

# Profil hlapljivih spojeva u kromhidrozi

---

**Plavčić, Anđela**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:665890>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-23**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**PROFIL HLAPLJIVIH SPOJEVA U KROMHIDROZI**

**ZAVRŠNI RAD**

**ANDELA PLAVČIĆ**

**Matični broj: 551**

**Split, rujan 2024.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJA**

**PROFIL HLAPLJIVIH SPOJEVA U KROMHIDROZI**

**ZAVRŠNI RAD**

**ANDELA PLAVČIĆ**

**Matični broj: 551**

**Split, rujan 2024.**

**UNIVERSITY OF SPLIT  
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY  
UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMISTRY**

**THE VOLATILE COMPOUND PROFILE IN CHROMHIDROSIS**

**BACHELOR THESIS**

**ANĐELA PLAVČIĆ**

**Parent number: 551**

**Split, September 2024**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu  
Kemijsko-tehnološki fakultet  
Preddiplomski Studij Kemije

**Znanstveno područje:** Prirodne znanosti  
**Znanstveno polje:** Kemija  
**Mentor:** Mila Radan

### PROFIL HLAPLJIVIH SPOJEVA U KROMHIDROZI

Anđela Plavčić, 551

#### Sažetak:

Kromhidroza je rijedak dermatološki poremećaj koji se manifestira izlučivanjem obojenog znoja, najčešće iz apokrinih znojnih žlijezda. Ova pojava može izazvati znoj u nijansama crvene, plave, zelene, smeđe ili crne boje, što može prouzročiti znatnu psihološku nelagodu kod pacijenata zbog neobičnog izgleda znoja. Glavni uzrok kromhidroze je nakupljanje lipofuscina, pigmenta koji se obično javlja kao nusprodukt starenja i oksidacijskog stresa. Lipofuscin se nakuplja u apokrinim žlijezdama i izlučuje zajedno sa znojem, što rezultira promjenom njegove boje. U radu su korištene tehnike poput plinske kromatografije i masene spektrometrije (GC-MS) za analizu uzorka znoja pacijentice. Cilj je bio identificirati hlapljive kemijske spojeve prisutne u znoju pacijentice. Rezultati su ukazali na prisutnost specifičnih spojeva koji mogu biti ključni u objašnjavanju fenomena kromhidroze.

**Ključne riječi:** kromhidroza, obojeni znoj, GC-MS, SPME, hlapljivi organski spojevi

**Rad sadrži:** 31 stranica, 9 slika, 1 tablice, 51 literaturne reference

**Jezik izvornika:** hrvatski

#### Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu završnog rada:

1. izv. prof.. dr. sc. Nives Vladislavić	predsjednik
2. doc. dr. sc. Marina Tranfić Bakić	član
3. izv. prof. dr.sc. Mila Radan	mentor

**Datum obrane:** 27.09.2024.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (PDF) obliku pohranjen** u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 35, u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice u Splitu te u javnoj internetskoj bazi završnih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split  
Faculty of Chemistry and Technology  
Undergraduate Study of chemistry

**Scientific area:** Natural sciences  
**Scientific field:** Chemistry  
**Supervisor:** Mila Radan, PhD, Associate professor

### THE VOLATILE COMPOUND PROFILE IN CHROMHIDROSIS

Anđela Plavčić, 551

#### Abstract:

Chromhidrosis is a rare dermatological disorder characterized by the secretion of colored sweat, most commonly from apocrine sweat glands. This condition can result in sweat in shades of red, blue, green, brown, or black, which may cause significant psychological discomfort in patients due to the unusual appearance of their sweat. The primary cause of chromhidrosis is the accumulation of lipofuscin, a pigment typically produced as a byproduct of aging and oxidative stress. Lipofuscin accumulates in the apocrine glands and is secreted with the sweat, leading to a change in color. In this study, techniques such as gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS) were employed to analyze samples of purple sweat secreted by a patient. The aim was to identify volatile chemical compounds responsible for this unusual sweat color. The results indicated the presence of specific compounds that may be key in explaining the phenomenon of chromhidrosis.

**Keywords:** chromhidrosis, GC-MS; colored sweat, SPME, volatile organic compounds

**Thesis contains:** 31 pages, 9 figures, 1 table, 51 references

**Original in:** Croatian

#### Defence committee for evaluation and defense of bachelor thesis:

- |  |              |
|--|--------------|
| 1. Nives Vladislavić, PhD, a Assoc. Prof.    | chair person |
| 2. Marina Tranfić Bakić, PhD, Assist.. Prof. | member       |
| 3. Mila Radan, PhD, Assoc. Prof.             | supervisor   |

**Defence date:** 27.09.2024.

**Printed and electronic (PDF) form of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology in Split, Ruđera Boškovića 35, in the public library database of the University of Split Library and in the digital academic archives and repositories of the National and University Library.

*Završni rad je izrađen u Zavodu za biokemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Mile Radan, u razdoblju od lipnja do rujna 2024. godine.*

## **ZAHVALA**

*Od srca se zahvaljujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Mili Radan, na strpljenju, stručnim savjetima i podršci tijekom izrade ovog završnog rada.*

*Posebnu zahvalnost dugujem svojim roditeljima, bratu i prijateljima, koji su mi bili najveća podrška i izvor motivacije kroz cijelo moje školovanje.*



## **ZADATAK ZAVRŠNOG RADA**

- detaljno objasniti poremećaj kromhidroze
- odrediti kemijski sastav i udio spojeva u ljubičastom znoju korištenjem vezanog sustava plinske kromatografije i spektrometrije masa
- analizirati dobivene kromatograme i identificirati prisutne metabolite
- istražiti prisutnost identificiranih metabolita u ljudskom znoju korištenjem baze ljudskog metaboloma

## SAŽETAK

Kromhidroza je rijedak dermatološki poremećaj koji se manifestira izlučivanjem obojenog znoja, najčešće iz apokrinih znojnih žlijezda. Ova pojava može izazvati znoj u nijansama crvene, plave, zelene, smeđe ili crne boje, što može prouzročiti znatnu psihološku nelagodu kod pacijenata zbog neobičnog izgleda znoja. Glavni uzrok kromhidroze je nakupljanje lipofuscina, pigmenta koji se obično javlja kao nusprodukt starenja i oksidacijskog stresa. Lipofuscin se nakuplja u apokrinim žlijezdama i izlučuje zajedno sa znojem, što rezultira njegovom promjenom boje. U radu su korištene tehnike poput plinske kromatografije i masene spektrometrije (GC-MS) za analizu uzorka znoja pacijentice. Cilj je bio identificirati hlapljive kemijske spojeve prisutne u znoju pacijentice. Rezultati su ukazali na prisutnost specifičnih spojeva koji mogu biti ključni u objašnjavanju fenomena kromhidroze.

**Ključne riječi:** kromhidroza, GC-MS, obojeni znoj, SPME, hlapljivi organski spojevi

## **ABSTRACT**

Chromhidrosis is a rare dermatological disorder characterized by the secretion of colored sweat, most commonly from apocrine sweat glands. This phenomenon can result in sweat in shades of red, blue, green, brown, or black, which may cause significant psychological discomfort in patients due to the unusual appearance of their sweat. The primary cause of chromhidrosis is the accumulation of lipofuscin, a pigment typically produced as a byproduct of aging and oxidative stress. Lipofuscin accumulates in the apocrine glands and is secreted with the sweat, leading to a change in color. In this study, techniques such as gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS) were employed to analyze samples of purple sweat secreted by a patient. The aim was to identify volatile chemical compounds responsible for this unusual sweat color. The results indicated the presence of specific compounds that may be key in explaining the phenomenon of chromhidrosis.

**Keywords:** chromhidrosis, GC-MS, colored sweat, SPME, volatile organic compounds

# SADRŽAJ

<b>UVOD</b> .....	1
<b>1. OPĆI DIO</b> .....	3
1.1    LJUDSKI ZNOJ .....	3
1.1.1    ANALIZA LJUDSKOG ZNOJA.....	5
1.2    KROMHIDROZA .....	8
1.3    KROMATOGRAFIJA .....	10
1.3.1    PLINSKA KROMATOGRAFIJA.....	11
1.3.2    PLINSKA KROMATOGRAFIJA SPREGNUTA SA SPEKTROMETRIJOM MASA (GC-MS) .....	13
1.4    PRETRAŽIVANJE BAZE LJUDSKOG METABOLOMA (HMDB) .....	15
1.5    UZORKOVANJE.....	15
1.6    PRIPREMA UZORKA .....	16
1.6.1    OTAPANJE U PENTANU.....	16
1.6.2    MIKROEKSTRAKCIJA KRUTE FAZE (SPME) .....	16
1.6.3    MIKROEKSTRAKCIJA HLAPLJIVIH METABOLITA IZ PLINOVITE FAZE IZNAD UZORKA ZNOJA (PROVOĐENJE HS-SPME).....	18
1.6.4    ANALIZA HLAPLJIVIH METABOLITA PUTEM PLINSKE KROMATOGRAFIJE SPREGNUTE SA SPEKTROMETRIJOM MASA.....	18
<b>2. KEMIJSKI SASTAV I RASPRAVA</b> .....	20
2.1    GC-MS ANALIZA DOBIVENA EKSTRAKCIJOM PENTANOM .....	20
2.2    GC-MS ANALIZA DOBIVENA SPME EKSTRAKCIJOM.....	21
2.3    USPOREDBA ANALIZA .....	24
<b>3. ZAKLJUČAK</b> .....	27
<b>4. LITERATURA</b> .....	28

## UVOD

Kromhidroza je rijedak dermatološki poremećaj koji se manifestira izlučivanjem obojenog znoja iz znojnih žlijezda. Iako znojenje predstavlja prirodan fiziološki proces neophodan za regulaciju tjelesne temperature, kod osoba s kromhidrozom dolazi do promjene boje znoja, što izaziva zabrinutost i nelagodu. Uobičajeno, znoj je bezbojan, sastoji se pretežno od vode, elektrolita, uree, amonijaka, mliječne kiseline i drugih otpadnih tvari, a njegov sastav može varirati ovisno o različitim čimbenicima kao što su prehrana, zdravstveno stanje, spol i fiziološki uvjeti. Međutim, kod kromhidroze, znoj može biti obojen u različite nijanse, uključujući crvenu, plavu, zelenu, smeđu i crnu boju, što je najčešće povezano s nakupljanjem pigmenta unutar apokrinih znojnih žlijezda.

