

UNIVERZITA KARLOVA

Prírodovedecká fakulta

---

Študijný program: Chémia

Študijný odbor: Analytická chémia



Bc. Radka Bušovská

**Analýza prchavých látok ľudského telesného pachu  
pomocou komprehenzívnej dvojdimenzionálnej  
plynovej chromatografie**

Analysis of a human body odour using comprehensive  
two-dimensional gas chromatography

Diplomová práca

Vedúci diplomovej práce: RNDr. Jana Sobotníková, PhD.

Konzultant: Mgr. Pavlína Kyjaková, PhD.

Praha, 2021

## Čestné prehlásenie

Prehlasujem, že som túto diplomovú prácu vypracovala samostatne pod vedením RNDr. Jany Sobotníkovéj, PhD. a Mgr. Pavlíny Kyjakovej, PhD., a že som uviedla všetky použité informačné zdroje a literatúru.

Táto práca ani jej podstatná časť nebola predložená k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

V Prahe dňa .....

.....

Podpis

## Abstrakt

Čuchové vnímanie telesného pachu zohráva dôležitú úlohu pri výbere životného partnera, najmä u žien. Výskumy ukazujú, že ženy si vyberajú partnera, ktorého telesný pach je podobný s pachom ich otca. Doposiaľ bol tento fenomén potvrdený iba štúdiami etologickými na základe subjektívneho vnímania pachových podobností.

Cieľom mojej diplomovej práce bolo preto otestovať túto hypotézu inštrumentálne pomocou komprehenzívnej plynovej chromatografie GC×GC–TOFMS s následnou multidimenzionálnou analýzou chemických profilov telesných pachov partnerov a otcov dospelých žien. Telesný pach bol vzorkovaný z ľavých a pravých podpazuší partnerov a otcov 41 žien (dokopy 164 vzoriek) pomocou vatovej tyčinky, ktorá bola následne zamrazená a extrahovaná do hexánu. Typické prchavé látky detegované vo všetkých skúmaných vzorkách boli uhl'ovodíky, karboxylové kyseliny, estery, alkoholy, aldehydy, ketóny, steroly a terpény. Pomocou novo dostupného „dlaždícového“ chromatografického algoritmu bola získaná sada 341 zlúčenín systematicky sa vyskytujúcich v mužskom axilárnom zápachu. Pre určenie chemických vzdialeností medzi všetkými pármami študovaných jedincov bola použitá analýza hlavných komponentov a z nej vypočítané Euklidovské vzdialenosti medzi všetkými subjektmi. Takto vyjadrené „chemické vzdialenosti“ sa ukázali byť významne menšie pre otca a partnera jednej ženy v porovnaní s rozdielmi medzi náhodnými pármami otcov a partnerov. Výsledky naznačujú, že ženy si skutočne vyberajú partnera s telesným pachom podobným k ich otcovi.

## Kľúčové slová:

Telesný pach; podpazušie; ľudské prchavé látky; výber partnera; GC×GC–TOFMS; komprehenzívna plynová chromatografia; analýza hlavných komponentov

## **Abstract**

Body odour perception plays an important role in human mate choice, especially in women. It was previously proposed that women select partners whose body odour resembles that of woman's fathers. Yet, this phenomenon has only been confirmed using ethological studies based on subjective perception of body odour similarities.

Therefore, the aim of my diploma thesis was to test this hypothesis instrumentally using comprehensive GC×GC–TOFMS and subsequent multidimensional analyses of body odour chemical profiles of male partners and fathers of adult women. Body odour sampling from left and right axilla of fathers and partners of 41 women (altogether 164 samples) was performed using cotton swabs, which were then frozen and extracted into hexane. Typical human volatile substances, such as hydrocarbons, carboxylic acids, esters, alcohols, aldehydes, ketones, sterols and terpenes were detected in all examined samples. Using a newly available “tile-based” chromatographic alignment algorithm, we obtained a set of 341 compounds systematically occurring in male axillary odour. The principal component analysis was used to calculate Euclidean distances for all pairs of the studied male subjects. These estimates of “chemical distances” revealed to be significantly smaller for father-partner pairs of individual women compared to the differences between randomized father-partner pairs. Our results suggest that women really do select partners with body odour similar to that of their fathers.

## **Keywords**

Axillary odour; human volatiles; partner choice; GC×GC–TOFMS; comprehensive two-dimensional gas chromatography; principal component analysis

## **Pod'akovanie**

Touto cestou by som chcela pod'akovať mojej konzultantke Mgr. Pavlíne Kyjakovej, PhD. a vedúcej mojej diplomovej práce RNDr. Jane Sobotníkovej, PhD. za trpezlivosť, čas a ochotu, ktorú mi v priebehu vypracovania diplomovej práce venovali. Rovnako by som sa chcela za pomoc pod'akovať aj Mgr. Robertovi Hanusovi, PhD.

Ďalej by som rada pod'akovala všetkým, ktorí sa akokoľvek podieľali na projekte, hlavne vedcom z Katedry Zoologie za zaistenie participantov a poskytnuté vzorky. Chcela by som pod'akovať celému laboratóriu Chémie spoločenského hmyzu na ÚOCHB AV ČR za príjemnú atmosféru a rodine, priateľovi a kamarátom za poskytnuté zázemie a podporu v priebehu celého môjho štúdia.

# Obsah

1 Úvod.....	10
2 Teoretická časť.....	11
2.1 Čuchová dráha .....	11
2.1.1 Anatómia ľudského čuchu .....	12
2.1.2 Vnímanie pachu .....	14
2.1.3 Olfaktorické dysfunkcie .....	15
2.2 Ľudský telesný pach.....	16
2.2.1 Pôvod ľudského telesného pachu a faktory, ktoré ho ovplyvňujú.....	16
2.2.2 Zloženie ľudského telesného pachu .....	18
2.2.3 Oblasti využitia telesného pachu.....	20
2.2.4 Príprava vzoriek telesného pachu .....	21
2.2.5 Meranie prchavých látok telesného pachu .....	24
2.3 Plynová chromatografia v spojení s hmotnostnou spektrometriou .....	26
2.3.1 Plynová chromatografia .....	26
2.3.2 Hmotnostná spektrometria .....	27
2.3.3 Komprehenzívna plynová chromatografia s hmotnostným detektorom .....	29
3 Ciele práce .....	33
4 Experimentálna časť .....	34
4.1 Použité chemikálie a prístroje .....	34
4.1.1 Použité chemikálie.....	34
4.1.2 Prístrojové vybavenie .....	34
4.2 Participanti.....	34
4.2.1 Pilotná štúdia .....	34
4.2.2 Hlavná štúdia .....	34
4.3 Vzorkovanie a príprava vzoriek .....	35
4.4 Chromatografické podmienky .....	36
4.5 Spracovanie dát .....	37
4.5.1 Spracovanie pomocou softvérov .....	37
4.5.2 Štatistické spracovanie dát.....	38
4.6 Identifikácia analytov.....	39

5 Výsledky práce .....	40
5.1 Optimalizácia základných parametrov .....	40
5.1.1 Modulačná perióda .....	40
5.1.2 Šírka píku .....	40
5.1.3 Pomer signálu a šumu .....	40
5.1.4 $F$ pomer.....	41
5.1.5 Veľkosť dlaždice .....	41
5.2 Chemický profil ľudského telesného pachu .....	42
5.3 Filtrovanie analytov .....	44
5.4 Charakteristické skupiny analytov ľudského telesného pachu .....	46
5.5 Pilotná štúdia .....	47
5.6 Hlavná štúdia .....	49
6 Diskusia .....	54
7 Záver .....	61
8 Literatúra .....	62
Prílohy.....	71

## Zoznam použitých skratiek

DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
VOCs	prchavé organické zlúčeniny (z angl. <i>volatile organic compounds</i> )
SPME	mikroextrakcia na pevnej fáze (z angl. <i>solid-phase microextraction</i> )
SBSE	extrakcia na sorpčných miešadielkach (z angl. <i>stir bar sorptive extraction</i> )
GC	plynová chromatografia (z angl. <i>gas chromatography</i> )
GSC	plynová adsorpčná chromatografia (z angl. <i>gas solid chromatography</i> )
GLC	plynová rozdeľovacia chromatografia (z angl. <i>gas liquid chromatography</i> )
TCD	tepelne vodivostný detektor (z angl. <i>thermal conductivity detector</i> )
ECD	detektor elektrónového záchytu (z angl. <i>electron capture detector</i> )
FID	plameňovo-ionizačný detektor (z angl. <i>flame ionization detector</i> )
MS	hmotnostná spektrometria (z angl. <i>mass spectrometry</i> )
GC–MS	plynová chromatografia v spojení s hmotnostným detektorom
EI	elektrónová ionizácia (z angl. <i>electron impact</i> )
CI	chemická ionizácia (z angl. <i>chemical ionization</i> )
TOF	analyzátor doby letu (z angl. <i>time of flight</i> )
GC–GC	dvojdimenziálna „ <i>heart cutting</i> “ plynová chromatografia
GC×GC	komprehenzívna dvojdimenziálna plynová chromatografia
GC×GC–TOFMS	komprehenzívna dvojdimenziálna plynová chromatografia v spojení s hmotnostným detektorom a analyzátorom doby letu
S/N	pomer signálu a šumu (z ang. <i>signal-to-noise ratio</i> )
ANOVA	analýza rozptylu (z angl. <i>analysis of variance</i> )
PCA	analýza hlavných komponentov (z angl. <i>principal component analysis</i> )



## Zoznam použitých symbolov

$m$	hmotnosť
$z$	náboj
$n$	nasýtený nerozvetvený uhl'ovodík
$S$	signál
$N$	šum
$w$	šírka píku
$KI$	Kovatsov retenčný index
$N$	počet atómov uhlíku
$t_R$	retenčný čas
$p$	pravdepodobnosť

# 1 Úvod

Čuch je evolučne najstarší zmysel. U živočíchov zohráva významnú úlohu pri orientácii v prostredí, napríklad pri hľadaní potravy a úniku pred predátormi, a taktiež pri vnútrodruhej komunikácii, čo zahŕňa aj hľadanie partnera [1]. Súčasný človek je dominantne vizuálnym tvorom a preto čuchu už nevenujeme takú pozornosť, no aj napriek tomu ostáva kľúčovým zmyslom v niektorých základných biologických procesoch. Ako jediný zo zmyslov neprechádza cez talamus ale rovno do limbického systému v mozgu, kde je čuchová informácia spojená s príslušnou emóciou (amygdala) a ihneď zapamätaná (hipokampus) [2]. Je to teda zmysel, ktorý je najviac prepojený s emóciami. Čuchové vnímanie zohráva dôležitú úlohu pri výbere partnera najmä pre ženy [3], tak ako aj iné atribúty ako napríklad črty tváre [4].

Na základe niektorých evolučných teórií sa predpokladalo, že si budeme vyberať partnera, ktorého telesný pach je čo najviac odlišný s našim telesným pachom a pachom našich rodičov, kvôli génovej rôznorodosti potomkov. Empirické výskumy však ukazujú, že je to naopak a máme tendenciu si vyberať partnera, ktorého telesný pach je podobný s pachom nášho rodiča opačného pohlavia. Toto subjektívne hodnotenie pachových podobností v predchádzajúcich štúdiách bolo potrebné overiť na inštrumentálnom leveli.

Komprehenzívna plynová chromatografia v spojení s hmotnostným detektorom je v súčasnosti najpoužívanejšia metóda pre separovanie a identifikáciu veľkého množstva analytov zo vzoriek s komplexnou maticou ako je telesný pach [5]. Pomocou dvoch kolón o rôznej polarite sme schopní dosiahnuť lepšiu separáciu analytov s podobnými vlastnosťami, oproti plynovej chromatografii klasickej.

Táto práca je zameraná na vyvinutie metodického postupu pre robustnú charakterizáciu jednotlivých jedincov podľa ich telesného pachu a oddelenie týchto jedincov pomocou komprehenzívnej plynovej chromatografie s následným štatistickým spracovaním.

## 2 Teoretická časť

### 2.1 Čuchová dráha

Čuch je evolučne najstarším zmyslom. Čuchovým vnímaním sú rozpoznávané molekuly z okolitého prostredia čo poskytuje organizmu informáciu o jeho chemickom zložení a hlavne o zmenách v tomto zložení [6].

Už jednoduché organizmy používajú čuch pre hľadanie potravy. Jednobunkové organizmy obsahujú čuchovo-chuťový receptor v ich bunečnej stene v priamom kontakte s vonkajším prostredím. Pre herbivoriálny hmyz je čuch dominantným zmyslom, ktorý mu slúži pre hľadanie rastlín a kvetov na opeľovanie. Na druhej strane, parazitický hmyz využíva čuch k hľadaniu svojho hostiteľa.

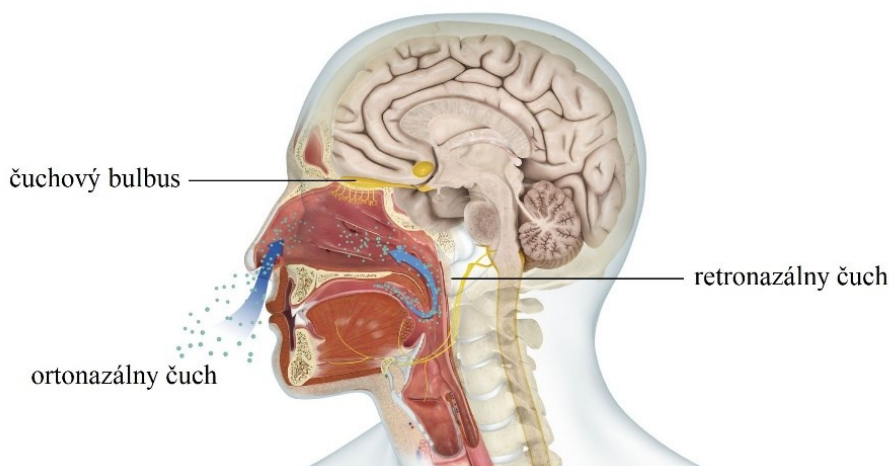
Čuch u stavovcov je dôležitým pri hľadaní potravy, orientácii v prostredí či úniku pred predátormi. Ryby majú čuchové receptory na pokožke, ktorá je v priamom spojení s vodou ako ich okolitým prostredím. U vtákov je čuch dôležitý pre orientáciu v prostredí pri ich migrácii. Cicavčí predátori vyhľadávajú korisť pomocou čuchu a naopak, korisť je schopná vďaka čuchovému vnímaniu rozpoznať hroziace sa nebezpečenstvo a následne pred predátormi uniknúť [6]. Okrem toho, pre cicavce je typické, že si svojim pachom označujú svoje teritórium. Čuch je pre nich dôležitým zmyslom vo vnútrodruhovej komunikácii, aj pri výbere ich sexuálneho partnera.

Význam čuchu u človeka je na rozdiel od iných cicavcov obmedzenejší. No aj napriek tomu, že v súčasnosti je človek dominantne vizuálnym tvorom, zohráva čuch dôležitú úlohu v niektorých základných biologických procesoch. Keďže v prípade ľudí už čuch nie je až tak dôležitý ako u evolučných predkov, nie je mu venovaná ani taká pozornosť ako kedysi a nie je ani tak dobre vyvinutý v porovnaní s inými živočíchmi napríklad s hlodavcami, ktoré patria do skupiny makrosmatických cicavcov. Aj napriek tomu, že človek je mikrosmatický, je schopný vnímať obrovské množstvo prchavých látok, s limitnou veľkosťou približne 300 Da [6]. Väčšie molekuly sa už nedostanú do čuchového epitelu, takže receptory ich nebudú schopné detegovať. Aj u človeka hrá čuch významnú rolu pri prijímaní potravy. Vďaka čuchu sme schopní rozlíšiť dobré jedlo od pokazeného. Napríklad pokazené vajíčka alebo mäso, ktoré sa pokazilo v dôsledku bakteriálnej

aktivity, typicky páchnu po sírovodíku, ktorého geometrický priemer prahovej hodnoty detekcie zápachu pre človeka je  $11 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (ppb) [7]. Čuchovým vnímaním sme schopní odhaliť a reagovať na nebezpečné situácie ako únik plynu v domácnosti či blízky požiar. Tak ako je to aj u iných cicavcov, čuch hrá u človeka významnú rolu pri výbere partnera.

### 2.1.1 Anatómia ľudského čuchu

Predtým ako je prchavá molekula schopná iniciovať nervovú činnosť zodpovednú za vnímanie pachu, musí najskôr vstúpiť do nosovej dutiny. Odorant sa dostane do nosovej dutiny buď z inhalovaného vzduchu (ortonazálny čuch) alebo cez „retronazálny čuch“ kedy molekuly z ústnej dutiny prechádzajú cez nosohltan do nosa [8] (Obr. 1). V nose sa musí vstrebať a rozpustiť v hliene, ktorý je produkovaný špecializovanými Bowmanovými žľazami a pokrýva čuchový epitel nosovej sliznice [9]. Nosová sliznica lemuje nosovú dutinu a sú v nej dva druhy epitelu, ktoré sa líšia vo svojej funkcii – respiračný epitel a čuchový epitel.

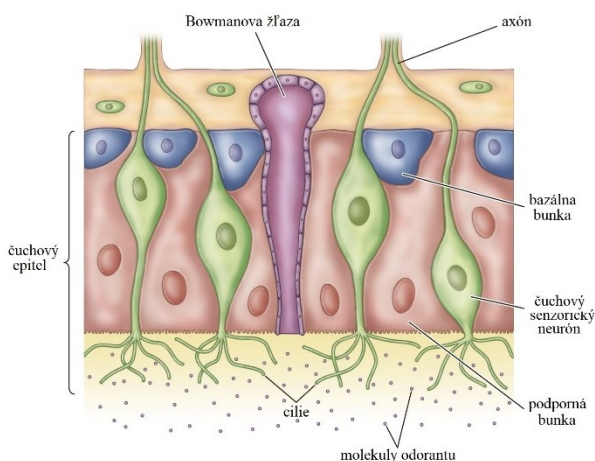


Obr. 1: Cesta odorantu z prostredia do nosovej dutiny [10].

