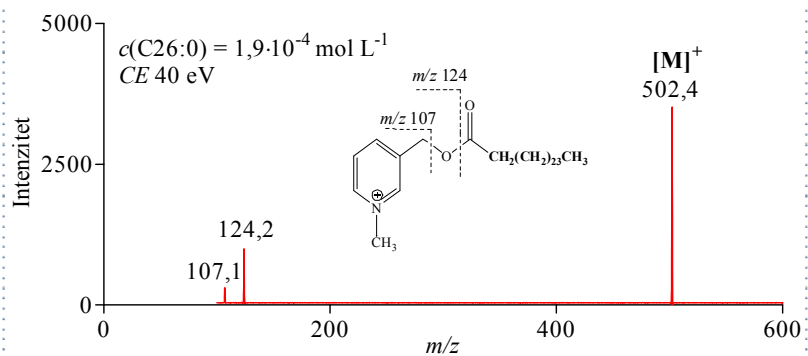
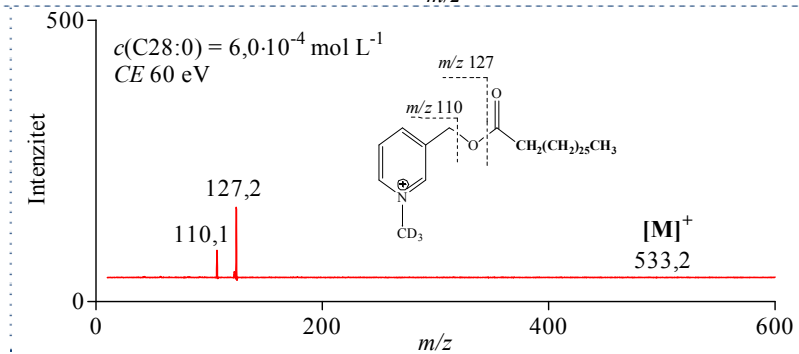
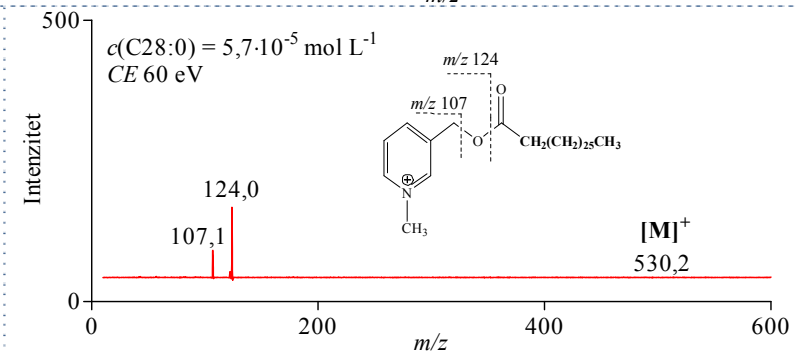
kiselina
(C19:0)

Beheninska

kiselina
(C22:0)

Lignocerinska

kiselina
(C24:0)

**Montanska
kiselina
(C26:0)****Cerotinska
kiselina
(C28:0)**

*CE kolizijska energija

Derivatizacijom masnih kiselina s BMP-*d*3 i CMP-*d*3 nastaju NMP-*d*3 derivati čiji se *m/z* roditeljskog iona i produkt iona nakon *O*-alkilnog, odnosno *O*-acilnog cijepanja razlikuje za 3 amu od NMP derivata. Razlika u *m/z* između derivata i njihovih odgovarajućih izotopnih analoga omogućila je razvoj LC-ESI-MS metode za njihovo istovremeno određivanje tijekom koelucije. Tijekom razvoja metode ispitan je utjecaj nekoliko kromatografskih kolona, sastava mobilne faze te količine dodanog BMP, CMP i TEA na kromatografiju derivata masnih kiselina. Višestruke tranzicijske reakcije prikazane u daljnjem razvoju metode praćene su prema parametrima iz Tablice 5. i uvjetima opisanim u P.3.3.8.

4.4.2. Ispitivanje utjecaja kromatografskih kolona pri razvoju LC-ESI-MS metode

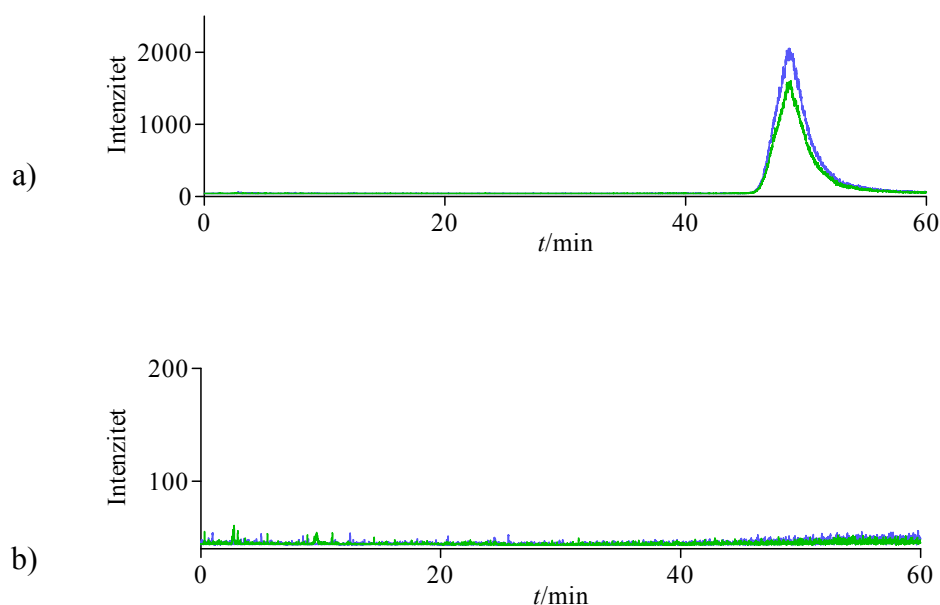
Tijekom razvoja metode za određivanje derivata masnih kiselina ispitani su kromatografski uvjeti na kromatografskim kolonama Synergy Hydro-RP (Phenomenex, Torrance, CA, USA), Zorbax Eclipse XDB-C8 (Agilent, Santa Clara, CA, USA) i Hypersil Gold (Thermo Scientific, MA, USA). Intenziteti signala NMP i NMP-*d*3 derivata masnih kiselina praćeni su višestrukim tranzicijskim reakcijama za koje su prethodno optimirani fragmentacijski uvjeti (Tablica 5.).

Prva ispitana kromatografska kolona Synergi Hydro-RP prema opisu proizvođača je deaktivirana („endcapped“) i ima slabu polarnu selektivnost kako bi se omogućilo zadržavanje hidrofobnih komponenata uslijed elektrostatskih interakcija te vodikovih veza.

Za separaciju NMP derivata masnih kiselina primijenjen je gradijent mobilne faze A (MilliQ voda i 0,1 % HCOOH) i mobilne faze B (CH₃CN) prema Tablici 11. te su kromatogrami višestrukih tranzicijskih reakcija prikazani na Slici 19.

Tablica 11. Gradijent mobilne faze pri analizi NMP derivata masnih kiselina na kromatografskoj koloni Synergi Hydro-RP

<i>t</i> /min	% B	protok/mL min ⁻¹
0	70	0,50
45	90	0,50
60	90	0,50
60,1	70	0,50
65	70	0,50



Slika 19. Kromatogrami višestrukih tranzicijskih reakcija $[M]^+ \rightarrow 124$ (plavo) i $[M]^+ \rightarrow 107$ (zeleno) na koloni Synergy Hydro-RP za: a) $c(C19:0) = 2,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, b) $c(C22:0) = 2,4 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. NMP derivati masnih kiselina eluirani su upotrebom gradijenta mobilne faze prema Tablici 11.

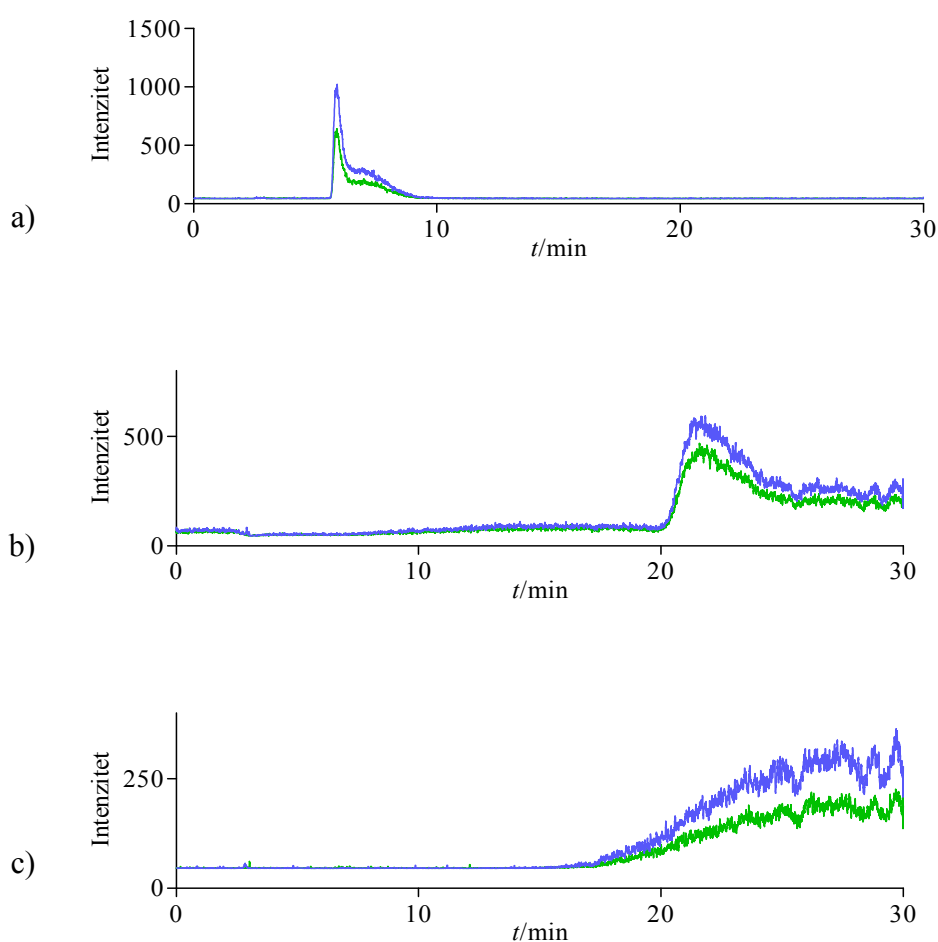
Iz Slike 19. vidljivo je da na kromatografskoj koloni Synergi Hydro-RP C19:0-NMP eluira približno oko 50 minute te da dolazi do širenja kromatografskog pika što ukazuje na predugo zadržavanje na stacionarnoj fazi kolone, dok je za eluciju C22:0-NMP bilo potrebno više od 60 minuta. Također, uočeno je da su širenje pikova i dugotrajna elucija bili izraženiji povećanjem acilnog lanca masne kiseline, dok je utjecaj na NMP derivate kraćih lanaca bio slabiji (Prilog 11.).

S obzirom na dugo vrijeme elucije derivata masnih kiselina i nezadovoljavajuću učinkovitost kromatografske kolone Synergi Hydro-RP, ispitana je prikladnost kromatografske kolone Zorbax-XDB-C8. Kolona Zorbax-XDB-C8 također je deaktivirana („endcapped“), no međutim sadržava dimetil-oktilsilanske lance (C8) koji su kraći od C18 lanaca koje sadržava stacionarna faza kromatografske kolone Synergi Hydro-RP.

Za separaciju NMP derivata masnih kiselina primijenjen je gradijent mobilne faze A (MilliQ voda i 0,1 % HCOOH) i mobilne faze B (CH_3CN) prema Tablici 12. te su kromatogrami višestrukih tranzicijskih reakcija prikazani na Slici 20.

Tablica 12. Gradijent mobilne faze pri analizi NMP derivata masnih kiselina na kromatografskoj koloni Zorbax XDB-C8

t/min	% B	protok/ mL min^{-1}
0	70	0,50
20	90	0,50
25	90	0,50
25,1	70	0,50
30	70	0,50



Slika 20. Kromatogrami višestrukih tranzicijskih reakcija $[\text{M}]^+ \rightarrow 124$ (plavo) i $[\text{M}]^+ \rightarrow 107$ (zeleno) NMP derivata masnih kiselina na koloni Zorbax-XDB: a) $c(\text{C12:0}) = 4,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, b) $c(\text{C19:0}) = 2,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, c) $c(\text{C22:0}) = 2,4 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. NMP derivati masnih kiselina eluirani su upotrebom gradijenta mobilne faze prema Tablici 12.

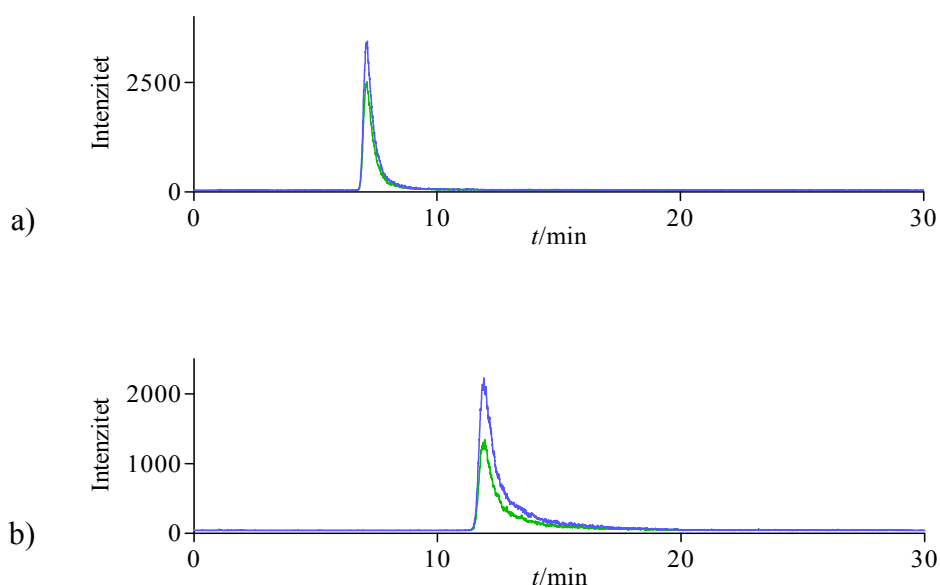
Manja hidrofobnost stacionarne faze kolone Zorbax-XDB-C8 u odnosu na stacionarnu fazu kolone Synergi Hydro-RP, očekivano je rezultirala kraćim vremenima zadržavanja NMP derivata masnih kiselina. No međutim, (Slika 20.) vidljiv je nepravilan oblik kromatografskog pikaza C12:0-NMP (tzv. “shoulder”) te je isto primijećeno za C16:0-NMP, C18:0-NMP, C18:1-NMP i C18:2-NMP (Prilog 12.). Također, uočeno je da porastom duljine acilnog lanca (C19:0-NMP i C22:0-NMP u odnosu na C12:0-NMP) dolazi do širenja kromatografskih pikova, odnosno njihove dugotrajne elucije (Slika 20.).

U svrhu poboljšanja kromatografskog određivanja ispitana je prikladnost i kromatografske kolone Hypersil Gold. Kolona Hypersil Gold također je deaktivirana (“endcapped”) te sadržava C4 lance. Zbog kraćih lanaca stacionarne faze kolona posjeduje manje hidrofoban karakter stoga pri separaciji hidrofobnih komponenata omogućava njihova kraća vremena zadržavanja. Za separaciju NMP derivata masnih kiselina primijenjen je gradijent mobilne faze A (MilliQ voda i 0,1 % HCOOH) i mobilne faze B (CH₃CN) prema Tablici 13. te su kromatogrami višestrukih tranzicijskih reakcija prikazani na Slici 21.

Tablica 13. Gradijent mobilne faze pri analizi NMP derivata masnih kiselina na kromatografskoj koloni Hypersil Gold

t/min	% B	protok/mL min ⁻¹
0	70	0,40
15	100	0,40
25	100	0,40
25,1	70	0,40
30	70	0,40

NMP derivati masnih kiselina eluirali su pri značajno kraćim retencijskim vremenima u usporedbi s onima postignutim na kromatografskim kolonama Synergi Hydro-RP i Zorbax-XDB-C8 (Slika 21.; Prilog 13.). Kraće zadržavanje NMP derivata vjerojatno je posljedica još manje hidrofobnosti, kraće duljine lanaca (C4) te manje veličine čestica stacionarne faze kolone Hypersil Gold. Osim toga, manje čestice stacionarne faze od 1,9 μm omogućavaju veću brzinu eluiranja i veću učinkovitost kromatografske kolone u odnosu na klasične kolone (veličine čestica 2,5 μm za Synergi Hydro-RP i 4 μm za Zorbax-XDB).



Slika 21. Kromatogrami višestrukih tranzicijskih reakcija $[M]^+ \rightarrow 124$ (plavo) i $[M]^+ \rightarrow 107$ (zeleno) NMP derivata masnih kiselina na koloni Hypersil Gold: a) $c(C19:0) = 4,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, b) $c(C22:0) = 3,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. NMP derivati masnih kiselina eluirani su upotrebom gradijenta mobilne faze prema Tablici 13.

Kolona Hypersil Gold pokazala se primjerenom za analizu NMP derivata masnih kiselina duljine lanca manje od 22 ugljikova atoma (Prilog 13.) čijom su primjenom kromatografski signali pokazivali zadovoljavajuće karakteristike. No međutim kako je vidljivo iz Slike 21., široki kromatografski pik od C22:0-NMP ukazuje na dugotrajnu eluciju analita i pokazuje znatan „peak tailing“ te je bilo za očekivati da će povećanjem duljine acilnog lanca masnih kiselina utjecaj biti još izraženiji. S obzirom da je cilj razvoja LC-ESI-MS analitičke metode bio omogućiti analizu masnih kiselina vrlo dugih lanaca ($> C22$), u daljnjem radu mijenjan je sastav i gradijent mobilne faze te su optimirani kromatografski uvjeti za analizu NMP derivata masnih kiselina na Hypersil Gold kromatografskoj koloni. Kako je pokazano u slijedećim primjerima odabir otapala znatno utječe na izgled kromatografskih pikova i intenzitet signala analita kao i na njihova retencijska vremena.

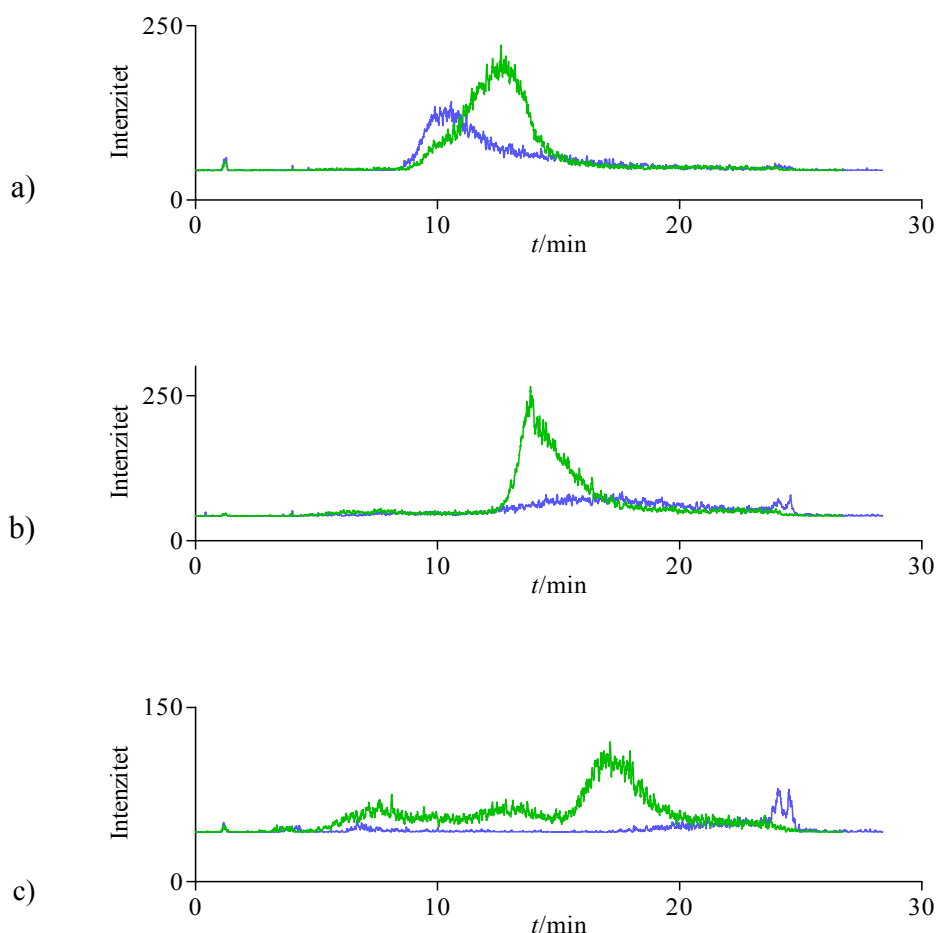
4.4.3. Ispitivanje utjecaja sastava mobilne faze pri razvoju LC-ESI-MS metode

Ispitivanje prikladnosti mobilne faze za eluciju derivata masnih kiselina obuhvaćala je niz gradijenata koji su se sastojali od mobilne faze A (MilliQ voda i 0,1 % HCOOH) i mobilne faze B (CH₃CN). NMP derivati masnih kiselina vrlo dugih lanaca (> C22) pokazivali su slab intenzitet i širenje pikova ukoliko se koristio samo CH₃CN kao mobilna faza B. Poznato je da dodatak elektrolita u otapalo (mravlja kiselina, octena kiselina, amonijev acetat) pospješuje stabilnost elektroraspršenja i potpomaže ionizaciju analita.¹³⁹ NMP derivati masnih kiselina analizirani su upotrebom gradijenta mobilne faze A (MilliQ voda i 0,1 % HCOOH) i mobilne faze B (CH₃CN ili CH₃CN sa 0,1 % HCOOH) prema Tablici 14. te su uspoređeni kromatogrami tranzicijske reakcije $[M]^+ \rightarrow 124$ prikazani na Slici 22.

Tablica 14. Gradijent mobilne faze pri analizi NMP derivata masnih kiselina na Hypersil Gold kromatografskoj koloni

<i>t</i> /min	% B	protok/mL min ⁻¹
0	60	0,35
2	90	0,35
4	90	0,45
5	100	0,45
20	100	0,45
20,1	60	0,35
25	60	0,35

Dodatak HCOOH u mobilnu fazu B najviše je utjecalo na izgled signala NMP derivata masnih kiselina vrlo dugih lanaca (> C22) gdje je došlo do sužavanja kromatografskih pikova i povećanja njihovog intenziteta (Slika 22.) dok utjecaj na analite kraćih acilnih lanaca nije bio toliko izražen (Prilog 14.).

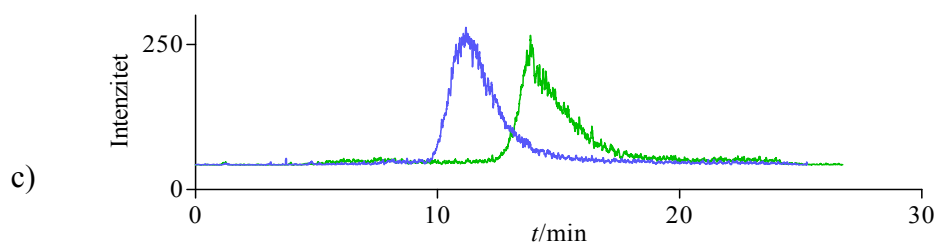
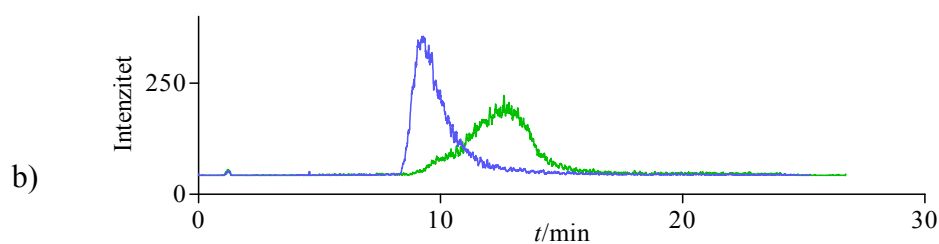
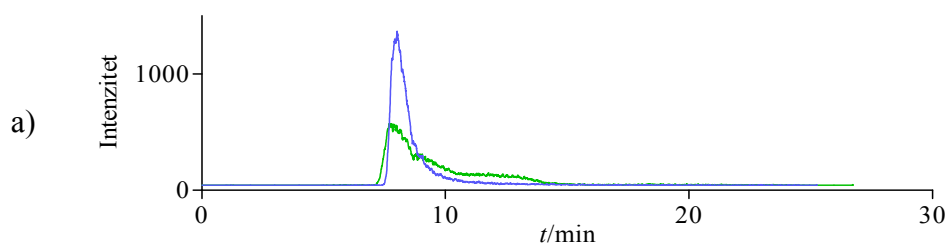


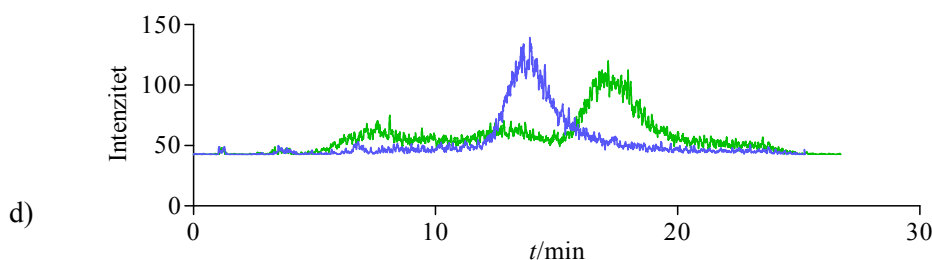
Slika 22. Kromatogrami tranzicijske reakcije $[M]^+ \rightarrow 124$ na Hypersil Gold kromatografskoj koloni: a) $c(C24:0) = 1,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, b) $c(C26:0) = 4,1 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, c) $c(C28:0) = 1,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. NMP derivati masnih kiselina eluirani su upotrebom gradijenta mobilne faze prema Tablici 14. te se mobilna faza B sastojala od CH_3CN (plavo) ili CH_3CN i 0,1 % HCOOH (zeleno).