Ljudski znoj je kompleksna mješavina različitih organskih i anorganskih spojeva. Muški znoj, primjerice, bogat je aldehydima, ketonima, masnim kiselinama i steroidnim spojevima, dok ženski znoj sadrži više alkohola i estera, a tijekom menstrualnog ciklusa može sadržavati povećane koncentracije steroidnih hormona. Kromhidroza se najčešće povezuje s apokrinim žlijezdama, koje se nalaze u područjima poput pazuha i prepona, gdje njihov znoj sadrži veće količine lipida i proteina, što doprinosi specifičnom mirisu tijela.

Glavni uzrok obojenja znoja kod kromhidroze su pigmenti poput lipofuscina, koji se nakupljaju u apokrinim žlijezdama. To je pigment poznat po svojoj varijabilnoj boji, koja može biti smeđa, crvena ili žuta, ovisno o stupnju oksidacije. Lipofuscin je složena smjesa oksidiranih proteina, lipida i manjih količina ugljikohidrata i metala. Ovaj pigment nastaje kao rezultat oksidacijskog stresa i nepotpune lizosomske razgradnje oštećenih mitohondrija, što povezuje njegovo nakupljanje s oštećenjem stanica. To može doprinijeti abnormalnoj pigmentaciji koja se primjećuje kod kromhidroze. Nadalje, lipofuscin može narušiti funkciju nepovezanih staničnih sustava, poput putanje ubikvitin/proteasom, što potencijalno dovodi do stanične disfunkcije i abnormalne aktivnosti žlijezda. Kao poznat biomarker staničnog starenja, nakupljanje lipofuscina u apokrinim žlijezdama moglo bi objasniti zašto je kromhidroza češća kod odraslih. Kod ekrine kromhidroze, koja je rjeđa, obojenje znoja nastaje zbog interakcije znoja s vanjskim tvarima poput boja ili kemikalija, dok se kod pseudo-kromhidroze znoj sam po sebi ne mijenja, već dolazi do promjene boje zbog interakcije s mikroorganizmima na površini kože.

Obzirom na rijetkost i složenost ovog poremećaja, kromhidroza nije dovoljno istražena, što otežava razumijevanje njezine etiologije i patofiziologije. Cilj ovog završnog rada je pružiti detaljan pregled trenutnih spoznaja o kromhidrozi, analizirati kemijski sastav hlapljive frakcije znoja kod osobe s ovim poremećajem te identificirati potencijalne spojeve koji bi se mogli povezati s ovim stanjem. Kako bi se identificirali hlapljivi spojevi iz znoja osobe s kromhidrozom, koristit će se analitičke tehnike plinska kromatografija u kombinaciji s masenom spektrometrijom (GC-MS).

# 1. OPĆI DIO

## 1.1 LJUDSKI ZNOJ

Znojenje je prirodni proces kojim se ljudsko tijelo hladi i održava unutarnju temperaturu. Znoj, vodena tekućina izlučena znojnim žlijezdama, sastoji se uglavnom od vode, ali sadrži i male količine elektrolita, uree, amonijaka, mliječne kiseline i drugih otpadnih tvari. Kemijski sastav znoja može varirati ovisno o različitim čimbenicima kao što su prehrana, zdravstveno stanje, razina hidracije i okolišni uvjeti. Osim nabrojanog, znoj sadrži i glukozu te tragove metala poput bakra, cinka i željeza.<sup>[1]</sup>

Postoje dvije glavne vrste znojnih žlijezda: ekrine i apokrine žlijezde. Ekrine žlijezde su raširene po cijelom tijelu i najviše su odgovorne za termoregulaciju. S druge strane, apokrine žlijezde nalaze se u područjima poput pazuha i prepona, a njihov znoj sadrži više lipida i proteina, što može biti povezano s mirisom tijela.<sup>[2]</sup>

Ekrine žlijezde proizvode znoj koji se sastoji uglavnom od vode i soli. Ovaj znoj isparava s površine kože, pomažući u hlađenju tijela tijekom fizičke aktivnosti ili u toplim uvjetima.<sup>[3]</sup> Apokrine žlijezde izlučuju gušći znoj koji sadrži lipide i proteine. Kada bakterije na koži razgrađuju te komponente, nastaje specifičan miris tijela.

Ljudski znoj može sadržavati različite spojeve koji imaju ulogu u komunikaciji između pojedinaca, kao što su feromoni. Ovi spojevi mogu utjecati na privlačnost, emocionalno stanje i druge aspekte međuljudskih odnosa. Znoj također može reflektirati unutarnje stanje organizma, čineći ga potencijalnim dijagnostičkim alatom za praćenje zdravlja i metaboličkih procesa. Na primjer, povišena razina laktata u znoju može ukazivati na intenzivnu fizičku aktivnost, dok prisutnost glukoze može biti znak poremećaja poput dijabetesa.<sup>[4]</sup>

U posljednje vrijeme, uzorkovanje kože dobiva sve veću pažnju u kliničkoj znanosti zbog svog potencijala za dobivanje vrijednih fizikalno-kemijskih informacija. Znoj, koji proizvode ekrine i apokrine žlijezde, te sebum, izlučen iz lojnih žlijezda, sadrže važne komponente nastale razgradnjom proteina i enzima, koje obogaćuju površinski sloj kože. Do sada je kod ljudi identificirano više od 1800 hlapljivih organskih spojeva (engl.

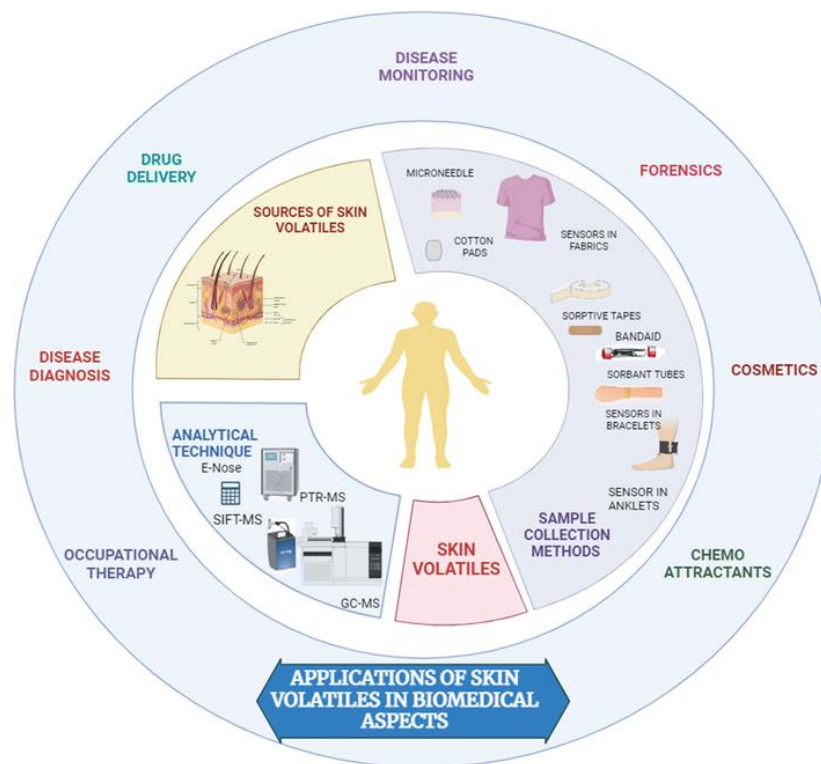
*Volatile Organic Compounds*, VOCs), od kojih se oko 500 izlučuje kroz površinu kože.<sup>[5]</sup> Volatolom je skup svih hlapljivih organskih spojeva koje organizam ili određeno tkivo, poput kože, oslobađa u okoliš.<sup>[6]</sup>

Slika 1 prikazuje različite primjene hlapljivih spojeva koje emitira ljudska koža u biomedicinskim kontekstima. Hlapljivi organski spojevi iz kože mogu se koristiti za dijagnostiku bolesti, praćenje zdravstvenog stanja, te u forenzičkim i kozmetičkim istraživanjima. Centralno mjesto na slici zauzimaju izvori hlapljivih spojeva, koji uključuju žlijezde znojnice (apokrine i ekrine), lojne žlijezde te mikrobiološke procese na koži.

Različite metode prikupljanja uzoraka prikazane su u unutarnjem krugu, uključujući upotrebu pamučnih jastučića, mikroniti i apsorpcijskih traka. Ove metode omogućuju prikupljanje spojeva koji se potom analiziraju različitim analitičkim tehnikama, kao što su GC-MS i e-nosači.

Vanjski prsten slike ilustrira različite primjene analize hlapljivih spojeva. Primjerice, u dijagnostici bolesti, hlapljivi organski spojevi se koriste za neinvazivno otkrivanje promjena u zdravlju, dok se u kozmetici koriste za analizu učinaka različitih proizvoda na miris tijela. Forenzička primjena hlapljivih organskih spojeva omogućuje detekciju bioloških tragova, a u okupacijskoj terapiji hlapljivi spojevi mogu pružiti uvid u metaboličke procese tijela. Tu je i istraživanje uloge hlapljivih organskih spojeva u privlačenju kemijskih spojeva, što je korisno u biomedicinskim i ekološkim istraživanjima.