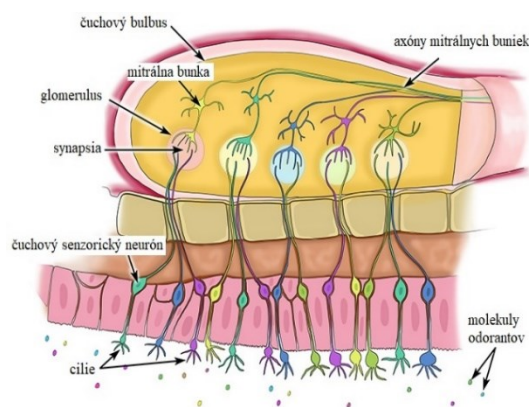
Čuchový epitel obsahuje rôzne typy buniek vrátane bazálnych buniek, podporných buniek a čuchových senzoričných neurónov (Obr. 2). Bazálne bunky sú kmeňové bunky, ktoré sú schopné neustále tvoriť nové čuchové senzoričné neuróny, čo umožňuje rekonštituovanie čuchového epitelu každé 2 – 4 týždne [11]. Vďaka tomuto je poškodenie čuchového epitelu, napríklad mechanicky alebo vdýchnutím toxických výparov väčšinou dočasné a len málokedy má trvalé následky. Podporné bunky predstavujú fyzickú

podporou pre čuchové senzorké neuróny a taktiež izolujú receptorové bunky medzi sebou. Olfaktorické neuróny sú neuróny bipolárneho typu, takže obsahujú jeden axon a jeden dendrit na opačných póloch bunčného tela [11]. Človek má približne 10 až 20 miliónov týchto senzorkých neurónov pre čuch [12].

Dendritické časti olfaktorických neurónov dosahujú na povrch epitelu sliznice, majú na svojom konci vlasové výbežky *cilie*, kde sa nachádzajú čuchové receptory citlivé na molekuly pachov a predstavujú vlastné miesto prijímania chemických podnetov. Okrem toho pohyblivé *cilie* slúžia pre posun hlienu smerom ku gastrointestinálnemu traktu a tým odstraňujú škodlivé látky a iritanty z pľúc a dýchacích ciest [6]. Človek ich má v priemere 25 na jeden neurón [13] na rozdiel od psov, ktoré ich majú pre jeden neurón stovky. Axony neurónov sú v hĺbke sliznice, združujú sa v silnejšie zväzky, vstupujú do *bulbus olfactorius* v mozgu, kde vytvárajú glomeruly a tam sú čuchové vzruchy predávané na synapsiách dendritom mitrálnej buniek, ktoré predstavujú druhé nervové bunky olfaktorickej dráhy (Obr. 3) [14].



Obr. 2: Popis buniek čuchového epitelu [15].



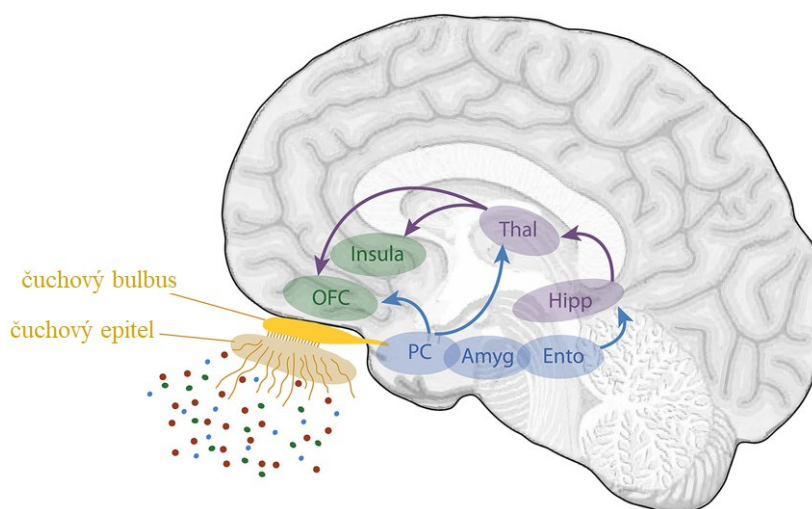
Obr. 3: Prepojenie prvých (čuchové senzorké neuróny) a druhých (mitrálne bunky) nervových buniek olfaktorickej dráhy v čuchovom bulbe [16].

V nose sa nachádzajú aj nervové zakončenia vlákien, ktoré sa dráždia iritujúcimi látkami ako čpavok, mentol či chlór a spôsobujú reflexné odpovede napríklad kýchanie, slzenie či zastavenie dýchania [12]. Na molekulárnej úrovni je dnes dobre známe, že pocit ochladenia mentolu je sprostredkovaný prechodnou aktiváciou melastatínového receptora TRPM8 [17], zatiaľ čo pocit bolesti je výsledkom aktivácie ankyrinového receptora TRPA1 [18].

Jeden čuchový receptor rozpoznáva viac odorantov a jeden odorant je rozpoznávaný viacerými čuchovými receptormi, ale rôzne odoranty sú rozpoznávané rôznymi kombináciami čuchových receptorov. Čuchový systém teda používa na kódovanie pachových identít kombinatorickú schému kódovania receptorov. Výsledný čuchový vnem závisí na rozpoznaní tohto kombinatorického vzoru [19].

### 2.1.2 Vnímanie pachu

Odorant po rozpustení v hliene nosovej sliznice aktivuje čuchové receptory čo následne spustí komplexnú signalizačnú kaskádu, ktorá v synapsiách na druhom konci neurónu generuje elektrický signál. Udalosti signalizačnej kaskády, ktorá nastáva po aktivácii receptora zahŕňajú klasický mechanizmus G proteínu, druhého posla (cyklický adenosínmonofosfát alebo inozitoltrifosát) a funkciu iónových kanálov ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ;  $\text{Cl}^-$ ), čo vedie k polarizácii bunky a tvorbe výboja na synapsiách s neurónmi v čuchovom bulbe [20]. Čuchový vzruch je z čuchového bulbu prenesený mitrálными bunkami do piriformnej kôry, ktorá je spolu s kôrou entoritálnou a amygdalou známa ako primárna čuchová kôra (Obr. 4). V piriformnej kôre sa formujú pachové vnemy a porovnávajú sa s predošlými vnemami, ktoré sú už v mozgu uložené. Čuchová informácia prechádza z piriformnej kôry do ďalších častí mozgu. Vedomé vnímanie vône sa formuje v orbitofrontálnej kôre [6].



Obr. 4: Čuchová dráha v mozgu. Modrou farbou je vyznačená primárna a zelenou sekundárna čuchová kôra. PC – piriformná kôra, Amyg – amygdala, Ento – entoritálna kôra, Hipp – hipokampus, Thal – talamus, OFC – orbitofrontálna kôra, Insula – ostrovček [21].

Spomedzi všetkých zmyslových stimulov sa zdá, že čuchové vnímanie vyvoláva tie najživšie a najemotívnejšie spomienky [22 – 25]. To je zvyčajne vysvetľované z anatomického hľadiska. Čuchová dráha pokračuje z piriformnej kôry do dvoch kľúčových štruktúr spojených s emóciami a pamäťou – amygdala a hipokampus. Na rozdiel od ostatných zmyslov, informácia k týmto štruktúram neprechádza cez talamus [21]. To znamená, že čuchová informácia nemusí byť vedome rozpoznateľná a nie je regulovaná či filtrovaná touto tzv. „bránou vedomia“. Nervy olfaktorickej dráhy sú priamo prepojené s mozgovými štruktúrami limbického systému, preto je prepojenie s emóciami pri čuchu zo zmyslov najsilnejšie [10]. Z týchto dvoch kľúčových oblastí sa informácie potom prenášajú do sekundárnej čuchovej kôry. Vďaka anatomickému prepojeniu medzi čuchovými a pamäťovými štruktúrami je čuch významným zmyslom pre prístup k spomienkam.

### **2.1.3 Olfaktorické dysfunkcie**

Dýchacie infekcie, poranenia hlavy, vystavenie chemikáliám či žiareniu môžu viesť k olfaktorickej dysfunkcii. Oslabenie čuchového vnímania môže byť zapríčinené aj starnutím. Významná časť staršej populácie má narušenú schopnosť identifikovať bežné domáce pachy a väčšina z nich o tomto poškodení ani nevie [26]. Viac ako polovica populácie USA medzi 65 – 80 rokmi má preukázateľnú stratu čuchu a približne tri štvrtiny populácie nad 80 rokov [27]. Štúdia taktiež ukazuje, že ženy majú lepšie čuchové vnímanie ako muži a to v každom veku a taktiež nefajčiari oproti fajčiarom.

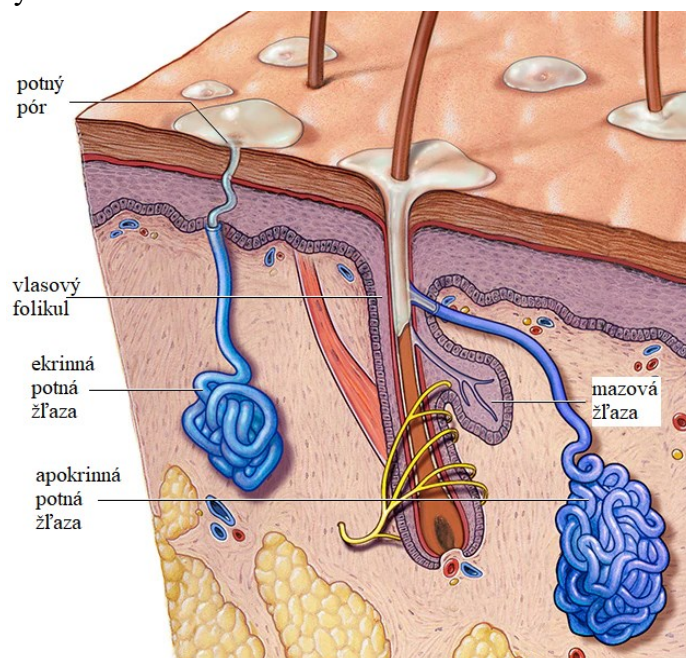
Čuchová dysfunkcia má viacero následkov, napríklad nižší záujem o aktivity spojené s jedlom ako varenie či jedenie jedál s výraznou chuťou (citrusy, chren), vyšší príjem sladkostí a v konečnom dôsledku vyššie riziko srdcových a chronických chorôb [28]. Takáto dysfunkcia výrazne ovplyvňuje psychickú pohodu človeka, kvalitu života a najmä každodennú bezpečnosť. Neúmerný počet starších ľudí zomiera každoročne na otravu toxickými plynmi a pri výbuchoch [9]. Štúdie ukazujú, že ľudia s poruchami čuchu sa v živote častejšie stretli s nebezpečnou udalosťou spojenou s čuchom. Medzi najčastejšie prípady patrili udalosti spojené s varením, ktoré predstavovali 45%, požitie pokazených potravín (25%), neschopnosť detegovať únik plynu (23%) a nedostatok schopnosti cítiť zápach ohňa (7%). Existuje korelácia medzi frekvenciou nebezpečných udalostí a stupňom čuchového poškodenia [29].

## 2.2 Ľudský telesný pach

Telesný pach je jedinečnou pachovou signatúrou každého človeka. Obsahuje informácie týkajúce sa genetickej konštitúcie daného človeka, vnútorného a vonkajšieho prostredia, fyziologického stavu (menštruačný cyklus) a jeho životosprávy, zahrňujúcej jeho stravu a hygienu [30].

### 2.2.1 Pôvod ľudského telesného pachu a faktory, ktoré ho ovplyvňujú

Telesný pach je výsledkom produkcie sekrčných žliaz a pôsobenia baktérií, ktoré produkované metabolity žliaz rozkladajú a premieňajú [31]. Ľudské telo je pokryté potnými a mazovými žľazami, ktoré majú dôležitú úlohu v termoregulácii, ochrane pokožky a ďalšie prospešné funkcie (Obr. 5). V našom tele sa nachádzajú dva druhy potných žliaz, a to ekrinné a apokrinné. Ekrinné žľazy sú lokalizované po celom tele a vylučujú vodný roztok obsahujúci soli a vo vode rozpustné látky (kyselina mliečna, aminokyseliny). Apokrinné žľazy sú sústredené iba v určitých oblastiach ako je podpazušie či vlasová pokožka a vylučujú hydrofóbnejšie produkty (tuky, steroidy, proteíny). Apokrinné žľazy sú živnou pôdou pre pôsobiacie baktérie a spolu s nimi majú najväčší vplyv na telesný pach [11],[31]. Obzvlášť v podpazuší sa nachádza obrovské množstvo sekrčných žliaz.



Obr. 5: Sekrčné žľazy nachádzajúce sa v koži ľudského tela. Na obrázku sú znázornené potné žľazy (ekrinná a apokrinná) a mazová žľaza [32].



Pach človeka je ovplyvnený viacerými faktormi. Ovplyvňuje ho jeho genotyp, ktorý sa s časom za normálnych okolností nemení a ďalšie faktory, ktoré sa v priebehu času líšia v závislosti na vnútorných a vonkajších podmienkach. Preto je ľudský telesný pach rozdelený podľa pôvodu do troch základných kategórií: primárny, sekundárny a terciárny [31].

Primárny telesný pach obsahuje zložky, ktoré sú v priebehu času stabilné bez ohľadu na stravu človeka či okolité prostredie. Je rozlišovacím znakom jednotlivca a závisí na jeho veku [33], pohlaví [34], etnickej príslušnosti [35], zdravotnom stave [36], plodnosti [37], genetických vlastnostiach [38] a na konkrétnej časti tela, odkiaľ je získaný (tvár, krk, dych, podpazušie) [39]. Za niektorých okolností sa môže počas života meniť aj táto primárna zložka telesného pachu. Takáto zmena môže byť spôsobená napríklad zhubným nádorovým ochorením, čo následne vedie k zmene produkcie prchavých organických látok človeka [40]. Kvôli tomuto poškodeniu DNA môžu niektoré látky úplne vymiznúť, zmeniť sa na iné zlúčeniny alebo sa zmení ich relatívna koncentrácia [41]. Do zmeny telesného pachu, ktorá súvisí s vekom môže byť zapojený napríklad 2-nonenal, generovaný oxidačnou degradáciou nenasýtených mastných kyselín [33]. Práve primárny telesný pach je významný v medicínskych, bezpečnostných, kozmetických a forenzných oblastiach.

Sekundárny telesný pach je výsledkom stravovacích a enviromentálnych faktorov. Obsahuje zlúčeniny, ktoré sú tiež endogénneho pôvodu, ale sú ovplyvnené faktormi vnútorného a vonkajšieho prostredia. Medzi faktory vnútorného prostredia patrí imunitný systém, choroby, menštruačný cyklus, psychický či emočný stav. Faktory vonkajšieho prostredia sa týkajú stravy a sú spojené so špecifickými diétami [42],[43]. Pach mužov, ktorí boli na bezmäsej diéte bol v štúdií Havlíčka a kol. subjektívne ženami hodnotený ako atraktívnejší, príjemnejší a menej intenzívny v porovnaní s mužmi, ktorí konzumovali červené mäso [42]. Podobným spôsobom došla Zuniga a kol. k tomu, že muži s väčším príjmom ovocia a zeleniny v strave mali tiež príjemnejší telesný pach [43]. Prekvapivo, aj konzumácia cesnaku môže mať pozitívne účinky na axilárny pach, pravdepodobne kvôli jeho zdravotným účinkom [39]. Naopak je to s konzumáciou vysokého množstva sacharidov, predovšetkým rafinovaných cukrov, kedy sa tento pach javí byť intenzívnejší a menej príjemný [43]. Medzi faktory vonkajšieho prostredia ovplyvňujúce telesný pach

patrí aj životné prostredie jednotlivca, čo zahŕňa napríklad teplotu, tlak či vlhkosť vzduchu [31]. Sekundárny pach súvisí tiež s užívaním liečiv a návykových látok ako je alkohol a tabak.

Terciárny telesný pach zahŕňa zlúčeniny, ktoré majú exogénny pôvod. Je výsledkom používania parfumov, šampónov, mydiel a ďalších kozmetických a hygienických prípravkov [44]. Je ovplyvnený aj pachom okolitého prostredia a iných osôb.

### **2.2.2 Zloženie ľudského telesného pachu**

Kožný pach je tvorený súborom látok s rôznou prchavosťou a odlišnými fyzikálne-chemickými vlastnosťami, ktoré sa líšia vo svojich koncentráciách. V štúdiách zaoberajúcich sa telesným pachom sú rozoberané najmä prchavé organické zlúčeniny (VOCs, z angl. *volatile organic compounds*), ktoré sa nachádzajú vo všetkých telesných tekutinách a sekrétoch [45]. Od roku 1953 je známe, že čerstvá, sterilná apokrinná sekrécia a teda axilárny pot je bez zápachu [46]. Inkubácia s rezidentnými baktériami, ktoré transformujú vo vode rozpustné chemické prekurzory na VOCs, vedie k produkcii charakteristického pachu, jedinečného pre každý organizmus.

Výnimkou sú ľudia, ktorí sú homozygotní pre gén ABCC11 s recesívnymi (AA) alelami, v takom prípade sú apokrinné žľazy neaktívne [47]. ABCC11 gén určuje axilárny pach [48] a typ ušného mazu [49]. Strata funkčného génu ABCC11 je zapríčinená jednonukleotidovým polymorfizmom. ABCC11 je nevyhnutný pre vylučovanie aminokyselinových konjugátov, ktoré sú prekurzormi kľúčových telesných odorantov. Jednonukleotidový polymorfizmus génu ABCC11 ovplyvňuje apokrinné potné žľazy, znižuje vylučovanie pachových molekúl a ich prekurzorov, vedie k zníženiu odorantových zlúčenín, poklesu vonných steroidov a znižuje vlhkosť axilárneho potu [47]. Predpokladá sa, že dominantná alela (G) je nevyhnutná pre vznik axilárneho zápachu, zatiaľ čo genotyp AA účinne označuje jedincov bez axilárneho zápachu [50].

Mazová sekrécia kože pozostáva zo zmesi voskových esterov, cholesterolových éterov, cholesterolu a ďalších sterolov, skvalénu, uhlíkovodíkov a triglyceridov, ktoré pri hydrolýze bakteriálnymi a kožnými lipázami poskytujú mono- a diglyceridy a voľné mastné kyseliny [51],[52]. Mono-, di-, triglyceridy a voľné mastné kyseliny tvoria

približne 60 hmotnostných percent povrchového lipidu ľudskej pokožky [53]. Hlavnou vlastnosťou lipidov ľudskeho mazu je rozmanitosť mastných kyselín zastúpených v triglyceridoch. Biochemicky bežné mastné kyseliny predstavujú iba 37 hmotnostných percent celkového obsahu kyselín. Patrí tu kyselina palmitová, myristová, stearovodíková, olejová a kyselina linolová. Zvyšných 63 % tvorí viac ako 200 rôznych mastných kyselín C<sub>10</sub> – C<sub>30</sub>, ktoré sú v živočíšnom tkanive len v stopových kvantitách [53]. Voľné či esterifikované diénové kyseliny s nerozvetveným reťazcom s párnym počtom uhlíkov v rozmedzí od C<sub>16</sub> – C<sub>22</sub> tvoria 3 % mastných kyselín v lipide na povrchu ľudskej pokožky. Ich hlavnými zástupcami sú kyseliny C<sub>18:2</sub>(5,8), C<sub>18:2</sub>(9,12), C<sub>20:2</sub>(7,10). Sú to kyseliny s 18 alebo 20 uhlíkmi v reťazci a dvoma dvojitými väzbami v rôznych polohách uvedených v zátvorkách. Predpokladá sa, že mierne rozdiely v celkovom zložení zmesi mazových mastných kyselín môžu hrať významnú úlohu v jedinečných individuálnych pachoch u ľudí [54].