No međutim, iako je dodatkom HCOOH u mobilnu fazu B došlo do uočljivog povećanja osjetljivosti pri detekciji C24:0-NMP , C26:0-NMP i C28:0-NMP njihova elucija trajala je do čak 4 minute (C28:0-NMP) što se očitovalo širokim kromatografskim pikom. Zbog smanjenja vremena elucije mobilna faza B modificirana je dodatkom MeOH . Ispitani su kromatografski uvjeti primjenom gradijenta mobilne faze A (MilliQ voda i 0,1 % HCOOH) i mobilne faze B s dodatkom MeOH (CH_3CN sa 0,1 % HCOOH i 10 % MeOH) prema Tablici 15. te su uspoređeni kromatogrami tranzicijske reakcije $[M]^+ \rightarrow 124$ prikazani na Slici 23.

Tablica 15. Gradijent mobilne faze pri analizi NMP derivata masnih kiselina na kromatografskoj koloni Hypersil Gold

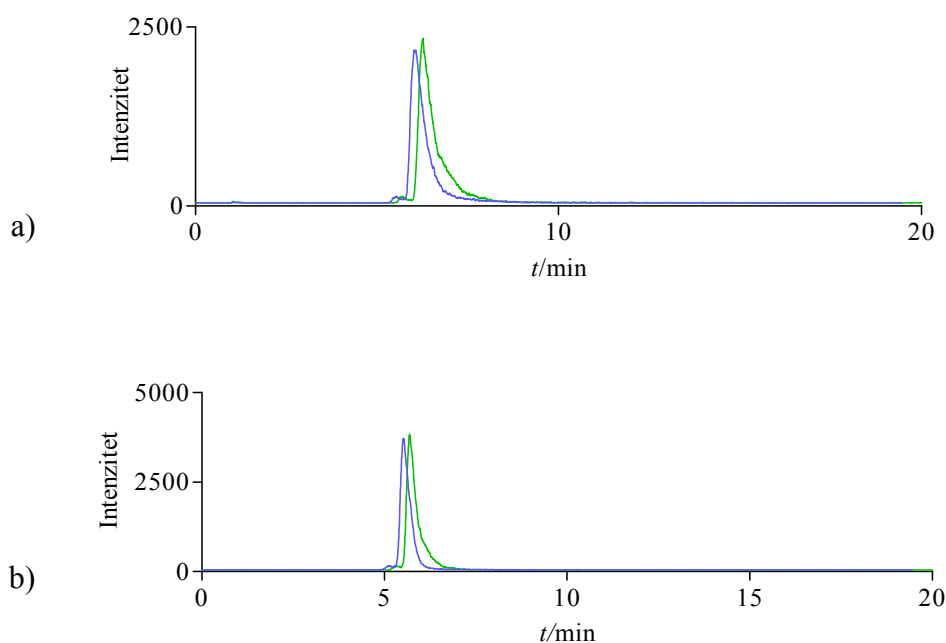
t/min	% B	protok/ mL min^{-1}
0	60	0,35
2	90	0,35
4	90	0,45
5	100	0,45
20	100	0,45
20,1	60	0,35
25	60	0,35





Slika 23. Kromatogrami tranzicijske reakcije $[M]^+ \rightarrow 124$ na Hypersil Gold kromatografskoj koloni: a) $c(C22:0) = 4,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, b) $c(C24:0) = 1,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, c) $c(C26:0) = 4,1 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, d) $c(C28:0) = 1,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. NMP derivati masnih kiselina eluirani su upotrebom gradijenta mobilne faze prema Tablici 15. te se mobilna faza B sastojala od CH_3CN sa 0,1 % HCOOH (zeleno) ili CH_3CN sa 0,1 % HCOOH i 10 % MeOH (plavo).

Ekperimentalno je pokazano da dodatak MeOH u mobilnu fazu u većini slučajeva skraćuje retencijsko vrijeme i doprinosi sužavanju kromatografskih pikova NMP derivata masnih kiselina vrlo dugih lanaca ($> C22$) (Slika 23.). S obzirom da je dodatkom alkohola (MeOH) poboljšán kromatografski signal, nadalje je ispitan utjecaj dodatka EtOH umjesto MeOH u mobilnu fazu B. NMP derivati masnih kiselina eluirani su primjenom gradijenta mobilne faze A (MilliQ voda i 0,1 % HCOOH) i mobilne faze B s dodatkom EtOH (CH_3CN sa 0,1 % HCOOH i 10 % MeOH ili CH_3CN sa 0,1 % HCOOH i 10 % EtOH) prema Tablici 15. te su uspoređeni kromatogrami tranzicijske reakcije $[M]^+ \rightarrow 124$ prikazani na Slici 24.

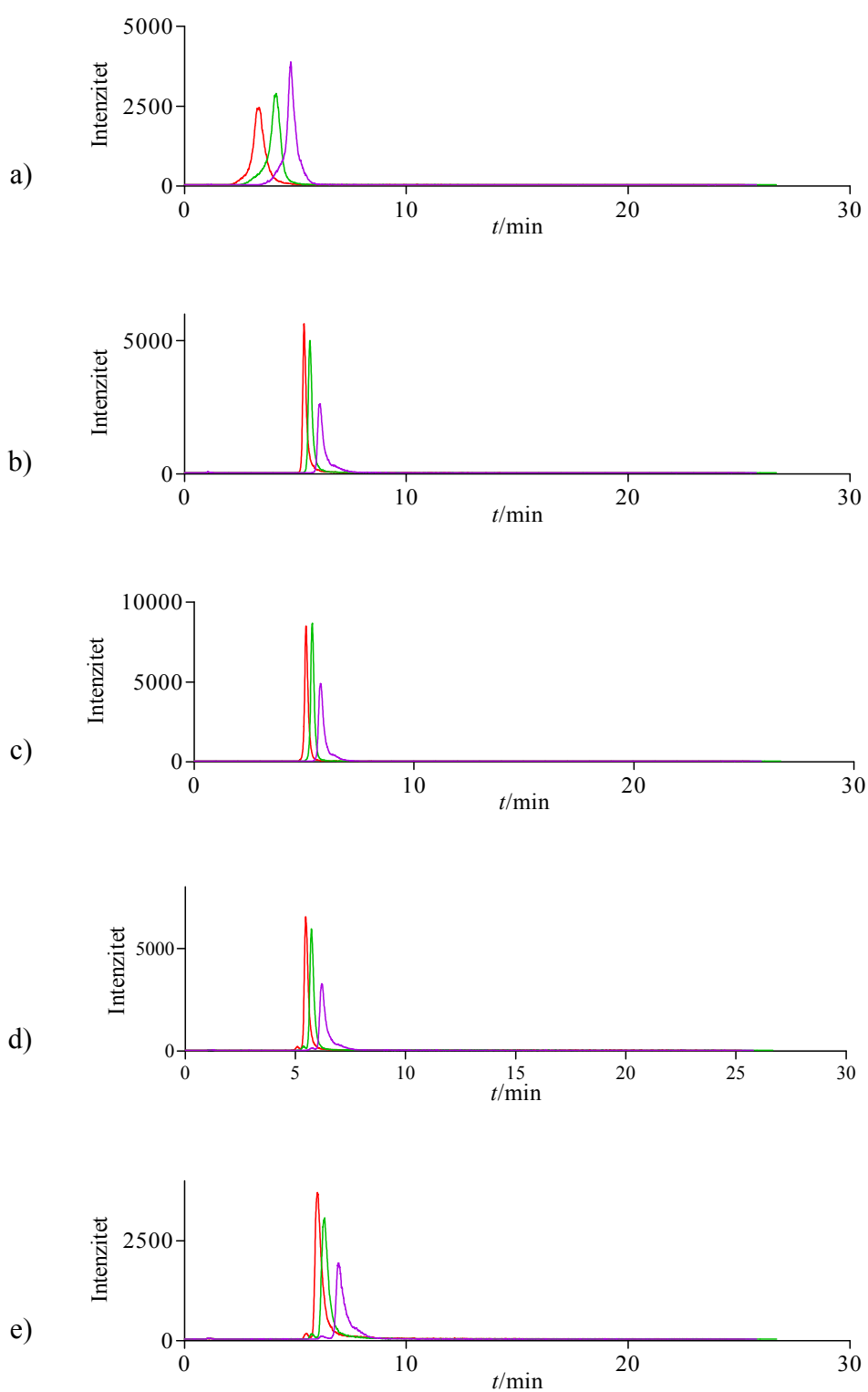


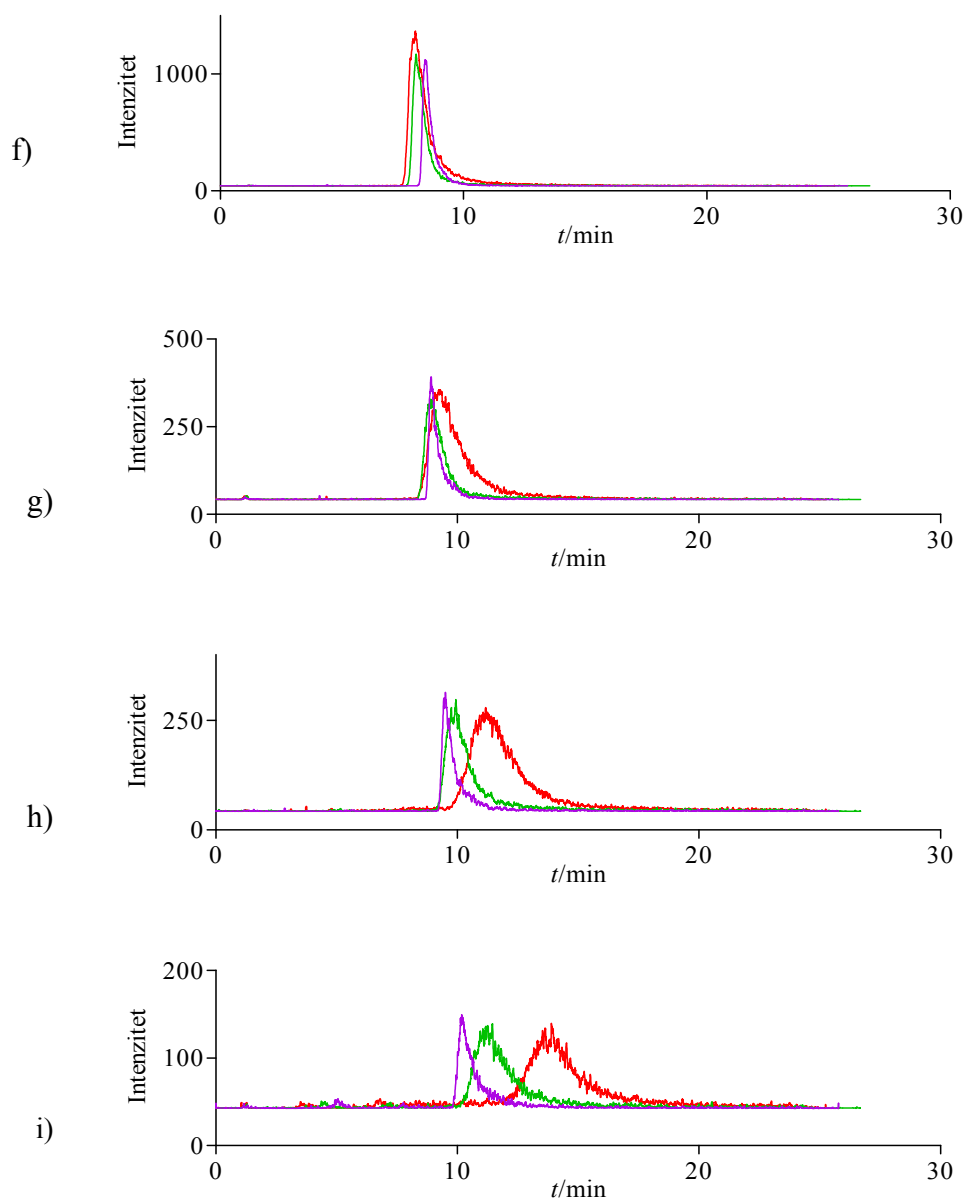
Slika 24. Kromatogrami tranzicijske reakcije $[M]^+ \rightarrow 124$ na Hypersil Gold kromatografskoj koloni: a) $c(C18:0) = 7,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, b) $c(C18:1) = 7,3 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. NMP derivati masnih kiselina eluirani su upotrebom gradijenta mobilne faze prema Tablici 15. te se mobilna faza B sastojala od CH_3CN sa 0,1 % HCOOH i 10 % MeOH (zeleno) ili CH_3CN sa 0,1 % HCOOH i 10 % EtOH (plavo).

Rezultati su pokazali da donekle bolji, iako ne znatno izražen, utjecaj na eluciju masnih kiselina ima MeOH u odnosu na EtOH koji se očitovao u povećanju visine kromatografskih pikova NMP derivata masnih kiselina kraćih lanaca ($< C22$) (Slika 24.; Prilog 16.) Moguće je da manji hidrofilni karakter EtOH omogućuje jaču adsorpciju molekula analita na stacionarnu fazu što ukazuje na manju kompetitivnu moć EtOH u odnosu na MeOH za aktivna mjesta stacionarne faze.

Eksperimentalno dobiveni podaci pokazali su da dodatak alkohola u mobilnu fazu dovodi do simetričnijih i užih kromatografskih pikova pa posljedično i na povećanje signala, što je najizraženije kod derivata masnih kiselina vrlo dugih lanaca. Poznato je da EtOH i MeOH kao protična otapala mogu stvarati polarne i ionske interakcije s s komponentama mobilne i stacionarne faze, te sekundarnim reakcijama sa stacionarnom fazom pospješuju eluciju masnih kiselina.

S obzirom da se MeOH pokazao kao pogodan modifikator mobilne faze B ispitan je utjecaj različitih koncentracija u mobilnoj fazi B na eluciju masnih kiselina. Uspoređeni kromatogrami tranzicijske reakcije $[M]^+ \rightarrow 124$ NMP derivata masnih kiselina na Hypersil Gold koloni nakon modifikacije mobilne faze B sa 10 % MeOH, 25 % MeOH i 50 % MeOH prikazani su na Slici 25. Vidljivo je (Slika 25.) da povećanjem koncentracije MeOH u mobilnoj fazi B dolazi do smanjenja visine kromatografskih pikova $\leq C22$ NMP derivata masnih kiselina te povećanja intenziteta, sužavanja i pomicanja prema kraćim retencijskim vremenima kromatografskih pikova masnih kiselina vrlo dugih lanaca ($> C22$). Uži kromatografski pikovi omogućuje njihovu lakšu integraciju i identifikaciju signala što je posebno važno pri određivanju masnih kiselina vrlo dugih lanaca.





Slika 25. Kromatogrami tranzicijske reakcije $[M]^+ \rightarrow 124$ na Hypersil Gold kromatografskoj koloni: a) $c(\text{C12:0}) = 6,8 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, b) $c(\text{C16:0}) = 4,9 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, c) $c(\text{C18:2}) = 7,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, d) $c(\text{C18:1}) = 7,3 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, e) $c(\text{C18:0}) = 4,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, f) $c(\text{C22:0}) = 4,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, g) $c(\text{C24:0}) = 1,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, h) $c(\text{C26:0}) = 4,1 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, i) $c(\text{C28:0}) = 1,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. NMP derivati masnih kiselina eluirani su upotrebom gradijenta mobilne faze prema Tablici 15. te se mobilna faza B sastojala od CH_3CN sa 0,1 % HCOOH i 10 % MeOH (crveno), CH_3CN sa 0,1 % HCOOH i 25 % MeOH (zeleno) i CH_3CN sa 0,1 % HCOOH i 50 % MeOH (ljubičasto).

Nakon ispitivanja prethodno navedenih kromatografskih kolona i optimiranja kromatografskih uvjeta analitička metoda za određivanje NMP derivata masnih kiselina razvijena je i validirana na Hypersil Gold C4 kromatografskoj koloni, dimenzija $100 \times 2,1$ mm, veličine čestica $1,9 \mu\text{m}$ uz mobilnu fazu A (MilliQ vode i 0,1 % HCOOH) i mobilnu fazu B (CH_3CN , 0,1 % HCOOH i 40 % MeOH) (Tablica 6).

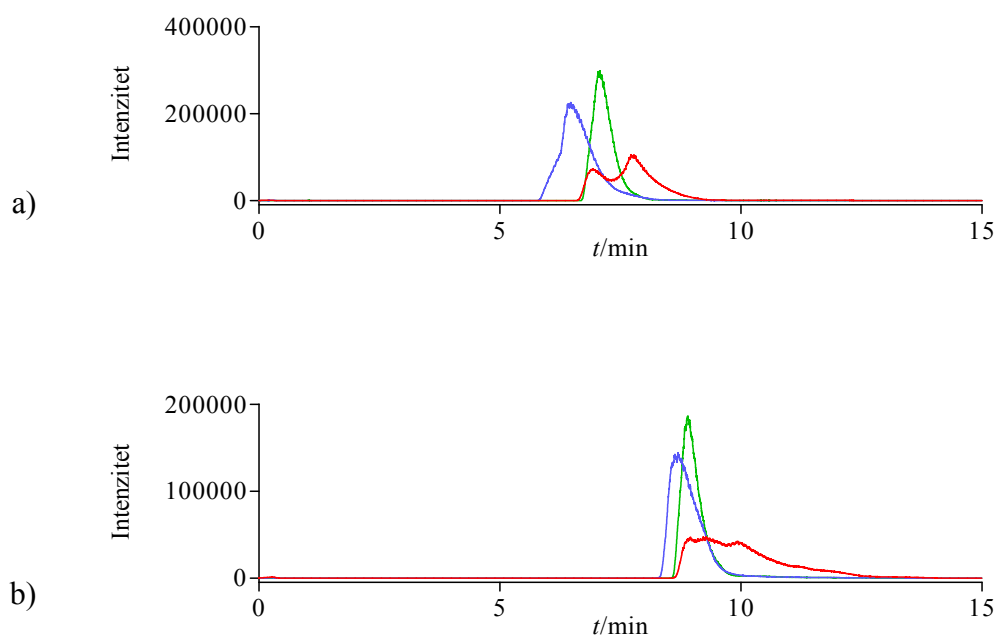
4.4.4. Ispitivanje utjecaja količine BMP, CMP i TEA na analizu derivata masnih kiselina

Osim optimiranja gradijenta i sastava mobilne faze te odabira kromatografske kolone za analizu, ispitan je utjecaj dodatka različitih količina BMP i CMP derivatizacijskih reagensa te TEA kao katalizatora reakcije derivatizacije. Eksperimentalni podaci pokazuju da su za analizu NMP derivata masnih kiselina optimalni uvjeti derivatizacije s dodatkom $200 \mu\text{L}$ BMP ($c(\text{BMP}) = 50 \mu\text{mol mL}^{-1}$) i $200 \mu\text{L}$ CMP ($c(\text{CMP}) = 200 \mu\text{mol mL}^{-1}$). Naime, iako je za NMP derivate masnih kiselina kraćih lanaca intenzitet kromatografskih pikova bio veći upotrebom manje količine BMP i CMP, veća količina BMP i CMP derivatizacijskih reagensa doprinjela je povećanju signala NMP derivata masnih kiselina vrlo dugih lanaca ($> \text{C}22$).

Tijekom derivatizacijske reakcije masnih kiselina (Shema 4.) dolazi do smanjenja količine TEA uslijed nastajanja trietilamonijeva jodida. U derivatizacijsku smjesu dodano je 1, 5 ili $10 \mu\text{L}$ TEA te su rezultati za C16:0-NMP i C18:0-NMP prikazani na Slici 26. C16:0-NMP i C18:0-NMP eluirani su gradijentom mobilne faze A (Milli Q voda i 0,1 % HCOOH) i mobilne faze B (CH_3CN) prema Tablici 16.

Tablica 16. Gradijent mobilne faze pri analizi C16:0-NMP i C18:0-NMP na kromatografskoj koloni Hypersil Gold

t/min	% B	protok/ mL min^{-1}
0	60	0,35
5	80	0,35
10	100	0,35
13	100	0,35
13,1	60	0,35
15	60	0,35



Slika 26. Utjecaj dodatka 1 μL (zeleno), 5 μL (plavo) i 10 μL (crveno) TEA za derivatizaciju masnih kiselina BMP i CMP derivatizacijskim reagensima na Hypersil Gold kromatografskoj koloni: a) $c(\text{C16:0}) = 9,6 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, b) $c(\text{C18:0}) = 9,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. NMP derivati masnih kiselina eluirani su upotrebom gradijenta mobilne faze prema Tablici 16.

Dodatkom većih količina TEA nastaju kromatografski pikovi nižih intenziteta čiji je oblik posebno nepravilan pri upotrebi 5 μL TEA. S obzirom da se katalizirajući reakciju derivatizacije TEA troši zbog nastajanja trietilamonijeva jodida, moguće je da nastala sol trietilamonijeva jodida utječe na oblik/izgled kromatografskih pikova i vrijeme zadržavanja C16:0-NMP i C18:0-NMP derivata tijekom kromatografske analize. Isto tako, moguće je da veće količine nastalog trietilamonijeva jodida supresijom ionizacije NMP derivata masnih kiselina dovode do nižih intenziteta njihovih kromatografskih pikova.

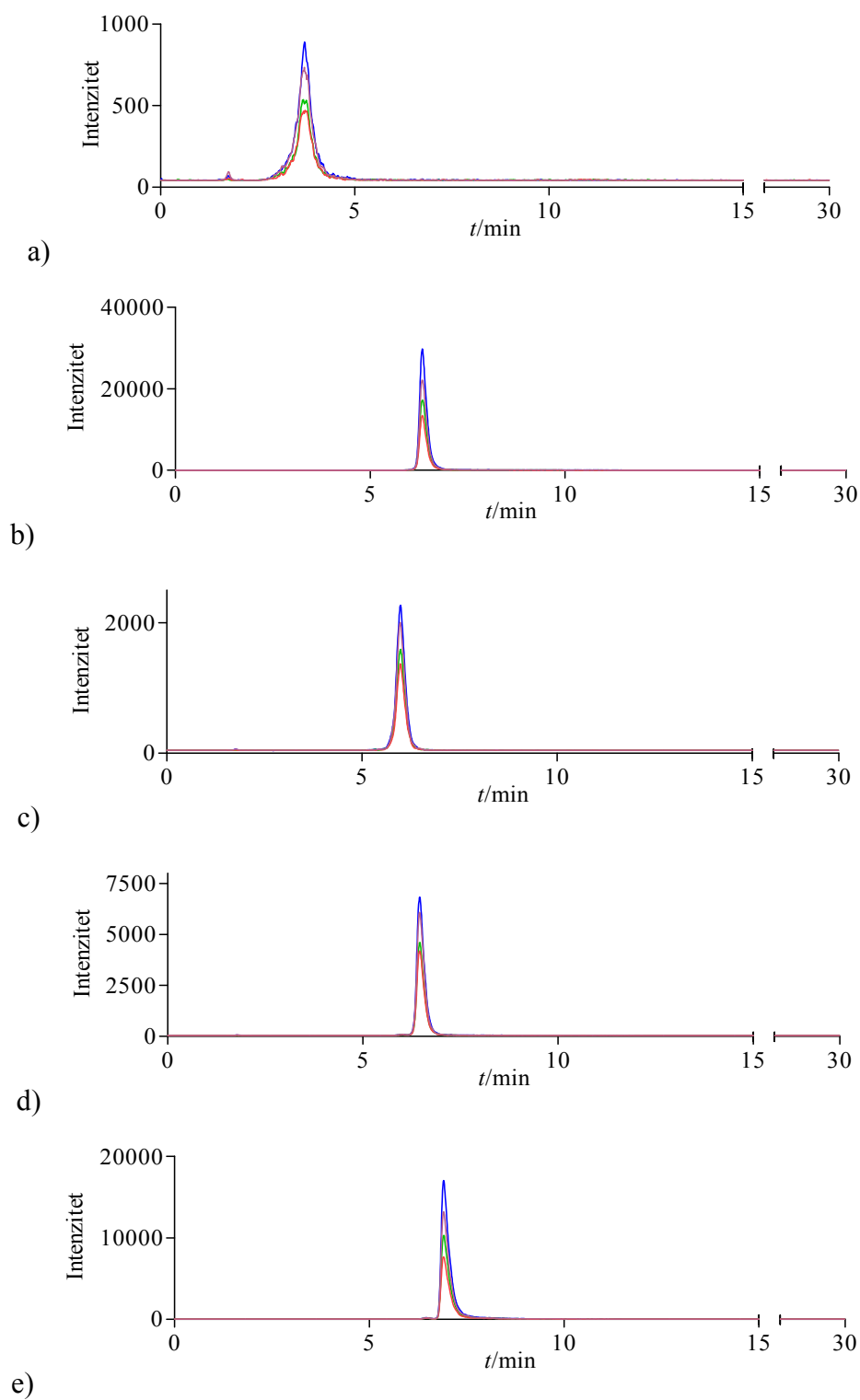
4.5. Kvantifikacija slobodnih masnih kiselina primjenom „surogat“ analita