Slika 1. Prikaz tehnika uzorkovanja ljudske kože<sup>[7]</sup>

Znojenje je ključno za održavanje homeostaze u tijelu, a njegove funkcije i sastav znoja mogu se značajno razlikovati među ljudima, ovisno o različitim čimbenicima poput genetike, prehrane i okoliša.<sup>[8]</sup>

### 1.1.1 ANALIZA LJUDSKOG ZNOJA

Ljudski znoj je kompleksna mješavina koja sadrži različite organske i anorganske spojeve. Kemijski sastav znoja može značajno varirati ovisno o spolu, prehrani, zdravstvenom stanju, fiziološkim uvjetima poput menstrualnog ciklusa kod žena te okolišnim čimbenicima. Ovdje ćemo detaljnije analizirati glavne komponente znoja kod muškaraca, žena te žena tijekom menstruacije, koristeći podatke iz nedavnih istraživanja. Različiti GC profil ekstrakta ljudskog znoja prikazani su na Slici 2.<sup>[4]</sup>

#### 1.1.1.1 SPOJEVI U ZNOJU MUŠKARACA

Kod muškaraca, znoj sadrži bogatstvo kemijskih spojeva, od kojih su neki specifični za muški metabolizam i hormonalni status. Glavni spojevi uključuju:

- **Aldehidi i ketoni:** Aldehidi poput heksanala i nonanala često su prisutni u znoju muškaraca i doprinose mirisu znoja, koji se često opisuje kao "masni" ili "uljni". Ketoni poput acetona također su prisutni i nastaju kao rezultat metabolizma masti.
- **Masne kiseline:** Muški znoj sadrži više dugolančanih masnih kiselina poput palmitinske kiseline, koje doprinose specifičnom mirisu znoja. Ove kiseline nastaju u lojnim žlijezdama, a mogu oksidirati na koži, dajući znoju karakterističan miris.
- **Aminokiseline i amini:** Prisutnost slobodnih aminokiselina poput leucina i izoleucina, kao i biogenih amina, povezana je s metabolizmom proteina na površini kože. Amini poput trimetilamina također doprinose mirisu znoja.
- **Steroidni spojevi:** Steroidni spojevi poput androstenona i androstenola specifični su za muški znoj i doprinose feromonalnom učinku.

#### 1.1.1.2 SPOJEVI U ZNOJU ŽENA

Znoj kod žena sadrži slične kemijske komponente kao i kod muškaraca, ali postoje određene razlike zbog hormonalnih razlika i različitih fizioloških procesa:

- **Karbonilni spojevi:** Karbonilni spojevi poput formaldehida i acetaldehida prisutni su u manjoj koncentraciji u odnosu na muški znoj, što može utjecati na drugačiji miris.
- **Alkoholi i esteri:** Znoj žena često sadrži više alkohola i estera, koji nastaju kao rezultat fermentacije bakterija na koži. Ovi spojevi mogu dati znoju "voćni" miris.
- **Steroidni hormoni:** U znoju žena, posebno tijekom menstrualnog ciklusa, može se detektirati prisutnost steroidnih hormona poput progesterona i estrogena. Ovi hormoni mogu utjecati na sastav znoja i njegov miris.

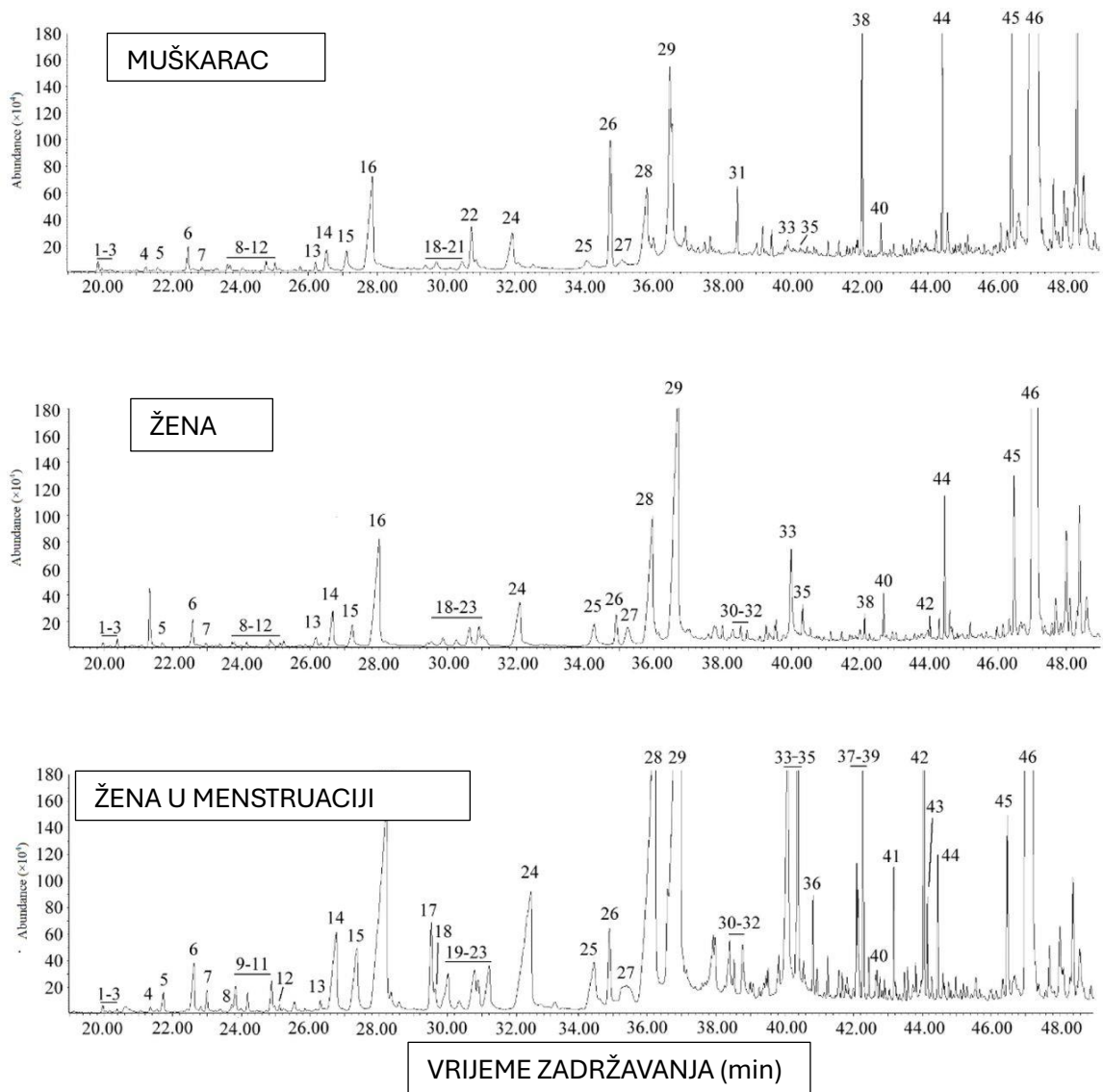
- **Vitamini i metaboliti:** U znoju žena prisutni su i vitamini poput vitamina C te njihovi metaboliti, koji također mogu utjecati na miris znoja.

### 1.1.1.3 SPOJEVI U ZNOJU ŽENA TIJEKOM MENSTRUACIJE

Tijekom menstruacije, kemijski sastav znoja kod žena može se promijeniti, što može rezultirati drugačijim mirisom ili bojom:

- **Feromoni:** Povećana proizvodnja feromona tijekom menstruacije može utjecati na privlačnost mirisa znoja. To može biti povezano s biološkim signalima vezanim uz plodnost.
- **Lipidi i proteini:** Sastav lipida u znoju može varirati tijekom menstrualnog ciklusa, što može dovesti do promjene u mirisu i konzistenciji znoja. Lipidi poput skvalena i ceramida češće su prisutni tijekom menstruacije.
- **Aminokiseline i njihovi derivati:** Povećana prisutnost određenih aminokiselina i njihovih derivata može biti rezultat hormonskih promjena tijekom menstruacije.
- **Hlapljivi organski spojevi (VOCs):** Neki hlapljivi organski spojevi, kao što su izopren i dimetil disulfid, mogu se povećati tijekom menstruacije, što doprinosi promjeni mirisa.

Ova detaljna analiza sastava znoja kod muškaraca, žena i žena tijekom menstruacije pruža uvid u složenost i varijabilnost ovog biološkog fluida. Spojevi prisutni u znoju ne samo da reflektiraju individualne fiziološke karakteristike, već mogu pružiti korisne informacije o zdravstvenom stanju i metaboličkim procesima. Razumijevanje ovih razlika može biti ključ u razvijanju personaliziranih pristupa u dijagnostici i njezi kože. <sup>[9-10]</sup>



Slika 2. Različiti GC profil ekstrakta ljudskog znoja <sup>[4]</sup>

## 1.2 KROMHIDROZA

Kromhidroza je rijedak dermatološki poremećaj koji uzrokuje izlučivanje obojenog znoja iz znojnih žlijezda. Ova rijetka pojava može uključivati znoj različitih nijansi, uključujući crvenu, plavu, zelenu, smeđu i crnu boju.<sup>[11]</sup> Kromhidroza je povezana s apokrinim znojnim žlijezdama, koje su smještene u područjima tijela bogatim dlakama, kao što su pazusi, genitalna područja i areole.<sup>[12]</sup> Ove žlijezde obično proizvode znoj koji je bezbojan, ali u slučaju kromhidroze, dolazi do nakupljanja i izlučivanja pigmenta koji

znoju daju specifične boje, što može izazvati psihološku nelagodu kod pacijenata zbog neobičnog izgleda.<sup>[13]</sup>

Najčešći oblik kromhidroze je apokrina kromhidroza, gdje pigmenti poput lipofuscina uzrokuju promjenu boje znoja. Lipofuscin je pigment koji se obično javlja kao nusprodukt starenja i oksidacijskog stresa. Ovaj pigment može imati varijabilnu boju, ovisno o stanju oksidacije, uključujući smeđu, crvenu ili žutu boju. U kromhidrozi, lipofuscin se nakuplja u apokrinim žlijezdama, a zatim se izlučuje zajedno sa znojem, što rezultira obojenjem znoja u karakteristične boje.<sup>[14]</sup>

Ekrina kromhidroza je rjeđi oblik ovog poremećaja i povezana je s ekrinim znojnim žlijezdama, koje se nalaze po cijelom tijelu. Kod ekrine kromhidroze, obojenje znoja obično nastaje zbog interakcije znoja s vanjskim tvarima, poput boja, kemikalija ili lijekova koji se izlučuju putem znoja. Ova vrsta kromhidroze obično je privremena i boja znoja se vraća u normalu nakon prestanka izlaganja uzročnom faktoru.<sup>[15]</sup>

Pseudo-kromhidroza je specifičan oblik kromhidroze u kojem znoj sam po sebi nije obojen, ali dolazi do promjene boje znoja zbog interakcije s mikroorganizmima ili kemikalijama na površini kože. Ova pojava može biti uzrokovana prisutnošću bakterija ili gljivica koje metaboliziraju komponente znoja, stvarajući pigmente koji uzrokuju obojen znoj. Ovaj oblik kromhidroze može biti izazvan različitim vanjskim čimbenicima i obično nestaje s prestankom izlaganja tim faktorima.<sup>[16]</sup>

Etiologija kromhidroze uključuje različite čimbenike, uključujući genetske predispozicije, metaboličke poremećaje, upalne procese i vanjske utjecaje, poput kontaminacije kemikalijama. Glavni mehanizam koji uzrokuje kromhidrozu je nakupljanje pigmenata unutar znojnih žlijezda, ali specifični uzroci različitih boja znoja još uvijek nisu potpuno razjašnjeni. Zbog svoje rijetkosti, kromhidroza nije opsežno istražena, što dodatno komplicira razumijevanje ovog poremećaja i otežava postavljanje dijagnoze i razvoj učinkovitih tretmana.<sup>[17]</sup>

### 1.3 KROMATOGRAFIJA

Kromatografija je analitička tehnika koja se koristi za razdvajanje komponenata složenih smjesa na temelju njihove različite raspodjele između dviju faza: mobilne i stacionarne faze. Ova metoda se temelji na različitim afinitetima molekula prema stacionarnoj fazi, pri čemu komponente s manjim afinitetom prema stacionarnoj fazi putuju brže kroz sustav, dok se one s većim afinitetom zadržavaju duže.