Ekrinný pot pochádza z extracelulárnej tekutiny, a preto odráža chémiu krvnej plazmy. Medzi VOCs rozpustené v krvi patria alkoholy, aldehydy a alkány. Analýza ekrinného sekrétu ukázala aj prítomnosť bielkovín, enzýmov, glykoproteínov, kyseliny mliečnej, glukózy, aminokyselín a anorganických solí [55]. Apokrinný sekrét obsahuje steroidné sulfáty, cholesterol, lipidy a približne 10 % bielkovín [56]. V podpazuší sú prítomné všetky typy kožných sekrétnych žliaz ako mazové, tak aj potné (ekrinné a apokrinné) a podieľajú sa na tvorbe telesného pachu. Hlavné skupiny látok, ktoré prispievajú k axilárnemu zápachu sú:

- Steroidy, najmä androstenol (5 $\alpha$ -androst-16-en-3-ol) a androstenón (5 $\alpha$ -androst-16-en-3-ón), ktoré majú pižmový zápach [57].
- Lineárne, rozvetvené a nenasýtené mastné kyseliny. Štúdia Zeng a kol. ukazuje, že sa jedná hlavne o kyseliny s počtom uhlíkov 6 až 11, pričom hlavnou pachovou zložkou je kyselina 3-metyl-2-hexénová [56]. Pachu prispievajú aj hydroxylované kyseliny, z ktorých kľúčová je kyselina 3-hydroxy-3-metyl-hexánová [47].
- Dôležitými komponentami, ktoré prispievajú k telesnému pachu sú tiež terminálne nenasýtené kyseliny, rozvetvené kyseliny 2-metyl-C<sub>6</sub> až -C<sub>10</sub> a 4-etyl- C<sub>5</sub> až -C<sub>11</sub> [56].
- Sulfanylalkanoly, najmä 3-metyl-3-sulfanylhexan-1-ol [58].

Z hľadiska relatívneho zastúpenia sa zistilo, že kyselina 3-metyl-2-hexénová a ďalšie kyseliny C<sub>6</sub> – C<sub>11</sub> sú prítomné vo väčšom množstve ako steroidy u mužov, a preto by mohli k axilárnemu zápachu aj významnejšie prispievať [56],[59]. Podobná štúdia o 5 rokov neskôr naznačuje, že rovnaká zmes látok spôsobujúcich telesný pach sa nachádza aj v ženských axilárnych sekrétoch, s niekoľkými malými kvalitatívnymi rozdielmi [60]. Zdá sa, že kyselina 3-metyl-2-hexénová je prenášaná na povrch kože apokrinnými sekrétmi a naviazaná na proteíny, ktoré sú uvoľňované s axilárnymi mikroorganizmami [61]. Kvalitatívna podobnosť kyslých zložiek tvoriacich charakteristické axilárne pachy žien i mužov ako aj proteínov prítomných vo vodnej fáze naznačuje podobný pôvod pre axilárne pachy oboch pohlaví.

### **2.2.3 Oblasti využitia telesného pachu**

#### *2.2.3.1 Medicínske využitie*

Telesný pach môže byť diagnostickým indikátorom viacerých chorôb, pretože niektoré spôsobujú jeho zmenu a vznik charakteristických zápachov. Patria tu infekčné choroby ako tuberkulóza lymfadenitída, kedy je telesný pach opísaný ako zatuchnuté pivo či týfus, ktorý spôsobuje pach ako čerstvo upečený chlieb. Aj niektoré neinfekčné choroby spôsobujú zmeny v telesnom pachu napríklad dna a schizofrénia [62]. Medzi prchavé látky spojené so schizofréniou patrí sírouhlik a pentán. Pri pokročilom karcinóme prsníka je to dimetyltrisulfid a mastné kyseliny. Myšlienka lekárskej diagnostiky chorôb pomocou analýzy VOCs z rôznych častí tela a s tým spojený výskum viedol k predpokladu, že v budúcnosti budú prchavé biomarkery špecifické pre jednotlivé choroby široko klinicky využívané [63].

#### *2.2.3.2 Kriminalistika a forenzná analýza*

V kriminalistike je častokrát potrebná identifikácia osôb alebo vecí. Osoby sa identifikujú pomocou vonkajších znakov, otláčkov prstov, DNA a taktiež pomocou ich pachu. Kriminalistickým odborom, ktorý sa zaoberá identifikáciou osôb a vecí na základe ich pachov je odorológia, ktorá sa ďalej delí na olfaktoriku a olfaktroniku podľa toho či je identifikácia prevádzaná subjektívne za pomoci cvičených psov alebo objektívne využitím prístrojov. Na každom mieste činu zanechal páchatel' svoj unikátny pach. Špeciálne cvičené psy sú schopné ho identifikovať a porovnať s pachom podozrivého.

### 2.2.3.3 Výber partnera

Predchádzajúce výskumy ukazujú, že čuchové vnímanie zohráva dôležitú úlohu aj pri výbere životného partnera. Z hľadiska fyzických podnetov kladú ženy podstatne väčší dôraz na telesný pach a muži na vizuálny vzhľad. Ženy sú všeobecne viac čuchovo orientované, nie len čo sa týka výberu partnera [3]. Štúdiá ukazujú, že ženy považovali čuchové vnímanie za dôležitejšie ako muži jak v sexuálnom tak aj v enviromentálnom kontexte. Predpokladalo sa, že budeme mať tendenciu vybrať si partnera s čo najviac odlišným telesným pachom s tým našim a našich rodičov, kvôli génovej rôznorodosti potomkov. Výsledky však ukazujú, že je to naopak a prítiažlivejší sú partneri s podobným telesným pachom ako rodič opačného pohlavia [4].

### 2.2.4 Príprava vzoriek telesného pachu

Od 70. rokov minulého storočia bolo publikovaných množstvo štúdií, ktoré sa zaoberajú ľudským čuchovým vnímaním, telesným pachom a jeho súvislosťou s medziľudskou komunikáciou, napríklad interakciou matky s jej dieťaťom či výberom partnera. Experimentálne metódy v štúdiách, zaoberajúcich sa ľudským pachom sú veľmi variabilné, a zároveň majú významný vplyv na dosiahnuté výsledky.

Vzorkovanie a príprava vzorky sú prvými a veľmi dôležitými krokmi jej celkovej analýzy. Výrazne ovplyvňujú spoľahlivosť a presnosť použitej metódy. Je podstatné vzorkovať selektívne a eliminovať interferenciu pozadia. Prieskumy ukazujú, že zberu vzoriek a ich príprave je venovaných až 80 % celkovej doby analýzy [64]. To je nevyhnutné, pretože analytické prístroje väčšinou nemôžu priamo manipulovať so vzorkami matric. Celý analytický proces môže byť zbytočný ak sa použije nevhodný spôsob prípravy vzorky. Proces zhromaždenia vzoriek ľudského telesného pachu zvyčajne zahŕňa:

- Obmedzenia pre ľudí poskytujúcich vzorky
- Médium, z ktorého je telesný pach odobraný
- Dĺžku vzorkovania
- Skladovanie vzoriek

Obmedzenia sa týkajú činností a hygienických či stravovacích oblastí. Sú potrebné pre minimalizáciu vonkajších faktorov, ktoré by telesný pach ovplyvnili a vytvorenie

jednotných podmienok vzorkovaných jednotlivcov. Medzi obmedzené činnosti môže patriť fyzické cvičenie alebo pohlavný styk. Hygienickým obmedzením, ktoré je potrebné dodržať niekoľko dní pred odberom vzoriek je najčastejšie používanie parfumov, parfumovaných mydiel, kozmetiky, deodorantov, sprchových gélov a podobne [65]. Niektoré štúdie však zohľadňujú aj tieto faktory, napríklad holenie, ktoré ovplyvňuje axilárny pach iba prechodne [66]. Väčšina štúdií vyžaduje pred odberom vzoriek určité stravovacie obmedzenia, vrátane konzumácie alkoholických nápojov a zákaz fajčenia. Avšak zoznam týchto obmedzení sa medzi štúdiami značne líši.

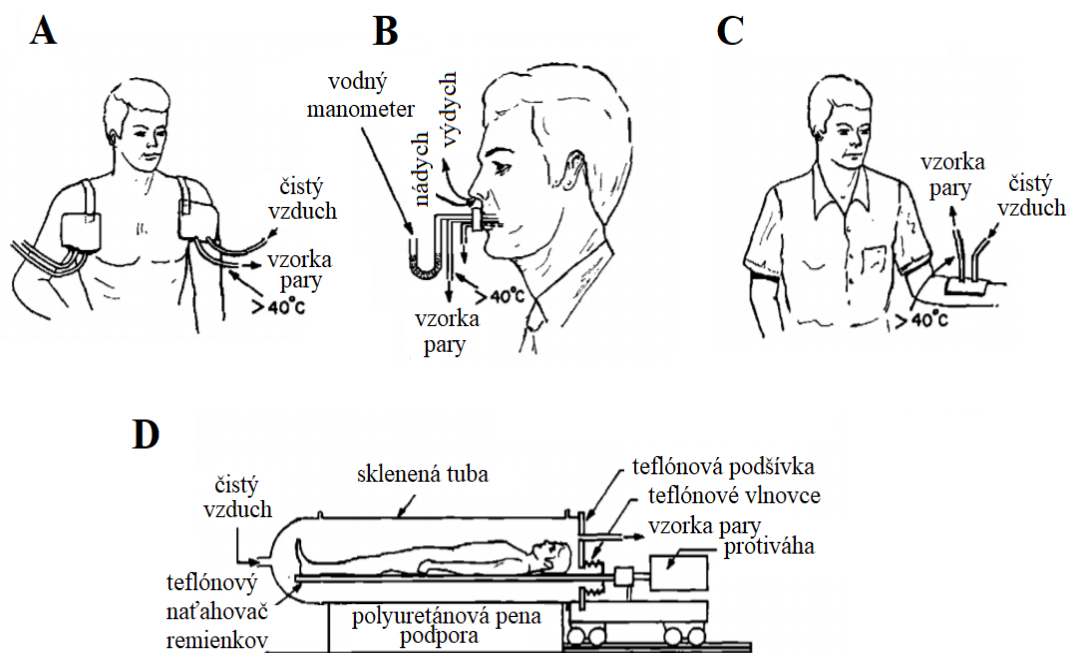
Vzorky sú väčšinou odoberané z oblasti podpazušia. Pre odber vzorky z podpazušia sa v minulosti používala drážkovaná gumová kefa, ktorou sa mechanicky otáčalo. Tento odber bol však nekomfortný a vzorka nebola reprezentatívna [67]. Neskôr bolo vzorkovanie podpazušia prevádzané zachytávaním VOCs na polyetylénovú formu [68] (Obr. 6A). Vzorkovanie z úst bolo uskutočnené pomocou náustku s dvoma hadicami, jedna slúžila pre prívod čistého vzduchu a druhá pre odvod vydychovanej pary regulovanou rýchlosťou (Obr. 6B). Kožné prchavé látky boli odoberané pomocou teflónovej nádoby [69] (Obr. 6C).

Štúdie ľudských telesných pachov boli poväčšine prevádzané na nosených tričkách alebo vatových tampónoch, ktoré sa nosili v oblasti podpazušia po dobu niekoľkých dní [70],[71]. Pri tričkách však nie je možné určiť zdroj telesného pachu, ktorý môže byť vytvorený z rôznych častí tela. Taktiež môžu byť znečistené prostredím. Preto sú v súčasnosti najčastejšie používané bavlnené podložky alebo vatové tampóny, ktoré sú v dlhodobom kontakte s podpazuším [72],[73]. Analyt sa z týchto matric oddeľuje použitím najstaršej metódy prípravy vzorky – extrakcie, za použitia vhodného rozpúšťadla s optimálnym výťažkom a selektivitou. Nevýhodou extrakcie tričiek bolo, že spôsobila kontamináciu pozadia z tkanín a stratu stopových zlúčenín, ktoré sa na tkaninách zachytili.

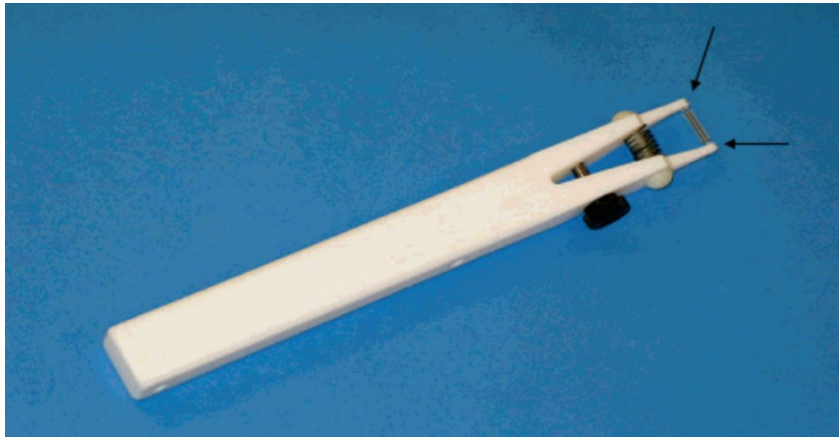
Aby sa zabránilo použitiu extrakcie rozpúšťadlom, boli používané iné metódy vzorkovania a prípravy vzoriek. Odoberanie vzoriek z celého ľudského tela bolo prevedené umiestnením jednotlivca do skleneného valca, kde bola vzorka prchavých látok odobraná prechodom prúdu plynu trubicou [69] (Obr. 6D). Pri tomto odbere bolo detegovaných približne 300 – 400 komponentov, z toho 135 bolo identifikovaných [74].

Vzduch musí byť zavádzaný v miere zodpovedajúcej rýchlosti odvádzania vzorky a zároveň dostatočne pomaly aby sa odorant nevyčerpával. Hadičky odvádzajúce vzorku by mali byť vyhrievané aspoň na 40 °C, kvôli zabráneniu kondenzácii vody v trubici [69].

Neskôr, konkrétne v roku 1990, vynášiel Pawliszyn metódu mikroextrakcie na pevnej fáze (SPME, z angl. *solid-phase microextraction*), čo je veľmi jednoduchá a efektívna metóda prípravy vzorky bez použitia rozpúšťadiel [75]. Aj v súčasnosti je to populárna metóda v rôznych oblastiach analytickej chémie a používa sa v spojení s plynovou chromatografiou, vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou, kapilárnou zónovou elektroforézou a hmotnostným detektorom. Potom bola zavedená aj ďalšia bezrozpúšťadlová metóda, extrakcia na sorpčných miešadielkach (SBSE, z angl. *stir bar sorptive extraction*) v spojení s termálnou desorpčnou plynovou chromatografiou s hmotnostným detektorom [34]. Miešadielko môže byť na bokoch upevnené do valčekového zariadenia, ktoré je znázornené na Obr. 7, pre odber vzorky z podpazušia [76].



Obr. 6: Možnosti odberu vzorky ľudského telesného pachu do zberných zariadení. A – zachytávanie prchavých látok na polyetylénovú formu, B – náustok pre vzorkovanie z úst, C – odber vzorky pomocou teflónovej nádoby, D – sklenený valec pre odber vzorky prchavých látok celého tela. Prevzaté a upravené podľa: [69].



Obr. 7: Valčekové zariadenie určené na držanie miešacej tyčinky pre SBSE. Šípky ukazujú miesta pripojenia miešacej tyčinky [76].

Ďalším parametrom je dĺžka vzorkovania, ktorá sa v štúdiách pohybuje v rozmedzí od 30 minút [77], cez 24 hodín [42], až po niekoľko dní [78], ba dokonca i týždeň [79]. Tieto rozdiely môžu viesť k rôznej sile pachu, takže ku kvantitatívnym rozdielom a ku kvalitatívnej variabilite v dôsledku aktivity kožných baktérií.

V niektorých štúdiách boli použité čerstvo nazbierané vzorky pre ich následné spracovanie [72]. Tento postup je náročný, obmedzuje počet hodnotiteľov a prevedených analýz a bráni možnosti spravodlivého porovnania medzi vzorkami odobratými od toho istého jedinca v rôznych časoch. Preto sú vo väčšine prípadov vzorky pred experimentálnou časťou najprv zamrazené až do niekoľkých hodín pred začiatkom hodnotenia či merania. Zamrazenie vzoriek telesného pachu by nemalo významne ovplyvňovať ich kvalitu. Hodnotenie opakovane zmrazených a rozmrazených vzoriek z hľadiska hedonicity a intenzity sa tiež významne nelíši od hodnotenia čerstvých vzoriek [80].

### 2.2.5 Meranie prchavých látok telesného pachu

Po samotnom vzorkovaní a spracovaní vzoriek nasleduje ich subjektívne hodnotenie alebo meranie vzoriek za použitia analytických metód.

Pri subjektívnom posudzovaní jedinca hodnotia a popisujú vzorky na základe ich vlastného čuchového vnímania. Napríklad v štúdiu Platek a kol. mali účastníci spomedzi piatich vzoriek, uložených v injekčných liekôvkách, identifikovať svoju vlastnú vzorku



predstavujúcu ich telesný pach [77]. Vzorok vo fliaštičkách sa potom hodnotil pomocou tzv. vizuálnej analógovej stupnice [81]. Účastníci hodnotili vzorky podľa toho ako sa pri ich vnímaní cítia, a potom ku vzorkám priradzovali prídavné mená z 11 predpísaných na základe ich prvotného dojmu. Taktiež opisovali vôňu jednotlivých vzoriek, napr. kvetinová. Výsledky ukazujú, že ženy vedeli lepšie identifikovať svoju vlastnú vzorku v porovnaní s mužmi.

V štúdiu Mallet a kol. boli vzorky taktiež subjektívne hodnotené, pričom bola hodnotená príjemnosť a parfumovaná stránka stimulov. Tieto dva aspekty boli hodnotené v 5-bodovej škále: od 1, veľmi nepríjemná, po 5, veľmi príjemná, a od 1, vôbec neparfumovaná, po 5, veľmi parfumovaná. Účastníci mali tiež identifikovať svoju vzorku a potom vzorky, ktoré podchádzajú od ľudí rovnakého a opačného pohlavia [78]. Medzi senzorické techniky, ktoré využívajú čuchové vnímanie vzoriek jedincami, patrí napríklad dynamická olfaktometria [82]. Fyziologické rozdiely v čuchových schopnostiach jednotlivých ľudí však môžu viesť k subjektívnym výsledkom. Olfaktometria je nákladná na dosiahnutie spoľahlivých výsledkov a tento systém založený na zmyslovom vneme nie je realizovateľný pre nepretržité monitorovanie vône. Preto sú potrebné prístroje, ktoré môžu poskytnúť jednoznačnú a reprodukovateľnú detekciu pachu.