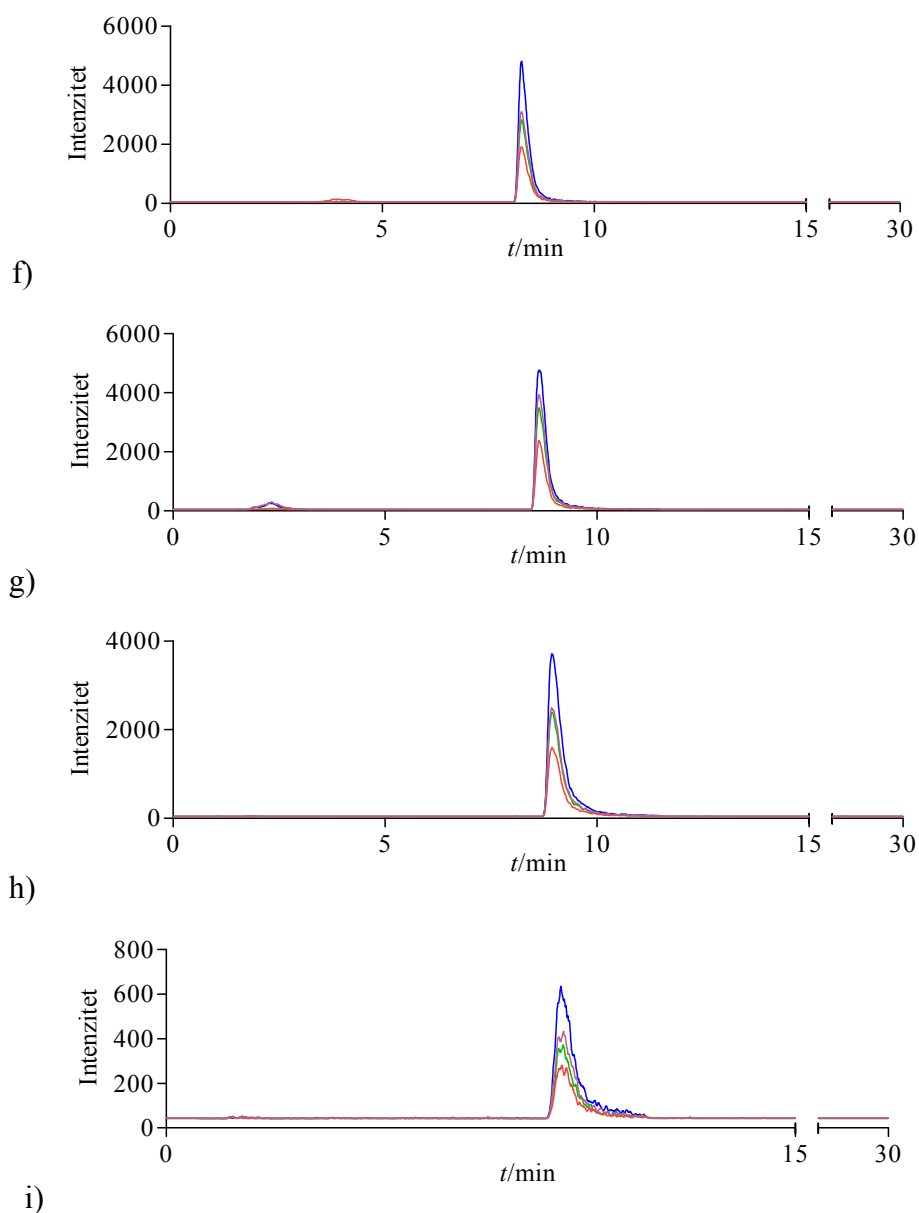
Prisutnost endogenih analita u matrici predstavlja izazov za razvoj analitičke metode i kvantifikaciju analita. Uz standardnu metodu superpozicije¹⁵⁴, zadnjih godina sve više pozornosti pridaje se razvoju metoda u kojima se kvantifikacija endogenih analita temelji na primjeni tzv. „surogat“ matrica ili „surogat“ analita koje predstavljaju alternativnu metodu standardnim metodama kvantifikacije primjenom LC-MS ili GC-MS tehnika. Općenito se analit kvantificira primjenom kalibracijske krivulje konstruirane u organskom otapalu ili vodenoj otopini, a za kompenziranje varijabilnosti u pripremi uzorka i instrumentalnoj analizi izotopno obilježeni analozi analita dodaju se kao unutarnji standard i matrici i standardima za kalibraciju. Međutim, takav način kvantifikacije ne uzima u obzir ekstrakcijski povrat analita iz biološkog uzorka niti efekt matrice tijekom pripreme uzorka ili instrumentalne analize. Alternativni pristup kvantifikaciji analita uključuje konstruiranje kalibracijske krivulje „surogat“ analita u samoj matrici (koja se u ovom slučaju može smatrati kao slijepi uzorak) koji se može primijeniti na kompleksne matrice kao što su biološki uzorci u kojoj su endogeni analiti prisutni u visokoj koncentraciji. Izotopno obilježeni analozi analita najčešće se upotrebljavaju kao „surogat“ analiti za kvantifikaciju zbog fizikalno-kemijskih svojstava koji su bazično istovjetni s fizikalno-kemijskim svojstvima analita od interesa.

Rožnati sloj kože izrazito je kompleksna matrica u kojoj su neke endogene slobodne masne kiseline prisutne u visokoj koncentraciji. Sama adhezivna vrpca, korištena za uzorkovanje rožnatog sloja kože, izvor je dugolančanih masnih kiselina koje se oslobađaju tijekom ekstrakcije iz adhezivnog materijala ili iz same vrpce. S obzirom na navedeno, NMP derivati masnih kiselina kvantificirani su primjenom tzv. „surogat“ analita, izotopno obilježenima (NMP-*d3*) derivatima masnih kiselina koji su pripremljeni u matrici. Kao unutarnji standard izabran je izotopno obilježen C19:0-NMP-*d3* derivat zbog strukturne sličnosti s NMP derivatima analita, a i nije prisutan u matrici. Derivatizacijska reakcija provodi se kod relativno niske temperature (kod 50 °C) te je za očekivati da će dodatkom otopine s izotopno obilježenim NMP derivatima i suviškom reagensa izravno u ekstrakt matrice doći do derivatizacije i slobodnih masnih kiselina matrice čega je posljedica varijabilno povećanje odziva detektora. Zbog toga je matrica prethodno podvrgnuta reakciji derivatizacije endogenih masnih kiselina s BMP i CMP reagensima (izotopno neobilježeni) u

koju su zatim dodani izotopno obilježeni standardi različitih koncentracija za konstruiranje kalibracijskog pravca. Za razliku od standardnog pristupa kvantifikaciji uz „surogat“ analit, u ovoj metodi nisu korišteni izotopno obilježeni standardni samih masnih kiselina, nego izotopno obilježeni derivatizacijski reagensi koji reakcijom daju izotopno obilježene NMP produkte.

S obzirom da supresija ionizacije te sastav (gradijent) mobilne faze utječe na visinu i izgled kromatografskog signala analita jedan od preduvjeta za korištenje izotopno obilježenih analoga analita kao surogata za kvantifikaciju je njihova koelucija. Eksperimentalno je pokazano da NMP i NMP-*d*3 derivati, bez obzira na duljinu lanca masne kiseline, koeluiraju kao što je prikazano na Slici 27.





Slika 27. Kromatogrami višestrukih tranzicijskih reakcija (plavo $[M]^+ \rightarrow 124$, zeleno $[M]^+ \rightarrow 107$, ljubičasto $[M]^+ - d3 \rightarrow 127$, crveno $[M]^+ - d3 \rightarrow 110$) na Hypersil Gold kromatografskoj koloni: a) $c(C12:0) = 1,4 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, b) $c(C16:0) = 1,7 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, c) $c(C18:2) = 2,1 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, d) $c(C18:1) = 5,4 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, e) $c(C18:0) = 9,9 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, f) $c(C22:0) = 1,6 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, g) $c(C24:0) = 2,4 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, h) $c(C26:0) = 1,7 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, i) $c(C28:0) = 0,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. NMP i NMP- $d3$ derivati masnih kiselina eluirani su upotrebom gradijenta mobilne faze prema Tablici 6.

U svrhu kvantifikacije analita, razlika u odgovoru detektora (engl. *response factor*, RF) određena je usporedbom omjera površine kromatografskog pika „surogat“ analita i internog standarda (IS) te omjera površine kromatografskog pika analita i internog standarda koji su pomiješani u omjeru 1:1 pri čemu je obuhvaćeno cijelo koncentracijsko područje određivanja. S obzirom da je RF vrijednost bilo moguće odrediti jedino u CH₃CN, zbog prisustva endogenih masnih kiselina u samoj matrici, polazilo se od pretpostavke da je razlika u odgovoru detektora u CH₃CN jednaka razlici odgovora detektora u matrici.

RF vrijednost može se izračunati prema izrazu (4), u kojem je A_{izotop} površina pika „surogat“ analita; A_{analit} površina pika analita; A_{IS} površina pika internog standarda.

$$RF = \frac{(A_{\text{izotop}}/A_{\text{IS}})}{(A_{\text{analit}}/A_{\text{IS}})} \quad (4)$$

S obzirom na nelinearni karakter odziva detektora i za NMP i za NMP-*d*3 derivate, za izračunavanje RF vrijednosti kroz cijelo koncentracijsko područje korištene su logaritamske vrijednosti odziva detektora i koncentracije kako je prikazano u Tablici 17. za [M]⁺→124 tranzicijske reakcije.

Tablica 17. Usporedba jednadžbi kalibracijskih pravaca NMP i NMP-*d3* derivata masnih kiselina pripremljenih u CH₃CN

Derivat analita	Tranzicijska reakcija	$t_{\text{eluiranja}}/\text{min}$	Jednadžba pravca
C12:0-NMP	306→124	4,15	$\log(y) = 0,9911\log(x) + 0,8175$
C12:0-NMP- <i>d3</i>	309→127	4,08	$\log(y) = 0,9914\log(x) + 0,7364$
C16:0-NMP	362→124	6,55	$\log(y) = 0,8452\log(x) + 0,9185$
C16:0-NMP- <i>d3</i>	365→127	6,55	$\log(y) = 0,8745\log(x) + 0,8031$
C18:0-NMP	390→124	7,15	$\log(y) = 0,8393\log(x) + 0,9268$
C18:0-NMP- <i>d3</i>	393→127	7,14	$\log(y) = 0,8538\log(x) + 0,8378$
C18:1-NMP	388→124	6,69	$\log(y) = 0,9769\log(x) + 0,7971$
C18:1-NMP- <i>d3</i>	391→127	6,71	$\log(y) = 1,02\log(x) + 0,7201$
C18:2-NMP	386→124	6,26	$\log(y) = 1,008\log(x) + 0,7921$
C18:2-NMP- <i>d3</i>	389→127	6,23	$\log(y) = 1,072\log(x) + 0,7188$
C22:0-NMP	446→124	8,39	$\log(y) = 0,8189\log(x) + 0,9921$
C22:0-NMP- <i>d3</i>	449→127	8,41	$\log(y) = 0,8302\log(x) + 0,8657$
C24:0-NMP	474→124	8,73	$\log(y) = 0,8274\log(x) + 0,8956$
C24:0-NMP- <i>d3</i>	477→127	8,73	$\log(y) = 0,8255\log(x) + 0,8231$
C26:0-NMP	502→124	8,98	$\log(y) = 0,8227\log(x) + 0,9799$
C26:0-NMP- <i>d3</i>	505→127	8,98	$\log(y) = 0,8361\log(x) + 0,8735$
C28:0-NMP	530→124	9,22	$\log(y) = 0,8973\log(x) + 0,8636$
C28:0-NMP- <i>d3</i>	533→127	9,19	$\log(y) = 0,9034\log(x) + 0,7271$

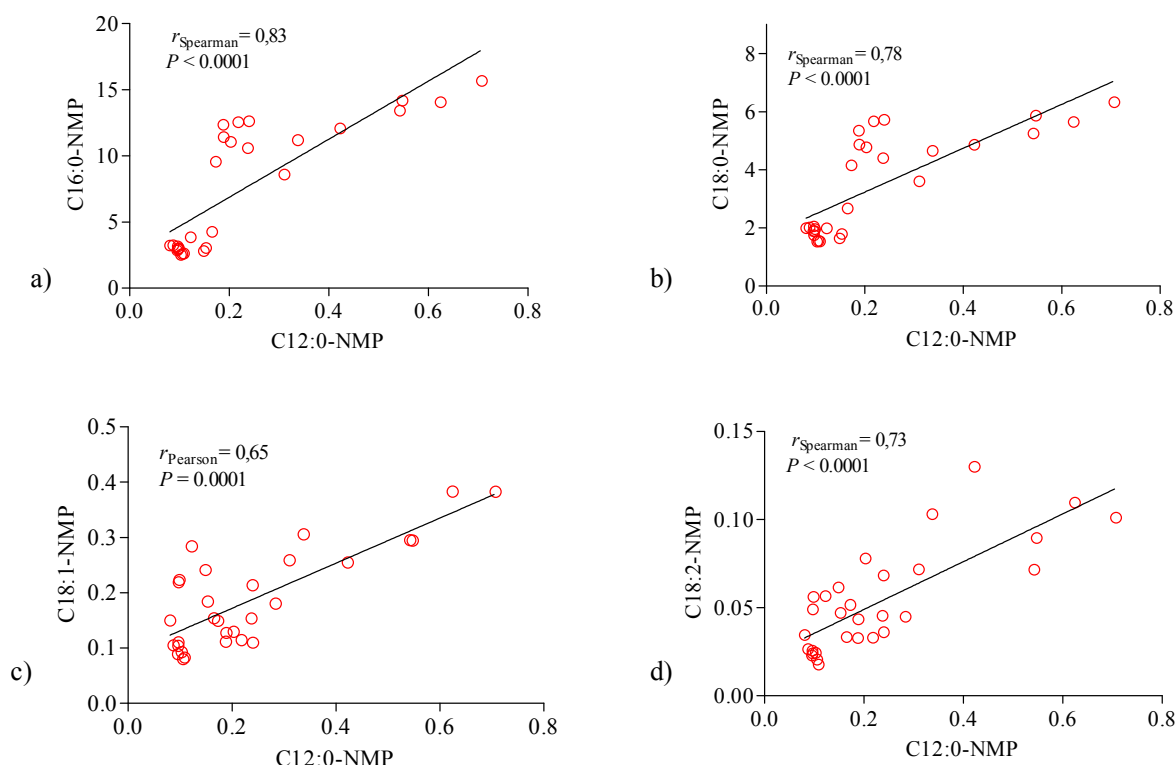
Ukoliko je potrebno iz podataka (Tablica 17.) RF se može računati za svaku pojedinu koncentraciju prema izrazu (5):

$$\log RF = \log x \times (a_1 - a_2) + b_1 - b_2 \quad (5)$$

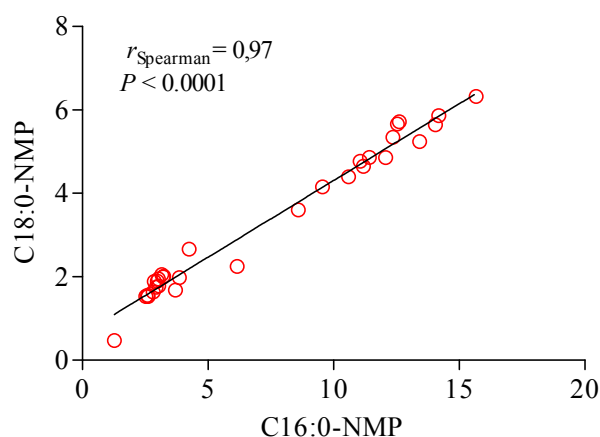
pri čemu je a_1 nagib pravca NMP-*d3* derivata masne kiseline; a_2 nagib pravca NMP derivata masne kiseline; b_1 odsječak pravca NMP-*d3* derivata masne kiseline; b_2 odsječak pravca NMP derivata masne kiseline;

Prema podacima u Tablici 17. izračunate RF vrijednosti kreću se od 0,70 za C28:0-NMP-*d3* do 0,85 za C24:0-NMP-*d3*. Nelinearni odziv u čistom otapalu u odnosu na linearni odziv u matrici kalibracijskih krivulja pojedinih analita za isto koncentracijsko područje mogao bi se pripisati ionizacijskim efektima i utjecaju matrice. Pokazano je da upotreba ESI umjesto APCI može voditi k izraženijem utjecaju matrice^{122,204} te da drugi mehanizmi ionizacije prisutni u APCI mogu voditi manjoj supresiji iona u odnosu na ESI.¹²³ Ovo bi možda djelomično moglo objasniti slabo izražen utjecaj matrice u nedavno objavljenoj LC-APCI-MS metodi za određivanje masnih kiselina u rožnatom sloju kože. U radu van Smeden i sur. faktor odgovora detektora određen je između otapala i matrice za deuterirane analoge C18:0 i C24:0 (C18:0-D35 i C24:0-D47) i iznosio je 99,6 % odnosno 100,7 %.⁷

Kao što je već napomenuto, adhezivna vrpca D-Squame također je izvor nekih slobodnih masnih kiselina u ekstraktu rožnatog sloja kože koje se prilikom ekstrakcije oslobađaju iz adhezivnog sredstva ili iz materijala same vrpce. Najveći doprinos ukupnoj masi određenih slobodnih masnih kiselina daju C16:0 i C18:0 te u puno manjoj mjeri C18:1 i C18:2. Dosada je poznata samo jedna LC-MS metoda za određivanje slobodnih masnih kiselina u rožnatom sloju kože uzorkovanih adhezivnom vrpcom tvrtke Nichiban u kojoj je također uočena povišena koncentracija C16:0, C18:0, C18:1 i C18:2 masnih kiselina uslijed ekstrakcije s adhezivne vrpce.⁷ C16:0, C18:0, C18:1 i C18:2 masne kiseline kvantificirane su uz pomoć korelacije s nepoznatim m/z 365,3 i 393,3 ionima čija prisutnost nije utvrđena u koži. Iako komponente s m/z 365,3 i 393,3 nisu identificirane, autori pretpostavljaju da pripadaju egzogenim lipidima. U ovom radu pristup je bio nešto drugačiji u tome što se količina masnih kiselina iz adhezivne vrpce procjenila iz njihove korelacije s C12:0 masnom kiselinom koja nije detektirana u rožnatom sloju, nego dolazi u potpunosti iz adhezivne vrpce, odnosno adhezivnog sredstva (Slika 28.).



Slika 28. Grafički prikaz korelacije C12:0-NMP s: a) C16:0-NMP, b) C18:0-NMP, c) C18:1-NMP, d) C18:2-NMP. Veličine na grafičkim osima predstavljaju odziv detektora za NMP derivate pojedinih masnih kiselina kao omjer površine kromatografskih pikova analita i IS.



Slika 29. Grafički prikaz korelacije C16:0-NMP i C18:0-NMP. Veličine na grafičkim osima predstavljaju odziv detektora za NMP derivate masnih kiselina kao omjer površine kromatografskih pikova analita i IS.

Analitički parametri LC-ESI-MS metode sumirani su u Tablici 18. Granica detekcije NMP-*d3* derivata masnih kiselina iznosila je od 0,002 – 0,014 $\mu\text{mol L}^{-1}$ za C18:2-NMP-*d3* i C18:0-NMP-*d3*, a granica kvantifikacije 0,007 – 0,048 $\mu\text{mol L}^{-1}$ za C18:2-NMP-*d3* i C18:0-NMP-*d3*. Ponovljivost unutar dana izražena kao koeficijent varijacije na nižoj koncentracijskoj razini bila je ispod 12 % za sve masne kiseline, dok je na višoj koncentracijskoj razini bila ispod 5,6 %. Ponovljivost između više dana na nižoj koncentracijskoj razini iznosila je 5,5 % za C24:0-NMP-*d3* do 22,3 % za C28:0-NMP-*d3* dok je na višoj koncentracijskoj razini bila ispod 5,8 % za sve masne kiseline osim za C28:0-NMP-*d3*. CV od 22,3 % za C28:0-NMP-*d3* mogao bi se djelomično objasniti što je određen pri koncentraciji bliskoj granici kvantifikacije za ovaj analit. Točnost je za sve NMP-*d3* derivate iznosila približno 100 %, osim za C28:0-NMP-*d3* kod kojeg je na nižem koncentracijskom nivou iznosila oko 112 %.

Ekstrakcijski povrat određen je dodatkom smjese masnih kiselina na koncentracijskoj razini ST 12,5 u uzorak. Primjenom ekstrakcije prema Bligh i Dyeru¹⁴¹ (Ekstrakcijski postupak 1) najmanji ekstrakcijski povrat (< 60 %) postignut je za C12:0-NMP-*d3*, C16:0-NMP-*d3* i C18:0-NMP-*d3*. Taj rezultat je bio iznenađujući s obzirom na opće prihvaćeno mišljenje da ekstrakcija po navedenoj metodi postiže ekstrakcijski povrat za masne kiseline između 90 i 95 %. Razlog tome mogao bi biti dvojak, ili nije došlo do zadovoljavajuće ekstrakcije iz kože i adhezivne vrpce ili su ekstrahirane masne kiseline zbog svojeg uvjetno rečeno hidrofilnog karaktera (djelomično uvjetovanog duljinom lanca i/ili prisutnošću nezasićenih dvostrukih veza) zadržane u vodenoj fazi. U prilog tome ide rad Lalmana i sur. koji su pokazali da se ekstrakcijom fermentacijskog medija s CHCl_3 rezultira manjim ekstrakcijskim povratom C16:0 i C18:0 u odnosu na $\text{CHCl}_3\text{:MeOH}$.²⁰⁵ Dodatno je pokazano primjenom modificirane ekstrakcijske metode po Bligh i Dyeru (Ekstrakcijski postupak 2, P.3.3.3.) koja je uključivala samo ekstrakciju s $\text{CHCl}_3\text{:MeOH:H}_2\text{O}$ (1:2:0,5, v/v/v) i uparavanje cjelokupnog volumena smjese otapala da je ekstrakcijski povrat ovih dviju masnih kiselina veći u odnosu na Ekstrakcijski postupak 1 (Tablica 18.).

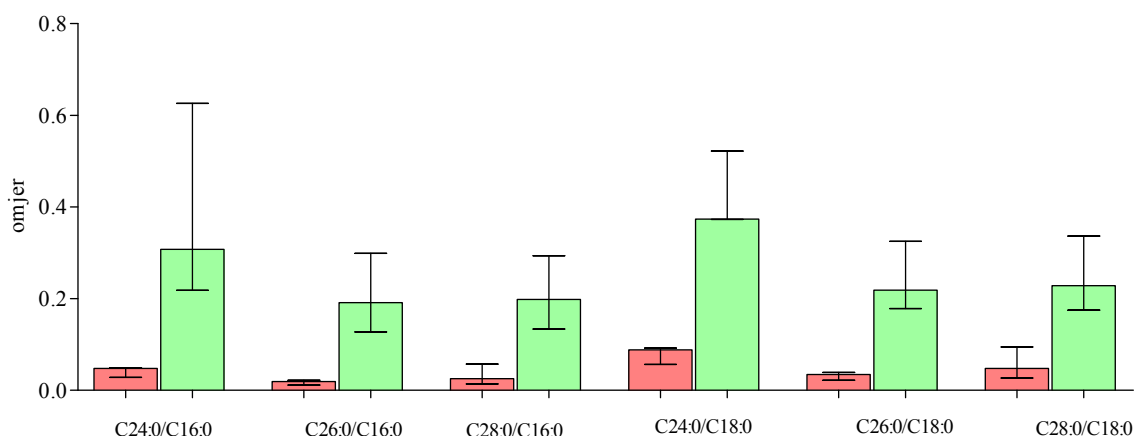
Tablica 18. Analitički parametri LC-ESI-MS metode za određivanje derivata masnih kiselina

Analitički parametar	N	C12:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C22:0	C24:0	C26:0	C28:0
Linearno područje ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	5	0,016 – 1,129	0,041 – 13,852	0,048 – 7,929	0,018 – 4,373	0,007 – 1,758	0,011 – 1,278	0,019 – 1,933	0,015 – 1,360	0,020 – 0,407
Granica detekcije ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	5	0,005	0,012	0,014	0,005	0,002	0,003	0,006	0,004	0,006
Granica kvantifikacije ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	5	0,016	0,041	0,048	0,018	0,007	0,011	0,019	0,015	0,020
Koncentracija ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	6	0,076	0,865	0,495	0,273	0,109	0,079	0,121	0,085	0,025
Ponovljivost unutar dana (CV, %)		5,83	3,03	3,18	3,7	4,33	4,25	4,33	4,14	11,93
Koncentracija ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	8	0,564	6,926	3,964	2,187	0,879	0,639	0,967	0,680	0,203
Ponovljivost unutar dana (CV, %)		4,26	3,38	2,13	2,85	3,24	3,99	4,60	5,22	5,63
Koncentracija ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	11	0,076	0,866	0,4956	0,273	0,109	0,079	0,121	0,085	0,025
Ponovljivost između dana (CV, %)		9,24	7,54	6,63	6,67	7,85	6,73	5,52	9,02	22,32
Koncentracija ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	12	0,564	6,926	3,964	2,187	0,879	0,639	0,967	0,680	0,203
Ponovljivost između dana (CV, %)		5,03	4,26	3,16	3,61	3,91	3,47	5,18	5,48	4,64

Koncentracija ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		0,076	0,866	0,495	0,273	0,109	0,079	0,121	0,085	0,025
Točnost (% $\pm$ <i>SD</i>)	6	101,3 $\pm$ 5,9	105,9 $\pm$ 3,2	102,7 $\pm$ 3,3	105,2 $\pm$ 3,9	104,0 $\pm$ 4,5	102,7 $\pm$ 4,4	104,0 $\pm$ 4,5	108,6 $\pm$ 4,5	112,2 $\pm$ 13,4
Koncentracija ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		0,564	6,926	3,964	2,187	0,879	0,639	0,967	0,680	0,203
Točnost (% $\pm$ <i>SD</i>)	8	100,5 $\pm$ 4,3	106,2 $\pm$ 3,6	105,3 $\pm$ 2,2	107,1 $\pm$ 3,1	103,0 $\pm$ 3,3	100,7 $\pm$ 4,0	102,3 $\pm$ 4,7	103,8 $\pm$ 5,4	102,9 $\pm$ 5,8
Ekstrakcijski povrat (Ekstrakcijski postupak 1) (% $\pm$ <i>SD</i>)	8	53,0 $\pm$ 19,1	47,2 $\pm$ 29,5	59,3 $\pm$ 26,0	68,8 $\pm$ 12,1	81,1 $\pm$ 13,3	115,7 $\pm$ 15,6	88,9 $\pm$ 12,9	90,2 $\pm$ 17,4	76,6 $\pm$ 43,0
Ekstrakcijski povrat (Ekstrakcijski postupak 2) (% $\pm$ <i>SD</i>)	6	30,0 $\pm$ 5,3	84,7 $\pm$ 21,4	81,9 $\pm$ 10,5	70,0 $\pm$ 14,0	68,0 $\pm$ 7,5	65,0 $\pm$ 6,4	47,8 $\pm$ 13,4	45,5 $\pm$ 11,6	25,3 $\pm$ 12,7

4.6. Primjena LC-ESI-MS metode za određivanje masnih kiselina

Slobodne masne kiseline uz kolesterol i ceramide tvore lamele, organizirane strukture lipida koje imaju ključnu ulogu u funkciji kože i zaštiti organizma. Poznato je da oštećena koža ima narušen sastav i organizaciju lipidnih slojeva što utječe na njezinu funkciju.