Povijest kromatografije započinje s ruskim botaničarom i biokemičarom Mihailom Semjonovičem Cvetom, koji je prvi izveo eksperimente u ovom području. U svojim ranim radovima, razdvajao je biljne pigmente koristeći staklenu kolonu napunjenu kalcijevim karbonatom kao stacionarnom fazom, dok je eter služio kao mobilna faza. Tijekom tih eksperimenata, različiti pigmenti formirali su obojene vrpce unutar kolone, ovisno o njihovoj interakciji sa stacionarnom fazom, što je bio temelj za razvoj kromatografske metode.

Kromatografija se dijeli prema načinu ostvarivanja kontakta između mobilne i stacionarne faze, pa tako razlikujemo plošnu i kolonsku kromatografiju. Plošna kromatografija, poput papirne kromatografije, koristi plohe kao stacionarnu fazu, dok se u kolonskoj kromatografiji koristi kolona ispunjena stacionarnom fazom. Kolonska kromatografija se dalje dijeli na plinsku i tekućinsku, ovisno o agregatnom stanju mobilne faze.

U plinskoj kromatografiji, mobilna faza je inertni plin, poput helija, argona ili dušika, dok je stacionarna faza obično nehlapljiva tekućina nanosena na kruti nosač. S druge strane, u tekućinskoj kromatografiji mobilna faza je tekućina niske viskoznosti, koja prolazi kroz kolonu ispunjenu stacionarnom fazom.

Kromatografske tehnike se također mogu klasificirati prema prirodi interakcije između stacionarne i mobilne faze. Ova klasifikacija uključuje razdjelnu kromatografiju, gdje se komponente razdvajaju na temelju razlike u topljivosti između faza; adsorpcijsku kromatografiju, koja se temelji na različitim afinitetima komponenata prema površini stacionarne faze; afinitetnu kromatografiju, koja koristi specifične biološke interakcije;

kromatografiju isključenjem, koja razdvaja molekule prema njihovoj veličini te ionsko-izmjenjivačku kromatografiju, koja razdvaja molekule na temelju njihovog naboja.

Ova svestranost čini kromatografiju ključnom metodom u analitičkoj kemiji, omogućujući preciznu analizu i karakterizaciju složenih smjesa, uključujući biološke uzorke kao što su znoj, krv i drugi tjelesni izlučevine.

### 1.3.1 PLINSKA KROMATOGRAFIJA

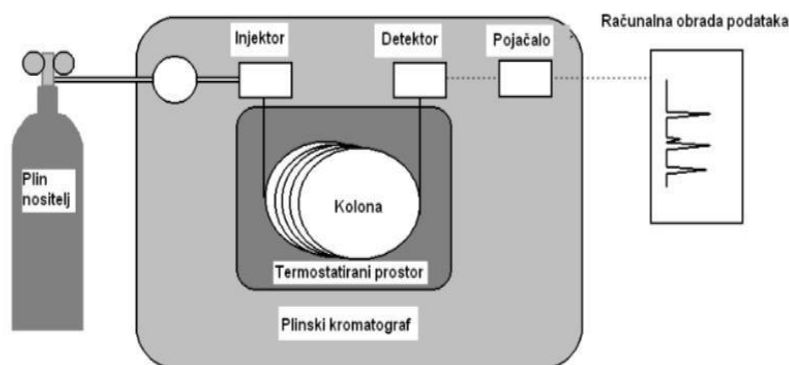
Plinska kromatografija (engl. *Gas chromatography*, GC) je analitička tehnika koja se koristi za razdvajanje i analizu smjesa hlapljivih spojeva, uključujući i one s nižom hlapljivošću, poput alkohola i ugljikovodika. Ova metoda nalazi široku primjenu u organskoj kemiji zbog svoje sposobnosti da precizno identificira i kvantificira komponente složenih smjesa. U plinskoj kromatografiji, uzorci moraju biti hlapljivi kako bi mogli ispariti prilikom injektiranja u sustav. Mobilna faza je inertni plin, dok je stacionarna faza nehlapljiva tekućina nanosena na kruti nosač unutar kolone.

Uzorak se ubrizgava kroz gumenu membranu u kolonu u plinskom stanju. Da bi se osiguralo brzo isparavanje uzorka, injektor, kolona i detektor zagrijani su na temperaturu nešto višu od temperature kolone. Ovaj pristup sprječava kondenzaciju uzorka i omogućuje optimalne uvjete za odvajanje komponenata u koloni. Tipično, volumeni injektiranih uzoraka u plinovitom stanju kreću se od 1 do 10  $\mu\text{L}$ , dok tekući uzorci obično imaju volumen od 0,1 do 1  $\mu\text{L}$ .

Plinski kromatograf (Slika 3)<sup>[18]</sup>, uređaj koji omogućuje provođenje plinske kromatografije, sastoji se od nekoliko ključnih komponenti: plina nositelja s regulatorom tlaka i mjeračem protoka, injektora, kolone smještene u termostatiranom prostoru, detektora i računala za analizu podataka. Kada se uzorak ubrizga u sustav, on se brzo isparava, a njegove komponente se razdvajaju unutar kolone na temelju njihove interakcije sa stacionarnom fazom. Eluirane komponente potom detektira detektor, čiji zapis omogućuje kvalitativno i kvantitativno određivanje prisutnih spojeva.

Detektori u plinskoj kromatografiji igraju ključnu ulogu u prepoznavanju eluiranih komponenti. Iako detektori sami po sebi ne identificiraju specifične spojeve, oni signaliziraju prisutnost molekula koje napuštaju kolonu. Postoji nekoliko vrsta detektora koji se koriste u GC:

- **Detektor toplinske vodljivosti** (engl. *Thermal conductivity detector*, TCD): Funkcionira na principu promjene toplinske vodljivosti plina nositelja uslijed prisutnosti analita.
- **Plamenoionizacijski detektor** (engl. *Flame Ionization Detector*, FID): Odlikuje se visokom osjetljivošću i širokim linearnim rasponom, te je jedan od najčešće korištenih detektora u organskoj kemiji.
- **Detektor apsorpcije elektrona** (engl. *Electron Capture Detector*, ECD): Posebno je osjetljiv na spojeve s elektronegativnim skupinama, kao što su halogeni i peroksidi, ali je manje osjetljiv na amine i alkohole.
- **Selektivni detektori:** Ovi detektori kombiniraju kromatografiju s tehnikama spektroskopije, omogućujući precizniju analizu specifičnih funkcionalnih skupina.



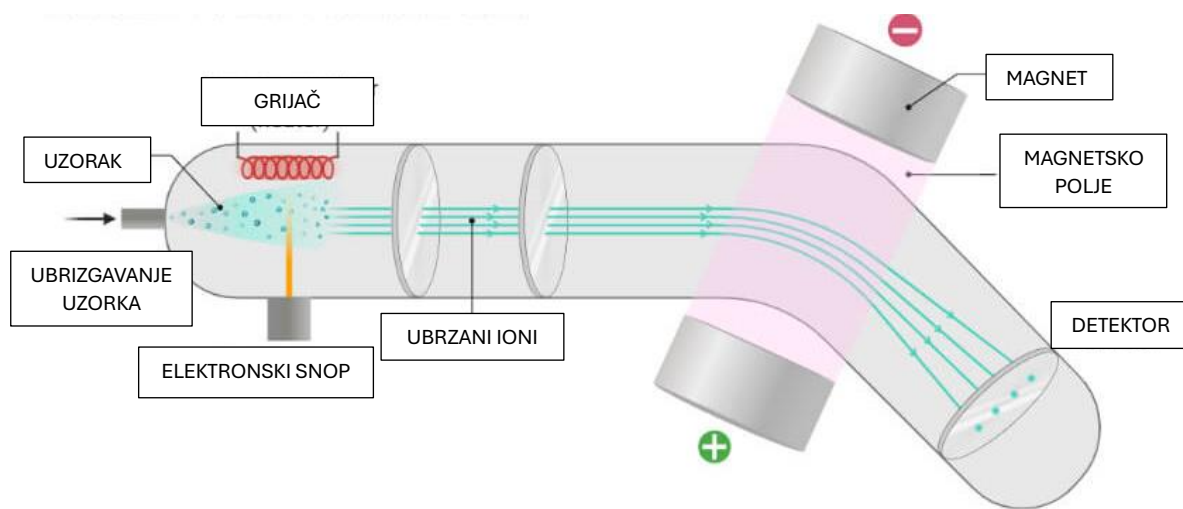
Slika 3. Shematski prikaz plinskog kromatografa

Pored ovih detektora, postoje i detektori za kvalitativnu identifikaciju analita, kao što su:

- **Maseni spektrometar (MS):** Maseni spektrometar (Slika 4) se sastoji od analizatora i detektora koji stvaraju i analiziraju ione. Najčešći analizator u GC-MS sustavu je kvadrupolni analizator, koji koristi četiri elektrode s promjenjivim polaritetom za odvajanje iona na temelju omjera mase i naboja. Kvadrupol je



posebno pogodan za upotrebu u kromatografiji zbog svoje sposobnosti brzog snimanja iona, što omogućuje detaljnu analizu sastava smjese.