Pre detekciu pachu môžu byť použité systémy s rôznymi detekčnými mechanizmami. Používajú sa chemické senzory, biosenzory, plynová chromatografia, hmotnostná spektrometria a kombinácie týchto metód [83]. Medzi najznámejšie chemické senzory patria tzv. elektronické nosy, ktoré napodobňujú biologické nosy, umožňujú zhodnotiť skúmanú vzorku a vytvoriť jej digitálny záznam [84].

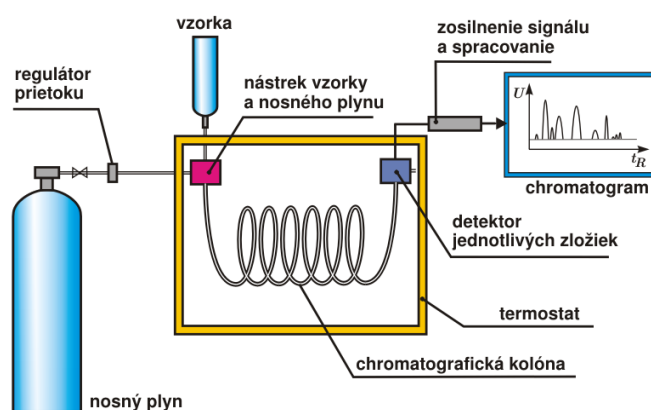
Cieľom merania za použitia analytických metód je určiť presné chemické zloženie VOCs charakterizujúce ľudský pach. Najpoužívanejšou metódou pre meranie prchavých látok a telesného pachu je plynová chromatografia, spojená väčšinou s hmotnostným detektorom. Veľmi často sa táto metóda používa v spojení so SPME [44] či s infračervenou spektroskopiou s Fourierovou transformáciou [56]. V niektorých štúdiách je pre meranie telesného pachu použitá termálna desorpcia zo sklenených guľôčok za využitia plynovej chromatografie s hmotnostným detektorom [85].

## 2.3 Plynová chromatografia v spojení s hmotnostnou spektrometriou

### 2.3.1 Plynová chromatografia

Plynová chromatografia (GC, z angl. *gas chromatography*) je jednou z najpoužívanejších a najdôležitejších analytických separačných metód v chémii. Je vhodná predovšetkým pre delenie a stanovenie prchavých organických látok rôzneho pôvodu. Moderná plynová chromatografia bola vyvinutá v roku 1952 [86]. V týchto rokoch bolo jednou z jej najväčších výziev zloženie ropy, ktorá nahradila uhlie ako hlavný zdroj kvapalných palív a chemických surovín [87]. Plynová chromatografia je základom výskumu, vývoja a kontroly kvality vzoriek v mnohých odvetviach priemyslu, najmä v petrochemickej výrobe, v potravinárstve, v oblasti životného prostredia, vo farmaceutickom priemysle a vo forenznej analýze.

Základným princípom metódy je rozdelenie jednotlivých zložiek vzorky medzi dve fázy. Po nástreku vzorky do injektora sú analyty separované medzi mobilnou fázou (nosný plyn) a stacionárnou fázou, ktorá je umiestnená v chromatografickej kolóne. Rôzne látky sa v kolóne pohybujú rozdielnymi rýchlosťami, podľa ich afinity ku stacionárnej fáze a tlaku nasýtených pár.



Obr. 8: Schéma plynového chromatografu. Prevzaté a upravené podľa: [88].

Súčasťou plynového chromatografu je tlaková nádoba obsahujúca nosný plyn s regulátorom prietoku, nástreková hlava, termostat so separačnou kolónou a detektor, za ktorým býva zapojený počítač pre zobrazenie signálu (Obr. 8). Vzorka je nadávkovaná

v plynnom alebo kvapalnom skupenstve do prúdu nosného plynu, kde je okamžite splynená. Jednotlivé zložky sú detegované v detektore. Signál je zaznamenávaný počítačom ako chromatogram čo predstavuje odozvu detektoru v závislosti na čase.

Ako nosný plyn bol najskôr používaný dusík, môže ním byť aj hélium alebo vodík či iný inertný plyn, ktorý sa neúčastní separácie [89]. V súčasnosti sú používané kapilárne separačné kolóny, ktoré obsahujú stacionárnu fázu na vnútornej stene ako tenký film, alebo náplňové kde je stacionárna fáza impregnovaná do pórovitej vrstvy. Ako kapilárne kolóny sú dnes používané výhradne kremenné kapiláry, zložené z taveného oxidu kremičitého s vrstvou polyimidu pre vyššiu pružnosť a odolnosť. Stacionárna fáza v kolónach môže byť v pevnom (GSC, z angl. *gas solid chromatography*) alebo kvapalnom skupenstve (GLC, z angl. *gas liquid chromatography*).

V spojení s plynovou chromatografiou sú používané rôzne druhy detektorov. Tepelne vodivostný detektor (TCD, z angl. *thermal conductivity detector*) je nedeštruktívny a univerzálny pre všetky látky, ktoré sa líšia svojou tepelnou vodivosťou od nosného plynu. Detektor elektrónového záchytu (ECD, z angl. *electron capture detector*) je taktiež nedeštruktívny, ale selektívny. Používa sa pre detekciu halogénderivátov a nitroderivátov. Veľmi citlivým detektorom, ktorý je tiež selektívny ale deštruktívny je plameňo-ionizačný detektor (FID, z angl. *flame ionization detector*), používaný najmä pre detegovanie uhľovodíkov. Univerzálnym detektorom pre takmer všetky organické látky, ktorý je vysoko špecifický a veľmi citlivý, je hmotnostný detektor (MS, z angl. *mass spectrometry*).

### 2.3.2 Hmotnostná spektrometria

Hmotnostná spektrometria je nepostrádateľným analytickým nástrojom vo viacerých vedných odboroch ako je chémia, biochémia, farmácia či medicína. Je používaná v rôznych oblastiach od elementárnej a izotopovej analýzy, cez charakterizáciu chemických reakcií po objasnenie štruktúry látok. Prvý prístroj pre separáciu iónov podľa pomeru ich hmotnosti k náboju ( $m/z$ ) skonštruoval začiatkom 20. storočia Joseph John Thomson, nositeľ Nobelovej ceny za objav elektrónu. Jeho práca viedla k objavu atómov a izotopov a tým sa považuje za otca hmotnostnej spektrometrie [90]. Toto bol začiatok viac ako storočia vývoja hmotnostnej spektrometrie do podoby, ktorá nám je známa dnes.

Používanie plynovej chromatografie v kombinácii s hmotnostnou spektrometriou (GC–MS) je stále častejšie. Hmotnostný detektor je vysoko citlivý, má nízke limity detekcie. Umožňuje kvalitatívnu i kvantitatívnu analýzu zlúčenín vo vzorkách a poskytuje informáciu o ich štruktúre, čo je dôležité pri ich konečnej identifikácii.

Molekuly z kolóny sú najprv ionizované na molekulové ióny a fragmenty. Tie sú ďalej fokusované a urýchľované do hmotnostného analyzátora, kde sa separujú podľa hodnôt pomeru ich hmotnosti k náboju,  $m/z$ . Fragmenty, ktoré majú tento pomer rôzny poskytujú rôzny signál a je možné ich následne detegovať a identifikovať. Relatívne zastúpenie jednotlivých iónov je zobrazené ako spektrum. Je nutné zariadenie udržiavať vo vysokom vákuu, aby sa medzi jednotlivými časticami nevymieňala energia [91].

Existuje viacero ionizačných techník, ktoré sú používané buď za zníženého tlaku alebo za atmosférického tlaku a spôsobujú mäkkú alebo tvrdú ionizáciu. Patria medzi nich sprejové ionizácie či ionizácia elektromagnetickým žiarením, no v spojení GC–MS sa používa predovšetkým elektrónová (EI, z angl. *electron impact*) a chemická ionizácia (CI, z angl. *chemical ionization*). Elektrónová ionizácia je najstaršou používanou metódou, kedy s molekulou interaguje prúd urýchlených elektrónov (spravidla 70 eV), ktoré z nej vyrazia valenčné elektróny za vzniku molekulárneho kation-radikálu. Elektróny sú emitované zo žeravého vlákna (W, Re) a urýchlené vďaka kladne nabitému kolektoru na opačnej strane. EI patrí do skupiny tvrdých ionizačných techník a poskytuje bohaté fragmentačné spektrá na úkor intenzity molekulového iónu, ba až jeho úplnému vymiznutiu [92].

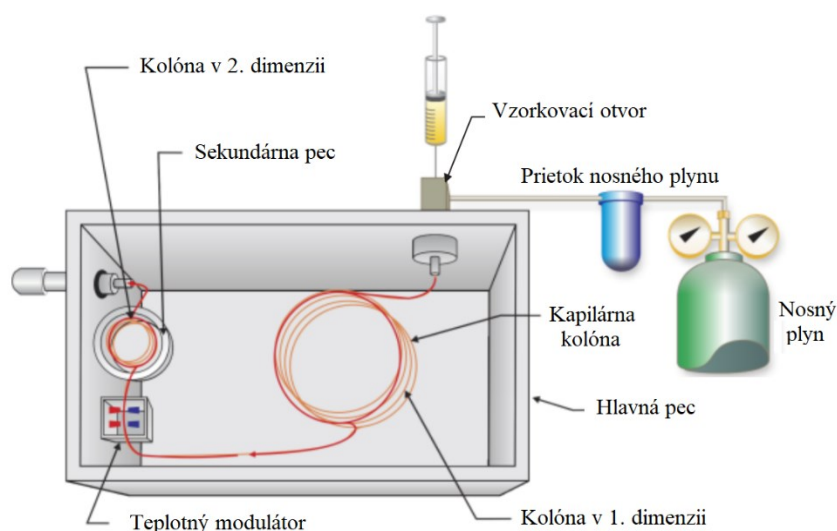
Následne sa ióny dostanú do analyzátora, ktorého úlohou je ich rozlíšiť na základe rozdielnych hodnôt pomeru  $m/z$ . Medzi najpoužívanejšie analyzátory patrí kvadrupólový analyzátor, iónová pasca a analyzátor doby letu. Analyzátor doby letu (TOF, z angl. *time-of-flight*) ako jediný nemá horný hmotnostný limit. Všetkým iónom je dodaná rovnaká energia a rýchlosť častíc s rovnakým nábojom závisí na ich hmotnosti, ióny s väčšou hodnotou  $m/z$  sa pohybujú pomalšie a naopak. Vysokého rozlíšenia je dosahované pomocou tzv. reflektoru čo je sústava kovových elektród, ktorá ióny zabrzdí a odrazí naspäť pre predĺženie dráhy a doby letu iónov [90]. TOF poskytuje vysoké rozlíšenie a má najvyššiu skenovaciu rýchlosť, preto je vhodný pre spojenie s viacrozmernými technikami GC.

### 2.3.3 Komprehenzívna plynová chromatografia s hmotnostným detektorom

Oddelenie a kvantifikácia látok nachádzajúcich sa v čoraz zložitejších maticiach je aj v súčasnosti analytickou výzvou. Niektoré matrice sú tak zložité, že klasickou GC nie sme schopní oddeliť jej jednotlivé zložky. Medzi takéto komplexné zmesi patrí napríklad ropa, prírodné arómy, parfumy, potraviny či telesný pach. Preto boli vyvinuté multidimenzionálne separačné techniky s lepšou separačnou schopnosťou oproti klasickej GC.

Najstaršou nekomprehenzívnou multidimenzionálnou separačnou technikou je „*heart cutting*“ (GC–GC). Táto technika zahrňuje vzorkovanie frakcie efluentu vychádzajúceho z jednej kolóny a následné nadávkovanie do druhej kolóny s rozdielnou selektivitou. Oproti klasickej GC zvyšuje selektivitu a píkuvú kapacitu. Táto metóda sa však ukázala byť efektívna iba v cieľenej analýze, kde sa nevyžaduje informácia týkajúca sa celej vzorky ale iba jednej alebo viacerých jednotlivých frakcií [93].

Komprehenzívna plynová chromatografia (GC×GC) predstavuje riešenie pre necieľenú analýzu, pretože separácia v dvoch dimenziách sa odohráva v rámci celej vzorky. Separácia pomocou komprehenzívnej dvojdimenzionálnej plynovej chromatografie (GC×GC) bola po prvýkrát opísaná v roku 1991 prof. Phillipsom a jeho študentom Liu-om [94]. Komprehenzívna plynová chromatografia v spojení s hmotnostným detektorom (GC×GC–TOFMS) je v súčasnosti najpoužívanejšia metóda pre separovanie a identifikáciu veľkého množstva analytov zo vzoriek s tak komplexnou maticou ako je aj telesný pach [5]. Pomocou dvoch kolón o rôznej polarite sme schopní dosiahnuť lepšiu separáciu analytov s podobnými vlastnosťami, oproti plynovej chromatografii klasickej. Pri GC×GC vzorka prechádza dvoma kolónami s rozdielnymi stacionárnymi fázami a na nich sa separuje (Obr. 9). Jedna kolóna je nepolárna a druhá je stredne až silne polárna. Na nepolárnej kolóne sú jednotlivé analyty separované najmä na základe ich tlaku nasýtených pár, teda bodu varu a na polárnejšej kolóne predovšetkým podľa ich polaritu. V systéme môže byť usporiadaná ako prvá nepolárna kolóna a za ňou polárnejšia alebo naopak, podľa povahy analyzovaného vzorku. Tieto dve kolóny sú umiestnené buď v jednej peci alebo v dvoch samostatných.

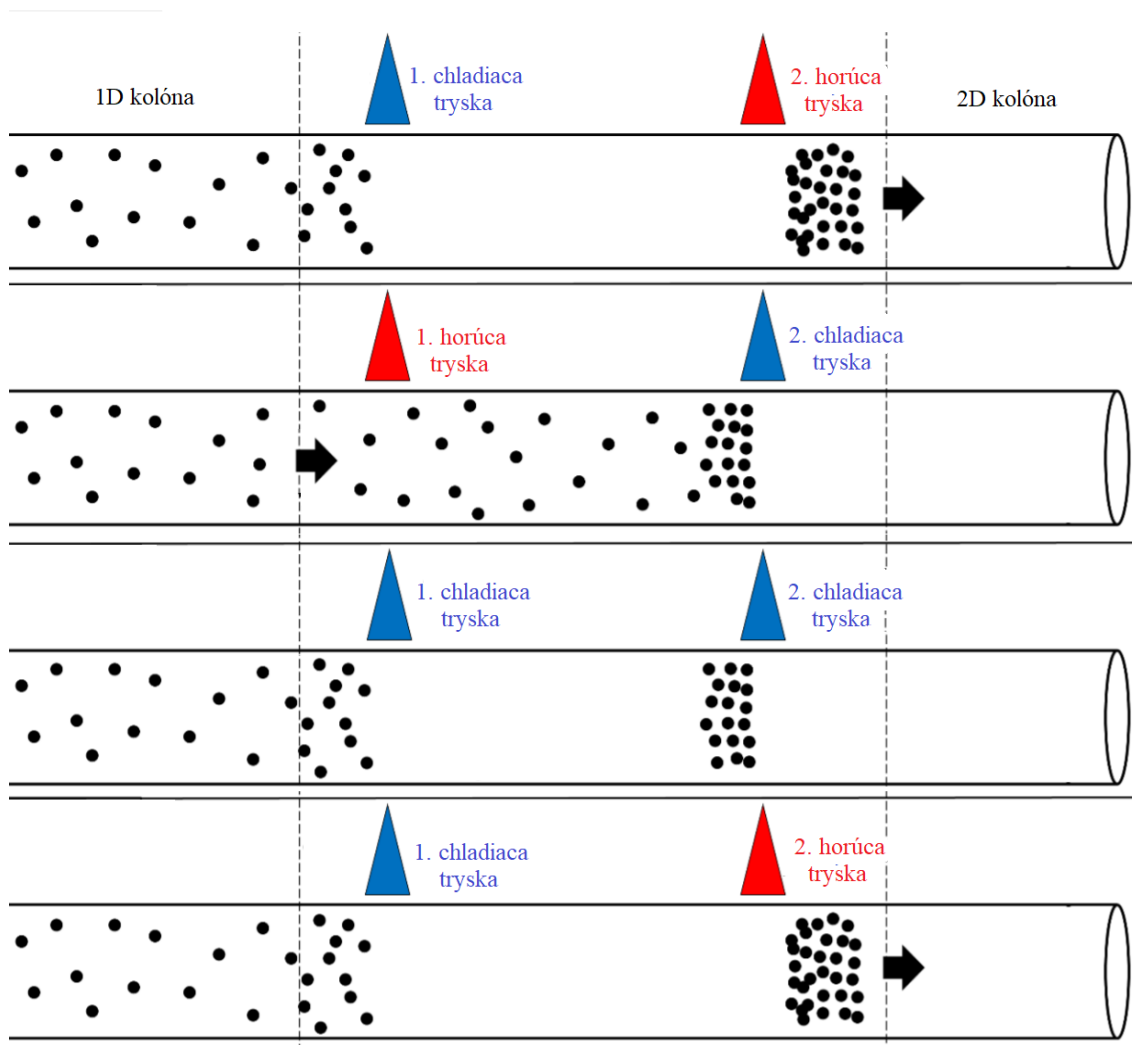


Obr. 9: Schéma GC×GC separačného systému v chromatografe. Prevzaté a upravené podľa: [95].

Medzi jednotlivými kolónami sa nachádza teplotný modulátor. Funkciou modulátoru je zachytiť frakcie efluentov z prvej kolóny, refokusovať ich na úzke chromatografické pásy a kontinuálne vstrekať do sekundárnej kolóny. Modulátor je nevyhnutnou súčasťou GC×GC prístroja, preto je označovaný ako jeho srdce [93]. Čas potrebný pre dokončenie jedného cyklu modulácie sa nazýva modulačná perióda. Modulátory môžu byť teplotné alebo tlakové, pričom teplotné sa ďalej delia podľa toho či sú založené na zohrievaní alebo chladení efluentu z primárnej kolóny na tzv. „heater-based“ a „cooling-based“. „Heater-based“ modulátory zachytávajú efluent z primárnej kolóny za teploty prostredia alebo o niečo vyššej. Naopak, „cooling-based“ modulátory efluent zachytávajú za nižšej teploty ako je v prostredí pomocou chladiacich mechanizmov za využitia napríklad tekutého dusíka, alebo oxidu uhličitého. Tlakové, respektíve prietokové modulátory k modulácii využívajú rôzne prietoky mobilnej fázy [96].