Slika 30. Usporedba omjera nekih slobodnih masnih kiselina u normalnoj koži (zeleno) i koži oštećenoj uslijed AD (crveno) ($n = 10$, medijan s interkvartilima)

Razvijena LC-ESI-MS metoda primijenjena je za određivanje slobodnih masnih kiselina u osoba s normalnom kožom i kožom oštećenom uslijed AD. Rezultati su pokazali da su dugolančane masne kiseline (C16:0 i C18:0) najzastupljenije, dok je od masnih kiselina s vrlo dugim lancima najzastupljenija C24:0 što je u skladu s podacima iz literature.^{29,32} Preliminarni rezultati isto tako ukazuju na činjenicu da osobe s AD (crveno) imaju nižu razinu slobodnih masnih kiselina s vrlo dugim lancima u odnosu na osobe s normalnom kožom (zeleno) (Slika 30.).

4.7. Ceramidi u rožnom sloju kože

Strukturne varijacije masnih kiselina i sfingoidne baze rezultiraju u velikom broju podklasa ceramida koje su pristutne u slobodnoj formi ili su vezane na proteine korneocita.³⁴ Iako su prve analize pojedinih klasa ceramida omogućavale njihovo određivanje tankoslojnom kromatografijom (HPTLC)^{108,206-208}, nedostatak se očitovao u činjenici da se primjenom HPTLC ne mogu razlikovati pojedini ceramidi unutar klase. Razvoj analitičkih metoda temeljenih na tekućinskoj kromatografiji u sprezi sa spektrometrijom masa u zadnjih desetak godina omogućio je njihovu detaljniju karakterizaciju.¹²⁰ Međutim, njihov veliki broj, raznovrsnost te velike varijacije u rožnom sloju kože, optimiranje uvjeta pripreme uzorka, separacije i ionizacije još uvijek predstavlja veliki izazov i ustraživanju ovih klasa spojeva.⁹

Za analizu ceramida upotrebljava se kromatografija normalnih^{34,37,116,209} i obrnutih^{118,120,136-137,210} faza, a moguća je njihova detekcija uz ESI-MS u oba načina snimanja, pozitivnom^{119,211} ili negativnom^{118,138} ovisno o zahtjevima analize i mogućnostima instrumenta. Pri analizi kromatografijom normalnih faza s obzirom na hidrofobni karakter ceramida velik broj vrsta eluira u kratkom vremenu, što može smanjiti osjetljivost analize. S druge strane, upotrebom kromatografije obrnutih faza moguća je bolja separacija. U pozitivnom načinu snimanja ceramidi nakon CID-a često pokazuju složen spektar masa.

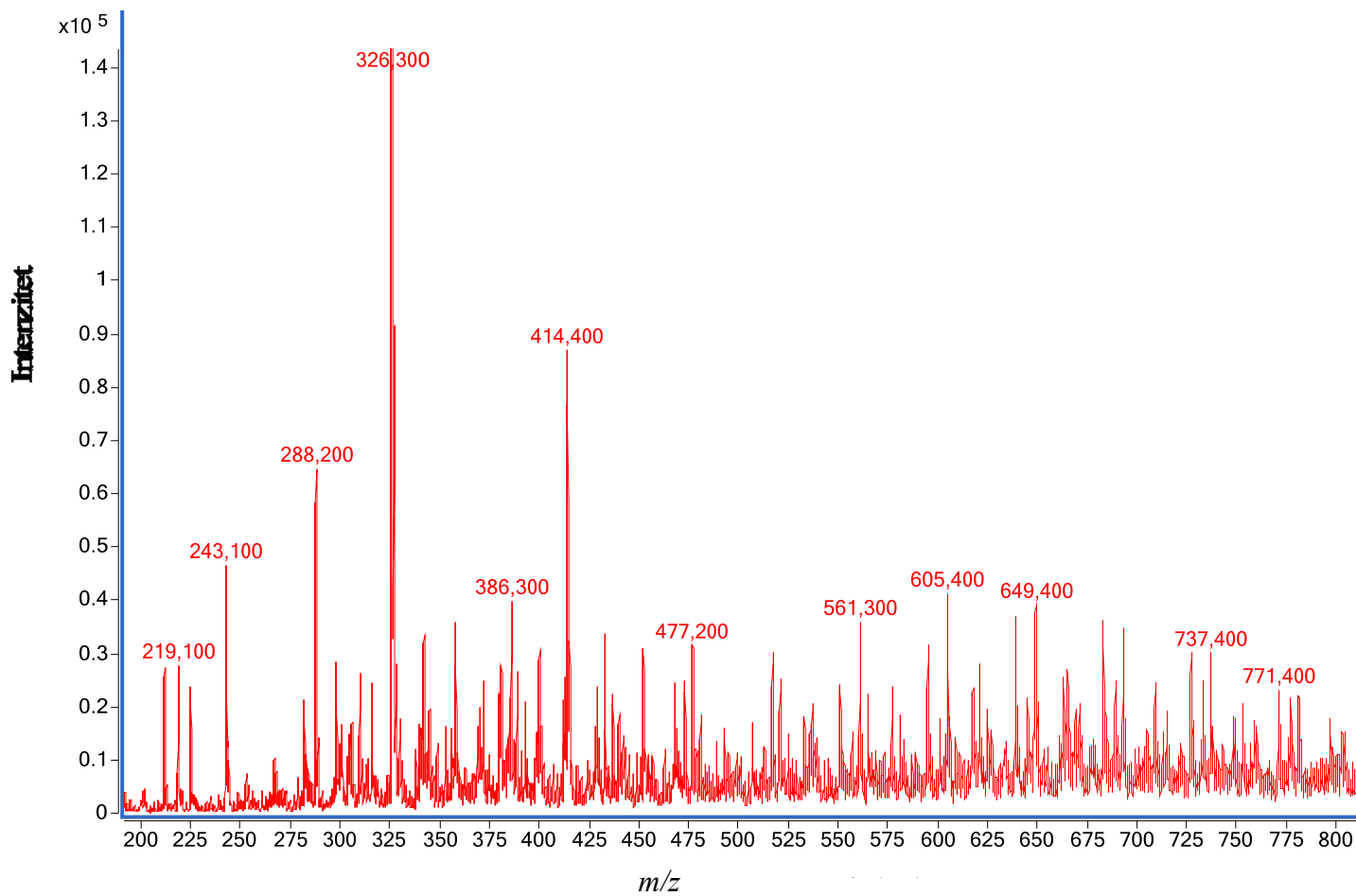
Opaženi signali najčešće pripadaju produkt ionima nastalih nakon cijepanja amidne veze odnosno eliminacije jedne ili više molekula vode uz molekulske ione. Literaturni podaci o sastavu individualnih ceramida unutar neke klase su oskudni.^{34,97,116} Dodatno ograničenje pri istraživanju ovih klasa spojeva predstavlja komercijalna (ne)dostupnost standarda ceramida. Stoga se pribjegava tzv. „in house“ sintezi pojedinih ceramida što je vrlo zahtjevan i dugotrajan postupak.^{37,116,212}

4.7.1. Ekstrakcijski postupci izolacije ceramida iz humanog epidermisa i adhezivne vrpce

S obzirom na ograničenu dostupnost analitičkih standarda ceramida koji bi se koristili u daljnjem radu, u okviru ove disertacije prvo je bilo potrebno izolirati ceramidne klase ekstrakcijskim postupcima iz humanog epidermisa. Intercelularni ceramidi su višestrukim ekstrakcijskim postupcima izolirani od ostalih lipidnih klasa kao što su fosfolipidi ili slobodne masne kiseline. Osim izoliranih ceramida, sintetski ceramidi klasa NP (III, IIIB) i AP (VI) okarakterizirani su u pozitivnom načinu snimanja primjenom LC-ESI-MS te su optimirani

parametri za njihovo praćenje višestrukim tranzicijskim reakcijama. Nakon karakterizacije, ispitani su kromatografski uvjeti za njihovu separaciju na kromatografskoj koloni Synergy Hydro-RP.

Klase intercelularnih lipida iz humanog epidermisa odvojene su u zadnjem koraku (Shema 3.) ekstrakcijom na čvrstoj fazi (engl. *solid phase extraction*, SPE) nakon čega je čistoća pojedine frakcije provjerena primjenom TLC. Na Slici 31. prikazana je ukupna ionska struja izoliranih ceramida iz humanog epidermisa koja ukazuje na kompleksnost sastava izoliranih ceramida. S obzirom na ograničenja u pogledu dostupne instrumentacije, u daljnjem radu analiza ceramida provedena je najprije na tri sintetski dobivena ceramida od kojih ceramid III i ceramid IIIB pripadaju klasi NP, dok ceramid VI pripada klasi AP.

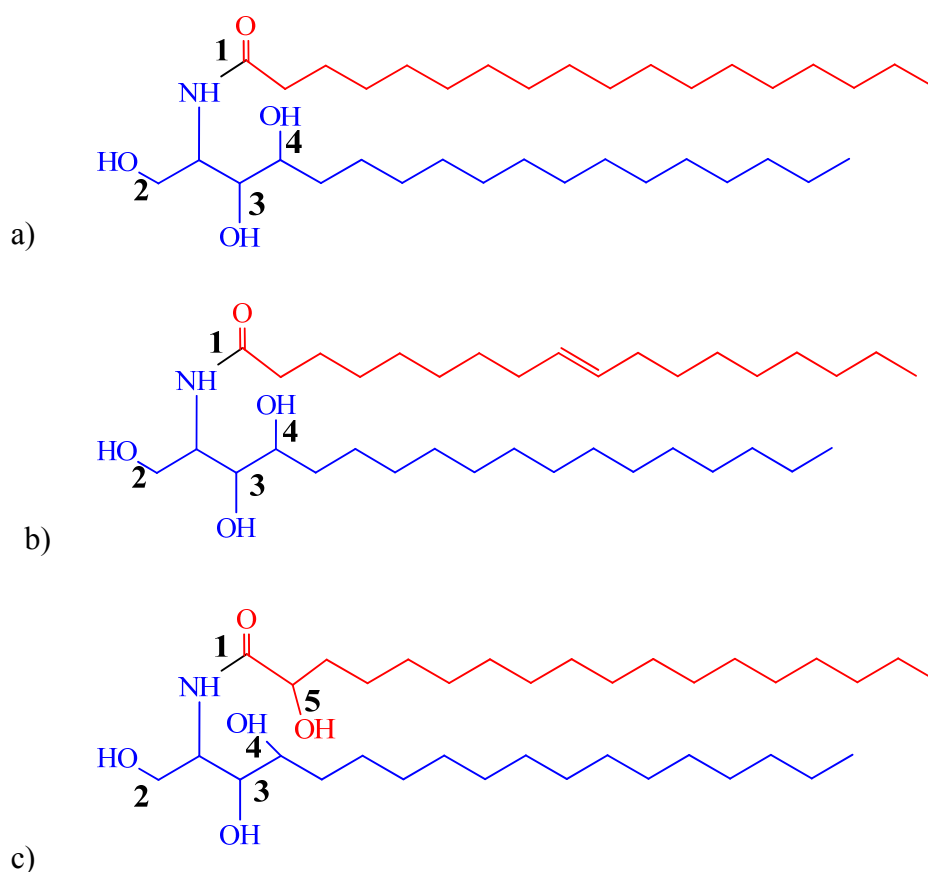


Slika 31. Ukupna ionska struja ceramida ekstrahiranih iz humanog epidermisa

4.8. Karakterizacija ceramida III, IIIB i VI

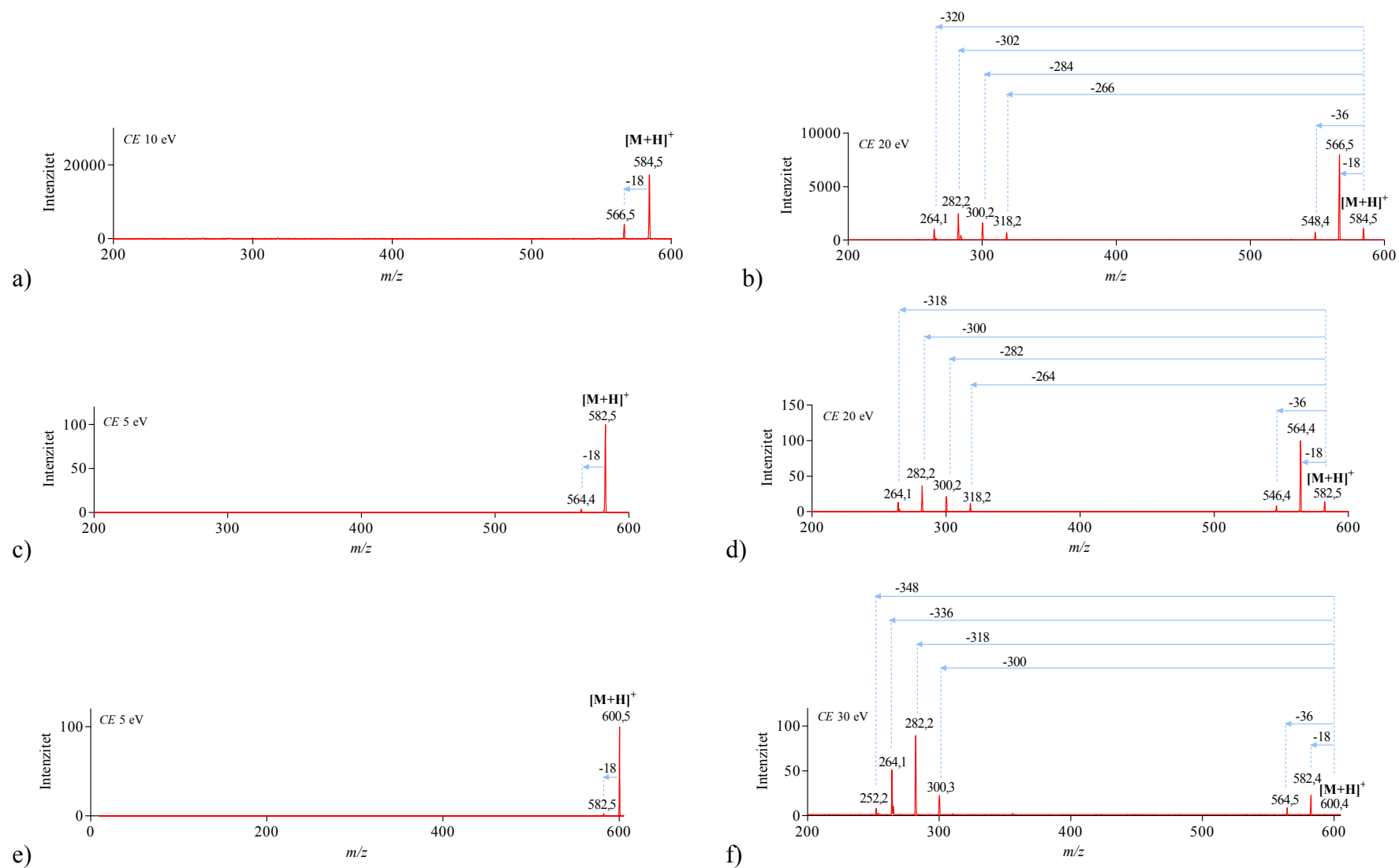
Sintetski dobiveni ceramidi klasa III, IIIB i VI okarakterizirani su upotrebom LC-ESI-MS tehnike u pozitivnom načinu rada. Analize ceramida napravljene na ESI-QQQ uključivale su TIC, produkt ione i MRM način snimanja.

Strukturu ceramida čine fitosfingozinska baza koja je amidnom vezom vezana na masnu kiselinu koja ne sadrži hidroksilnu skupinu (CER III, CER IIIB) ili koja sadrži α -hidroksi masnu kiselinu (CER VI) (Slika 32.). Ceramid IIIB sadržava dvostruku vezu na mjestu C8 lanca masne kiseline po čemu se razlikuje od ceramida III. U pozitivnom načinu rada ceramidi pokazuju protonirane molekulske ione $[M+H]^+$ iz kojih nakon CID-a nastaje niz karakterističnih fragmentacijskih produkt iona (Slika 33.).



Slika 32. Struktura ceramida: a) III, b) IIIB i c) VI. Položaj 1 označava cijepanje amidne veze, dok položaji 2, 3, 4 i 5 označavaju mjesta gdje dolazi do eliminacije molekula vode

Ceramid III (NP) pri kolizijskoj energiji od 10 eV pokazuje signal najvećeg intenziteta pri m/z 584 koji pripada protoniranoj molekuli ceramida (Slika 33. a). Analogno tome, ceramid IIIB (NP) i ceramid VI (AP) uz kolizijsku energiju od 5 eV najveći intenzitet signala imaju pri m/z 582 odnosno pri m/z 600 (Slika 33. c, e). Također, u spektrima se opažaju fragmentacijski ioni čiji je m/z za 18 manji od $[M+H]^+$ (m/z 566, 564 i 582) koji odgovaraju eliminaciji jedne molekule vode iz molekule ceramida $[M+H]^+-H_2O$ (Slika 33. a, c, e). Gubitak molekule vode moguć je uslijed eliminacije jedne od hidroksilnih skupina iz fitosfingozinskog lanca ceramida (Slika 32. položaj 2, 3, 4) odnosno α -hidroksilne skupine prisutne na lancu masne kiseline ceramida VI (Slika 32. položaj 5). Povećanjem kolizijske energije za ceramide III i IIIB na 20 eV te ceramid VI na 30 eV nastaje niz fragmentacijskih iona u kojima ion pri m/z za 18 manji od $[M+H]^+$ (m/z 566, 564 i 582) odgovara eliminaciji jedne molekule vode iz molekule ceramida $[M+H]^+-H_2O$ (Slika 33. b, d, f). Osim toga vidljivo je da povećanjem kolizijske energije nastaju produkt ioni čiji je m/z za 36 manji od $[M+H]^+$ (m/z 548, 546 i 564) koji odgovara eliminaciji dvije molekule vode iz molekule ceramida $[M+H]^+-2H_2O$ (Slika 33. b, d i f) uslijed gubitka dvije hidroksilne skupine (Slika 32. položaj 2, 3, 4, 5). Fragmentacijski produkt nastao cijepanjem amidne veze (Slika 32. položaj 1) nalazi se pri m/z 318 te pripada fitosfingozinskom dijelu molekule i zajednički je za sva tri ceramida. Ostali produkt ioni fragmentacijskog spektra ceramida pri m/z 300, 282 i 264 nastaju eliminacijom jedne, dvije ili tri molekule vode uslijed gubitka jedne ili više hidroksilnih skupina fitosfingozinskog lanca (Slika 32. položaj 2, 3, 4).

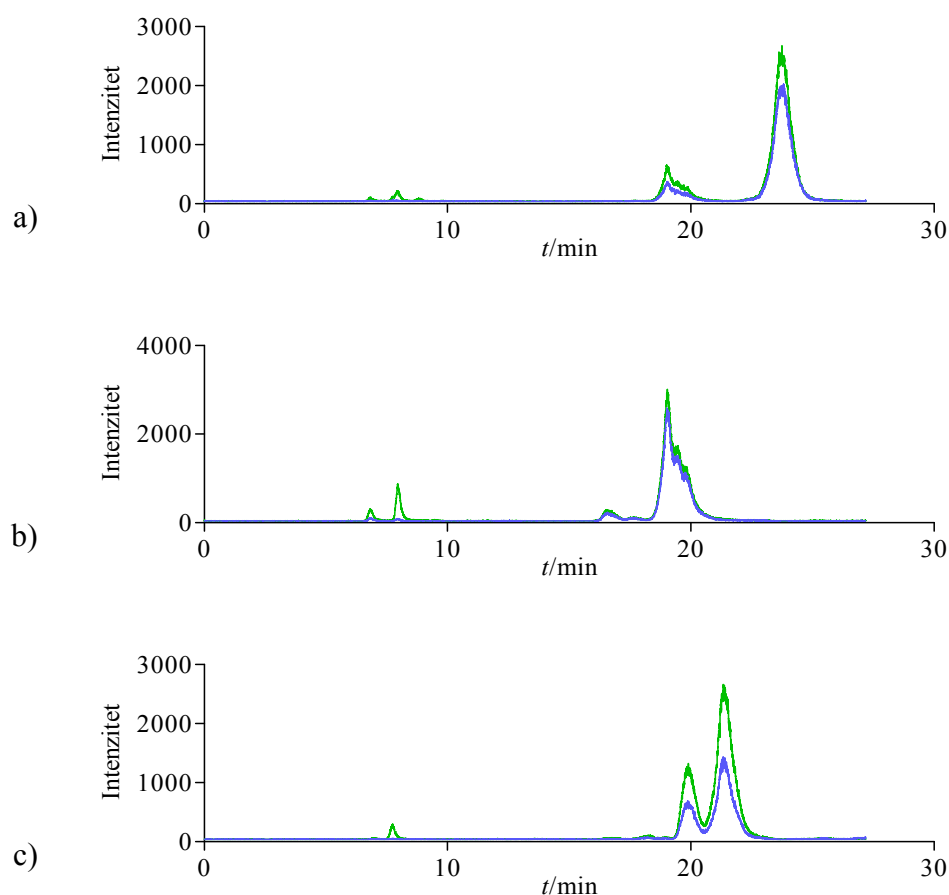


Slika 33. Prikaz produkt iona: a) i b): ceramid III; c) i d): ceramid IIIB; e) i f): ceramid VI; otapalo voda s 0,1 % HCOOH

Razdvajanje ceramida III, IIIB i VI upotrebom obrnutih faza omogućava njihovo razdvajanje prvotno na temelju hidrofobnih interakcija koje ovise o duljini lanca masne kiseline, duljini lanca fitosfingozina i broju prisutnih nezasićenih veza. Prednost analize ceramida obrnutim fazama su njihova izraženija hidrofobna svojstva u odnosu na hidrofilna na kojima se temelji separacija normalnim fazama. Osim toga, analiza fosfolipida tzv. „shotgun“ tehnikom već je pokazala da je RP-LC rezultirala većim kapacitetom pikova lipida u odnosu na NP-LC.²¹³

Sintetski dobiveni ceramidi III, IIIB i VI analizirani su na Synergi Hydro-RP kromatografskoj koloni uz gradijentnu eluciju prema Tablici 8. Ceramidi su praćeni višestrukim tranzicijskim reakcijama $[M+H]^+ \rightarrow 282$ i $[M+H]^+ \rightarrow [M+H-H_2O]^+$ čiji su uvjeti optimirani prema Tablici 7., a kromatogrami višestrukih tranzicijskih reakcija prikazani su na Slici 34.

Kako je vidljivo iz kromatografskih prikaza tranzicijska reakcija $[M+H]^+ \rightarrow 282$ pokazivala je signal višeg intenziteta u odnosu na $[M+H]^+ \rightarrow [M+H-H_2O]^+$. Retencijsko vrijeme najkraće je bilo za ceramid IIIB iza kojeg je slijedio ceramid VI i na kraju ceramid III uspoređujući kromatografske pikove višeg intenziteta pojedinih ceramida.



Slika 34. Kromatografski prikaz višestrukih tranzicijskih reakcija $[M+H]^+ \rightarrow 282$ (zeleno) i $[M+H]^+ \rightarrow [M+H-H_2O]^+$ (plavo) na kromatografskoj koloni Synergi Hydro-RP: a) ceramid III, b) ceramid IIIB i c) ceramid VI. Gradijentna elucija mobilne faze prema Tablici 8., $c(\text{CER III}) = c(\text{CER IIIB}) \approx 1,7 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $c(\text{CER VI}) \approx 1,1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$

Ceramidi su pri eluciji pokazivali dva pika različitih retencijskih vremena što je bilo najizraženije kod ceramida VI. Može se pretpostaviti da su dvostruki pikovi pri eluciji pokazatelj mogućeg različitog načina putovanja i mehanizma zadržavanja ceramida. Osim toga, dvostruki pikovi mogu upućivati na nepovoljnu stacionarnu fazu i nepovoljan gradijent mobilne faze koji su upotrijebljeni za separaciju ceramida. Hidrofobnost stacionarne faze i hidrofobna svojstva uslijed dugih lanaca masne kiseline i fitosfingozinske baze doprinose interakciji ceramida sa stacionarnom fazom. Stoga, analiti eluiraju pri dužim retencijskim vremenima i dolazi do širenja kromatografskih pikova. S obzirom na prikazane rezultate, u daljnjem radu i karakterizaciji ceramida potrebno je optimirati uvjete elucije i izbora otapala te ispitati kromatografske uvjete na koloni drugačijih svojstava.