Slika 4. Shematski prikaz rada masene spektrometrije

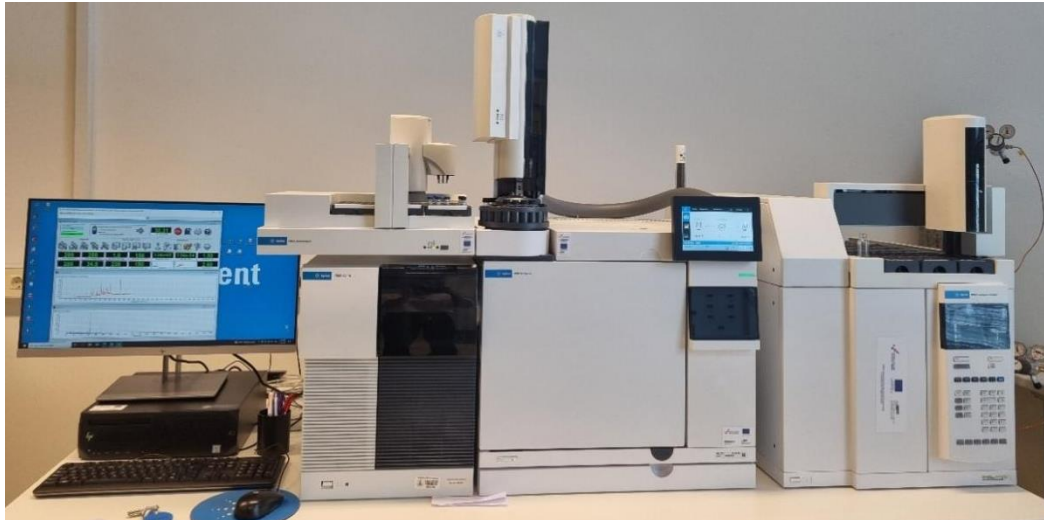
- **Infracrveni spektrometar s Fourierovom transformacijom** (engl. *Fourier transform infrared spectroscopy*, FTIR): Ovaj instrument se koristi za identifikaciju molekula na temelju njihove apsorpcije infracrvenog zračenja, što pruža informacije o molekularnoj strukturi.

Plinska kromatografija u kombinaciji s ovim detektorima predstavlja izuzetno moćnu tehniku za analizu složenih organskih smjesa, omogućujući detaljno razumijevanje njihovog sastava.<sup>[19-24]</sup>

### 1.3.2 PLINSKA KROMATOGRAFIJA SPREGNUTA SA SPEKTROMETRIJOM MASA (GC-MS)

GC-MS (Slika 5) (plinska kromatografija spregnuta sa masenom spektrometrijom) je napredna analitička tehnika koja kombinira dva moćna instrumenta kako bi se omogućila detaljna analiza tvari prisutnih u uzorku. Ova kombinacija metoda pruža visoku specifičnost i osjetljivost, što omogućuje analitičarima da istodobno identificiraju

(kvalitativno) i kvantificiraju spojeve unutar složenih smjesa. Zbog svoje preciznosti i pouzdanosti, GC-MS se često smatra zlatnim standardom u analizi bioloških uzoraka, identificiranju droga, otrova, te drugih kemijskih supstanci.



*Slika 5. Uređaj za GC-MS analizu*

Plinska kromatografija omogućuje razdvajanje komponenti smjese na temelju njihovih različitih interakcija sa stacionarnom fazom unutar kolone. Svaka komponenta smjese, ovisno o svom afinitetu prema stacionarnoj fazi, eluirat će iz kolone u različitim vremenskim intervalima. Nakon razdvajanja, komponente se prenose u maseni spektrometar, gdje se analiziraju na temelju omjera njihove mase i naboja.

Sinergijsko djelovanje plinske kromatografije i masene spektrometrije ključno je za postizanje visoke razlučivosti i točnosti u identifikaciji spojeva. GC-MS je posebno učinkovit u analizi složenih smjesa gdje je potrebno identificirati i kvantificirati spojeve u prisutnosti brojnih drugih tvari. Bez kombinacije ovih dviju tehnika, bilo bi izuzetno teško ili nemoguće precizno odrediti specifične molekule unutar uzorka.

Instrumentacija za GC-MS analizu sastoji se od dva glavna dijela: plinskog kromatografa i masenog spektrometra. Ova dva sustava mogu biti povezana na više načina, uključujući otvoreni i direktni spoj. Kada se uzorak ubrizga u plinski kromatograf, on se pretvara u plinovito stanje i transportira kroz kolonu uz pomoć inertnog plina koji služi kao mobilna faza. Komponente uzorka različito se vežu za stacionarnu fazu, što rezultira njihovim postupnim eluiranjem iz kolone prema detektoru. Nakon što komponente napuste kolonu,

ulaze u maseni spektrometar, gdje se ioniziraju i analiziraju prema omjeru mase i naboja, generirajući elektronski signal koji se zatim interpretira.

GC-MS metoda se koristi u širokom spektru primjena, od forenzičkih analiza i toksikologije, do istraživanja u farmaciji i biokemiji, zbog svoje sposobnosti da pruži detaljne informacije o sastavu uzoraka na molekularnoj razini.<sup>[25]</sup>

#### 1.4 PRETRAŽIVANJE BAZE LJUDSKOG METABOLOMA (HMDB)

U okviru ovog istraživanja, izvršena je detaljna analiza hlapljivih metabolita prisutnih u uzorcima znoja. Za svaki identificirani metabolit, provedeno je pretraživanje u bazi podataka ljudskog metaboloma (engl. *Human Metabolome Database*, HMDB). HMDB predstavlja sveobuhvatnu i besplatno dostupnu bazu podataka koja sadrži opsežne informacije o malim molekulama metabolita prisutnim u ljudskom tijelu.

Baza HMDB omogućuje korisnicima pristup širokom spektru podataka koji uključuju kemijske karakteristike, biomolekulske informacije, kao i kliničke podatke povezane s pojedinim metabolitima. Svaki metabolit u bazi popraćen je detaljnim opisom koji obuhvaća njegovu strukturu, biološku ulogu, podrijetlo u organizmu, te potencijalne veze s različitim fiziološkim i patološkim stanjima. Korištenjem ove baze podataka, dobiveni metabolomički profili znoja mogu se preciznije analizirati i interpretirati.<sup>[26]</sup>

#### 1.5 UZORKOVANJE

Uzorak za analizu prikupljen je od pacijentice koja je imala simptome kromhidroze, što se očitovalo ljubičastim znojem u stanju stresa. Koristili smo sterilnu tkaninu koja je bila u dodiru s preponama pacijentice, gdje su ostali tragovi ljubičastog znoja (Slika 6). Dio te tkanine pažljivo smo izrezali i spremili u zatvorenu posudu kako bismo spriječili kontaminaciju i sačuvali uzorak za analizu. Uzorak je zatim čuvan u hladnjaku na +4 °C jedan dan do same analize.



*Slika 6. Uzorak tkanine sa znojem*

## 1.6 PRIPREMA UZORKA

### 1.6.1 OTAPANJE U PENTANU

Za potrebe analize, uzorak tkanine na kojoj su bili prisutni tragovi ljubičastog znoja stavljen je u posudu, a zatim je dodan pentan kako bi se omogućio kontakt između otapala i tkanine. Pentan, kao nepolaro otapalo, omogućava ekstrakciju lipofilnih komponenti iz uzorka, čime se olakšava daljnja analiza prisutnih spojeva. Ovaj postupak osigurava da svi spojevi koji su topivi u pentanu budu učinkovito ekstrahirani iz tkanine.

### 1.6.2 MIKROEKSTRAKCIJA KRUTE FAZE (SPME)

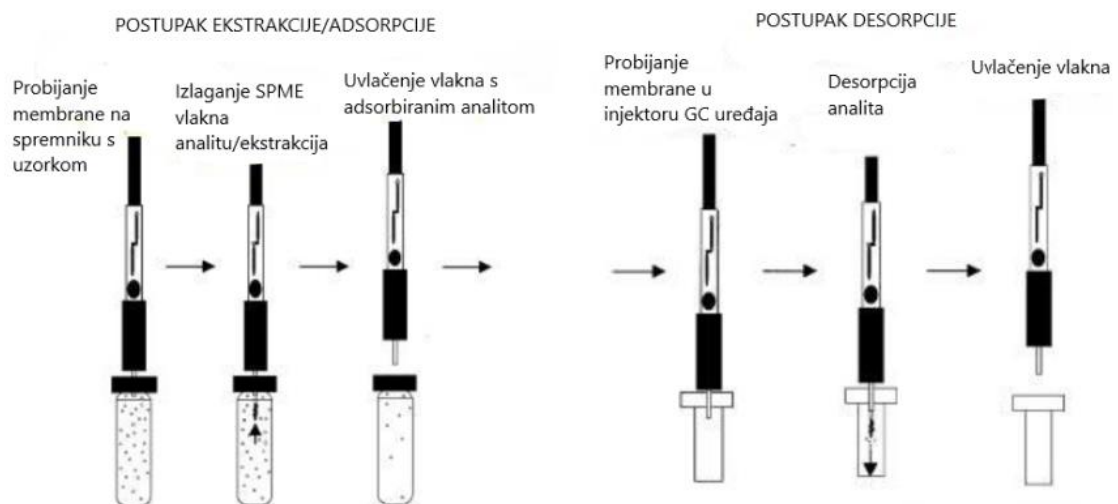
Mikroekstrakcija krute faze (SPME) predstavlja suvremenu analitičku tehniku koja omogućava jednostavnu i brzu ekstrakciju, koncentraciju i analizu hlapljivih te poluhlapljivih spojeva. Ovaj postupak izvodi se bez korištenja otapala, čime se izbjegava potencijalna kontaminacija uzoraka, a vrijeme pripreme značajno se smanjuje. SPME

koristi vlakna obložena adsorpcijskim materijalom koja se uranjaju u ili postavljaju iznad uzorka (eng. headspace metoda), gdje dolazi do adsorpcije analita.<sup>[27]</sup>

SPME tehnika je uvedena od strane J. Pawliszyna krajem 1980-ih godina i ubrzo je stekla popularnost zbog svoje jednostavnosti i efikasnosti. Ključna prednost ove metode je u kombiniranju tri procesa (uzorkovanje, ekstrakcija i koncentracija) u jednom koraku.