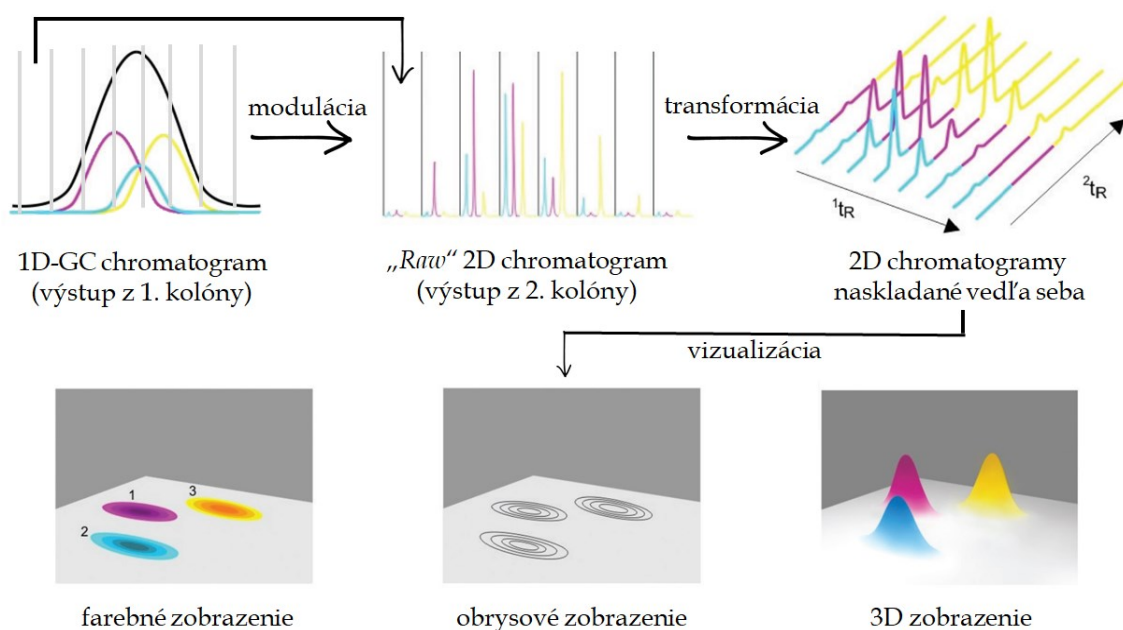
Najpoužívanejším modulátorom je teplotný kryogénny modulátor s tekutým dusíkom, ktorý má dvojstupňový systém modulácie a štyri trysky (dve chladiace a dve horúce). Jeho priebeh sa dá opísať v štyroch etapách a je znázornený na Obr. 10. V prvej etape modulácie je zapnutá 1. chladiaca tryska, ktorá zakoncentruje efluent z primárnej kolóny a súčasne je zapnutá 2. horúca tryska pre vypustenie analytov z predchádzajúcej modulácie do sekundárnej kolóny. Následne je zapnutá 1. horúca tryska pre uvoľnenie zakoncentrovaného efluentu a spolu s ňou je zapnutá 2. chladiaca tryska pre ďalšiu

fokusáciu. V tretej fáze sú zapnuté obe chladiace trysky, pričom 1. začne fokusovať už ďalšiu moduláciu a 2. tryska naďalej fokusuje aj tie analyty, ktoré v prvej etape neboli zmodulované a fokusované. V poslednej etape ostáva 1. chladiaca tryska naďalej zapnutá pre fokusáciu a v druhej modulačnej časti je zapnutá 2. horúca tryska pre uvoľnenie efluentu do sekundárnej kolóny [97].



Obr. 10: Priebeh kryogénneho štvortryskového modulátoru znázornený v štyroch krokoch. Modrou sú znázornené chladiace trysky a červenou horúce trysky. Prevzaté a upravené podľa: [97].

Výstupom z GC×GC je dvojdimenzionálny chromatogram. Tento chromatogram vzniká transformáciou a naskladaním jednotlivých klasických chromatogramov z druhej kolóny vedľa seba do druhej dimenzie. Schéma jeho vzniku je znázornená na Obr. 11. Prvá dimenzia predstavuje retenčné časy analytov z prvej kolóny a druhá dimenzia ich retenčné časy z druhej kolóny. 2D chromatogram je následne vizualizovaný v 2D alebo 3D zobrazení pre zvýraznenie intenzity signálu čo predstavuje kvantitatívne zastúpenie daného analytu. Podľa nameraných retenčných časov a spektier sme schopní jednotlivé analyty identifikovať porovnávaním s informáciami v dostupných knižniciach a databázach.



Obr. 11: Schematické znázornenie vzniku a vizualizácie dvojdimenzionálneho plynového chromatogramu. Prevzaté a upravené podľa: [98].



### 3 Ciele práce

- Na pilotnej štúdií vypracovať metodiku pre analýzu telesného pachu od vzorkovania cez meranie až po vyhodnotenie výsledkov
- Ukázať, že vypracovaná GC×GC–TOFMS metóda je vhodná pre rozlíšenie jedinca na základe odobraného pachu z podpazušia
- Kvalitatívna a kvantitatívna analýza vzoriek telesného pachu otcov a partnerov hlavnej štúdie
- Štatistickým spracovaním výsledných dát zistiť koreláciu medzi zložením telesného pachu partnerov zúčastnených žien a ich otcov

# 4 Experimentálna časť

## 4.1 Použité chemikálie a prístroje

### 4.1.1 Použité chemikálie

- hélium o čistote 5,0 (Messer Group, Nemecko)
- kvapalný dusík (Messer Group, Nemecko)
- *n*-hexán (86,18 g/mol; SupraSolv®; Merck KGaA, Nemecko)
- 1-bromnonán ( $\geq 98\%$ ; Fluka AG, Buchs SG, Švajčiarsko)
- 1-bromeikozán (98%; Sigma Aldrich, USA)
- alkány C<sub>7</sub> – C<sub>40</sub> (1 ng/μl; Sigma Aldrich, USA)

### 4.1.2 Prístrojové vybavenie

- Plynový dvojdimenzionálny chromatograf Pegasus 4D (LECO Corp., St Joseph, MI, USA) s hmotnostným detektorom
- Ultrazvukový sonikátor (Ultrasonic LC 30, Elma, Nemecko)
- Striekačka Hamilton 10 μl
- Sklenené pipety s balónikom
- Sklenené vialky 2 ml

## 4.2 Participanti

### 4.2.1 Pilotná štúdia

Pilotnej štúdie sa zúčastnilo celkom 6 mužov. Boli to vysokoškolský študenti vo veku 18 až 40 rokov. Zúčastnení muži nemuseli dodržiavať obmedzenia v stravovaní ale nemohli použiť antiperspirant či deodorant v deň odberu vzoriek. Každý poskytol triplikát vzorky z oboch podpazuší čo dokopy činilo 36 vzoriek.

### 4.2.2 Hlavná štúdia

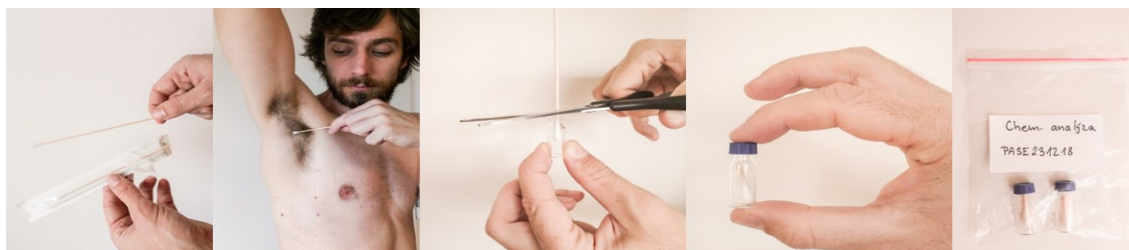
Štúdie sa zúčastnili ženy vo veku 18 – 35 rokov, ich partneri a otcovia. Požadovaný vek partnerov bol 18 – 40 rokov a vek ich biologických otcov bol maximálne 65 rokov.

Skúmané boli vzorky otcov a partnerov od 41 žien, takže dokopy 41 prislúchajúcich párov otec-partner, teda 82 mužov. Každý poskytol jednu vzorku z pravého a jednu z ľavého podpazušia čo dokopy činilo 164 vzoriek. Vekové rozpätie partnerov bolo stanovené kvôli homogenite vzoriek na jedincov v reprodukčnom období a horná veková hranica otcov bola stanovená kvôli zmenám telesného pachu vplyvom starnutia [33]. Podmienkou bolo, aby ženy vyrastali so svojim otcom aspoň 12 rokov v jednej domácnosti. Čo sa týka partnerského vzťahu žien, ten musel byť párom hodnotený ako dlhodobý s perspektívou do budúcnosti, pričom musel trvať aspoň 6 mesiacov. Participanti nemali žiadne zdravotné problémy, najmä tie, ktoré by mohli ovplyvňovať ich telesný pach [62] a taktiež neboli pravidelnými fajčiarmi.

Každý z participantov musel pred vzorkovaním telesného pachu dodržiavať diétu a restriktívnu stravu po dobu 2 dní zahrňujúce zákaz jedenia pikantných jedál, cesnaku, cibule, kyslých výrobkov, zrelých syrov, pitia alkoholu, fajčenia a fyzickej aktivity. Participanti mali taktiež zakázané používanie antiperspirantov, deodorantov, sprchových gélov, mydiel, parfumov a parfumovanej kozmetiky. Odber vzorky telesného pachu bol prevedený zúčastnenými jednotlivcami na druhý deň ich diéty.

### 4.3 Vzorkovanie a príprava vzoriek

Pre vzorkovanie bola použitá sterilná vatová tyčinka, ktorou sa v podpazuší 20x otočilo a následne bola vložená do 2 ml sklenenej vialky (Obr. 12). Okrem odberu vzorky z podpazušia bol prevedený aj odber kontrolnej vzorky prostredia mávaním čistú vatovou tyčinkou v prostredí okolo jednotlivca. Tyčinky so vzorkami boli skrátané, uzavreté vo vialkách a ihneď chladené na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  až do extrakcie. Bola prevedená extrakcia do  $400\text{ }\mu\text{l}$  destilovaného *n*-hexánu po dobu 24 hodín pri  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$  s 10 minútovým pôsobením ultrazvuku. K  $1\text{ }\mu\text{l}$  extraktu boli pridané vnútorné štandardy (10 ng 1-bromnonánu a 100 ng 1-bromeikozánu) a boli skladované pri  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  až do ich analýzy.

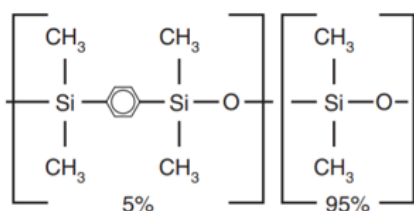


Obr. 12: Znárodnenie vzorkovania jednotlivými participantmi s následným uchovaním a označením vzoriek.

## 4.4 Chromatografické podmienky

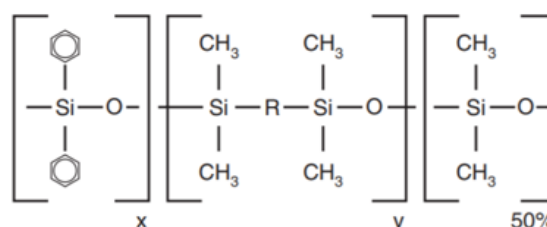
Vzorky boli analyzované pomocou GC×GC–TOFMS prístroja Pegasus 4D (LECO Corp., St Joseph, MI, USA). V chromatografe bola zapojená najprv dlhšia nepolárna kolóna a za ňou krátka polárnejšia kolóna. Prvá bola nepolárna kolóna Rxi®-5Sil MS (30 m, ID 0,25 mm, df 0,25  $\mu\text{m}$ , Restek, Bellefonte, PA, USA), ktorej stacionárna fáza je zobrazená na Obr. 13. V druhej dimenzii bola semi-polárna kolóna Rxi®-17Sil MS (1,5 m, ID 0,1 mm, df 0,1  $\mu\text{m}$ , Restek, Bellefonte, PA, USA) so stacionárnou fázou znázornenou na Obr. 14. Medzi nimi bol teplotný štvortryskový modulátor s dvoma chladiacimi a dvoma horúcimi tryskami. Horúci pulz trval 600 ms a modulačná perióda činila 5 sekúnd.

Rxi®-5Sil MS



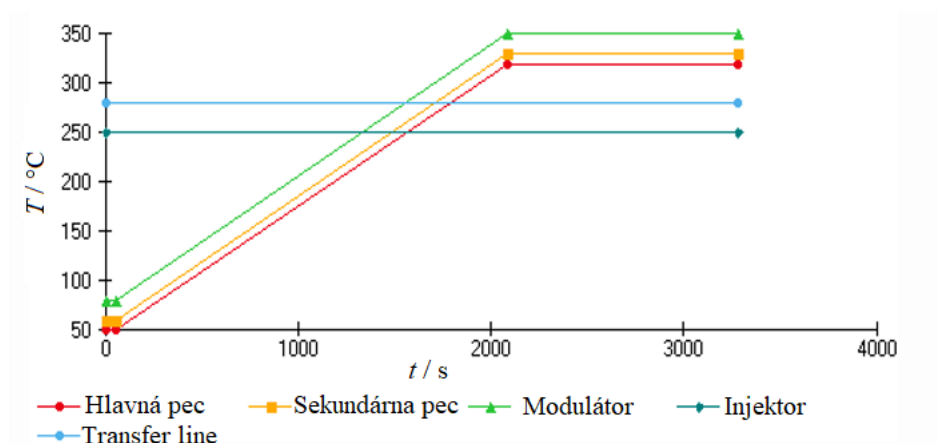
Obr. 13: Štruktúra stacionárnej fázy nepolárnej kolóny v prvej dimenzii.

Rxi®-17Sil MS



Obr. 14: Štruktúra stacionárnej fázy semi-polárnej kolóny v druhej dimenzii.

Analýza prebiehala za teplotného gradientu (Obr. 15). Teplotný program bol 50 °C (1 min), 8 °C/min až do 320 °C (20 min). Sekundárna kolóna bola o 10 °C teplejšia a modulátor o 20 °C teplejší ako primárna kolóna. Mobilnou fázou bolo hélium s konštantným prietokom 1 ml/min. Celkový čas jednej analýzy bol 54,75 min (3285 s).



Obr. 15: Teplotný program používaný pri analýze vzoriek.

Extrakt boli nadávkované o objeme 1  $\mu$ l pomocou automatického dávkovača do injektora s/bez deliča toku o teplote 250 °C v režime bez deliča toku (angl. *splitless*). Skenovanie začalo po uplynutí 400 s rýchlosťou 100 skenov za sekundu a zbierané boli hmoty v rozmedzí 29 – 600 Da. Oneskorená akvizícia bola nastavená pre vylúčenie signálu, ktorý poskytoval hexán ako rozpúšťadlo. Napätie detektora bolo 1 500 V.

## 4.5 Spracovanie dát

### 4.5.1 Spracovanie pomocou softvérov

Získané chromatogramy boli spracované pomocou softvérov s cieľom odstrániť píky, ktoré nepredstavujú látky ľudského pachu ale sú to napríklad analyty vymyté z kolóny alebo kontaminanty z vatovej tyčinky či prostredia. To bolo docielené vylúčením klasifikačných oblastí, kde sa vyskytujú najmä siloxány a ručným odstránením tradičných kontaminantov. Chromatogramy boli spracované dvomi softvérmi fungujúcimi na rôznom princípe. Najprv boli spracované pomocou LECO ChromaTOF<sup>®</sup> software v. 4.72 (LECO, St. Joseph, MI), ktorý zaradom detegoval všetky analyty na základe vstupných parametrov zahrňujúcich pomer signálu a šumu (S/N) a typickú šírku píku ( $w$ ).

Následne boli chromatogramy spracované pomocou novo vyvinutého softvéru ChromaTOF- Tile<sup>®</sup> v. 0.27 (LECO, St. Joseph, MI), ktorý používa tzv. „dlaždicovú“ metódu. Cieľom tohto nového softvéru je nájsť tie chemické látky, ktoré sú v súbore vzoriek významné hľadaním rozdielov kvantít medzi skupinou vzoriek a referenčnou skupinou. Softvér chromatogramy rozdelí na malé dlaždice, ktoré porovnáva s referenčnou skupinou a posúva tak, aby sa každý analyt vyskytoval v strede danej dlaždice. Tie musia byť dostatočne veľké aby pokryli šírku píku analytu aj s jeho možným posunom. Medzi tri základné vstupné parametre pre tento nový algoritmus patrí veľkosť dlaždice, kvantitatívny odstup od šumu (S/N) a prijateľný  $F$  pomer, ktorý predstavuje zastúpenie analytov v porovnaní s referenčnou skupinou. Pre účely tejto analýzy boli všetky vzorky ľudského pachu definované ako jediná skupina a ako referenčná skupina bola použitá skupina nasýtených nerozvetvených alkánov ( $C_7 - C_{40}$ , 1ng/ $\mu$ l, Sigma Aldrich) v roztoku  $n$ -hexánu. Softvér potom previedol  $F$  test analýzy rozptylu (ANOVA, z angl. *analysis of variance*) medzi vzorkou a referenčnou skupinou. Analyty boli softvérom hľadané v knižniciach a identifikované s príslušnou pravdepodobnosťou.

Výsledkom bola tabuľka s analytmi, ktoré sú na definovanej hladine  $F$  významne zastúpené vo všetkých ľudských vzorkách, automatické identifikácie analytov spolu s príslušnou mierou pravdepodobnosti, kvantitatívne zastúpenie, retenčné časy v oboch kolónach, retenčné indexy a ďalšie príslušné informácie.

#### 4.5.2 Štatistické spracovanie dát

Výsledná tabuľka významných analytov z ChromaTOF-Tile<sup>®</sup> v. 0.27 (LECO, St. Joseph, MI) bola následne spracovaná štatisticky na základe kvantitatívneho zastúpenia každého analytu v jednotlivých vzorkách. Kvantita analytu je vyjadrená ako súčet všetkých plôch píkov daného analytu, teda jeho objem. Tabuľka bola opäť prefiltrovaná a boli z nej vylúčené vnútorné štandardy a analyty pochádzajúce z vatovej tyčinky. Výsledná tabuľka objemov píkov bola podrobená odmocninovej transformácii, ktorá znižuje význam kvantitatívne dominantných píkov a zároveň homogenizuje rozptyl hodnôt objemov píkov (heteroscedasticitu).