§ 5. ZAKLJUČAK

- Razvijena je RP-LC-UV metoda za određivanje komponenata prirodnih čimbenika zadržavanja vlage (NMF), histidina (His), piroglutaminske kiseline (PCA), tirozina (Tyr), *trans*-urokanske kiseline (*trans*-UCA) i *cis*-urokanske kiseline (*cis*-UCA) kao bioindikatora funkcije kožne barijere.
- Razvijena metoda uspješno je primijenjena za određivanje razine komponenata NMF-a u uzorcima normalne kože i kože oštećene uslijed iritacijskih reagensa, UV zračenja i atopijskog dermatitisa (AD).
- Pokazano je da intrizični (AD) i okolišni faktori utječu na značajno smanjenje razine NMF-a ukazujući na smanjenje funkcije kožne barijere.
- U drugom dijelu istraživanja, razvijena je osjetljiva i pouzdana LC-ESI-MS metoda za određivanje slobodnih masnih kiselina u rožnom sloju kože.
- Analitička metoda temelji se na derivatizaciji masnih kiselina s derivatizacijskim reagensima 2-brom-1-*N*-metilpiridinij jodidom (BMP) i 3-hidroksimetil-*N*-metilpiridinij jodidom (CMP) te analizi nastalih 3-aciloksimetil-*N*-metilpiridinij jodid (NMP) derivata.
- Kvantifikacija je provedena upotrebom izotopno obilježenih 3-aciloksimetil-*N*-trideuterometilpiridinij jodid (NMP-*d*3) derivata masnih kiselina kao „surogat“ analita.
- Doprinos masnih kiselina C16:0, C18:0, C18:1 i C18:2 ekstrahiranih iz adhezivne vrpce procijenjen je iz korelacije s C12:0 ekstrahirane samo iz adhezivne vrpce.
- Razvijena metoda primijenjena je za analizu masnih kiselina u normalnoj i koži oštećenoj uslijed AD-a, a preliminarni rezultati ukazuju povećanu razinu dugolančanih slobodnih masnih kiselina i smanjenu razinu slobodnih masnih kiselina s vrlo dugim lancima u rožnom sloju osoba s AD-om u odnosu na osobe s normalnom kožom.
- Ukupna ionska struja ESI-MS pokazala je kompleksnost sastava slobodnih intercelularnih ceramida izoliranih iz humanog epidermisa.
- Sintetski ceramidi III, IIIB i VI okarakterizirani su primjenom LC-ESI-MS praćenjem višestrukim tranzicijskim reakcijama.

§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ

Kratica	Engleski naziv	Hrvatski naziv
AD	Atopic dermatitis	Atopijski dermatitis
APCI	Atmospheric pressure chemical ionization	Kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku
BMP	2-bromo- <i>N</i> -methyl-pyridinium iodide	2-brom-1- <i>N</i> -metilpiridinij jodid
Br-py	2-bromopyridine	2-brom-piridin
C12:0	Lauric acid	Laurinska kiselina
C16:0	Palmitic acid	Palmitinska kiselina
C18:0	Stearic acid	Stearinska kiselina
C18:1	Oleic acid	Oleinska kiselina
C18:2	Linoleic acid	Linolna kiselina
C19:0	Nonadecanoic acid	Nonadekanska kiselina
C22:0	Behenic acid	Behenska kiselina
C24:0	Lignoceric acid	Lignocerinska kiselina
C26:0	Cerotic acid	Cerotinska kiselina
C28:0	Montanic acid	Montanska kiselina
Carb-py	3-carbinolpyridine	3-hidroksimetilpiridin
CER III	Ceramide III	Ceramid III
CER IIIB	Ceramide IIIB	Ceramid IIIB
CER VI	Ceramide VI	Ceramid VI
cis-UCA	<i>Cis</i> -urocanic acid	<i>Cis</i> -urokanska kiselina
CMP	3-carbinol- <i>N</i> -methylpyridinium iodide	3-hidroksimetil- <i>N</i> -metilpiridinij jodid
ESI	Electrospray ionization	Ionizacija elektroraspršenjem
EtOH	Ethanol	Etanol

His	Histidine	Histidin
MeOH	Methanol	Metanol
NMF	Natural moisturizing factor	Prirodi čimbenici zadržavanja vlage
NMP	3-acyloxymethyl-1-methylpyridinium iodide	3-aciloksimetil- <i>N</i> -metilpiridinij jodid
OD	Optical density	Optička denzitometrija
PCA	Pyrrolidone carboxylic acid	Piroglutaminska kiselina
RF	Response factor	Faktor odgovora detektora
TEWL	Trans-epidermal water loss	Trans-epidermalni gubitak vode
<i>trans</i>-UCA	<i>Trans</i> -urocanic acid	<i>Trans</i> -urokanska kiselina
Tyr	Tyrosine	Tirozin

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. P.M. Elias, *Drug Dev. Res.* **13** (1988) 97-105.
2. J.A. Bouwstra, M. Poncet, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1758** (2006) 2080-2095.
3. J. Hadgraft, M.E. Lane, *Int. J. Pharm.* **305** (2005) 2-12.
4. J. Koyama, I. Horii, K. Kawasaki, Y. Nakayama, Y. Morikawa, T. Mitsui, *J Soc Cosmet Chem* **35** (1984) 183-195.
5. J.A. Bouwstra, G.S. Gooris, J.A. Van der Spek, W. Bras, *J. Invest. Dermatol.* **97** (1991) 1005-1012.
6. M. Wegener, R. Neubert, W. Rettig, S. Wartewig, *Chem. Phys. Lipids* **88** (1997) 73-82.
7. J. van Smeden, W.A. Boiten, T. Hankemeier, R. Rissmann, J.A. Bouwstra, R.J. Vreeken, *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids* **1841** (2014) 70-79.
8. K. Raith, H. Farwanah, S. Wartewig, R.H.H. Neubert, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **106** (2004) 561-571.
9. C.A. Haynes, J.C. Allegood, H. Park, M.C. Sullards, *J. Chromatogr. B* **877** (2009) 2696-2708.
10. <http://cnx.org/content/m46060/latest/> preuzeto 20.05.2014.
11. P. Elias, K. Feingold, M. Fartasch, *Skin Barrier*. New York, NY: Taylor & Francis Group (2006) 261-272.
12. E. Proksch, J.M. Brandner, J.M. Jensen, *Exp. Dermatol.* **17** (2008) 1063-1072.
13. L.N. Marekov, P.M. Steinert, *J. Biol. Chem.* **273** (1998) 17763-17770.
14. A.V. Rawlings, C.R. Harding, *Dermatologic Therapy* **17** (2004) 43-48.
15. I. Horii, Y. Nakayama, M. Obata, H. Tagami, *Br. J. Dermatol.* **121** (1989) 587-592.
16. S. Kezic, N. Novak, I. Jakasa, J.M. Jungersted, M. Simon, J.M. Brandner, M.A. Middelkamp-Hup, S. Weidinger, *Front. Biosci., Landmark Ed.* **19** (2014) 541-556.
17. A.V. Rawlings, L.R. Scott, C.R. Harding, P.A. Bowser, *J. Invest. Dermatol.* **103** (1994) 731-740.
18. I.R. Scott, C.R. Harding, *Dev. Biol.* **115** (1986) 84-92.
19. S. Verdier-Sévrain, F. Bonté, *Journal of Cosmetic Dermatology* **6** (2007) 75-82.
20. I.R. Scott, C.R. Harding, J.G. Barrett, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **719** (1982) 110-117.
21. C.R. Harding, A. Watkinson, A.V. Rawlings, I.R. Scott, *Int. J. Cosmetic Sci.* **22** (2000) 21-52.
22. N.K. Gibbs, J. Tye, M. Norval, *Photochem. Photobiol. Sci.* **7** (2008) 655-667.

23. J.W. Fluhr, P.M. Elias, M.Q. Man, M. Hupe, C. Selden, J.P. Sundberg, E. Tschachler, L. Eckhart, T.M. Mauro, K.R. Feingold, *J. Invest. Dermatol.* **130** (2010) 2141-2144.
24. S.M. Ali, G. Yosipovitch, *Acta Derm.-Venereol.* **93** (2013) 261-269.
25. G.M. O'Regan, P.M.J.H. Kemperman, A. Sandilands, H. Chen, L.E. Campbell, K. Kroboth, R. Watson, M. Rowland, G.J. Puppels, W.H.I. McLean, P.J. Caspers, A.D. Irvine, *J. Allergy Clin. Immunol.* **126** (2010) 574-580.e571.
26. C.N.A. Palmer, A.D. Irvine, A. Terron-Kwiatkowski, Y. Zhao, H. Liao, S.P. Lee, D.R. Goudie, A. Sandilands, L.E. Campbell, F.J.D. Smith, G.M. O'Regan, R.M. Watson, J.E. Cecil, S.J. Bale, J.G. Compton, J.J. DiGiovanna, P. Fleckman, S. Lewis-Jones, G. Arseculeratne, A. Sergeant, C.S. Munro, B. El Houate, K. McElreavey, L.B. Halkjaer, H. Bisgaard, S. Mukhopadhyay, W.H.I. McLean, *Nat Genet* **38** (2006) 441-446.
27. J.A. Bouwstra, G.S. Gooris, F. Dubbelaar, M. Ponec, *J. Lipid Res.* **42** (2001) 1759-1770.
28. J.A. Bouwstra, G.S. Gooris, *Open Dermatol. J.* **4** (2010) 10-13.
29. I.N. Lars Norlén, Anders Lundsjö, Tomas Cronholm, Bo Forslind, *Arch. Dermatol. Res.* **290** (1998) 508-516.
30. M. Ansari, N. Nicolaides, H. Fu, *Lipids* **5** (1970) 838-845.
31. J.A. Bouwstra, G.S. Gooris, K. Cheng, A. Weerheim, W. Bras, M. Ponec, *J. Lipid Res.* **37** (1996) 999-1011.
32. J. van Smeden, M. Janssens, E.C.J. Kaye, P.J. Caspers, A.P. Lavrijsen, R.J. Vreeken, J.A. Bouwstra, *Exp. Dermatol.* **23** (2014) 45-52.
33. V.S. Thakoersing, J. van Smeden, A.A. Mulder, R.J. Vreeken, A. El Ghalbzouri, J.A. Bouwstra, *J. Invest. Dermatol.* **133** (2013) 59-67.
34. J. Van Smeden, L. Hoppel, R. Van Der Heijden, T. Hankemeier, R.J. Vreeken, J.A. Bouwstra, *J. Lipid Res.* **52** (2011) 1211-1221.
35. J.A. Bouwstra, F.E.R. Dubbelaar, G.S. Gooris, A.M. Weerheim, M. Ponec, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1419** (1999) 127-136.
36. J.A. Bouwstra, K. Cheng, G.S. Gooris, A. Weerheim, M. Ponec, *Biochim. Biophys. Acta, Lipids Lipid Metab.* **1300** (1996) 177-186.
37. Y. Masukawa, H. Narita, E. Shimizu, N. Kondo, Y. Sugai, T. Oba, R. Homma, J. Ishikawa, Y. Takagi, T. Kitahara, *J. Lipid Res.* **49** (2008) 1466-1476.
38. H. Farwanah, J. Wohlrab, R.H. Neubert, K. Raith, *Anal. Bioanal. Chem.* **383** (2005) 632-637.

39. Y. Mizutani, S. Mitsutake, K. Tsuji, A. Kihara, Y. Igarashi, *Biochimie* **91** (2009) 784-790.
40. S. Motta, M. Monti, S. Sesana, R. Caputo, S. Carelli, R. Ghidoni, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* **1182** (1993) 147-151.
41. Y. Ohno, S. Suto, M. Yamanaka, Y. Mizutani, S. Mitsutake, Y. Igarashi, T. Sassa, A. Kihara, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107** (2010) 18439-18444.
42. Y. Uchida, *Derm.-Endocrinol.* **3** (2011) 65-69.
43. G. Imokawa, A. Abe, K. Jin, Y. Higaki, M. Kawashima, A. Hidano, *J. Invest. Dermatol.* **96** (1991) 523-526.
44. J. Ishikawa, H. Narita, N. Kondo, M. Hotta, Y. Takagi, Y. Masukawa, T. Kitahara, Y. Takema, S. Koyano, S. Yamazaki, A. Hatamochi, *J. Invest. Dermatol.* **130** (2010) 2511-2514.
45. J. Jungersted, H. Scheer, M. Mempel, H. Baurecht, L. Cifuentes, J. Høgh, L. Hellgren, G. Jemec, T. Agner, S. Weidinger, *Allergy* **65** (2010) 911-918.
46. S. Kezic, P.M.J.H. Kemperman, E.S. Koster, C.M. De Jongh, H.B. Thio, L.E. Campbell, A.D. Irvine, I.W.H. McLean, G.J. Puppels, P.J. Caspers, *J. Invest. Dermatol.* **128** (2008) 2117-2119.
47. R. Tupker, C. Willis, E. Berardksca, C. Lee, M. Fartasch, T. Atinrat, J. Serup, *Contact Dermatitis* **37** (1997) 53-69.
48. A. Mehling, M. Kleber, H. Hensen, *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* **45** (2007) 747.
49. C.M. Slotosch, G. Kampf, H. Löffler, *Contact Dermatitis* **57** (2007) 235-241.
50. A.M. Kligman, W. Wooding, *J. Invest. Dermatol.* **49** (1967) 78-94.
51. K. Ananthapadmanabhan, K. Yu, C. Meyers, M. Aronson, *J. Soc. Cosmet. Chem.* **47** (1996) 185-200.
52. C. Barresi, C. Stremnitzer, V. Mlitz, S. Kezic, A. Kammeyer, M. Ghannadan, K. Posa-Markaryan, C. Selden, E. Tschachler, L. Eckhart, *J. Invest. Dermatol.* **131** (2010) 188-194.
53. U. Jacobi, N. Meykadeh, W. Sterry, J. Lademann, *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* **1** (2003) 884-889.
54. S.J. Bashir, A.L. Chew, A. Anigbogu, F. Dreher, H.I. Maibach, *Skin Res. Technol.* **7** (2001) 40-48.
55. H. Löffler, F. Dreher, H. Maibach, *Br. J. Dermatol.* **151** (2004) 746-752.
56. F. Dreher, A. Arens, J. Hostynek, S. Mudumba, J. Ademola, H. Maibach, *Acta Derm.-Venereol.* **78** (1998) 186-189.

57. R. Voegeli, J. Heiland, S. Doppler, A.V. Rawlings, T. Schreier, *Skin Res. Technol.* **13** (2007) 242-251.
58. D. Mohammed, Q. Yang, R.H. Guy, P.J. Matts, J. Hadgraft, M.E. Lane, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **82** (2012) 171-174.
59. S. Kezic, A. Kammeyer, F. Calkoen, J.W. Fluhr, J.D. Bos, *Br. J. Dermatol.* **161** (2009) 1098-1104.
60. J. Morales, G. Günther, A.L. Zanocco, E. Lemp, *Anal. Lett.* **46** (2013) 95-106.
61. J. Caron, B. Martin, B. Shroot, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* **230** (1982) 125-130.
62. K. Hermann, D. Abeck, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* **749** (2000) 41-47.
63. K. Hermann, D. Abeck, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* **750** (2001) 71-80.
64. K.M. Naohiro TATEDA, Kiyoshi Hasebe, Toshiaki Miura, *Anal. Sci.* **17** (2001) 775-778.
65. M. Takahashi, T. Tezuka, *Arch. Dermatol. Res.* **295** (2004) 448-452.
66. J.-K. Lin, J.-Y. Chang, *Anal. Chem.* **47** (1975) 1634-1638.
67. M. Takahashi, T. Tezuka, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* **688** (1997) 197-203.
68. H. Mark, C.R. Harding, *Int. J. Cosmetic Sci.* (2012).
69. A. Heazell, M. Brown, W. Dunn, S. Worton, I. Crocker, P. Baker, D. Kell, *Placenta* **29** (2008) 691-698.
70. G.A. Pope, D.A. MacKenzie, M. Defernez, M.A. Aroso, L.J. Fuller, F.A. Mellon, W.B. Dunn, M. Brown, R. Goodacre, D.B. Kell, *Yeast* **24** (2007) 667-679.
71. K.M. Joo, J.Y. Han, E.D. Son, G.W. Nam, H.Y. Chung, H.J. Jeong, J.C. Cho, K.M. Lim, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **897** (2012) 55-63.
72. P. Caspers, G. Lucassen, R. Wolthuis, H. Bruining, G. Puppels, *Biospectroscopy* **4** (1998) S31-S40.
73. P.J. Caspers, G.W. Lucassen, E.A. Carter, H.A. Bruining, G.J. Puppels, *J. Invest. Dermatol.* **116** (2001) 434-442.
74. P.J. Caspers, G.W. Lucassen, G.J. Puppels, *Biophys. J.* **85** (2003) 572-580.
75. A. Baclig, T. Bakker Schut, G. O'Regan, A. Irvine, W. McLean, G. Puppels, P. Caspers, *J. Raman Spectrosc.* **44** (2013) 340-345.
76. A.P. Teixeira, J.L. Rangel, L.J. Raniero, M.G. Tosato, P.P. Fávero, A.A. Martin, *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica* **30** (2014) 11-16.
77. M. Egawa, J. Nomura, H. Iwaki, *Photochem. Photobiol. Sci.* **9** (2010) 730-733.

78. K. Shibata, Y. Nishioka, T. Kawada, T. Fushiki, E. Sugimoto, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* **695** (1997) 434-438.
79. D. Zare, K. Muhammad, M.H.B. Bejo, H.M. Ghazali, *J. Chromatogr.* **1256** (2012) 144-149.
80. M. Robinson, M. Visscher, A. Laruffa, R. Wickett, *J. Cosmet. Sci.* **61** (2010) 13-22.
81. W. Schwarz, K. Langer, A. Haag, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* **310** (1984) 188-192.
82. P. Shieh, S.S. Cheng, D.H. Kuo, W.C. Fu, M.C. Hsu, F.A. Chen, *Taiwan Pharm. J.* **59** (2007) 141-148.
83. H. Morrison, D. Avnir, T. Zarrella, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* **183** (1980) 83-86.
84. W. Schwarz, K. Langer, A. Haag, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* **310** (1984) 188-192.
85. J.C. Caron, B. Martin, B. Shroot, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **230** (1982) 125-130.
86. H. Morrison, D. Avnir, T. Zarrella, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* **183** (1980) 83-86.
87. X. Chu, T. Zhao, Y. Zhang, A. Zhao, M. Zhou, X. Zheng, M. Dan, W. Jia, *Chromatographia* **69** (2009) 645-652.
88. N. Zehethofer, D.M. Pinto, D.A. Volmer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **22** (2008) 2125-2133.
89. M. Špitsmeister, K. Adamberg, R. Vilu, *J. Microbiol. Methods* **82** (2010) 288-295.
90. M.C. Thomas, S.R. Dunn, J. Altvater, S.G. Dove, G.W. Nette, *Anal. Chem.* **84** (2012) 5976-5983.
91. C.L. Bowen, J. Kehler, C.A. Evans, *J. Chromatogr. B* **878** (2010) 3125-3133.
92. K. Nagy, A. Jakab, J. Fekete, K. Vékey, *Anal. Chem.* **76** (2004) 1935-1941.
93. J.L. Kerwin, A.M. Wiens, L.H. Ericsson, *J. Mass Spectrom.* **31** (1996) 184-192.
94. A. Carrier, J. Parent, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **24** (2001) 97-107.
95. D. Perret, A. Gentili, S. Marchese, M. Sergi, L. Caporossi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18** (2004) 1989-1994.
96. S. Banerjee, S. Mazumdar, *Int. J. Anal. Chem.* **2012** (2012).

97. R. T'Kindt, L. Jorge, E. Dumont, P. Couturon, F. David, P. Sandra, K. Sandra, *Anal. Chem.* **84** (2012) 403-411.
98. M. Jemal, Z. Ouyang, D.S. Teitz, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **12** (1998) 429-434.
99. R.B. Cole, J. Zhu, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13** (1999) 607-611.
100. A. Kuksis, L. Marai, J.J. Myher, *Lipids* **26** (1991) 240-246.
101. B. Andersson, R. Holman, *Lipids* **9** (1974) 185-190.
102. N. Dubois, C. Barthomeuf, J.-P. Bergé, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **108** (2006) 28-32.
103. S.J. Barry, R.M. Carr, S.J. Lane, W.J. Leavens, S. Monte, I. Waterhouse, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17** (2003) 603-620.
104. S.M. Lamos, M.R. Shortreed, B.L. Frey, P.J. Belshaw, L.M. Smith, *Anal. Chem.* **79** (2007) 5143-5149.
105. W.-C. Yang, J. Adamec, F.E. Regnier, *Anal. Chem.* **79** (2007) 5150-5157.
106. M. Janssens, J. van Smeden, G.S. Gooris, W. Bras, G. Portale, P.J. Caspers, R.J. Vreeken, T. Hankemeier, S. Kezic, R. Wolterbeek, A.P. Lavrijsen, J.A. Bouwstra, *J. Lipid Res.* **53** (2012) 2755-2766.
107. M. Ponc, A. Weerheim, P. Lankhorst, P. Wertz, *J. Invest. Dermatol.* **120** (2003) 581-588.
108. Robson, *J. Lipid Res.* **43** (1994) 2060-2068.
109. M.E. Stewart, D.T. Downing, *J. Invest. Dermatol.* **105** (1995) 613-618.
110. P.W. Wertz, D.T. Downing, *J. Lipid Res.* **24** (1983) 759-765.
111. H. Higuchi, M. Nakamura, A. Kuwano, M. Kasamatsu, H. Nagahata, *Can. J. Vet. Res.* **69** (2005) 155.
112. K. Shimada, J.S. Yoon, T. Yoshihara, T. Iwasaki, K. Nishifuji, *Adv. Vet. Dermatol.* **20** (2009) 541-546.
113. I. Popa, L.H. Thuy, B. Colsch, D. Pin, H. Gatto, M. Haftek, J. Portoukalian, *Arch. Dermatol. Res.* **302** (2010) 639-644.
114. H. Farwanah, B. Pierstorff, C.E.H. Schmelzer, K. Raith, R.H.H. Neubert, T. Kolter, K. Sandhoff, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **852** (2007) 562-570.
115. H. Farwanah, P. Nuhn, R. Neubert, K. Raith, *Anal. Chim. Acta* **492** (2003) 233-239.
116. Y. Masukawa, H. Narita, H. Sato, A. Naoe, N. Kondo, Y. Sugai, T. Oba, R. Homma, J. Ishikawa, Y. Takagi, T. Kitahara, *J. Lipid Res.* **50** (2009) 1708-1719.

117. J.-P. Vietzke, O. Brandt, D. Abeck, C. Rapp, M. Strassner, V. Schreiner, U. Hintze, *Lipids* **36** (2001) 299-304.
118. J.P. Vietzke, M. Strassner, U. Hintze, *Chromatographia* **50** (1999) 15-20.
119. K. Raith, R.H.H. Neubert, *Anal. Chim. Acta* **403** (2000) 295-303.
120. K. Raith, S. Zellmer, J. Lasch, R.H.H. Neubert, *Anal. Chim. Acta* **418** (2000) 167-173.
121. M. Gu, J.L. Kerwin, J.D. Watts, R. Aebersold, *Anal. Biochem.* **244** (1997) 347-356.
122. B. Matuszewski, M. Constanzer, C. Chavez-Eng, *Anal. Chem.* **70** (1998) 882-889.
123. L.L. Jessome, D.A. Volmer, (2006).
124. Y. Masukawa, H. Tsujimura, *Lipids* **42** (2007) 275-290.
125. A. Hinder, C. Schmelzer, A. Rawlings, R. Neubert, *Skin Pharmacol. Physiol.* **24** (2011) 127-135.
126. F.-F. Hsu, J. Turk, M.E. Stewart, D.T. Downing, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **13** (2002) 680-695.
127. K. Raith, R.H. Neubert, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **12** (1998) 935-938.
128. J.M.E. Quirke, C.L. Adams, G.J. Van Berkel, *Anal. Chem.* **66** (1994) 1302-1315.
129. W.J. Griffiths, *Mass Spectrometry Reviews* **22** (2003) 81-152.
130. J.G. Bollinger, G. Rohan, M. Sadilek, M.H. Gelb, *J. Lipid Res.* (2013) jlr. D040782.
131. F. Valianpour, J.J. Selhorst, L.E. van Lint, A.H. van Gennip, R.J. Wanders, S. Kemp, *Mol. Genet. Metab.* **79** (2003) 189-196.
132. D.W. Johnson, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14** (2000) 2019-2024.
133. D.W. Johnson, M.-U. Trinh, T. Oe, *J. Chromatogr. B* **798** (2003) 159-162.
134. C. Pettinella, S.H. Lee, F. Cipollone, I.A. Blair, *J. Chromatogr. B* **850** (2007) 168-176.
135. X. Li, A.A. Franke, *Anal. Chem.* **83** (2011) 3192-3198.
136. J. Bielawski, Z.M. Szulc, Y.A. Hannun, A. Bielawska, *Methods* **39** (2006) 82-91.
137. T. Kasumov, H. Huang, Y.-M. Chung, R. Zhang, A.J. McCullough, J.P. Kirwan, *Anal. Biochem.* **401** (2010) 154-161.
138. X. Han, *Anal. Biochem.* **302** (2002) 199-212.
139. J. Smeraglia, S. Baldrey, D. Watson, *Chromatographia* **55** (2002) S95-S99.
140. L. Cuadros-Rodríguez, M.G. Bagur-González, M. Sánchez-Viñas, A. González-Casado, A.M. Gómez-Sáez, *J. Chromatogr.* **1158** (2007) 33-46.
141. E.G. Bligh, W.J. Dyer, *Can. J. Biochem. Physiol.* **37** (1959) 911-917.