SPME metoda omogućuje uzorkovanje različitih vrsta analita iz različitih matrica, uključujući biološke uzorke, okolišne uzorke, tekućine iz hrane i pića, te industrijske materijale. Metoda je također kompatibilna s naprednim analitičkim tehnikama poput plinske kromatografije (GC) i masene spektrometrije (MS), što omogućuje točnu identifikaciju i kvantifikaciju spojeva.<sup>[28]</sup>

U ovom istraživanju korištena je **vlakno-SPME tehnika**. U vlakno-SPME tehnici, vlakno je obloženo sorbensom i uronjeno u uzorak, pri čemu se analiti adsorbiraju na površinu vlakna. Nakon postizanja ravnoteže, vlakno se uklanja iz uzorka i analiti se termički desorbiraju u plinski kromatograf, gdje se dalje analiziraju (Slika 7)<sup>[29]</sup>.



*Slika 7. Prikaz postupka ekstrakcije i desorpcije analita koristeći SPME tehniku*

SPME tehnika je široko primjenjiva jer omogućuje ekstrakciju i koncentraciju spojeva bez dodatnih kemijskih reagensa, čime se minimizira utjecaj na okoliš, a gubitak analita svodi na minimum. Zbog njezine osjetljivosti, metoda je posebno pogodna za analizu

kompleksnih bioloških uzoraka kao što su znoj, krv i urin, gdje su prisutne niske koncentracije hlapljivih spojeva. [30]

### 1.6.3 MIKROEKSTRAKCIJA HLAPLJIVIH METABOLITA IZ PLINOVITE FAZE IZNAD UZORKA ZNOJA (PROVOĐENJE HS-SPME)

Ekstrakcija znoja provedena je korištenjem pamučnih krpica koje su bile postavljene na kožu pacijenata kako bi apsorbirale izlučeni znoj. Nakon toga, krpice su bile stavljene u bočice od 10 mL za daljnju ekstrakciju, a VOC spojevi izolirani su i analizirani pomoću SPME ekstrakcije i plinske kromatografije-masene spektrometrije (GC-MS). Bočice su bile hermetički zatvorene pomoću septuma i aluminijskog poklopca, nakon čega je uzorak znoja stavljen na termoblok na temperaturu od 60°C tijekom 30 minuta.

Kada je postignuta ravnoteža između tekuće i plinovite faze, vlakno je bilo izloženo plinovitoj fazi, omogućujući hlapljivim spojevima da se vežu na SPME vlakno tijekom 20 minuta.

Nakon toga, vlakno se uvuklo natrag u iglu i prenijelo u injektor plinskog kromatografa. Nakon injektiranja izvršena je termička desorpcija spojeva pri 220°C u trajanju od 5 minuta.

Po završetku rada sa SPME vlaknom, važno je omogućiti vlaknu da se ohladi prije pohrane.

### 1.6.4 ANALIZA HLAPLJIVIH METABOLITA PUTEM PLINSKE KROMATOGRAFIJE SPREGNUTE SA SPEKTROMETRIJOM MASA

Za analizu hlapljivih metabolita korišten je plinski kromatograf model 8890 GC zajedno s trostrukim kvadrupolnim spektrometrom masa 7000 D (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, SAD). Spojevi su se odvajali putem nepolarne kolone HP5MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm debljina stacionarne faze, Agilent, CA, SAD). [29]

Helij je korišten kao mobilna faza s protokom od 1 mL po minuti. Injektor je radio na temperaturi od 280 °C. Temperatura pećnice bila je na početnih 40 °C tijekom prve dvije minute, a zatim se povećavala 5 °C u minuti do postizanja 180 °C. Nakon toga, temperatura je dodatno povišena do konačnih 220 °C.

Cjelokupna analiza trajala je 42 minute.

Što se tiče radnih uvjeta za spektrometar masa, elektronska ionizacija provodila se s energijom od 70 eV, dok je temperatura međuspoja bila postavljena na 260 °C, a izvora iona na 200 °C. Maseni spektri su snimani u rasponu  $m/z$  od 30 do 400.

## 2. KEMIJSKI SASTAV I RASPRAVA

### 2.1 GC-MS ANALIZA DOBIVENA EKSTRAKCIJOM PENTANOM

Koristili smo pentan, nepolaro otapalo, za ekstrakciju lipofilnih spojeva iz uzorka znoja. Ova metoda je pogodna za izolaciju hidrofobnih spojeva koji se lako otapaju u organskim otapalima poput pentana. Tablica (tablica 1) sadrži spojeve koji su identificirani u uzorku ljubičastog znoja nakon ekstrakcije pentanom. Ključni spojevi uključuju:

- **Skvalen** (13,28%): Ovaj spoj je glavni lipid u koži i često se nalazi u sebumu, što sugerira da znoj iz apokrinih žlijezda može sadržavati visoke razine lipida. Skvalen je nepolarni spoj koji pridonosi hidrataciji kože, a njegova prisutnost može ukazivati na lipofilne komponente apokrinih žlijezda.<sup>[31]</sup>
- **Kolesterol** (3,34%): Ovaj spoj je ključna komponenta staničnih membrana, a njegova prisutnost u znoju ukazuje na izlučivanje iz lipida u apokrinskim žlijezdama.<sup>[32]</sup>
- **Benzojeva kiselina, eikozil ester** (1,58%): Ovaj ester često je prisutan u kozmetičkim proizvodima, što može ukazivati na vanjsku kontaminaciju ili izloženost kozmetici.<sup>[33]</sup>
- **Dietil ftalat** (1,02%) i **Benzil benzoat** (4,04%): Prisutnost tih spojeva može ukazivati na izlaganje zagađivačima ili kozmetičkim proizvodima, budući da se ovi spojevi često koriste u parfemima i plastičnim materijalima.<sup>[34]</sup>
- **n-Heksil salicilat** (0,60%): Koristi se kao miris u kozmetici, što dodatno potvrđuje mogućnost vanjske kontaminacije znoja.<sup>[35]</sup>

Pentanska ekstrakcija bila je izuzetno učinkovita u izoliranju lipofilnih spojeva, što je potvrđeno prisutnošću dugolančanih masnih kiselina i estera poput **2-heksadecen-1-ola** i **propil-14-metil-pentadekanoata**. Ti spojevi su karakteristični za apokrine žlijezde, koje izlučuju znoj bogat lipidima. Spojevi poput **palmitinske kiseline** i dugolančanih estera ukazuju na prisutnost lojnog sekreta, što je karakteristično za apokrine znojne žlijezde. Ovi spojevi mogu također doprinijeti karakterističnom mirisu znoja. Prisutnost spojeva poput **dietil ftalata** i **benzil benzoata** može sugerirati kontaminaciju iz vanjskih



izvora, uključujući kozmetičke proizvode ili zagađenje iz okoliša. To je česta pojava u znoju, posebno u uzorcima prikupljenim iz područja izloženih kozmetici.<sup>[36]</sup>

## 2.2 GC-MS ANALIZA DOBIVENA SPME EKSTRAKCIJOM

Mikroekstrakcija krute faze je neinvazivna tehnika koja omogućuje ekstrakciju i koncentraciju hlapljivih i poluhlapljivih spojeva iz uzorka bez upotrebe otapala. Ova metoda je idealna za analizu hlapljivih organskih spojeva koji su prisutni u znoju, a zbog visoke osjetljivosti SPME metode moguće je detektirati niske koncentracije spojeva. U tablici (tablica 1) se nalazi niz spojeva identificiranih metodom SPME, dok su na Slikama 8 i 9 prikazani GC profili ekstrakta znoja dobiveni ekstrakcijama. Ključni spojevi uključuju:

- **Limonen** (9,06%): Ovaj spoj je jedan od najčešćih monoterpena i prisutan je u mnogim kozmetičkim proizvodima i prirodnim izvorima poput agruma. Njegova prisutnost može ukazivati na vanjsku kontaminaciju ili unos putem prehrane.<sup>[37]</sup>
- **Nonanal** (2,82%): Aldehyd koji se prirodno nalazi u ljudskom znoju i doprinosi karakterističnom mirisu znoja, a često je povezan s oksidacijom lipida.<sup>[38]</sup>
- **Benzenacetonitril** (2,79%): Industrijski spoj koji može biti prisutan kao zagađivač, ali se također može nalaziti u kozmetici i parfemima.<sup>[39]</sup>
- **1-Dodecen** (5,38%): Hlapljivi organski spoj koji može biti prisutan kao rezultat oksidacije masnih kiselina ili vanjske kontaminacije.<sup>[40]</sup>

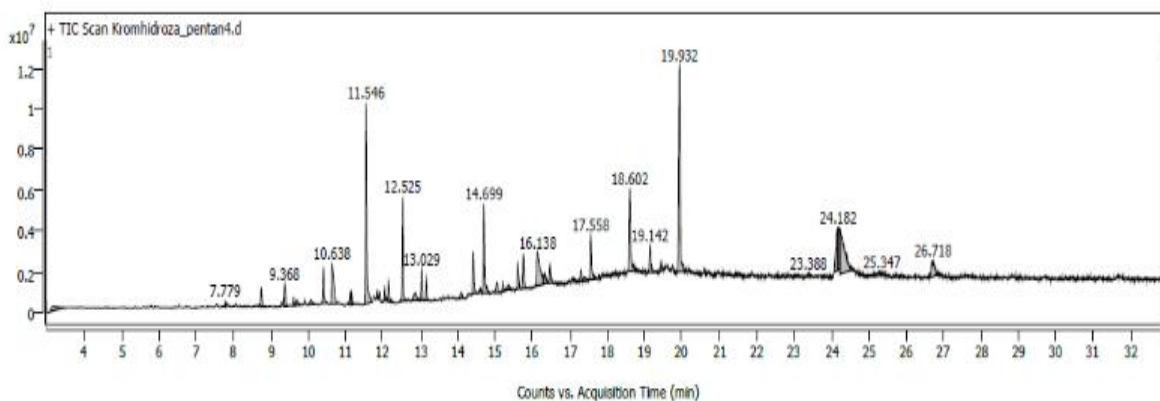
SPME metoda je izuzetno učinkovita za izolaciju hlapljivih spojeva poput monoterpena, aldehida i ketona. Prisustvo spojeva poput **Limonena** i **nonanala** ukazuje na bogatstvo hlapljivih organskih spojeva u znoju, koji mogu igrati ulogu u stvaranju mirisa i drugih karakteristika znoja. Prisustvo **nonanala**, koji je poznat po svojoj ulozi u stvaranju mirisa znoja, te drugih aldehida i ketona, ukazuje na ključne spojeve koji doprinose mirisu znoja. Ovi spojevi često su produkt oksidacije lipida na koži i igraju važnu ulogu u prepoznavanju mirisnih komponenti ljudskog znoja.<sup>[41]</sup>