Objemy boli potom relativizované podelením hodnôt sumou objemov všetkých analytov danej vzorky. To je dôležitý krok pre to, aby sme chromatogramy mohli medzi sebou porovnávať, keďže samotné vzorkovanie ovplyvňuje kvanitu analytov a niektoré vzorky boli silnejšie ako iné. Výsledné hodnoty boli štandardizované pre priradenie rovnakej váhy všetkým píkom. V poslednom kroku bolo relatívne zastúpenie každého z analytov porovnané pomocou analýzy hlavných komponentov (PCA, z angl. *Principal component analysis*), a vzájomná chemická zhoda vzoriek bola interpretovaná z prvých troch komponentov. Vynesením hodnôt prvých troch komponentov pre všetky vzorky boli získané grafy chemickej variability medzi vzorkami. Tieto hodnoty boli zároveň využité pre vypočítanie Euklidovských vzdialeností medzi každou dvojicou vzoriek a výsledná hodnota bola použitá pre vyjadrenie „chemickej“ vzdialenosti medzi vzorkami. Pre štatistické spracovanie dát boli použité programy Microsoft Excel, Canoco a Statistica.

## 4.6 Identifikácia analytov

Identita jednotlivých analytov z výslednej sady bola určená za pomoci knižníc s následnou manuálnou kontrolou. Softvéry používali knižnice mainlib, replib a wiley8st. Identifikácia bola zisťovaná na základe dvoch aspektov, ktoré boli porovnávané medzi knižnicami či databázami (NIST, PubChem) a nameranými dátami.

Boli porovnávané hmotnostné spektrá s elektrónovou ionizáciou jednotlivých analytov (EI-MS spektrum). Ďalej boli porovnávané ich retenčné indexy. Keďže retenčný čas nie je nemennou súčasťou ale so zmenou systému a podmienok (napr. zmena kolóny) sa mení, je možné ho pri identifikácii použiť iba ak porovnávame neznámu látku so štandardom za rovnakých podmienok. Bez použitia štandardov sú používané retenčné indexy, kedy je neznáma látka porovnávaná s referentnými látkami alebo skupinou látok. Bol používaný tzv. Kovatsov retenčný index (*KI*) a retenčné dáta boli v daných podmienkach vzťahované na homologickú radu *n*-alkánov. Kovatsov retenčný index závisí na stacionárnej fáze a na teplote. *KI* je definovaný ako [99, 100]:

$$KI = 100 \cdot (N - 1) + 100 \cdot \frac{\log_{t_R(vz)} - \log_{t_R(N-1)}}{\log_{t_R(N+1)} - \log_{t_R(N-1)}}, \quad 1$$

pričom pre retenčný index alkánu platí:

$$KI = 100 \cdot N \quad 2$$

kde  $N - 1$  predstavuje počet atómov C v najbližšom nižšom *n*-alkáne,  $N + 1$  počet atómov C v najbližšom vyššom *n*-alkáne,  $t_R(vz)$  predstavuje retenčný čas analytu vo vzorke,  $t_R(N - 1)$  retenčný čas najbližšieho nižšieho *n*-alkánu,  $t_R(N + 1)$  retenčný čas najbližšieho vyššieho *n*-alkánu a  $N$  v rovnici (2) predstavuje počet atómov C v danom alkáne.

# 5 Výsledky práce

## 5.1 Optimalizácia základných parametrov

### 5.1.1 Modulačná perióda

Modulačná perióda predstavuje čas potrebný pre dokončenie jedného cyklu modulácie pri meraní pomocou komprehenzívnej dvojdimenzionálnej plynovej chromatografie. Boli skúmané modulačné periódny 3 s a 5 s a z toho bola zvolená doba modulačnej periódny 5 s ako optimálna a tá bola použitá pri meraní výsledných chromatogramov.

### 5.1.2 Šírka píku

Pre procesovanie chromatogramov pomocou LECO ChromaTOF<sup>®</sup> software v. 4.72 bolo potrebné zvoliť očakávanú šírku píku analytu ( $w$ ). Tá bola vypočítaná ako násobok počtu modulačných zón (3 až 6) a modulačnej periódny. Pre výpočet šírky píku analytu sa počítalo so 4 modulačnými zónami. Z toho boli pre šírku píku analytu podľa nastavenej modulačnej periódny (3 s alebo 5 s) vypočítané hodnoty 12 s, 15 s a 20 s a z nich bola zvolená hodnota 20 s ako optimálna šírka píku, najmä kvôli najlepšej detekcii abundantných analytov.

### 5.1.3 Pomer signálu a šumu

Pomer signálu a šumu je dôležitým vstupným parametrom pre oba použité softvéry. Boli skúmané pomery S/N v rozsahu 10 – 200, konkrétne hodnoty 10, 20, 50, 100 a 200. Z následne vygenerovaných tabuliek analytov bol podľa relevancie jednotlivých analytov zvolený ako optimálny pomer S/N = 50 pre obidva softvéry. Tento pomer bol zvolený pre redukciu celkového počtu píkov na čo najviac relevantné, ktoré pochádzajú z ľudských vzoriek a tvoria telesný pach, a zároveň aby pri spektrách jednotlivých analytov nebol príliš veľký šum.



### 5.1.4 *F* pomer

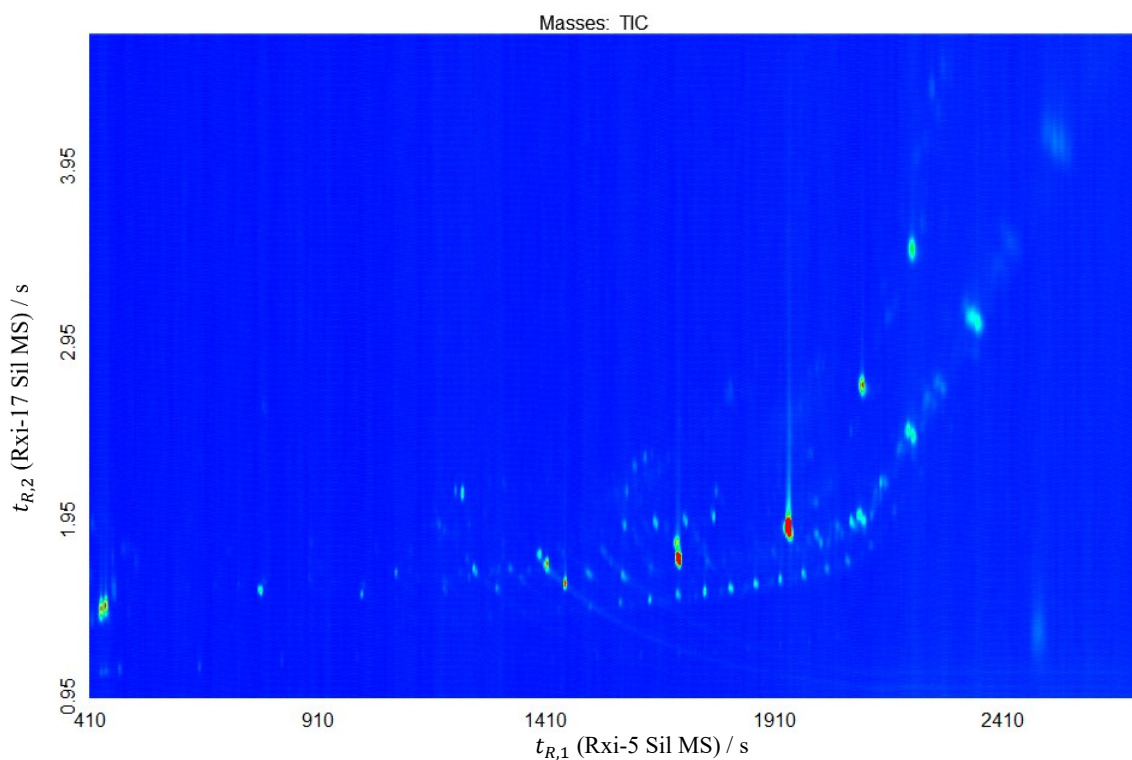
*F* pomer je vstupný parameter potrebný pre spracovanie dát softvérom ChromaTOF-Tile® v. 0.27. Tento pomer sa používa pre vyhľadávanie štatisticky významných rozdielov medzi triedami vzoriek. V tomto prípade boli vzorky rozdelené do dvoch tried, pričom prvá trieda zahrňovala vzorky ľudského pachu mužov a druhá trieda obsahovala referenčnú skupinu *n*-alkánov C<sub>7</sub> – C<sub>40</sub>. Tento pomer slúži pre zdôraznenie rozdielov medzi jednotlivými triedami a ignorovanie tých látok, ktoré sa medzi triedami nelíšia. *F* pomer je počítaný ako podiel variácie medzi triedami a variácie v rámci triedy. Vysoký *F* pomer je očakávaný pre analyt, ktorý je rozdielny medzi triedami ale zhodný v rámci triedy. Nízky *F* pomer sa očakáva u látky, ktorá je buď takmer rovnako zastúpená v oboch triedach alebo výrazne variabilná v rámci jednej alebo oboch tried. Čím väčší teda *F* pomer je, tým menej analytov bolo nájdených, pretože softvér vyhľadával tie, v ktorých sa chromatogramy čo najviac líšili od referenčnej skupiny ale zároveň boli veľmi podobné v chromatogramoch v rámci skupiny. Boli skúmané hodnoty *F* pomeru 1, 2, 5, 10 a 20. Pre každý *F* pomer bola hodnotená kvalita separácie vzoriek jednotlivých ľudí a na základe toho bol zvolený *F* pomer 2 ako najlepší a s touto hodnotou vstupného parametru boli všetky vzorky spracované.

### 5.1.5 Veľkosť dlaždice

Veľkosť dlaždice je ďalším vstupným parametrom potrebným pre softvér ChromaTOF-Tile® v. 0.27. Vo všeobecnosti sa vhodná veľkosť dlaždice vypočíta ako súčet šírky píku a posunu v oboch dimenziách v rámci analyzovanej sady vzoriek. Je potrebné aby sa rovnaký analyt vo všetkých chromatogramoch nachádzal v rovnakej dlaždici. Potom je možné jednotlivé analyty porovnávať medzi rôznymi chromatogrammi. Ak je dlaždica príliš veľká môže rozmazať analyt a obsahovať viacero rôznych analytov a naopak, ak je príliš malá tak môže rozdeliť jeden analyt do viacerých dlaždíc. Veľkosť dlaždice môže byť softvérom vypočítaná pomocou zadaných širok píku v polovici výšky pre obe dimenzie a posunu alebo môže byť jej rozmer manuálne zadaný ako počet modulácií × počet spektier. Chromatogramy boli spracované pri veľkostiach dlaždíc 6×10 a 5×14, pričom rozmery sú uvedené v sekundách. Ako optimálna veľkosť dlaždice bol zvolený rozmer 6 s × 10 s.

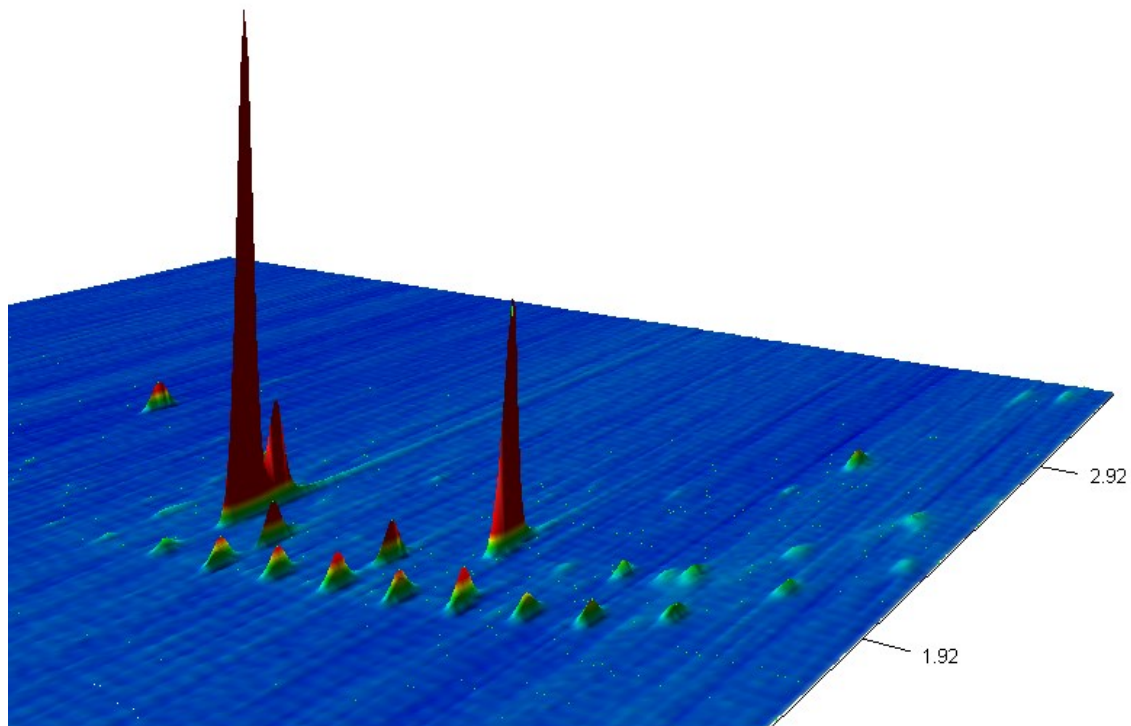
## 5.2 Chemický profil ľudského telesného pachu

Meraním pomocou komprehenzívnej dvojdimenzionálnej plynovej chromatografie s optimálnou modulačnou periódou (5 s) boli získané dvojdimenzionálne chromatogramy jednotlivých vzoriek ľudského telesného pachu. Tieto chromatogramy sú znázornené tak, že os x predstavuje retenčný čas analytov v prvej kolóne (v tomto prípade nepolárnej) a os y predstavuje ich retenčný čas v druhej, semi-polárnej kolóne. Intenzita píkov jednotlivých analytov je znázornená pomocou farebnej škály od modrej po červenú, kde červená predstavuje najväčšiu intenzitu. Príklad získaného 2D chromatogramu je zobrazený na Obr. 16.



Obr. 16: Vizualizácia 2D chromatogramu. Retenčné časy v oboch kolónach sú uvedené v sekundách. Najvýraznejším analytom v tomto chromatograme je skvalén ( $t_{R,1} = 1940$  s;  $t_{R,2} = 2,44$  s;  $KI = 2842$ ).

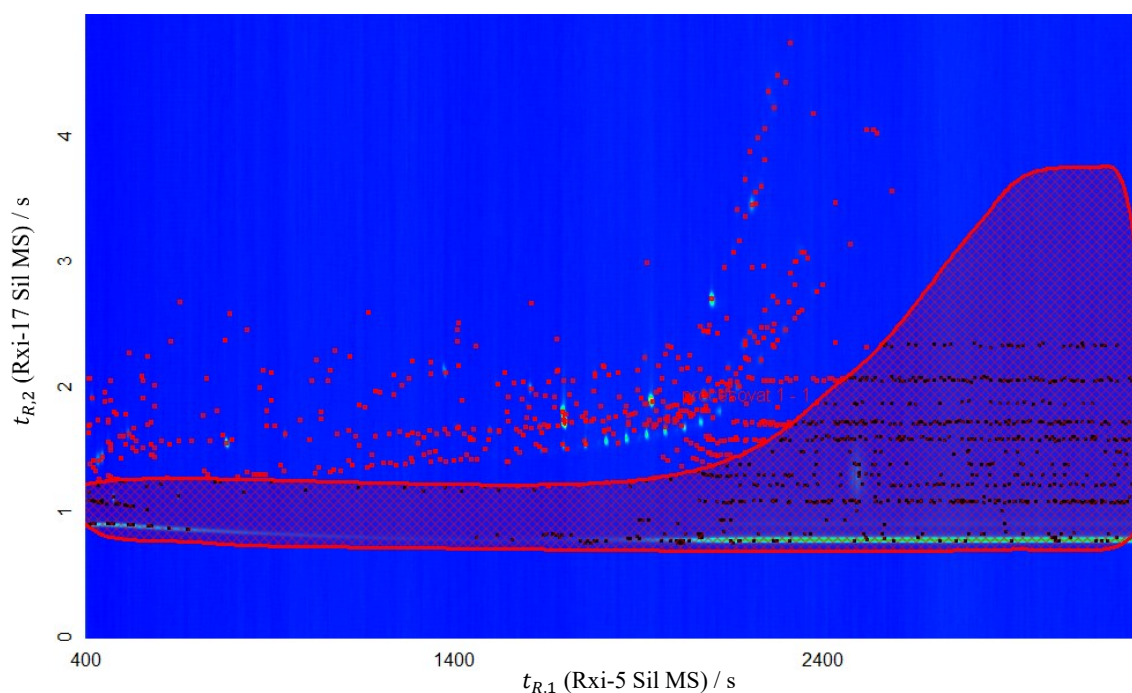
Chromatogramy je možné vizualizovať aj v 3D zobrazení, kedy píky jednotlivých analytov vystupujú do tretej osi, ktorá znázorňuje ich intenzitu. Príklad získaného dvojdimenzionálneho chromatogramu v 3D zobrazení je uvedený na Obr. 17.



Obr. 17: Vizualizácia 2D chromatogramu v 3D zobrazení. Retenčné časy sú uvedené v sekundách. Čím intenzívnejší je pík analytu, tým väčší je v tretej osi z.

### 5.3 Filtrovanie analytov

Chromatogramy boli najprv spracované pomocou LECO ChromaTOF<sup>®</sup> software v. 4.72. Pre spracovanie bolo potrebné nastaviť základné vstupné parametre na optimálne zistené hodnoty. To zahŕňa očakávanú šírku píku analytu,  $w$ , ktorá bola nastavená na hodnotu 20 s a pomer signálu a šumu, ktorého hodnota bola nastavená na pomer  $S/N = 50$ . Softvér na základe vstupných parametrov detegoval 800 – 3 500 analytov nachádzajúcich sa v jednotlivých analyzovaných vzorkách. Z týchto analytov bolo potrebné odstrániť tie, ktoré nepochádzajú z ľudského podpažušia. V získaných chromatogramoch nameraných vzoriek boli ručne vyznačené klasifikačné oblasti (Obr. 18) pre odstránenie siloxánov, ktoré predstavujú analyty vymyté z kolóny a nepochádzajú z telesného potu.