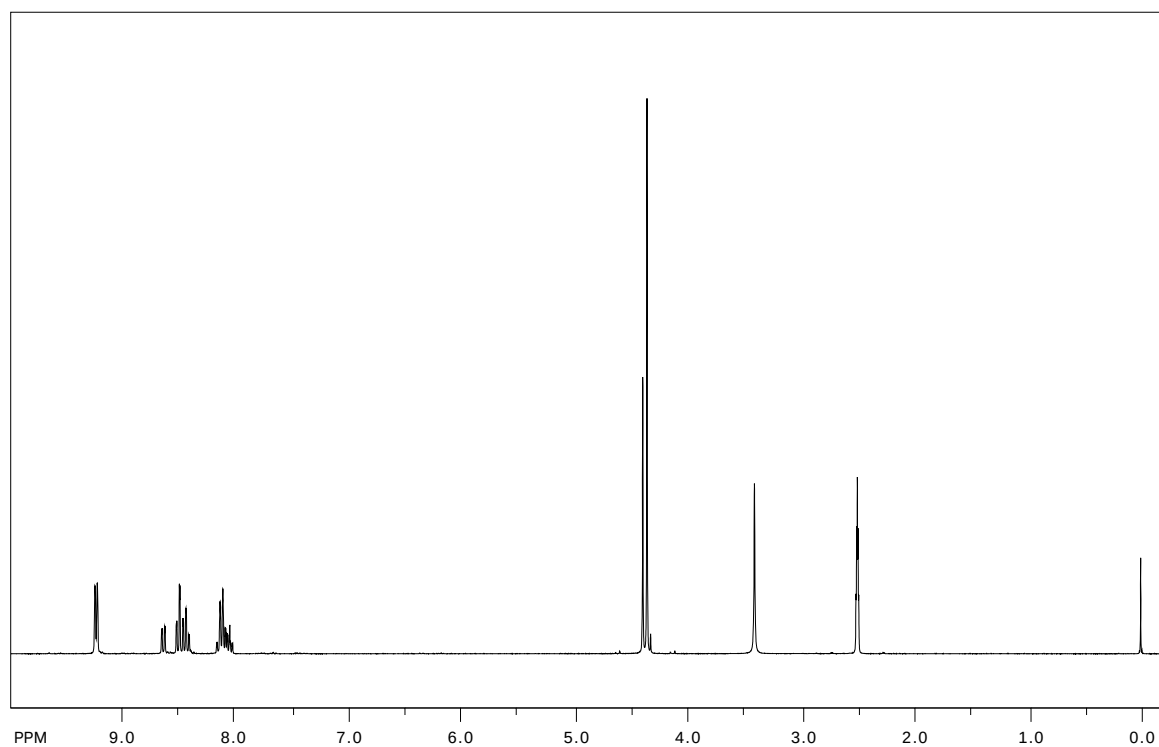
142. A. Lavrijsen, I. Higounenc, A. Weerheim, E. Oestmann, E. Tuinenburg, H. Bnddé, M. Ponec, *Arch. Dermatol. Res.* **286** (1994) 495-503.
143. E. Chambers, D.M. Wagrowski-Diehl, Z. Lu, J.R. Mazzeo, *J. Chromatogr. B* **852** (2007) 22-34.
144. W. Li, L.H. Cohen, *Anal. Chem.* **75** (2003) 5854-5859.
145. X. Guo, E. Lankmayr, *Bioanalysis* **3** (2011) 349-352.
146. A. Cappiello, G. Famiglini, P. Palma, E. Pierini, V. Termopoli, H. Trufelli, *Anal. Chem.* **80** (2008) 9343-9348.
147. A. Ćirić, H. Prosen, M. Jelikić-Stankov, P. Đurđević, *Talanta* **99** (2012) 780-790.
148. S. Ongay, G. Hendriks, J. Hermans, M. van den Berge, N.H.T. ten Hacken, N.C. van de Merbel, R. Bischoff, *J. Chromatogr.* **1326** (2014) 13-19.
149. M. Jemal, A. Schuster, D.B. Whigan, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17** (2003) 1723-1734.
150. A. Weerheim, M. Ponec, *Arch. Dermatol. Res.* **293** (2001) 191-199.
151. N.C. van de Merbel, *TrAC, Trends Anal. Chem.* **27** (2008) 924-933.
152. R. Ahmadkhaniha, A. Shafiee, N. Rastkari, M.R. Khoshayand, F. Kobarfard, *J. Chromatogr. B* **878** (2010) 845-852.
153. M. Bader, *J. Chem. Educ.* **57** (1980) 703.
154. Y. Liu, X.-W. Shi, E.-H. Liu, L.-S. Sheng, L.-W. Qi, P. Li, *J. Chromatogr.* **1254** (2012) 43-50.
155. N. Penner, R. Ramanathan, J. Zgoda-Pols, S. Chowdhury, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **52** (2010) 534-543.
156. K. Kinoshita, S. Jingu, J. Yamaguchi, *Anal. Biochem.* **432** (2013) 124-130.
157. E. Rodríguez-Gonzalo, R. Hernández-Prieto, D. García-Gómez, R. Carabias-Martínez, *J. Chromatogr. B* **942-943** (2013) 21-30.
158. B.R. Jones, G.A. Schultz, J.A. Eckstein, B.L. Ackermann, *Bioanalysis* **4** (2012) 2343-2356.
159. R.J. Brown, *Anal. Chim. Acta* **648** (2009) 153-156.
160. R.J. Brown, M.R. Roberts, D.J. Brett, *Anal. Chim. Acta* **635** (2009) 1-5.
161. R. Ahmadkhaniha, A. Shafiee, N. Rastkari, F. Kobarfard, *Anal. Chim. Acta* **631** (2009) 80-86.
162. H.R. Liang, T. Takagaki, R.L. Foltz, P. Bennett, *J. Chromatogr. B* **824** (2005) 36-44.

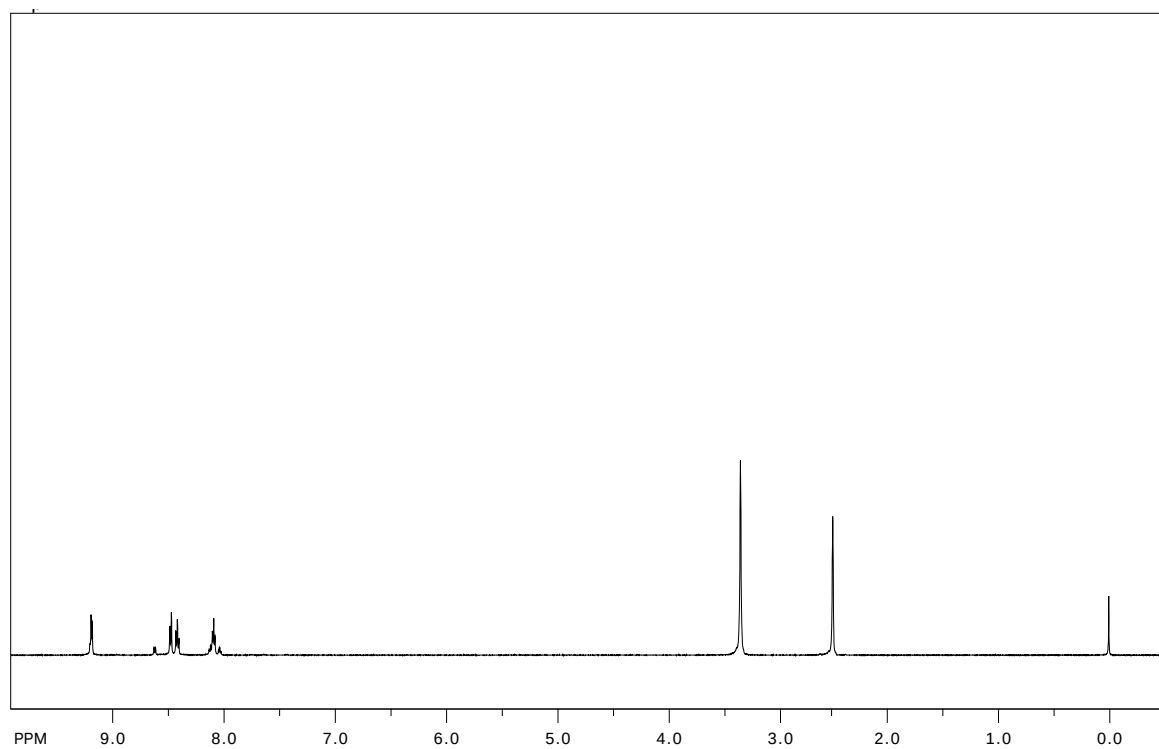
163. T. Hahn, S. Hansen, D. Neumann, K.H. Kostka, C.M. Lehr, L. Muys, U. Schaefer, *Skin Pharmacol. Physiol.* **23** (2010) 183-192.
164. P. Smith, R.I. Krohn, G. Hermanson, A. Mallia, F. Gartner, M. Provenzano, E. Fujimoto, N. Goeke, B. Olson, D. Klenk, *Anal. Biochem.* **150** (1985) 76-85.
165. P.M. Elias, M. Steinhoff, *J. Invest. Dermatol.* **128** (0000) 1067-1070.
166. P.M. Elias, *J. Invest. Dermatol.* **132** (2012) 2131-2133.
167. J. Bouwstra, G. Gooris, M. Poncet, *J. Biol. Phys.* **28** (2002) 211-223.
168. A.V. Rawlings, P.J. Matts, *J. Invest. Dermatol.* **124** (2005) 1099-1110.
169. J.M. Jungersted, L.I. Hellgren, T. Drachmann, G.B.E. Jemec, T. Agner, *Skin Pharmacol. Physiol.* **23** (2010) 62-67.
170. M. Janssens, J. Van Smeden, G.S. Gooris, W. Bras, G. Portale, P.J. Caspers, R.J. Vreeken, S. Kezic, A.P.M. Lavrijsen, J.A. Bouwstra, *J. Invest. Dermatol.* **131** (2011) 2136-2138.
171. M. Robinson, M. Visscher, A. LaRuffa, R. Wickett, *J. Cosmet. Sci.* **61** (2009) 23-29.
172. R.J.G. Rycroft, Textbook of contact dermatitis, Springer, Berlin [u.a.], 2001.
173. C.M. de Jongh, M.M. Verberk, S.W. Spiekstra, S. Gibbs, S. Kezic, *Skin Res. Technol.* **13** (2007) 390-398.
174. T. Jui-Chen, N.D. Weiner, G.L. Flynn, J. Ferry, *Int. J. Pharm.* **72** (1991) 227-231.
175. C.R. Harding, S. Aho, C.A. Bosko, *Int. J. Cosmetic Sci.* (2013).
176. I. Jakasa, C.M. De Jongh, M.M. Verberk, J.D. Bos, S. Kežić, *Br. J. Dermatol.* **155** (2006) 104-109.
177. I. Jakasa, M.M. Verberk, A.L. Bunge, J. Kruse, S. Kezic, *Exp. Dermatol.* **15** (2006) 801-807.
178. C.M. De Jongh, I. Jakasa, M.M. Verberk, S. Kezic, *Br. J. Dermatol.* **154** (2006) 651-657.
179. M. Hata, Y. Tokura, M. Takigawa, M. Sato, Y. Shioya, Y. Fujikura, G. Imokawa, *Lab. Invest.* **82** (2002) 1451-1461.
180. G.M. O'Regan, A. Sandilands, W.H.I. McLean, A.D. Irvine, *J. Allergy Clin. Immunol.* **124** (2009) R2-R6.
181. I. Dapic, I. Jakasa, N.L.H. Yau, S. Kezic, A. Kammeyer, *Anal. Lett.* **46** (2013) 2133-2144.
182. I. Angelova-Fischer, I. Dapic, A.-K. Hoek, I. Jakasa, T.W. Fischer, D. Zillikens, S. Kezic, *Acta Derm.-Venereol.* **1** (2013) 5555.

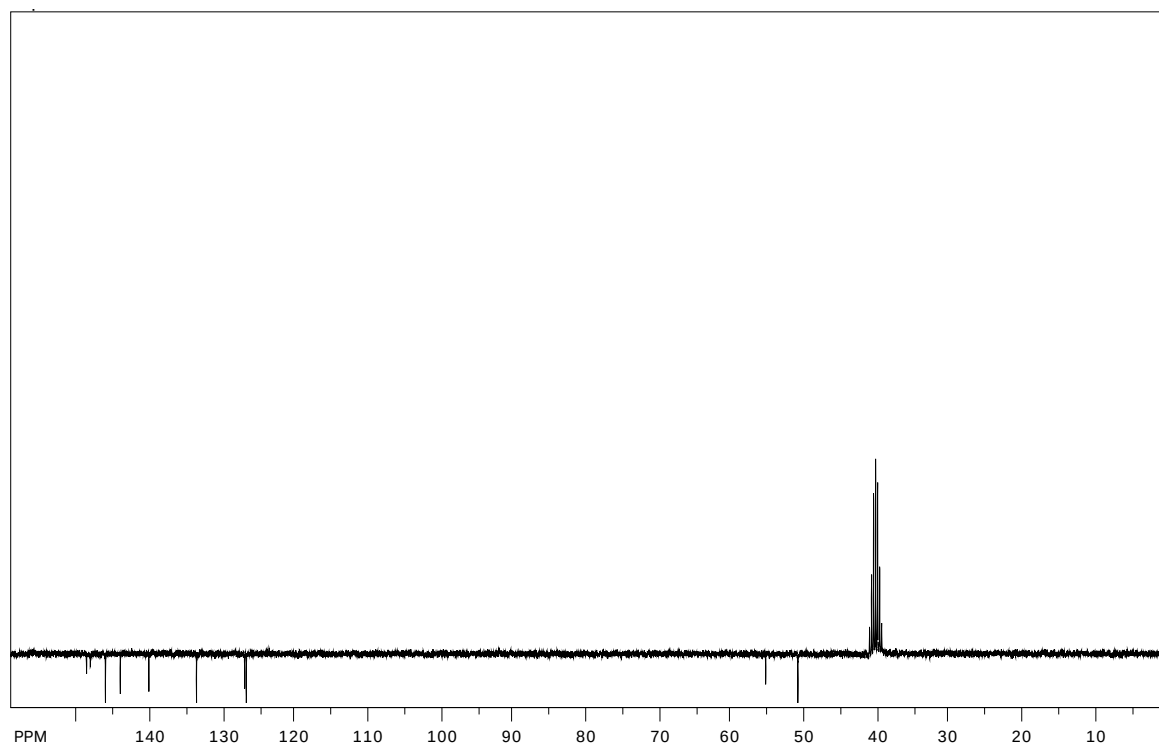
183. S. Kezic, G. O'Regan, N. Yau, A. Sandilands, H. Chen, L. Campbell, K. Kroboth, R. Watson, M. Rowland, W. Irwin McLean, *Allergy* **66** (2011) 934-940.
184. V. Mlitz, J. Latreille, S. Gardinier, R. Jdid, Y. Drouault, P. Hufnagl, L. Eckhart, C. Guinot, E. Tschachler, *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **26** (2012) 983-990.
185. F. Thawer-Esmail, I. Jakasa, G. Todd, Y. Wen, S.J. Brown, K. Kroboth, L.E. Campbell, G.M. O'Regan, W.I. McLean, A.D. Irvine, *The Journal of allergy and clinical immunology* **133** (2014) 280.
186. D.G. Koopman, S. Kežić, M.M. Verberk, *Br. J. Dermatol.* **150** (2004) 493-499.
187. M. Gloor, B. Senger, M. Langenauer, J.W. Fluhr, *Skin Res. Technol.* **10** (2004) 144-148.
188. J. Aramaki, C. Löffler, S. Kawana, I. Effendy, R. Happle, H. Löffler, *Br. J. Dermatol.* **145** (2001) 704-708.
189. J. Bandier, K. Ross-Hansen, B.C. Carlsen, T. Menné, A. Linneberg, S. Stender, P.B. Szecsi, M. Meldgaard, J.P. Thyssen, J.D. Johansen, *Contact Dermatitis* **69** (2013) 355-362.
190. J.P. Thyssen, B. Carlsen, T. Menné, A. Linneberg, N. Nielsen, M. Meldgaard, P.B. Szecsi, S. Stender, J. Johansen, *Br. J. Dermatol.* **163** (2010) 115-120.
191. J. Serup, G.B. Jemec, G.L. Grove, (2006).
192. M. Gloor, *Skin Pharmacol. Physiol.* **17** (2004) 267-273.
193. H. Törmä, M. Lindberg, B. Berne, *J. Invest. Dermatol.* **128** (2008) 1212-1219.
194. O. ten Berge, E.F. Knol, H. van Weelden, M.S. de Bruin-Weller, C.A.F.M. Bruijnzeel-Koomen, *Adverse effects of ultraviolet irradiation in atopic dermatitis* (2010) 55.
195. L.K. Dotterud, T. Wilsgaard, L.H. Vorland, E.S. Falk, *International Journal of Circumpolar Health* **67** (2008).
196. J. Viiri, H. Jauhonen, A. Kauppinen, T. Ryhänen, T. Paimela, J. Hyttinen, I. Sorri, J. Laihia, L. Leino, K. Kaarniranta, *Mol. Vis.* **15** (2009) 1799.
197. J. Tabachnick, *Arch. Biochem. Biophys.* **70** (1957) 295.
198. E.C. De Fabo, L.J. Webber, E.A. Ulman, L.D. Broemeling, *The Journal of nutrition* **127** (1997) 2158-2164.
199. F. de Fine Olivarius, H. Wulf, J. Crosby, M. Norval, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **48** (1999) 42-47.
200. A. Kammeyer, M. Teunissen, S. Pavel, M. RIE, J. Bos, *Br. J. Dermatol.* **132** (1995) 884-891.
201. F. Bonté, A. Saunois, P. Pinguet, A. Meybeck, *Arch. Dermatol. Res.* **289** (1997) 78-82.

202. T. Mukaiyama, M. Usui, E. Shimada, K. Saigo, *Chem. Lett.* **4** (1975) 1045-1048.
203. <http://www.sisweb.com/mstools/isotope.htm> (preuzeto 12.06.2014.)
204. B. Matuszewski, M. Constanzer, C. Chavez-Eng, *Anal. Chem.* **75** (2003) 3019-3030.
205. J. Lalman, D. Bagley, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **81** (2004) 105-110.
206. A. Di Nardo, P. Wertz, A. Gianneti, S. Seidenari, *Acta Derm.-Venereol.* **78** (1998) 27-30.
207. P.W. Wertz, M.C. Miethke, S.A. Long, J.S. Strauss, D.T. Downing, *J. Invest. Dermatol.* **84** (1985).
208. M.C.M. Philip W Wertz, Sherri A Long, John S Strauss and Donald T Downing, *J. Invest. Dermatol.* **84** (1984) 410-412.
209. B.J. Pettus, A. Bielawska, B.J. Kroesen, P.D. Moeller, Z.M. Szulc, Y.A. Hannun, M. Busman, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17** (2003) 1203-1211.
210. M.H. Lee, G.H. Lee, J.S. Yoo, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17** (2002) 64-75.
211. M. Fillet, J.C. Van Heugen, A.C. Servais, J. De Graeve, J. Crommen, (2001).
212. F.F. Sahle, S. Lange, B. Dobner, J. Wohlrab, R.H.H. Neubert, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **60** (2012) 7-13.
213. T. Houjou, K. Yamatani, M. Imagawa, T. Shimizu, R. Taguchi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **19** (2005) 654-666.

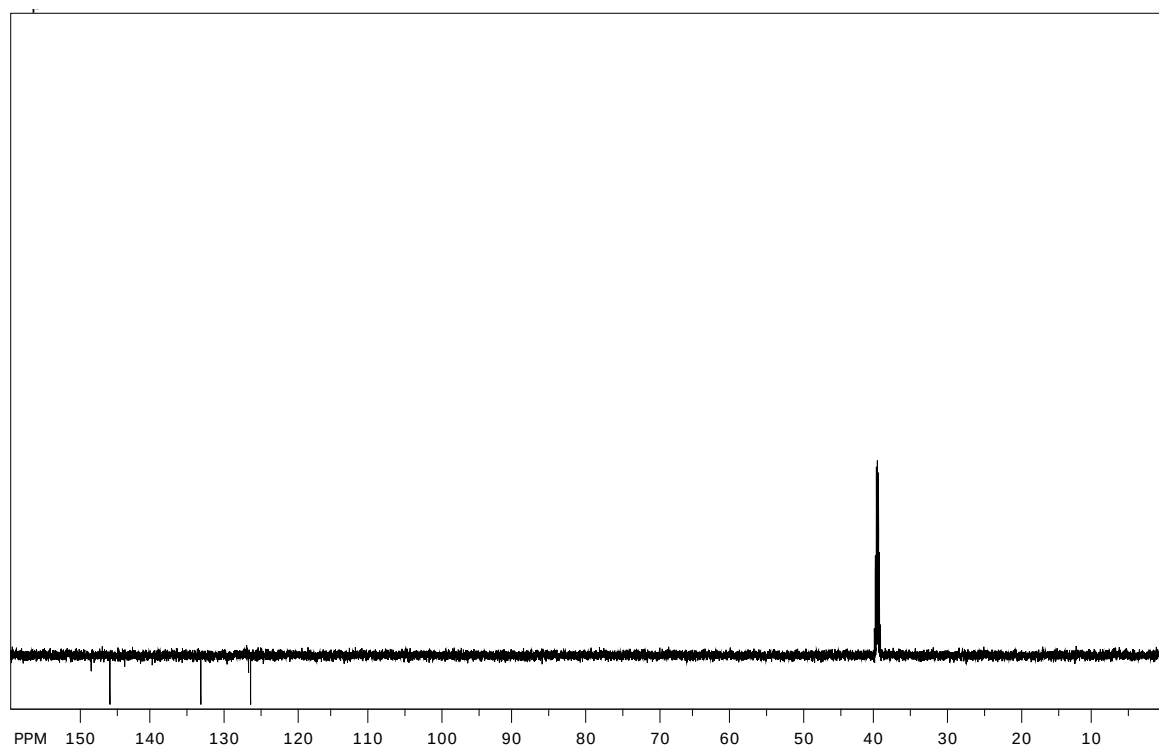
§ 8. DODATAK

Prilog 1. ^1H NMR spektar derivatizacijskog reagensa BMP

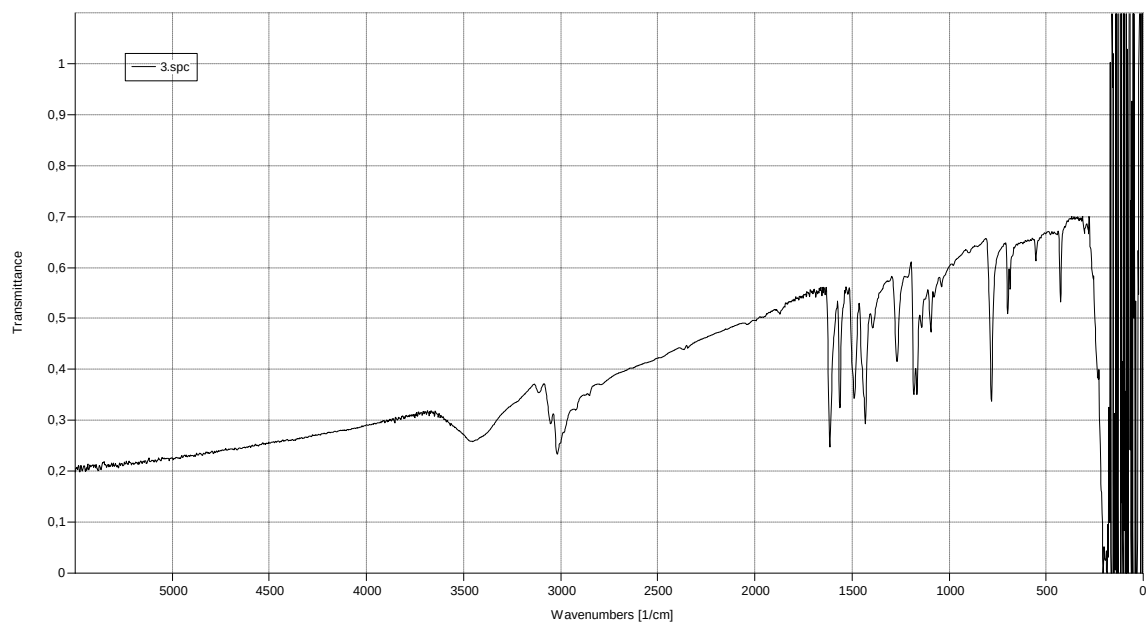
Prilog 2. ^1H NMR spektar derivatizacijskog reagensa BMP- d_3 