Tablica 1. Kemijski sastav znoja dobiven ekstrakcijom pentanom i mikroekstrakcijom krute faze (SPME)

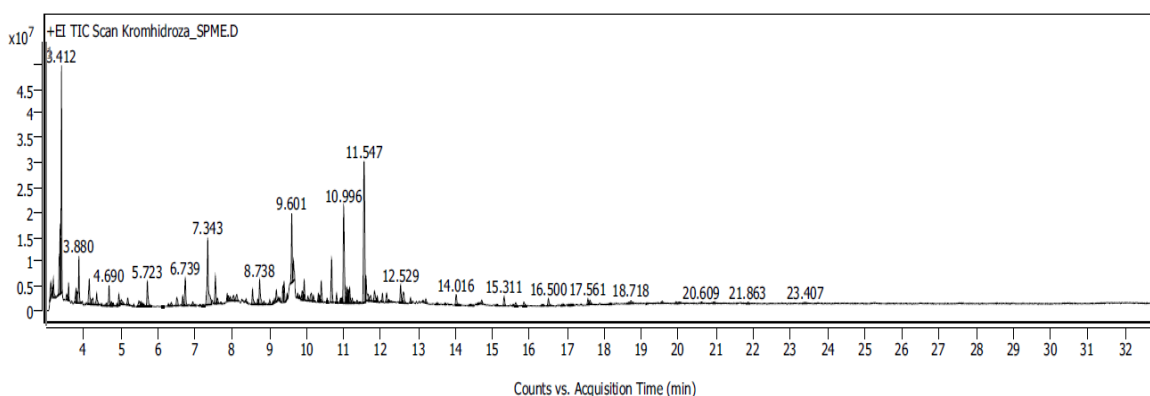
Rbr	Naziv spoja	RT	Ekstrakcija pentanom %	SPME %	HMDB
1	Izopulegol	3,19	1,21		Nije pronađen
2	Limonen	3,41		9,06	Krv, zadrž, fekalije, slina, urin
3	$\gamma$ -Terpinen	3,60		0,68	Fekalije, slina, urin
4	Nonanal	3,88		2,82	Krv, zadrž, fekalije, slina
5	Dekanal	4,69		1,25	Krv, zadrž, fekalije, slina, urin
6	$\alpha$ -Fenchyl acetat	4,90		0,13	Nije pronađen
7	Metil-10,11-tetradekadienoat	5,59		0,15	Urin
8	Tetradekanal	6,67		0,54	Slina, fekalije, urin
9	1-Dodecen	7,34		5,38	Zadrž, slina
10	2,4-bis-(1,1-dimetiletil) fenol	7,78	0,24	0,35	Fekalije, urin
11	Amil salicilat	8,55		1,00	Slina
12	2-metildekan	8,69		0,26	Zadrž
13	Dietil ftalat	8,74	1,02	1,77	Fekalije, urin
14	Dihidro metil jasmonat	9,36	1,40	0,19	Krv, slina, urin
15	1-(4-izopropilfenil)-2-metilpropil acetat	9,60	0,37	3,55	Nije pronađen
16	n-heksil salicilat	9,68	0,60		Slina
17	(cis)-2-nonadekan	10,06	0,52		Slina, fekalije
18	5-fenilddodekan	10,18		0,30	Nije pronađen
19	cis-3-Heksenil salicilat	10,34		0,31	Slina
20	2-(fenilmetilen)-oktanal	10,40	2,13	1,25	Slina
21	Benzil benzoat	10,63	4,04		Krv, urin
22	Nonadekan	10,80		0,44	Slina, fekalije
23	7-Heksadecenal	10,91		0,26	Nije pronađen

24	2-Etilheksil salicilat	10,99		6,94	Slina
25	5- $\alpha$ -kolestanol	11,35		0,20	Krv, fekalije
26	7-acetil-6-etil-1,1,4,4-tetrametiltetralin	12,15	1,17		Krv
27	1,2-benzendikarboksilna kiselina dibutil ester	12,52	4,74	1,11	Krv
28	Izopropil-heksadekanoat	13,03	1,27		Urin, slina
29	Etilen brasilat	13,16	1,11		Nije pronađen
30	11,13-Dimetil-12-tetradecen-1-ol acetat	15,34	0,44		Nije pronađen
31	eikozil benzoat	15,61	1,58		Nije pronađen
32	2-Etilheksil trans-4-metoksicinamat	15,75	1,71		Slina
33	(Z)-9-oktandecamid	16,13	5,09		Krv
34	Butil-9-tetradecenoat	16,33	1,09		Urin, krv, slina, fekalije
35	Monoetilheksil ftalna kiselina	17,55	2,63		Znoj, krv, urin
36	Skvalen	19,93	13,28		Znoj, krv, fekalije
37	Kolesterol	24,18	3,34		Žuč, krv, fekalije, urin, slina, cerebrospinalna tekućina

RT – retencijsko vrijeme, % - udio pojedinih spojeva u znoju



*Slika 8. GC profil ekstrakta znoja dobiven ekstrakcijom pomoću pentana*



*Slika 9. GC profil ekstrakta znoja dobiven SPME ekstrakcijom*

## 2.3 USPOREDBA ANALIZA

Kromhidroza, stanje pri kojem znoj poprima obojenost, uglavnom se povezuje s oksidacijskim stresom i lipidnom peroksidacijom, što dovodi do stvaranja pigmenta poput lipofuscina, koji je ključan za karakteristično obojenje znoja. [42]

Analiza uzoraka znoja provedena je pomoću SPME i ekstrakcije pentanom. Obje metode korištene su za identifikaciju različitih hlapljivih organskih spojeva, a GC-MS omogućila je precizno otkrivanje spojeva. Korištenjem baze podataka ljudskog metaboloma, identificirani su ključni spojevi i njihov biološki izvor. Važno je napomenuti da su neke

supstance, kao što su neki kozmetički proizvodi i lijekovi, isključene iz analize kako bi se izbjegla kontaminacija podataka. Tablica 1 sažima rezultate, ističući 37 spojeva kategoriziranih prema kemijskim klasama, uključujući aldehide, estere masnih kiselina, derivate benzojeve kiseline i druge.<sup>[43]</sup>

U analizi pomoću SPME metode, identificirani su aldehidi kao što su nonanal i dekanal, spojevi povezani s lipidnom peroksidacijom staničnih membrana. Lipidna oksidacija je važna jer dovodi do stvaranja lipofuscina, što predstavlja ključnu komponentu patogeneze kromhidroze. Naglašena je uloga oksidacijskog stresa u degradaciji lipida, što doprinosi boji znoja kod pacijenata s kromhidrozom.<sup>[13, 3]</sup> Prisutnost ovih aldehida također ukazuje na kontinuirani oksidacijski stres, čime se povezuju specifične kemijske reakcije sa simptomima bolesti.<sup>[44]</sup>

S druge strane, ekstrakcija pentanom pokazala se učinkovitom u detekciji lipofilnijih spojeva poput skvalena, kolesterola, te zasićenih masnih kiselina, uključujući palmitinsku, stearinsku i laurinsku kiselinu. Ovi lipidi igraju ključnu ulogu u održavanju hidrolipidne barijere kože, ali također mogu oksidirati, što doprinosi stvaranju pigmenta karakterističnih za kromhidrozu.<sup>[45]</sup> Prisutnost ovih spojeva podržava teoriju da lipidna peroksidacija doprinosi stvaranju lipofuscina. Potvrđena je uloga oksidacije lipida u patologiji lojnih žlijezda.<sup>[52, 13]</sup>

Esterski spojevi poput metil-10,11-tetradekadienoata i izopropil-heksadekanoata potvrđuju važnost masnih kiselina u normalnoj funkciji kože i njenom mikrobiomu. Njihova prisutnost u ekstraktima pentana podržava hipotezu da lipidna peroksidacija igra ključnu ulogu u nastanku kromhidroze. Nadalje, spojevi kao što su derivati benzojeve kiseline mogu imati prooksidativni učinak u prisutnosti metalnih iona poput željeza i bakra, što dodatno pojačava oksidacijski stres u stanicama kože.<sup>[46]</sup>

Zanimljivo je da je kromhidroza povezana s prisutnošću lipofuscina, pigmenta koji se nakuplja kao rezultat oksidacijskih procesa. Skvalen i kolesterol, koji su ključni lipidi u sekretima lojnih žlijezda, mogu oksidirati i time doprinijeti razvoju ovog pigmenta.<sup>[47]</sup> Prisutnost ovih spojeva u pentanskim uzorcima potvrđuje njihovu važnost u patogenezi bolesti. Nadalje, detekcija 9-oktadecenamida, amidne kiseline, ukazuje na poremećaje u metabolizmu lipida u apokrinim žlijezdama, što dodatno potvrđuje povezanost oksidacijskog stresa s razvojem kromhidroze.<sup>[48]</sup>

Zaključno, ovaj rad daje značajan doprinos razumijevanju biokemijskih mehanizama koji dovode do kromhidroze. Usporedba dviju metoda ekstrakcije pokazuje da ekstrakcija pentanom bolje detektira lipofilnije spojeve, dok SPME metoda bolje identificira hlapljivije spojeve. Kombinirajući obje metode, dobiven je detaljan uvid u kemijski sastav znoja, što omogućava bolje razumijevanje patogeneze kromhidroze. Ovi rezultati podržavaju teoriju da lipidna peroksidacija i oksidacijski stres igraju ključnu ulogu u stvaranju lipofuscina, koji je odgovoran za karakteristično obojenje znoja kod ove rijetke bolesti. <sup>[49-51]</sup>

### 3. ZAKLJUČAK

Ovaj rad pruža uvid u profil volatoloma kod kromhidroze, koristeći SPME i ekstrakciju pentanom za identifikaciju ključnih hlapljivih organskih spojeva. Detekcija aldehida, estera masnih kiselina, derivata benzojeve kiseline i lipofilnih spojeva potvrđuje ulogu lipidne peroksidacije i metaboličke disregulacije u ovom stanju.