Obr. 18: Chromatogram s vyznačenými detegovanými analytmi. Bodmi sú znázornené analyty nájdené softvérom LECO ChromaTOF<sup>®</sup> software v. 4.72. Mriežkovanou červenou plochou je vyznačená oblasť, ktorá bola vylúčená spolu s analytmi, ktoré sa v nej nachádzajú a sú v nej označené čiernymi bodmi. Retenčné časy sú uvedené v sekundách.

V softvéri ChromaTOF- Tile<sup>®</sup> v. 0.27 boli taktiež vylúčené oblasti kde sa vyskytujú najmä siloxány. Na rozdiel od prvého softvéru, v tomto prípade oblasti neboli vyznačené ručne, ale boli presne vymedzené tak ako je to znázornené v Tabuľke 1.

Tabuľka 1: Vylúčené oblasti v chromatogramoch. Symbol  $t_{R,1}$  predstavuje retenčný čas v prvej dimenzii (nepolárna kolóna) a  $t_{R,2}$  v druhej dimenzii (semi-polárna kolóna). Retenčné časy sú uvedené v sekundách.

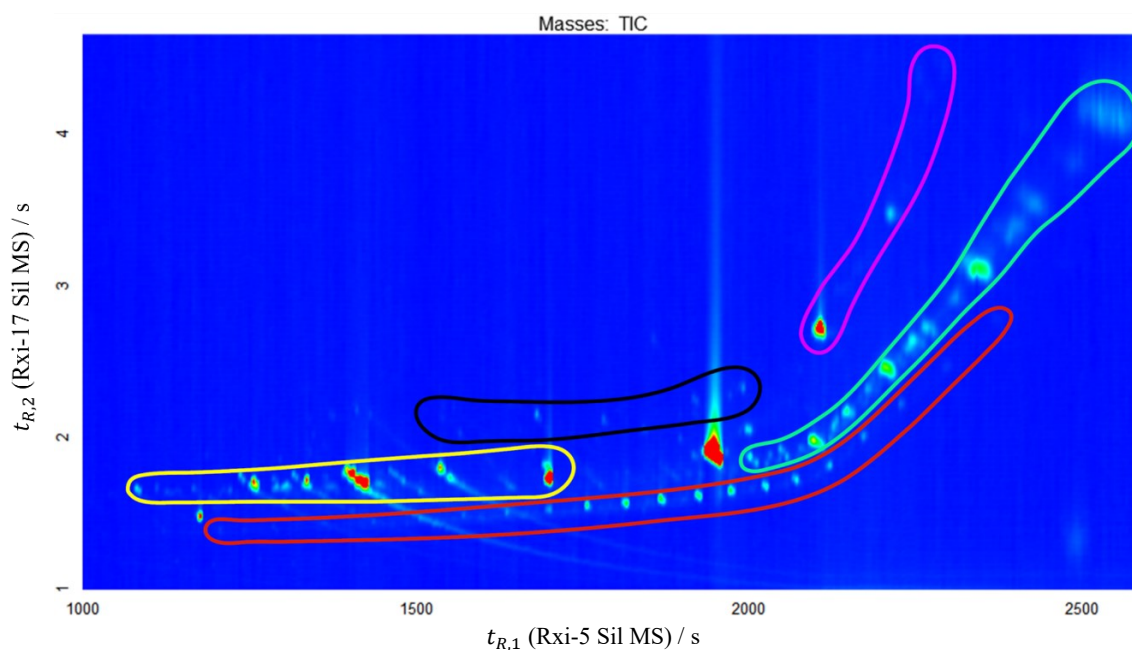
$t_{R,1} / s$		$t_{R,2} / s$	
od	do	od	do
0	3275	0	1,05
1300	3275	0	1,30
1500	3275	0	1,37
1900	3275	0	1,50
2100	3275	0	1,60
2200	3275	0	1,74
2300	3275	0	2,23
2400	3275	0	2,65
2500	3275	0	3,10

## 5.4 Charakteristické skupiny analytov ľudského telesného pachu

V chromatogramoch nameraných vzoriek boli nájdené analyty patriace do týchto skupín:

- Uhl'ovodíky
- Karboxylové kyseliny
- Voskové estery
- Amidy
- Steroly
- Alkoholy
- Aldehydy
- Ketóny
- Aromatické zlúčeniny
- Estery
- Étery
- Laktóny
- Terpény

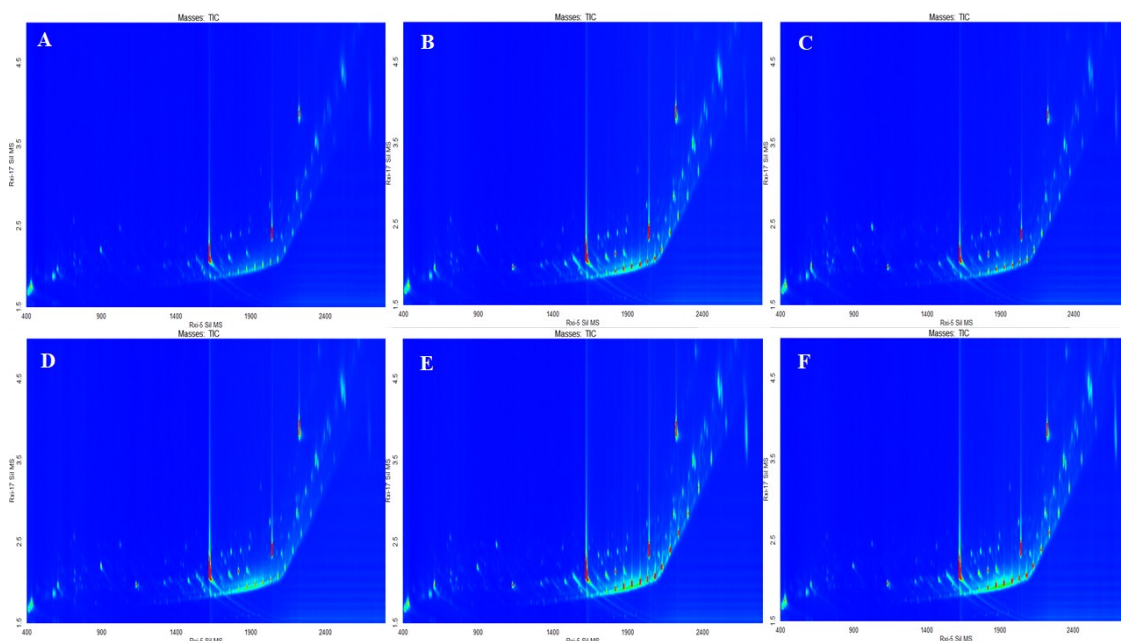
Niektoré z týchto charakteristických skupín analytov majú v chromatogramoch typické miesto výskytu. Oblasti ich výskytu sú vyznačené na nasledujúcom obrázku (Obr. 19).



Obr. 19: Chromatogram s vyznačenými skupinami analytov, ktoré sa nachádzajú vo vzorkách telesného pachu. Znáznomenými skupinami sú uhl'ovodíky (červená), karboxylové kyseliny (žltá), voskové estery (zelená), amidy (čierna) a steroly (fialová).

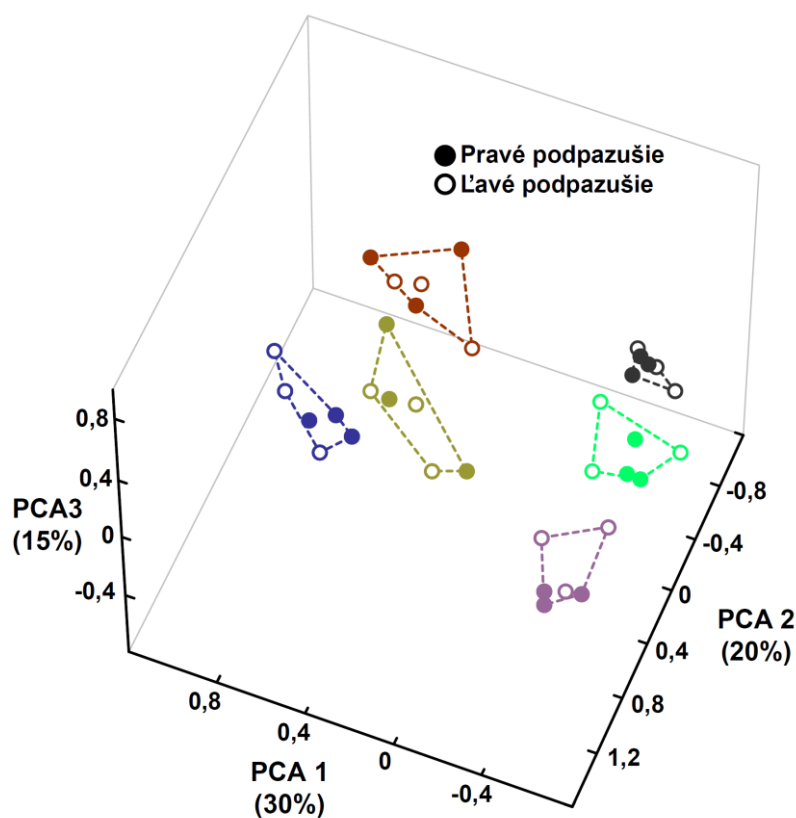
## 5.5 Pilotná štúdia

Ešte pred samotným meraním vzoriek 41 prislúchajúcich párov otec-partner bola prevedená pilotná štúdia, ktorej sa zúčastnilo 6 mužov. Každý poskytol triplikát vzorky z pravého a ľavého podpazušia. Namerané chromatogramy jedného človeka pilotnej štúdie sú znázornené na Obr. 20. Horný riadok (Obr. 20A, B, C) predstavuje triplikát vzoriek z jeho ľavého podpazušia a dolný riadok (Obr. 20D, E, F) triplikát vzoriek z jeho pravého podpazušia.



Obr. 20: Výsledné chromatogramy patriace jednému človeku pilotnej štúdie. A, B, C – triplikát z ľavého podpazušia; D, E, F – triplikát z pravého podpazušia.

Chromatogramy pilotnej štúdie boli spracované v softvéri ChromaTOF- Tile<sup>®</sup> v. 0.27 so vstupnými parametrami S/N = 50, F pomer = 2 a veľkosťou dlaždice 6 s × 10 s. Spracovaním všetkých 36 chromatogramov šiestich zúčastnených mužov pilotnej štúdie v tomto softvéri vznikla tabuľka obsahujúca kvantitatívne zastúpenie jednotlivých analytov, v ktorých sa chromatogramy líšia v porovnaní s referenčnou skupinou. Táto tabuľka obsahovala dokopy 418 významných analytov. Tabuľka bola ďalej použitá pre štatistické spracovanie dát. Bola prevedená PCA analýza, ktorej výsledok je zobrazený na Obr. 21. Z tohto obrázku je vidieť, že pomocou vypracovanej metodiky bola docielená dostatočná separácia jednotlivých participantov na základe chemických profilov ich telesných pachov.

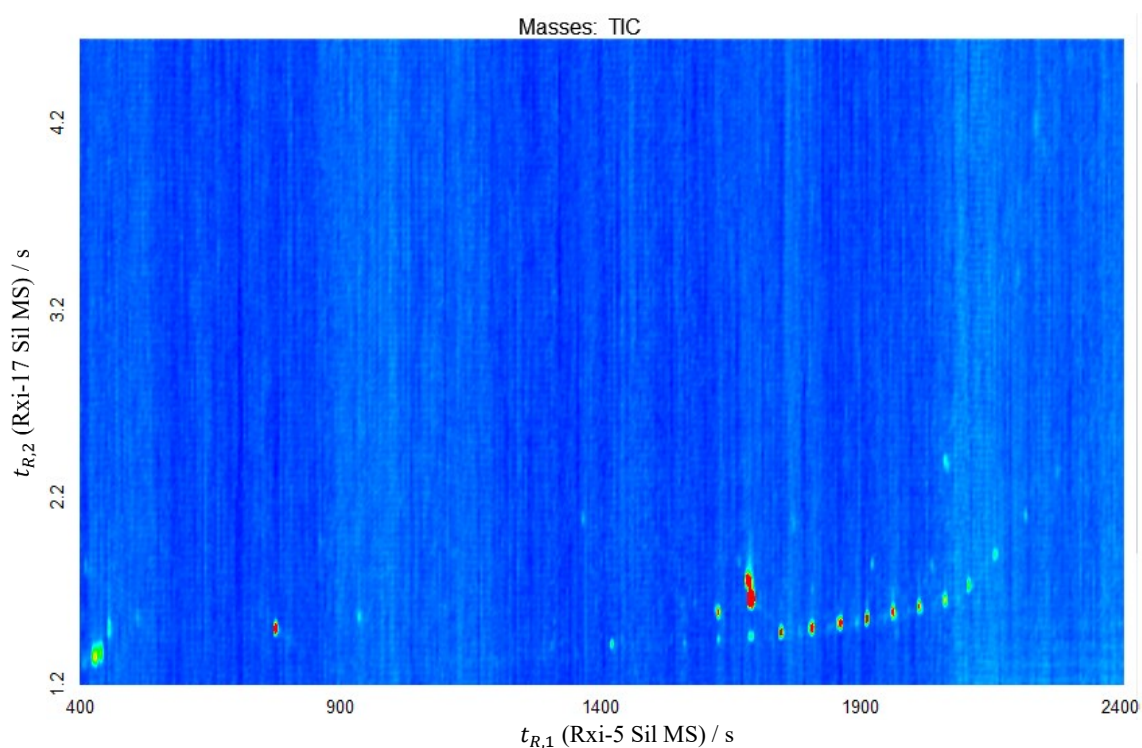


Obr. 21: Výsledok PCA pilotnej štúdie. Boli použité tri hlavné komponenty, ktoré pokrývajú dokopy 65% variability. Variabilita, ktorú pokrývajú jednotlivé hlavné komponenty je uvedená pod osami v zátvorkách. Participanti sú vyznačený rôznymi farbami. Vyplnenou farebnou kružnicou sú označené triplikáty pravého podpazušia a kružnicou bez výplne sú označené triplikáty ľavého podpazušia zúčastnených mužov. Modrou farbou je označený muž, ktorého chromatogramy sú znázornené vyššie, na predchádzajúcom Obr. 20.



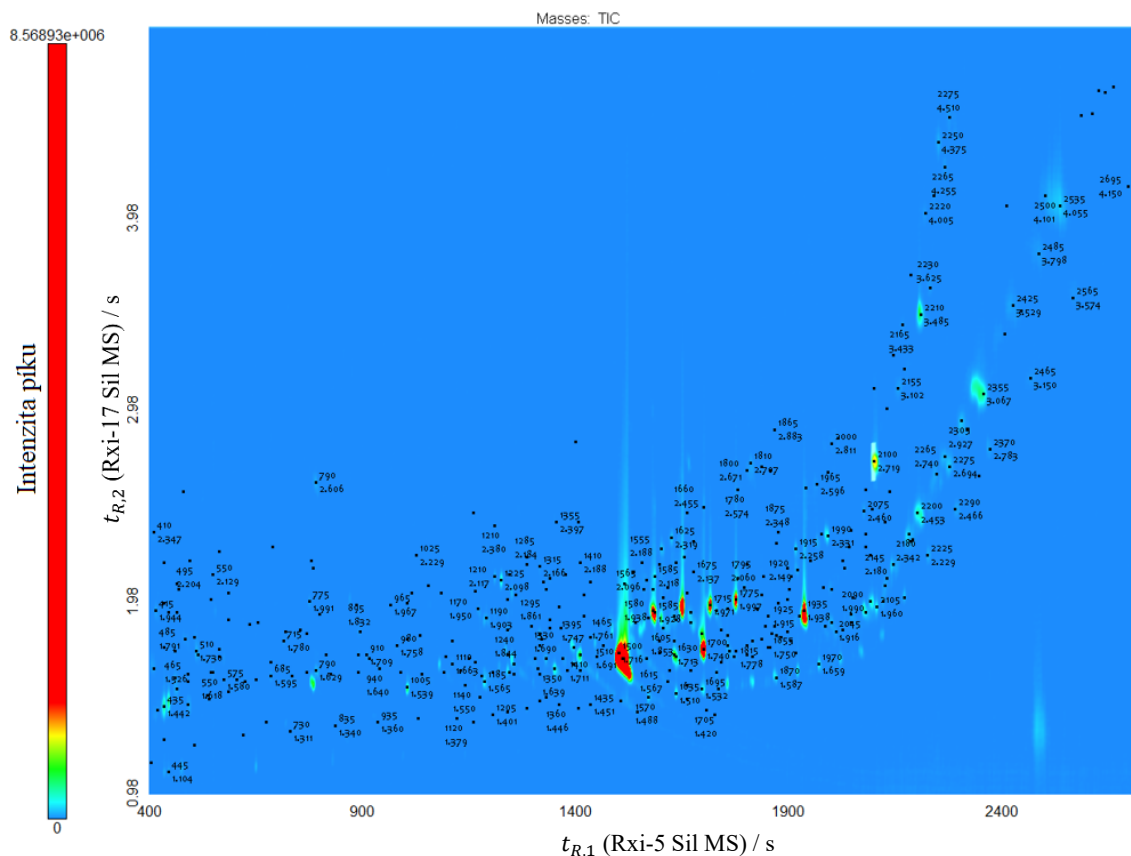
## 5.6 Hlavná štúdia

V prvom rade bola prevedená analýza všetkých 82 kontrolných vzoriek prostredia pre zistenie, ktoré látky zo vzoriek teleného pachu pochádzajú z vatovej tyčinky či prostredia okolo jednotlivcov a nepredstavujú látky tvoriace ich axilárny pach, ktoré boli v štúdiu skúmané. Na Obr. 22 je uvedený nameraný chromatogram kontrolnej vzorky jedného otca z hlavnej štúdie. V kontrolných vzorkách boli okrem vnútorných štandardov nájdené uhľovodíky s dĺžkou reťazca v rozmedzí od C<sub>16</sub> – C<sub>35</sub>, ftaláty, aldehydy, ketóny a ďalšie látky, ktoré sú uvedené v Prílohe 1.