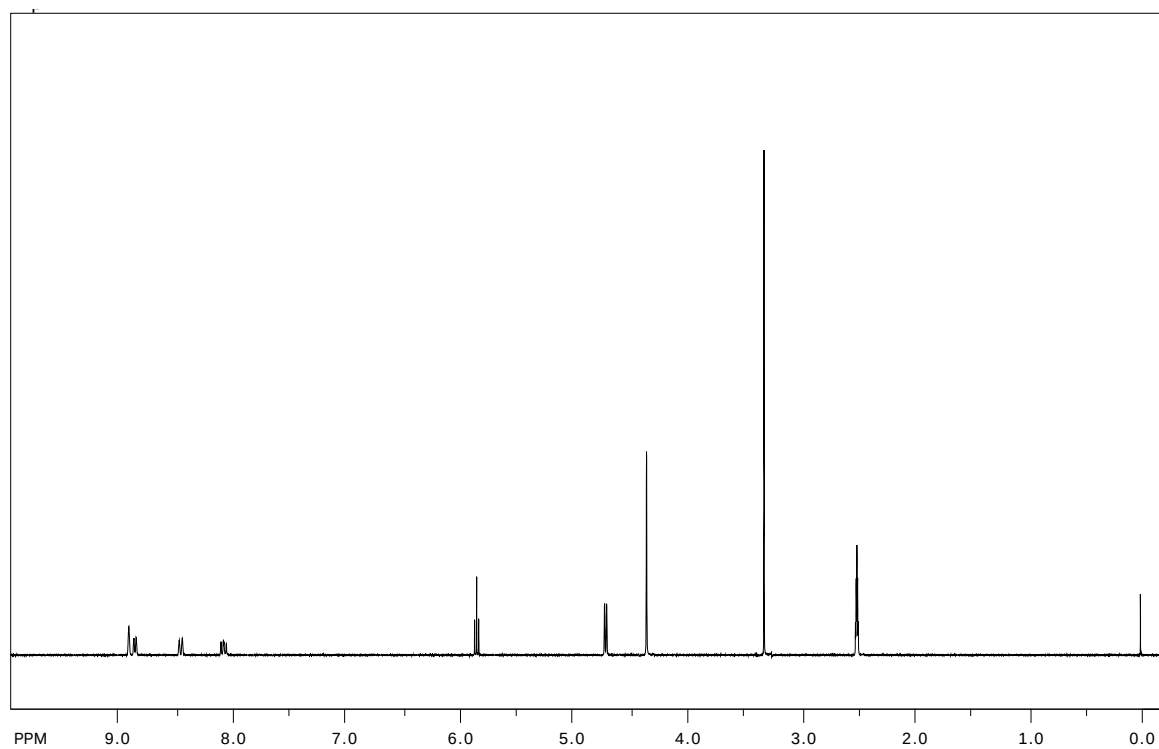
Prilog 3. ^{13}C NMR spektar derivatizacijskog reagensa BMP

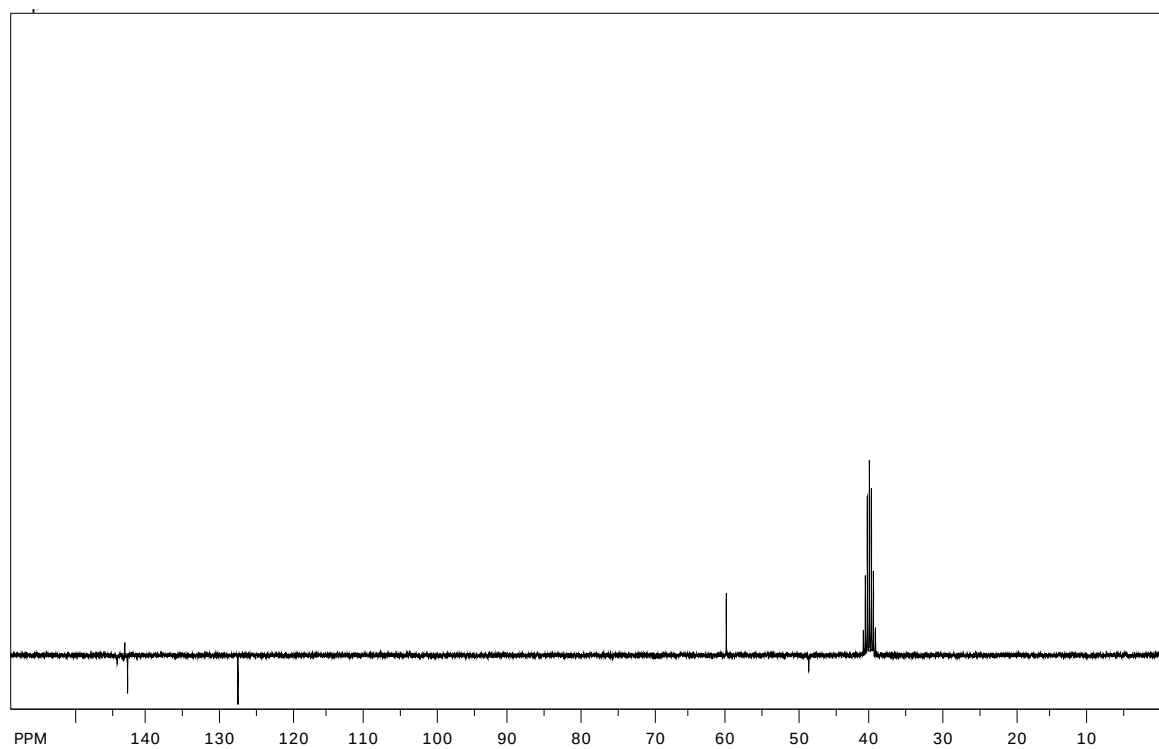
Prilog 4. ^{13}C NMR spektar derivatizacijskog reagensa BMP-*d*3

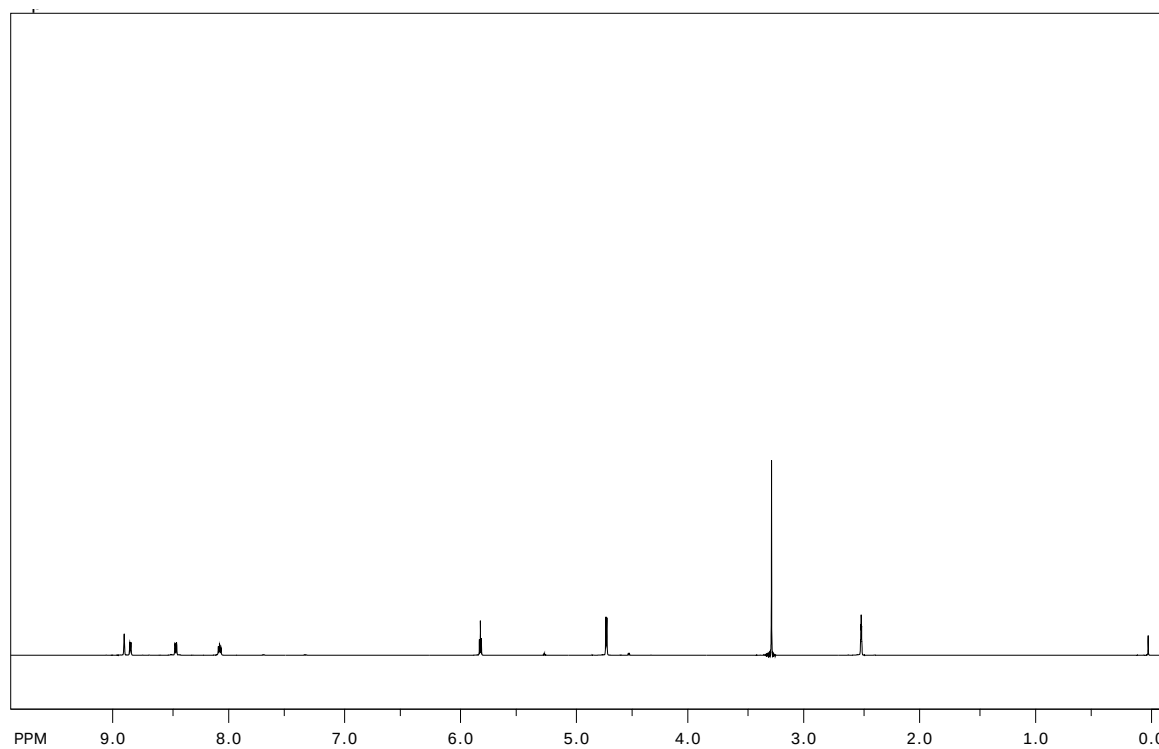


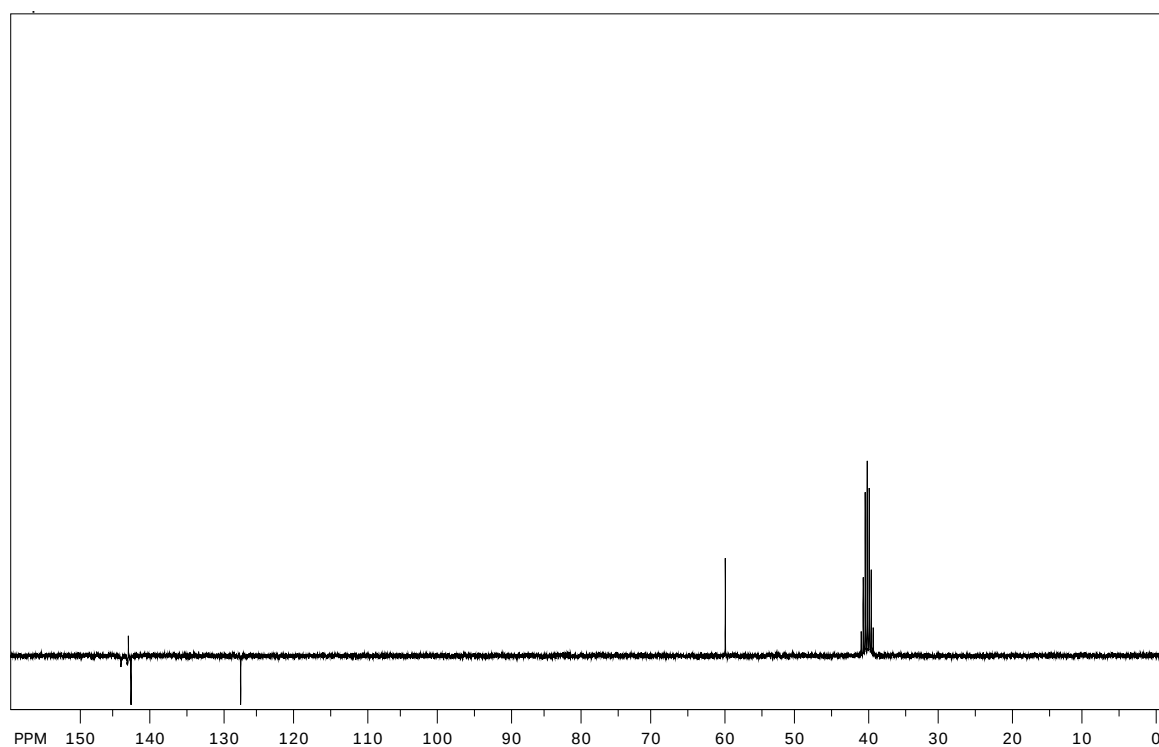
Prilog 5. IR spektar derivatizacijskog reagensa BMP



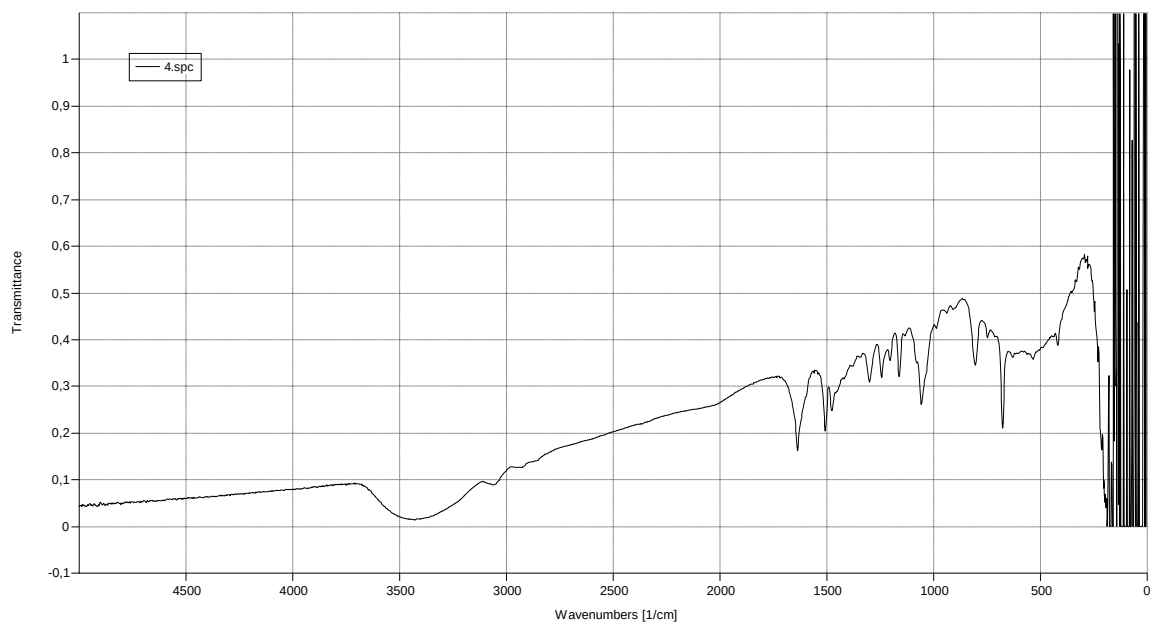
Prilog 6. ^1H NMR spektar derivatizacijskog reagensa CMP

Prilog 7. ^{13}C NMR spektar derivatizacijskog reagensa CMP

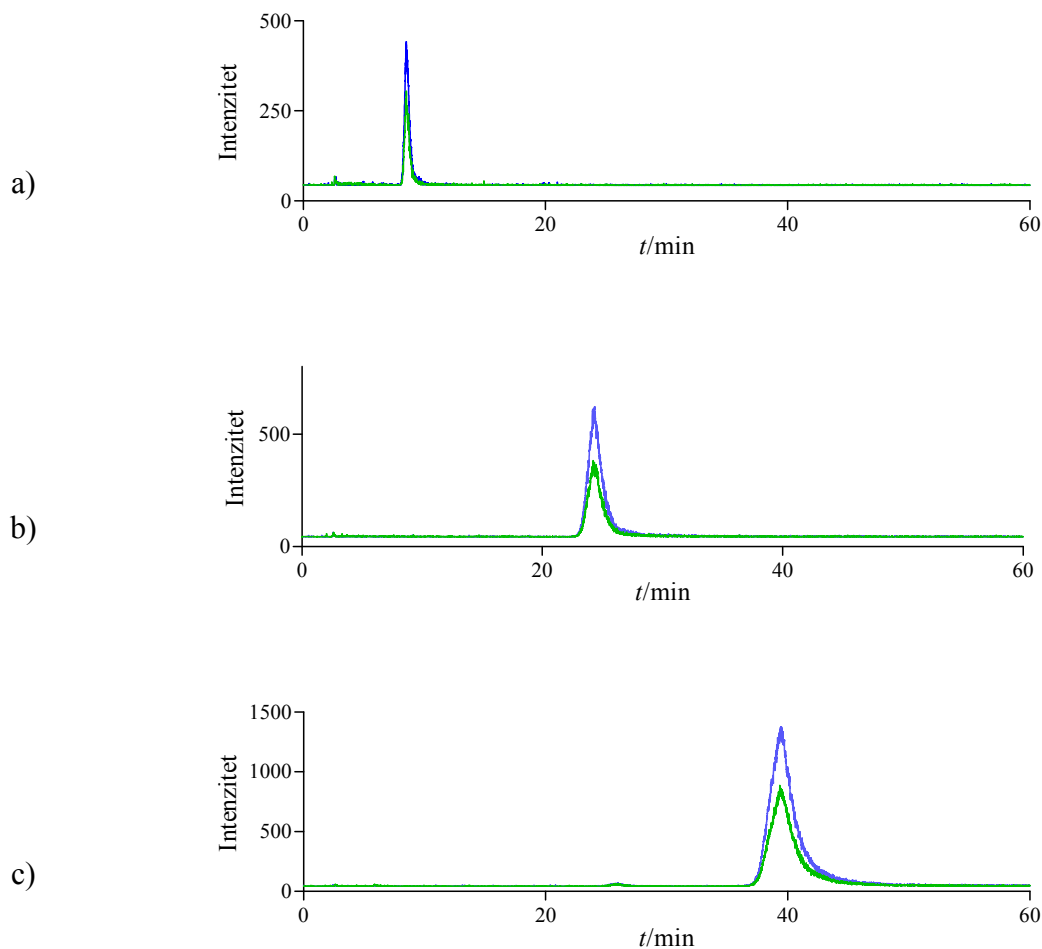
Prilog 8. ^1H NMR spektar derivatizacijskog reagensa CMP-*d3*

Prilog 9. ^{13}C NMR spektar derivatizacijskog reagensa CMP-*d3*

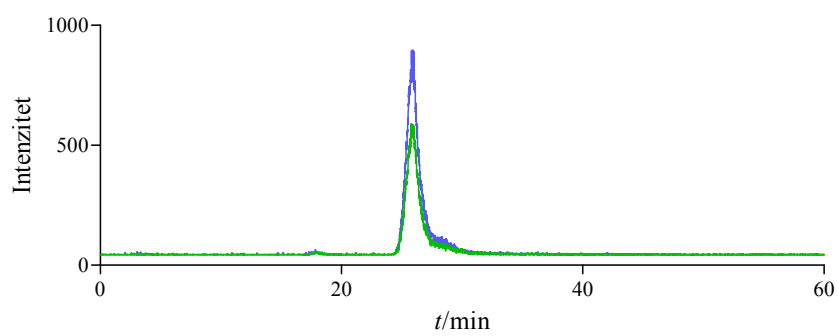
Prilog 10. IR spektar derivatizacijskog reagensa CMP



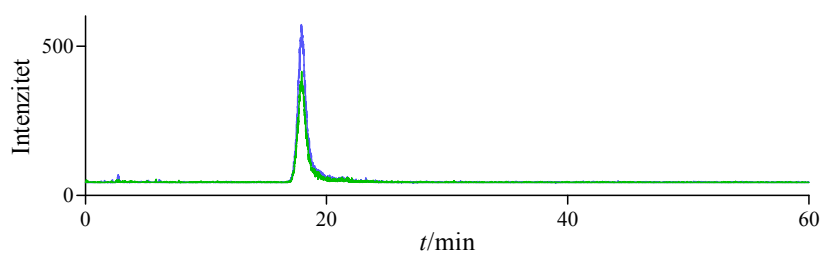
Prilog 11. Kromatogrami višestrukih tranzicijskih reakcija $[M]^+ \rightarrow 124$ (plavo) i $[M]^+ \rightarrow 107$ (zeleno) NMP derivata masnih kiselina na koloni Synergy Hydro-RP: a) $c(C12:0) = 4,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, b) $c(C16:0) = 2,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, c) $c(C18:0) = 2,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, d) $c(C18:1) = 4,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, e) $c(C18:2) = 4,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. NMP derivati masnih kiselina eluirani su upotrebom gradijenta mobilne faze prema Tablici 11.



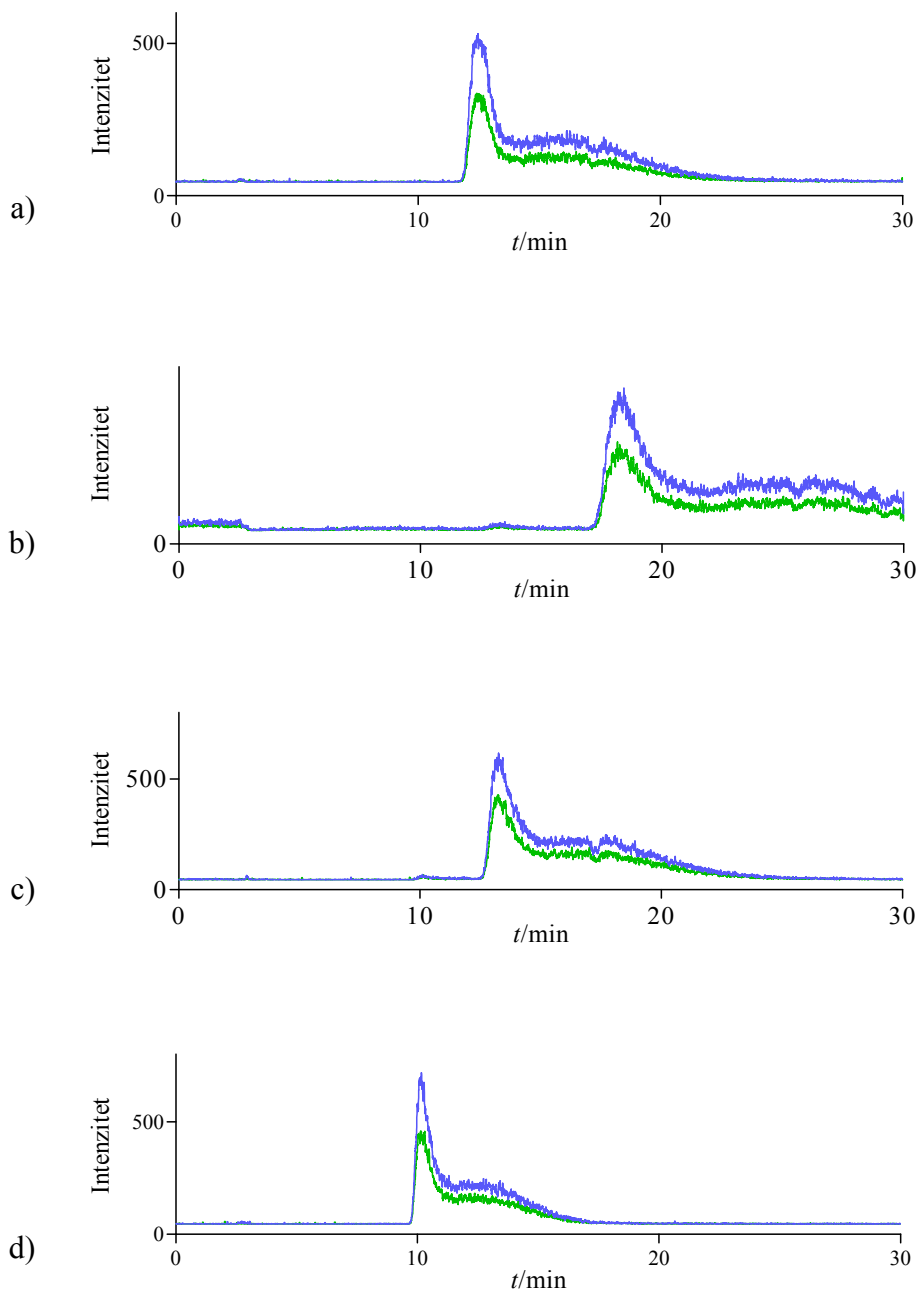
d)



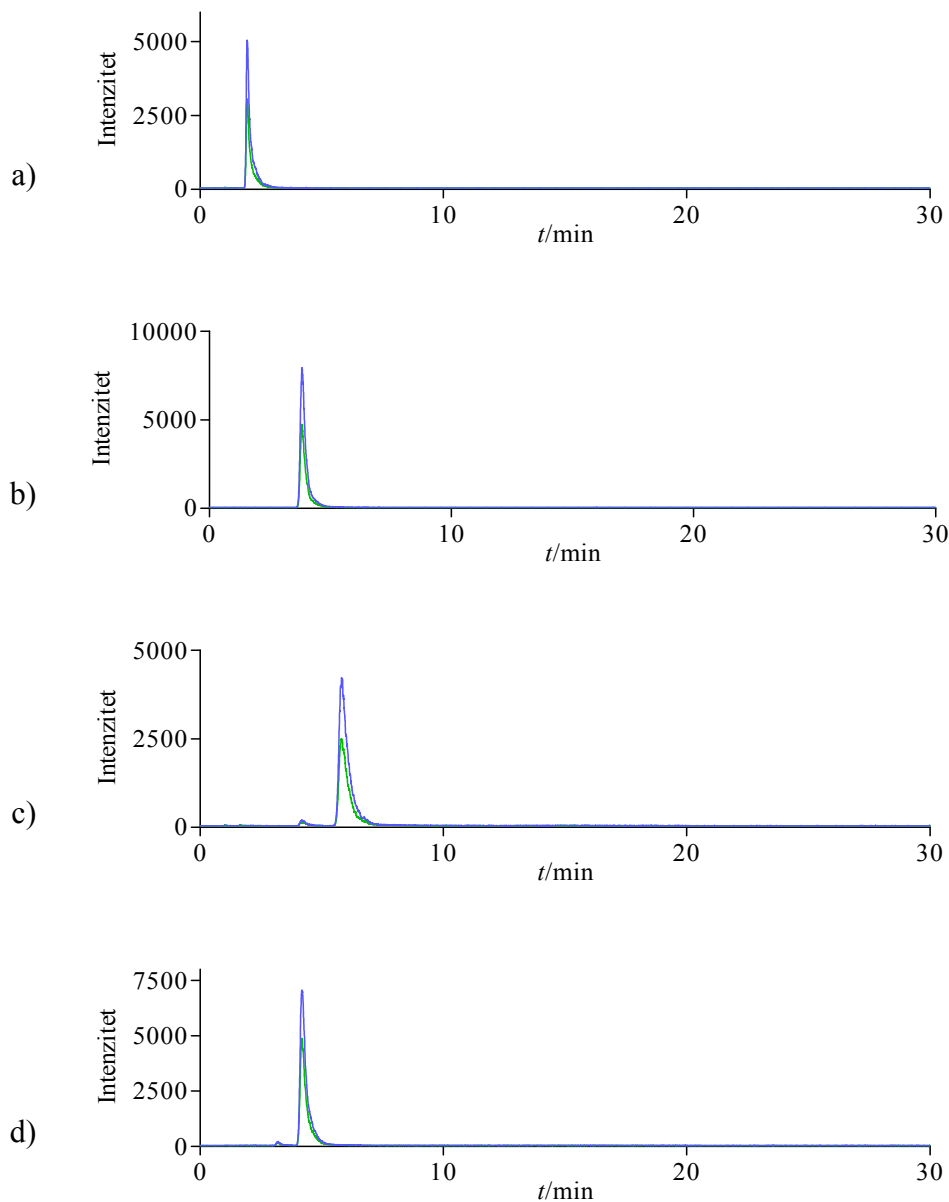
e)

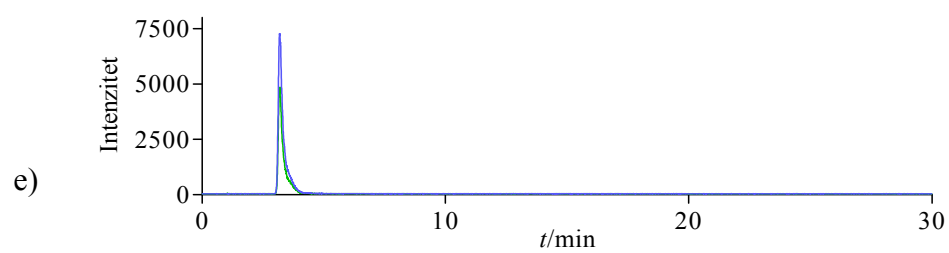


Prilog 12. Kromatogrami višestrukih tranzicijskih reakcija $[M]^+ \rightarrow 124$ (plavo) i $[M]^+ \rightarrow 107$ (zeleno) NMP derivata masnih kiselina na koloni Zorbax-XDB: a) $c(C16:0) = 2,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, b) $c(C18:0) = 2,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, c) $c(C18:1) = 4,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, d) $c(C18:2) = 4,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. NMP derivati masnih kiselina eluirani su upotrebom gradijenta mobilne faze prema Tablici 12.