Aldehidi poput nonanala i dekanala ukazuju na razgradnju lipida, dok esteri masnih kiselina i skvalen naglašavaju važnost sastava lipida kože u formiranju lipofuscina. Prisutnost derivata benzojeve kiseline sugerira uključenost u oksidacijske procese i detoksikacijske puteve. Također, spojevi poput 9-oktadecenamida odražavaju poremećaje u metabolizmu lipida unutar apokrinih žlijezda.

U konačnici, ovaj rad pokazuje važnost profiliranja volatoloma u kromhidrozi, pružajući uvid u biokemijske procese koji stoje iza ovog stanja i otvarajući mogućnosti za identifikaciju biomarkera i razvoj budućih dijagnostičkih alata.

## 4. LITERATURA

1. URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Perspiration> ( 30.08.2024.)
2. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6773238/> (30.08.2024.)
3. URL: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/23328940.2019.1632145> (19.09.2024.)
4. URL: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2024.08.15.608030v1.full> (30.08.2024.)
5. URL: <https://www.mdpi.com/2218-1989/12/9/824> (15.09.2024.)
6. Slika 1, S. *Keerthana*, "Skin emitted volatiles analysis for noninvasive diagnosis: the current advances in sample preparation techniques for biomedical application." *Journal of Analytical Science* 12014 (2024.)
7. URL: <https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/physrev.1954.34.2.202?journalCode=physrev> (30.08.2024.)
8. URL: [https://www.researchgate.net/publication/375289943\\_Enrichment\\_of\\_sweat-derived\\_extracellular\\_vesicles\\_of\\_human\\_and\\_bacterial\\_origin\\_for\\_biomarker\\_identification](https://www.researchgate.net/publication/375289943_Enrichment_of_sweat-derived_extracellular_vesicles_of_human_and_bacterial_origin_for_biomarker_identification) (30.08.2024.)
9. Slika 2 Različiti GC profil ekstrakta ljudskog znoja URL: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2024.08.15.608030v1.full> (30.08.2024.)
10. URL: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/chromhidrosis> (30.08.2024.)
11. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554395/> (05.09.2024.)
12. *A. Wang, A. Wysong, K. M. Nord, B. M. Egbert, J. Kosek*, Chromhidrosis: A rare diagnosis requiring clinicopathologic correlation. *American Journal of Dermatopathology*, **36**(2014.), 853–855 doi: 10.1097/DAD.0000000000000000
13. *A. Alhudaif, M. K. Almazied, M. Khashoggi, E. Alasgah, A. Alhaddab*. Facial Apocrine Chromhidrosis: A Case Report (2024.)
14. *A. Mansi, B. Charles, S. Amanda*. Facial Apocrine Chromhidrosis: A Case Report. *Journal of the American Academy of Dermatology Case Reports*.(2024.)
15. URL: <https://www.dermatologytimes.com/view/chromhidrosis-a-rare-clinical-finding> (09.09.2024.)



16. *R. Susseman, P. McHenry, K. Smith.* A Case of Eccrine Chromhidrosis Due to Multivitamin Supplementation. *Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology* (2019.)
17. Slika 3. *A. Radonić,* Izolacija i identifikacija slobodnih i glikozidno vezanih hlapljivih spojeva iz smrike (*Juniperus oxycedrus L.*) Magistarski rad KTF, Split (2000.)
18. *Nj. Radić , L. Kukoč-Modun,* Uvod u analitičku kemiju, Školska knjiga, Zagreb, (2011), 630.-650.
19. *L. Kukoč – Modun,* Instrumentne metode analize,(2022) dio predavanj, str.103
20. *D. A. Skoog, H. D. West, F. J. Holler,* Uvod u kromatografske metode. Osnove analitičke kemije. Školska knjiga; (1999). 645-674.
21. *J. Pranjić,* Primjena GC – MS u istraživanju raka, Završni rad, (2020), Split
22. *A. Perković,* Kvantitativno određivanje fenola iz uzorka krvi i mokraće primjenom GC-MS metode, Diplomski rad, (2018), Split
23. *E. de Hoffman, V.Stroombant,* Mass spectrometry- principles and applications, third edition, (2007), 217-230
24. URL:<https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/gc-ms-principle-instrument-and-analyses-and-gc-msms-362513> (05.09.2024.)
25. URL: <https://hmdb.ca/> (30.08.2024.)
26. *J. Mrvelj,* Identifikacija hlapljivih organskih metabolita u urinu trudnih žena s preeklampsijom, Lipanj, 2022
27. *A. Mornar, I. Marinac-Anđić, D. Amidžić Klarić, J.Kovačić:* Mikroekstrakcija čvrstom fazom – inovativni pristup u bioanalitičkim istraživanjima, Zagreb, 2022. doi: <https://doi.org/10.15255/KUI.2022.003>
28. Slika 7. *P. Živalj* metabolička analiza urina: pronalaženje biomarkera preeklampsije korištenjem HS-SPME/GC-MS, listopad 2023.
29. URL: <https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/solid-phase-microextraction> (05.09.2024.)
30. *A. Pappas,* The relationship of diet and acne: a review, *Dermato-Endocrinology*, **1** (2009) 262-267. doi: <https://doi.org/10.4161/derm.1.5.9447>.
31. *A. J. Thody, S. Shuster,* Control and function of sebaceous glands, *Physiol. Rev.*, **69** (1989) 383-416.

32. *R. E. Dodson, et al.*, Endocrine disruptors and personal care products: Presence of parabens, phthalates, and phenols in San Francisco Bay Area households, *Environ. Sci. Technol.*, **46** (2012) 12002-12009. doi: <https://doi.org/10.1021/es3019065>.
33. *A. R. Zota, et al.*, Phthalates exposure and endocrine disruptors, *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, **12** (2010) 9-25. doi: <https://doi.org/10.1007/s11154-010-9134-1>.
34. *R. P. Dullaart, et al.*, A guide to cosmetic ingredients, *J. Cosmet. Dermatol.*, **3** (2014) 157-164.
35. *C. F. Poole*, *The Essence of Chromatography*, Elsevier, (2012.)
36. *N. S. Sangwan, et al.*, Limonene production in plants and its applications, *Phytochemistry*, **57** (2001) 613-618. doi: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00084-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00084-4).
37. *X. N. Zeng, J. J. Leyden, H. J. Lawley, K. Sawano, G. Preti*, Identification of nonanal as a volatile component in human body odor, *J. Chem. Ecol.*, **22** (1996) 237-257. doi: 10.1007/BF02055118.
38. *G. A. Jungclaus, et al.*, Identification of organic compounds in industrial waste waters, *Anal. Chem.*, **50** (1978) 1387-1395. doi: 10.1021/ac50030a013.
39. *R. D. Morrison, B. L. Murphy*, *Environmental Forensics*, Academic Press, 2014.
40. *J. Pawliszyn*, *Handbook of Solid Phase Microextraction*, Academic Press, 2012.
41. *A. J. Lillemor, P. Stokowska*, Lipidomics: A Novel Approach to the Study of Human Sweat, *J. Lipid Res.*, **57** (2016) 123-137. doi: 10.1194/jlr.R045229.
42. *X. N. Zeng, J. J. Leyden, H. J. Lawley, K. Sawano, I. Nohara, G. Preti*, Analysis of volatile organic compounds in human sweat, *J. Chem. Ecol.*, **22** (1996) 237-257. doi: 10.1007/BF02055118.
43. *A. G. James, et al.*, Volatile fatty acids and lactic acid as markers of odor-generating bacteria in human sweat, *J. Chromatogr. B*, **792** (2004) 323-327. doi: 10.1016/j.jchromb.2003.12.014.
44. *R. P. Belardi, J. B. Pawliszyn*, Theory of solid-phase microextraction, *Anal. Chem.*, **61** (1989) 622-629. doi: 10.1021/ac00182a013.
45. *S. Haze, Y. Gozu, S. Nakamura, Y. Kohno, K. Sawano*, 2-Nonenal newly found in human body odor tends to increase with aging, *J. Invest. Dermatol.*, **116** (2001) 520-524. doi: 10.1046/j.1523-1747.2001.01277.x.
46. *T. M. Kitson, K. E. Kitson*, Lauric acid and its derivatives: A review of biological applications, *Lipids*, **44** (2009) 653-664. doi: 10.1007/s11745-009-3311-5.

47. C. Zeng, J. J. Leyden, H. J. Lawley, K. Sawano, G. Preti, Analysis of characteristic odors from human male axillae, *J. Chem. Ecol.*, **22** (1996) 137-160. doi: 10.1007/BF02055111.
48. C. Zeng, G. Preti, Volatile organic compounds in human sweat: A review, *J. Invest. Dermatol.*, **106** (1996) 726-732. doi: 10.1111/1523-1747.ep12338589.
49. D. T. Downing, M. E. Stewart, J. S. Strauss, Lipid composition of comedones compared with human skin surface lipids, *J. Invest. Dermatol.*, **77** (1981) 84-88. doi: 10.1111/1523-1747.ep12478936.
50. M. Ottaviani, T. Alestas, E. Flori, A. Mastrofrancesco, K. Peris, C. C. Zouboulis, Sebum and acne: Lipid composition and squalene oxidation in comedones, *J. Invest. Dermatol.*, **126** (2006) 2458-2465. doi: 10.1038/sj.jid.5700500.
51. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18637798/> (pristupljeno 15.09.2024.)