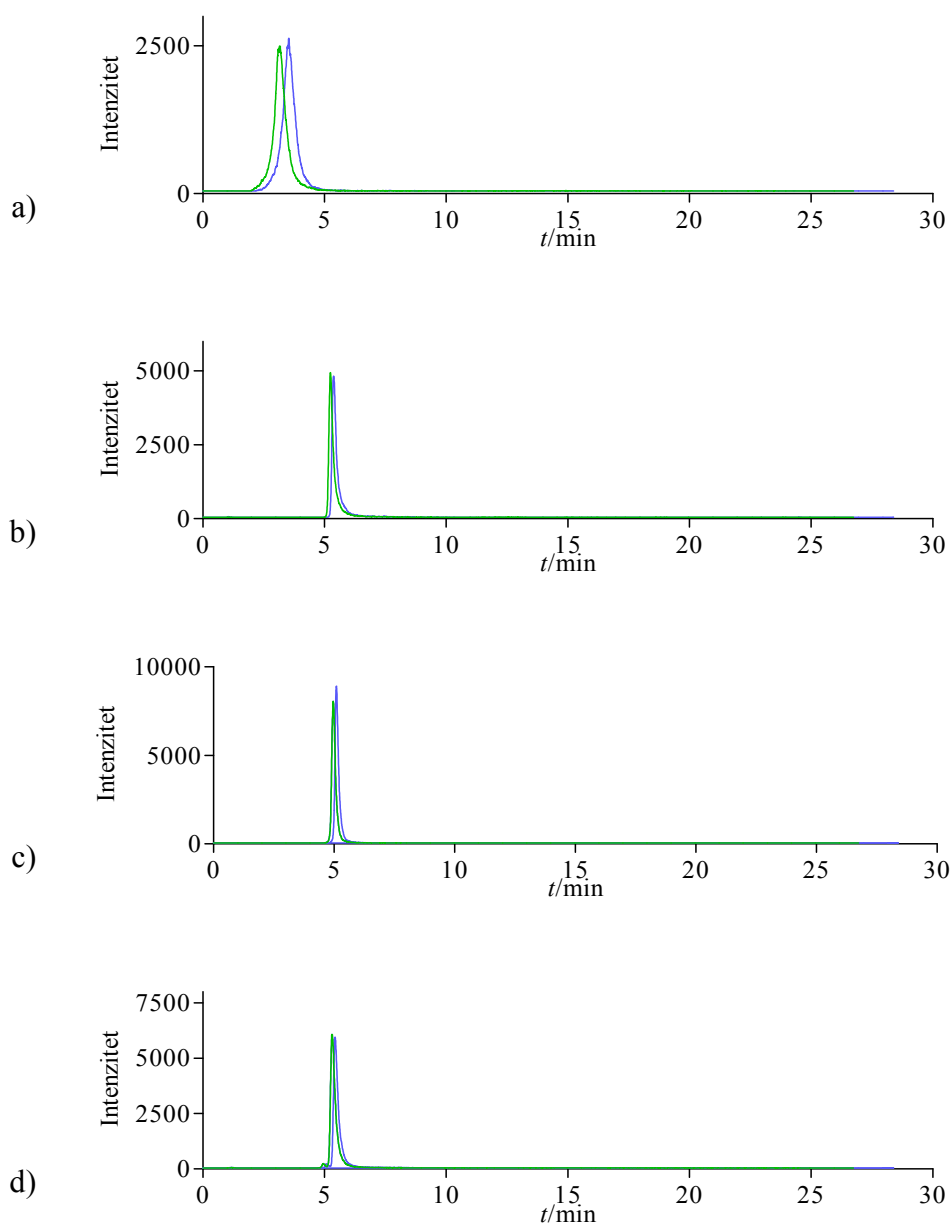


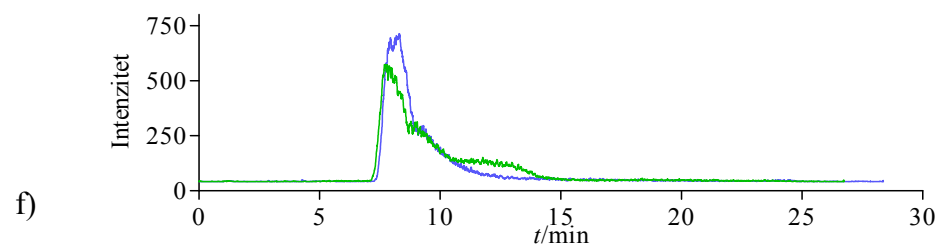
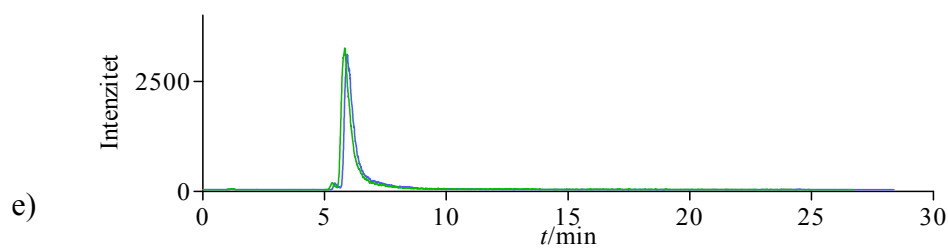
Prilog 13. Kromatogrami višestrukih tranzicijskih reakcija $[M]^+ \rightarrow 124$ (plavo) i $[M]^+ \rightarrow 107$ (zeleno) NMP derivata masnih kiselina na koloni Hypersil Gold: a) $c(C12:0) = 6,6 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, b) $c(C16:0) = 4,4 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, c) $c(C18:0) = 4,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, d) $c(C18:1) = 6,9 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, e) $c(C18:2) = 6,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. NMP derivati masnih kiselina eluirani su upotrebom gradijenta mobilne faze prema Tablici 13.



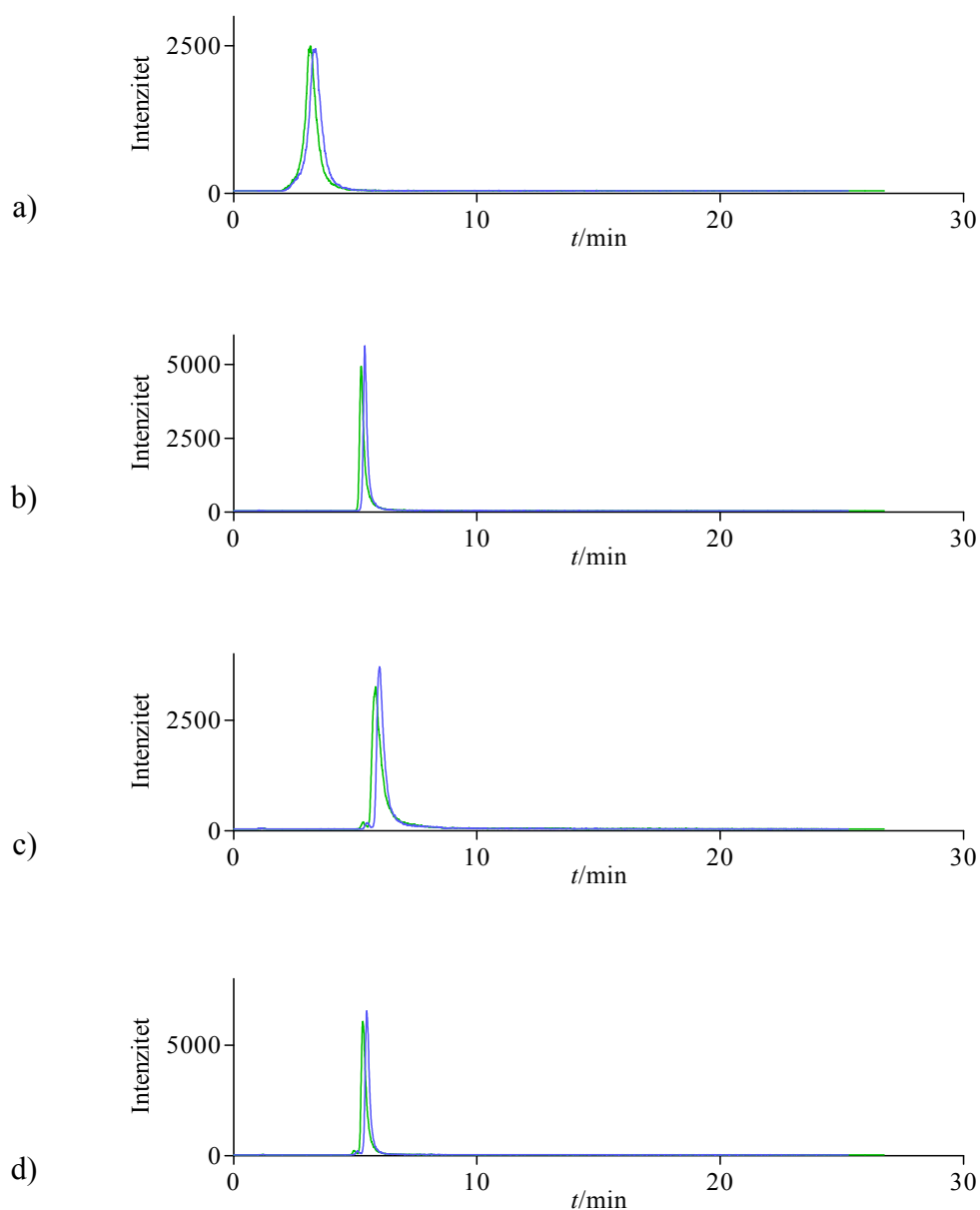


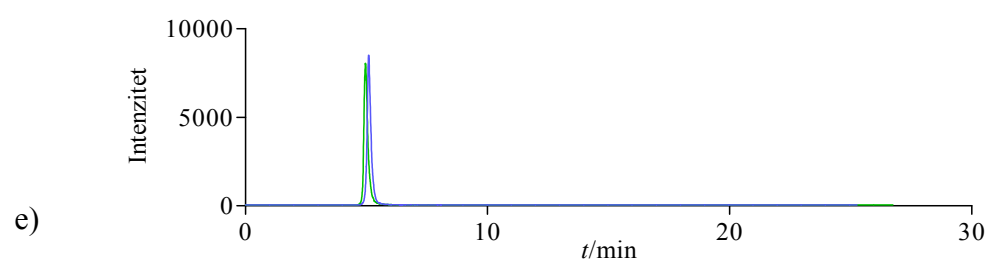
Prilog 14. Kromatogrami tranzicijske reakcije $[M]^+ \rightarrow 124$ na Hypersil Gold kromatografskoj koloni: a) $c(\text{C12:0}) = 6,8 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, b) $c(\text{C16:0}) = 4,9 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, c) $c(\text{C18:2}) = 7,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, d) $c(\text{C18:1}) = 7,3 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, e) $c(\text{C18:0}) = 4,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, f) $c(\text{C22:0}) = 4,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. NMP derivati masnih kiselina eluirani su upotrebom gradijenta mobilne faze prema Tablici 14. te se mobilna faza B sastojala od CH_3CN (plavo) ili CH_3CN i 0,1 % HCOOH (zeleno).



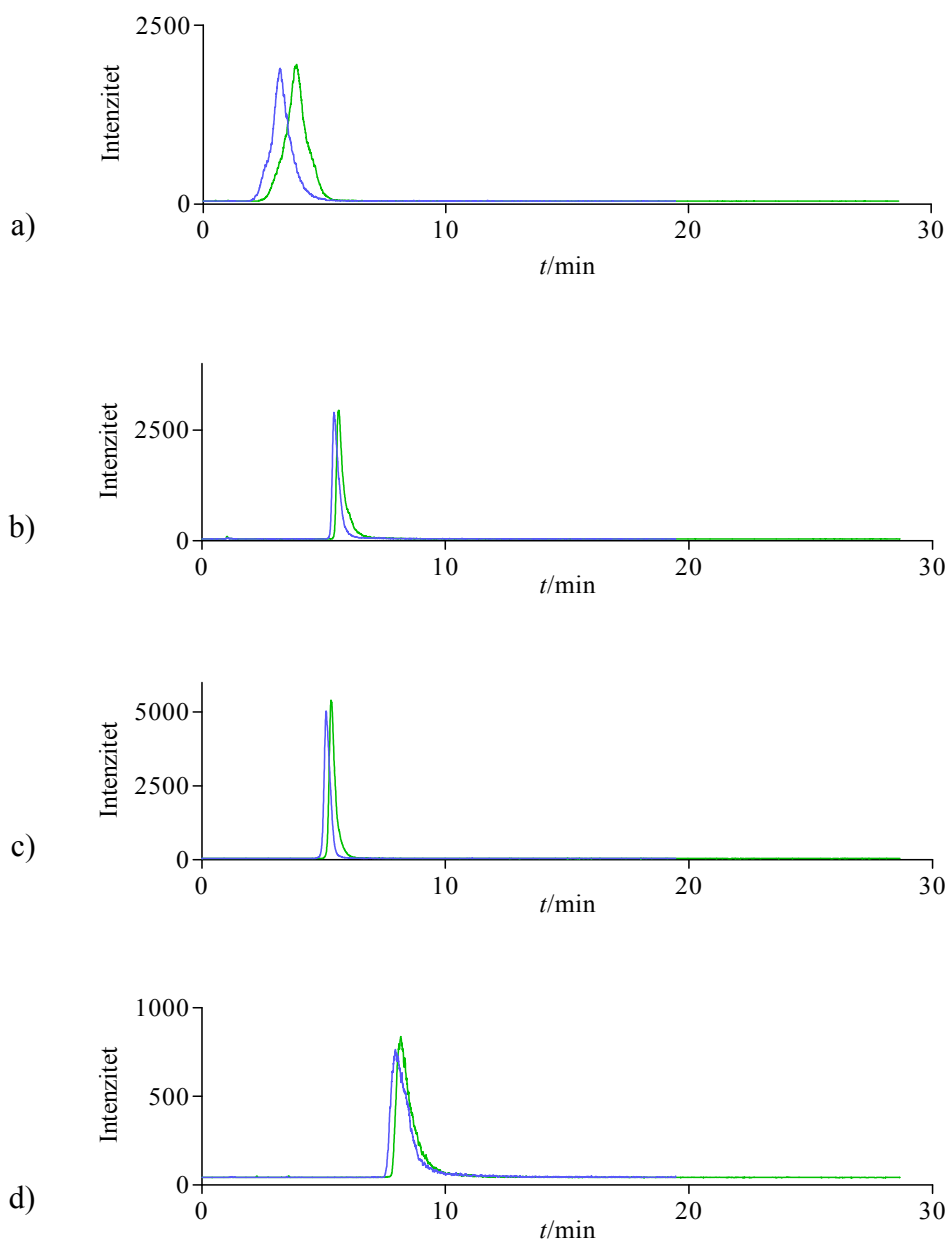


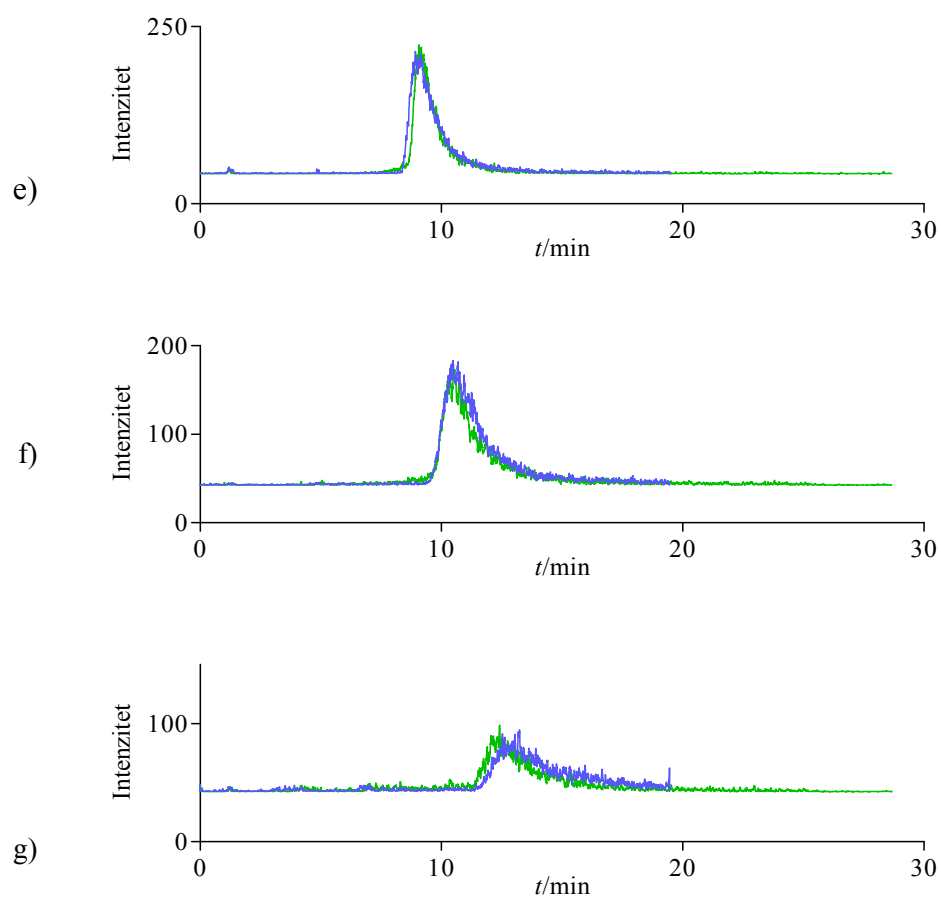
Prilog 15. Kromatogrami tranzicijske reakcije $[M]^+ \rightarrow 124$ NMP derivata masnih kiselina na Hipersil Gold kromatografskoj koloni: a) $c(C12:0) = 6,8 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, b) $c(C16:0) = 4,9 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, c) $c(C18:0) = 4,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, d) $c(C18:1) = 7,3 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, e) $c(C18:2) = 7,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. NMP derivati masnih kiselina eluirani su upotrebom gradijenta mobilne faze prema Tablici 15. te se mobilna faza B sastojala od CH_3CN sa 0,1 % HCOOH (zeleno) ili CH_3CN sa 0,1 % HCOOH i 10 % MeOH (plavo).





Prilog 16. Kromatogrami tranzicijske reakcije $[M]^+ \rightarrow 124$ na Hypersil Gold kromatografskoj koloni: a) $c(C12:0) = 6,8 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, b) $c(C16:0) = 4,9 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, c) $c(C18:2) = 7,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, d) $c(C22:0) = 4,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, e) $c(C24:0) = 1,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, f) $c(C26:0) = 4,1 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, g) $c(C28:0) = 1,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. NMP derivati masnih kiselina eluirani su upotrebom gradijenta mobilne faze prema Tablici 15. te se mobilna faza B sastojala od CH_3CN sa 0,1 % HCOOH i 10 % MeOH (zeleno) ili CH_3CN sa 0,1 % HCOOH i 10 % EtOH (plavo).





§ 9. ŽIVOTOPIS

Irena Đapić rođena je 25.07.1984. godine u Osijeku gdje je završila osnovnu i srednju školu. 2003. godine upisala je Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu te 2008. godine stječe diplomu diplomiranog inženjera kemije. Od 2009. godine zaposlena je kao asistentica u Laboratoriju za analitičku kemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Sveučilišni poslijediplomski studij prirodnih znanosti, polje Kemija, smjer Analitička kemija na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisuje 2009. godine. Doktorsku disertaciju izrađuje pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Ivone Jakaša i dr. sc. Renate Kobetić, znan. sur.

Tijekom izrade doktorske disertacije usavršavala se na Coronel Institute of Occupational Health, Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam, Nizozemska u ukupnom trajanju od 6 mjeseci te na Faculté de Médecine et de Pharmacie, Lyon, Francuska u trajanju od 2 tjedna.

2013. godine usmenim priopćenjem pod nazivom "HPLC method for the determination of NMFs and applications" na znanstvenom skupu SKINBAD Final conference održanom u Kopenhagenu, Danska prezentirala je HPLC metodu za određivanje komponenata prirodnih čimbenika zadržavanja vlage koja je razvijena u okviru doktorske disertacije.

2014. godine dodjeljena joj je Ronnie Marks nagrada od *International Society for stratum corneum research* za znanstveni rad pod naslovom "Determination and Quantification of Free Fatty acids in Human *Stratum Corneum* by LC-MS" koji je usmeno prezentirala na međunarodnom znanstvenom skupu "Stratum corneum VIII" održanom u Cardiffu, Wales.

Koautor je 4 znanstvene publikacije objavljene u znanstvenim časopisima indeksiranim u *Current Contents* te više posterskih priopćenja na međunarodnim znanstvenim skupovima.

Sudjeluje u izvođenju laboratorijskih vježbi i seminara u okviru kolegija "Uvod u kemiju i kemijsku analizu" na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

U suradnji sa "Ljetnom tvornicom znanosti" sudjelovala je u više radionica popularizacije znanosti.

Znanstveni radovi objavljeni u časopisima indeksiranim u bazi *Current Contents*:

1. Angelova-Fischer, I.; Dapic, I.; Hoek, A.-K.; Jakasa, I.; Fischer, T. W.; Zillikens, D.; Kezic, S.,
Skin barrier integrity and natural moisturizing factor levels after cumulative dermal exposure to alkaline agents in atopic dermatitis. *Acta Derm.-Venereol.* **94** (2013) 640 – 644.
2. Dapic, I.; Jakasa, I.; Yau, N. L. H.; Kezic, S.; Kammeyer, A.
Evaluation of an HPLC Method for the Determination of Natural Moisturizing Factors in the Human Stratum Corneum. *Anal. Lett.* **46** (2013) 2133 – 2144.
3. Dapic, I.; Kovačević, D.
Electrokinetic Study of Bovine Serum Albumin Adsorption on Previously Formed PAH/PSS Multilayer. *Croat. Chem. Acta* **84** (2011) 185 – 191.
4. Primorac, E.; Dapic, I.; Štrbe, N.; Kovačević, D.
Adsorption of bovine serum albumin on previously formed PAH/PSS multilayer: A stagnation point optical reflectometry study. *Colloids Surf., B* **76** (2010) 305 – 310.

Sudjelovanje na međunarodnim znanstvenim skupovima:

1. Jakasa, I.; Dapic, I.; Kobetic, R.; Kezic S.;
Determination of free fatty acids of different chain lengths in the *stratum corneum* as a biomarker of skin barrier; Etiology and Prevention of occupational contact dermatitis: New challenges; Barcelona, Španjolska (lipanj, 2014)
 2. Dapic, I.; Brkljacic, L.; Jakasa, I.; Kezic, S.; Kobetic, R.;
LC-ESI-MS characterization of free fatty acids in human *stratum corneum*; X Meeting of Young Chemical Engineers; Zagreb, Hrvatska (veljača, 2014)
 3. Angelova-Fischer, I.; Hoek, Anne K; Dapic, I.; Ziliken, D.; Kežić, S.;
Atopic dermatitis confers enhanced skin responses to experimentally-induced tandem repeated irritation in vivo, International investigative dermatology, Edinburgh, (svibanj, 2013)
-

4. Angelova-Fischer, I., Hoek, A-K.; Dapic, I.; Fischer T. W., Zillikens, D., Kezic, S.;
Barrier function, cytokine and natural moisturizing factor levels after in vivo tandem
repeated irritation in healthy and atopic individuals; 6th International Conference on
Occupational and Environmental Exposure of Skin to Chemicals; Amsterdam,
Nizozemska (lipanj, 2013)
 5. Visser, M.; Malvestio, A; Jakasa, I.; Dapic, I.; Kezic, S.;
The effect of dermal exposure to a skin irritant sodium lauryl sulphate on the levels of
natural moisturizing factors in the stratum corneum; 6th International Conference on
Occupational and Environmental Exposure of Skin to Chemicals; Amsterdam,
Nizozemska (lipanj, 2013)
 6. Dapic, I.; Kezic, S.; Kammeyer, A.; Jakasa, I.;
Impact of adhesive tapes and extraction methods in the determination of natural
moisturizing factors by high performance liquid chromatography, 13th International
Chromatography School, Zagreb, Hrvatska (lipanj, 2012)
 7. Dapic, I.; Kezic, S.; Kammeyer, A.; Jakasa, I.;
Determination of natural moisturizing factors in human *stratum corneum* by liquid
chromatography, 12th International School of Ion Chromatography / LC extended
addition, Zagreb, Hrvatska (30. lipnja-1. srpnja, 2011)
 8. Dapic, I.; Kovačević, D.;
Adsorption of BSA on Previously Formed Polyelectrolyte Multilayer ; Reflectometric
and Electrokinetic Study // Workshop of COST Action D43 Functionalized Materials
and Interfaces; Madrid, Španjolska, (rujan, 2011)
 9. Dapic, I.; Kovačević, D.;
Formation of polyelectrolyte-protein multilayers on SiO₂ particles, XII. Ruzicka days,
Vukovar, Hrvatska (rujan, 2011)
 10. Mutka, S.; Dapic, I.; Kovačević, D.;
Interactions between bovine serum albumin and poly(allylamine hydrochloride);
potentiometric and reflectometric study, 21st Conference of the European Colloid and
Interface Society, Ženeva, Švicarska (rujan, 2007)
-