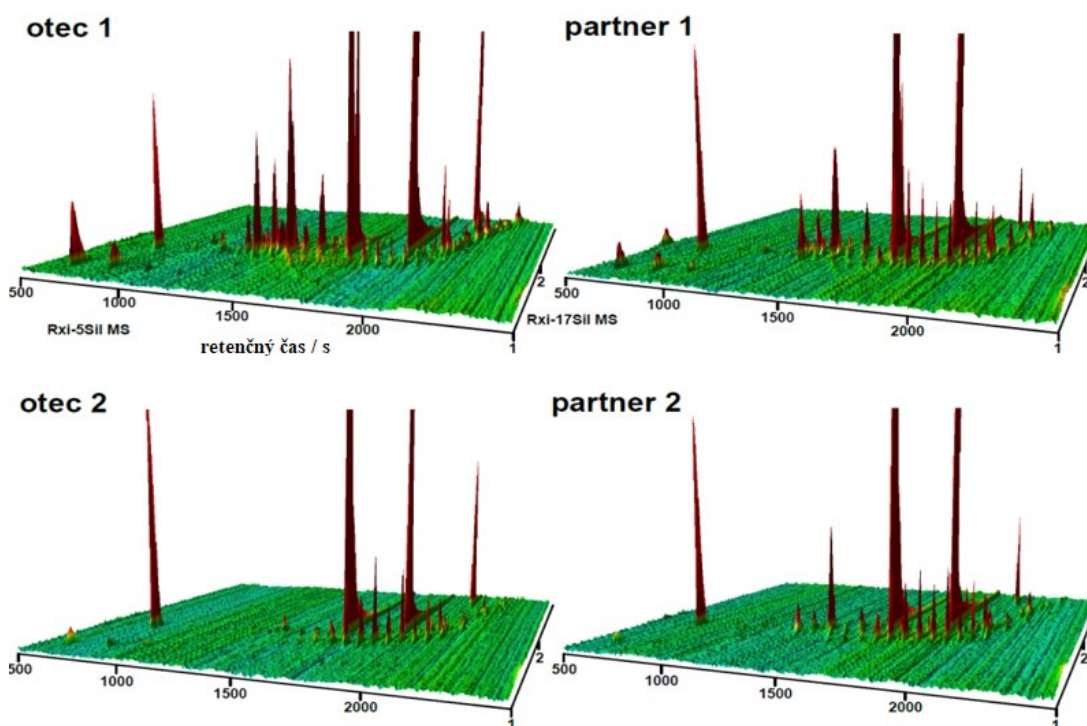
Obr. 22: Chromatogram kontrolnej vzorky prostredia. Retenčné časy sú uvedené v sekundách.

Boli merané vzorky partnerov 41 žien a ich otcov. Z pôvodných analytov, ktorých bolo priemerne 1 500 v jednej vzorke, boli odstránené tie, ktoré nepochádzajú z človeka. Chromatogramy boli spracované softvérom ChromaTOF-Tile® v. 0.27 po zadaní vstupných parametrov zahrňujúcich pomer signálu a šumu ( $S/N = 50$ ),  $F$  pomer (2) a veľkosť dlaždice ( $6\text{ s} \times 10\text{ s}$ ). Týmto bol získaný konečný počet 341 významných analytov hlavnej štúdie, v ktorých sa jednotlivé chromatogramy líšili a tie boli následne štatisticky spracované. Významné analyty sú vyznačených na Obr. 23 spolu s ich príslušnými retenčnými časmi v oboch dimenziách. Z týchto 341 analytov bolo kompletne identifikovaných 120 analytov, zvyšné boli identifikované čiastočne (vid' Príloha 2).



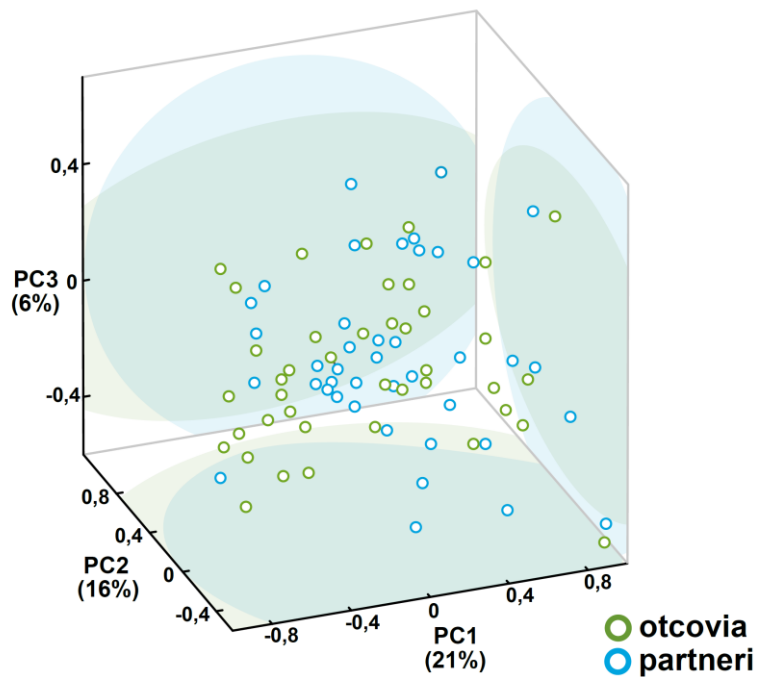
Obr. 23: Analyty spracované softvérom ChromaTOF-Tile® v. 0.27 s ich retenčnými časmi na oboch kolónach. V chromatograme je vyznačených 341 konečných analytov. Naľavo vedľa chromatogramu je farebná škála pre znázornenie intenzity píkov čo predstavuje kvantitatívne zastúpenie príslušných analytov. Najvýraznejším analytom v tomto chromatograme je 1-oktadecanol ( $t_{R,1} = 1510\text{ s}$ ;  $t_{R,2} = 1,69\text{ s}$ ;  $KI = 2108$ ).

Na Obr. 24 sú pre porovnanie zobrazené chromatogramy v 3D zobrazení patriace otcom a partnerom dvoch rôznych žien. Je vidieť, že rôzni ľudia majú už na prvý pohľad rozdielne chromatogramy a líšia sa jak v kvalitatívnom tak v kvantitatívnom zastúpení obsahujúcich látok. Zároveň je vidieť podobnosti chromatogramov mužských vzoriek v rámci otcovsko-partnerských dvojíc.

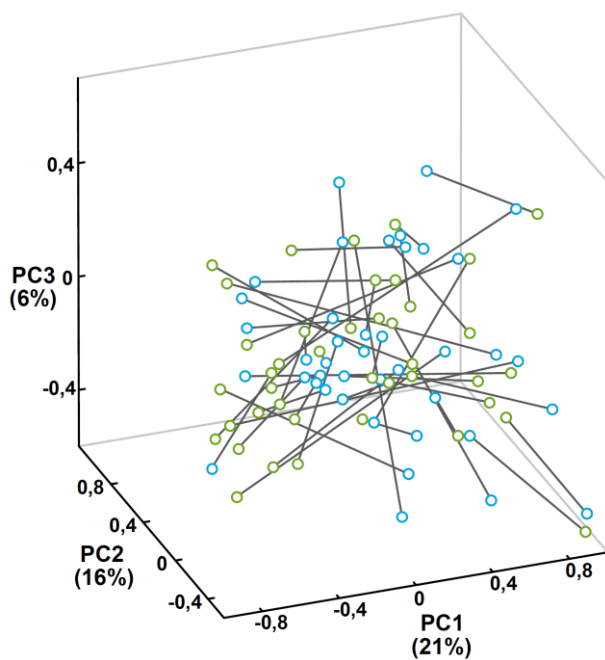


Obr. 24: Štyri chromatogramy v 3D zobrazení patriace dvom otcovsko-partnerským prislúchajúcim dvojiciam. Chromatogramy prislúchajúcich dvojíc otec-partner sú zobrazené v rovnakom riadku.

Bola prevedená PCA analýza pre 82 vzoriek hlavnej štúdie a jej výsledok je na Obr. 25. Pre analýzu boli použité priemerné hodnoty z pravého a ľavého podpazušia všetkých zúčastnených, takže sa pracovalo s 82 hodnotami. Hodnoty boli spriemerované pri štatistickom spracovaní dát v ich relatívnych percentách. Z Obr. 25 je vidieť že otcovia a partneri sa medzi sebou prekrývajú a nezhlukujú sa do skupín. Ďalej je možné počítať Euklidovské vzdialenosti medzi jednotlivými mužmi s pomocou PCA skóre pre prvé tri komponenty (Obr. 26). PCA súradnice jednotlivých ľudí sú uvedené v Prílohe 3.

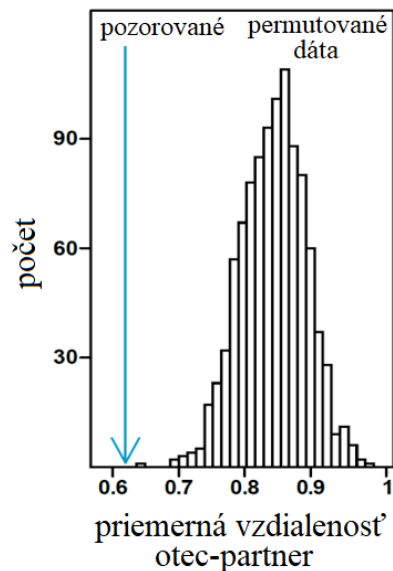


Obr. 25: Výsledok PCA analýzy hlavnej štúdie. Graf zobrazuje tri hlavné komponenty, ktoré pokrývajú 41% variability. Modrou sú vyznačení partneri a zelenou otcovia. Modrá a zelená elipsa znázorňuje rozptyl vzoriek vo všetkých troch osiach, ich 95% konfidenčný interval.



Obr. 26: Výsledok PCA s tromi hlavnými komponentmi hlavnej štúdie. Modrou sú vyznačení partneri a zelenou otcovia. Úsečkou sú pospájané jednotlivé prislúchajúce dvojice otec-partner. Úsečky odpovedajú Euklidovským vzdialenostiam medzi prislúchajúcimi párami.

Z PCA skóre pre prvé tri komponenty (Príloha 3) bola vypočítaná priemerná Euklidovská vzdialenosť medzi príslušnými otcovsko-partnerskými dvojicami odpovedajúca jednotlivým úsečkám na obrázku. Jej hodnota činí 0,64 a je znázornená modrou šípkou na Obr. 27. Boli porovnávané vzdialenosti medzi otcami a k nim príslušnými partnermi s otcami a náhodnými partnermi. Bola prevedená permutácia predstavujúca prepojenie otcov tisíckrát s náhodnými partnermi. Z každej permutácie bola vždy spočítaná priemerná hodnota vzdialeností vzniknutých náhodných dvojíc otec-partner a tieto hodnoty sú vyznačené na Obr. 27. Z tohto obrázku je vidieť, že najčastejšie pozorovaná hodnota priemeru vzdialeností medzi náhodnými párami je 0,85 a to konkrétne stokrát. V žiadnej z permutovaných matíc nebola priemerná vzdialenosť medzi otcom a náhodným partnerom menšia ako pozorovaná priemerná vzdialenosť 0,64 ( $p < 0,001$ ).



Obr. 27: Vypočítané priemerné vzdialenosti medzi otcami a k nim príslušnými partnermi a medzi otcami a náhodnými partnermi. Modrou je vyznačená priemerná hodnota vzdialenosti medzi príslušnými otcovsko-partnerskými dvojicami a činí 0,64. Na ose x je hodnota Euklidovskej vzdialenosti a na ose y je uvedený počet, koľkokrát sa táto vzdialenosť pri permutácii vyskytovala.

## 6 Diskusia

Analýza telesného pachu a jeho spoločenský význam v medziľudskej komunikácii je aktuálnym predmetom štúdia vedcov rôznych odvetví. Najmä pre jeho jedinečnosť je telesný pach dôležitý vo viacerých oblastiach ako kriminalistika, forenzná analýza či medicína. Telesný pach zohráva významnú rolu aj pri výbere partnera ako ukazujú predchádzajúce štúdie, pričom navzdory tomu čo sa prvotne predpokladalo výskumy ukazujú, že máme tendenciu vybrať si partnera, ktorého telesný pach je podobný s pachom nášho rodiča opačného pohlavia.

Podobnosť pachu partnera ženy s pachom jej otca bola skúmaná subjektívne vedcami na Katedre Zoológie Prírodovedeckej fakulty Univerzity Karlovej nezávislými hodnotiteľmi, ktorí priradzovali ku vzorke otcov vždy 4 vzorky partnerov (z toho jeden bol partner dcéry príslušného otca a ostatní boli náhodní partneri) od najpodobnejšej po najmenej podobnú, na základe ich čuchového vnímania [101]. Z toho bolo spočítané percentuálne poradie vzorky prislúchajúceho partnera na prvom (najpodobnejšia), druhom, treťom a štvrtom (najmenej podobná) mieste. Výsledky tejto štúdie ukazujú, že najčastejšie sa vzorka daného partnera vyskytovala na prvom mieste a to konkrétne v 34% čo je viac ako náhoda (25%).

V predkladanej diplomovej práci je táto podobnosť skúmaná objektívne za využitia metódy GC×GC–TOFMS a vyhodnocovaná pomocou štatistického spracovania dát. Participanti hlavnej štúdie boli zaistení Katedrou Zoológie. Uchádzači museli vyplniť vstupný online formulár a následne boli vybraní tí, ktorí vyhovovali stanoveným podmienkam [101]. Po dodržaní dvojdňových obmedzení si účastníci odobrali vzorku telesného pachu z ľavého a pravého podpazušia pomocou sterilných vatových tyčiniek.

V metóde použitej pre meranie jednotlivých vzoriek bola nastavená oneskorená akvizícia, takže vzorky boli merané až po uplynutí doby 400 s od ich nástreku kvôli použitému rozpúšťadlu – *n*-hexánu, ktorý v tejto oblasti poskytoval vysoký a rozmytý pík. Nevýhodou toho je, že analyty ktoré sú podobne prchavé ako *n*-hexán nie je možné pri tejto príprave vzoriek vidieť a detegovať. Hmotnostný detektor je vhodný pre necielenú analýzu, takže aj v tomto prípade, kedy sa vyžadovala informácia týkajúca sa celej

vzorky, nie len jej frakcií. Hmotnostný spektrometer poskytuje informáciu o štruktúre analytu čo je výhodné v tak komplikovanej matrici ako je telesný pach a zároveň dôležité pri konečnej identifikácii jednotlivých analytov. Analyzátor doby letu je síce deštruktívny ale veľmi rýchly, je schopný skenovať až 100 spektier za sekundu a to je výhodou pri meraní vzoriek s takýmto veľkým počtom analytov. Kolóny boli tvorené taveným oxidom kremičitým s rôznymi stacionárnymi fázami znázornenými na Obr. 13 a Obr. 14. Z týchto štruktúr je hneď na prvý pohľad vidieť, že kolóna v druhej dimenzii je polárnejšia kvôli fenylovým zvyškom a analyty sa tu teda delia podľa miery interakcie s touto polárnou fázou, takže podľa ich polaritu. Opačné usporiadanie kolón, čiže najprv polárnejšia a potom nepolárna kolóna, môže byť o niečo účinnejšie a môže viesť k lepšej separácii analytov ich rozmiestnením vo väčšom priestore chromatogramu [102]. Avšak identifikácia by bola omnoho zložitejšia vzhľadom na to, že k tomuto usporiadaniu nie sú v databázach dostupné retenčné indexy na základe ktorých by boli analyty identifikované. Usporiadanie kolón je vždy určené podľa povahy analyzovaného vzorku. Použitie teplotného gradientu (Obr. 15) namiesto izotermického merania malo za následok to, že separácia analytov vo vzorkách prebehla rýchlejšie. Ťažké a málo prchavé analyty sa dostanú zvýšením teploty skôr z kolóny k detektoru a tým je celkový čas jednej analýzy podstatne skrátený a činil 54,75 minút.

V prvom rade bolo potrebné optimalizovať niektoré základné parametre týkajúce sa chromatografických podmienok a parametre pre následné softvérové spracovanie chromatogramov. Najprv bola optimalizovaná doba trvania modulačnej periódy. Ak by bola modulačná perióda príliš krátka, nemuselo by dôjsť k dostatočnej separácii jednotlivých analytov v chromatograme a naopak, ak by modulačná perióda trvala veľmi dlho, niektoré výrazné analyty s vysokým  $m/z$  by z druhej kolóny vyšli až po uplynutí tejto doby a ich retenčné časy v druhej dimenzii by sa zmenili k nižším hodnotám a už by sa nenachádzali na svojom charakteristickom mieste. Z tohto dôvodu by bolo vhodné namiesto konštantnej modulačnej periódy zvoliť jej gradient, ak by to prístrojové vybavenie umožňovalo, takže jej doba by sa s postupným časom zvyšovala. Vzhľadom na tieto poznatky bola zo skúšaných modulačných periód 3 s a 5 s vybratá doba 5 s ako optimálna. Pre LECO ChromaTOF<sup>®</sup> software v. 4.72 bola zisťovaná očakávaná šírka píku analytu. Pri nastavení šírky píkov na malú hodnotu by mohli byť niektoré abundantné analyty softvérom detegované ako dve rôzne zlúčeniny a na druhej strane, ak by bola

nastavená šírka píku príliš veľká, softvér by mohol považovať viaceré rôzne zlúčeniny za jeden výrazný analyt. Preto bola na základe prevedených experimentov nastavená hodnota pre očakávanú šírku píku analytu na 20 s. Pomer signálu a šumu je dôležitým parametrom pre obidva používané softvéry potrebný pre redukciu počtu analytov na tie, ktoré sú relevantné. Ako optimálna bola zvolená hodnota  $S/N = 50$ . Pre spracovanie chromatogramov softvérom ChromaTOF-Tile<sup>®</sup> v. 0.27 bolo potrebné optimalizovať  $F$  pomer pre získanie rozumného konečného počtu relevantných analytov a hľadanie rozdielov medzi jednotlivými vzorkami v porovnaní s referenčnou skupinou. Vhodné nastavenie hodnoty tohto pomeru je tiež potrebné pre kvalitnú separáciu ľudských vzoriek pri PCA. Bol nastavený vstupný parameter  $F$  pomeru na hodnotu 2. Veľkosť dlaždice pre tento softvér je parameter potrebný pre správnu detekciu analytov analogicky ako je vyššie spomínaná šírka píku pre prvý softvér. Ako optimálna veľkosť dlaždice boli nastavené rozmery  $6\text{ s} \times 10\text{ s}$ .

Pri spracovaní chromatogramov pomocou dvoch softvérov sa zdal byť presnejší softvér ChromaTOF-Tile<sup>®</sup> v. 0.27 v porovnaní s LECO ChromaTOF<sup>®</sup> software v. 4.72. Problémovou bola najmä detekcia mastných kyselín a ďalších analytov, ktorých zóny sa veľmi rozmývali a softvér LECO ChromaTOF<sup>®</sup> častokrát detegoval jeden analyt ako viacero rôznych analytov alebo detegoval rozmytý analyt viackrát. V tomto sa zdal byť správnejší druhý softvér, ktorý nedetegoval jeden analyt viackrát. Preto bol pre spracovanie výsledných chromatogramov používaný prevažne ChromaTOF-Tile<sup>®</sup>. Neskôr pri konečnej identifikácii analytov, kde už niektoré informácie z tohto softvéru neboli dostačujúce, boli EI-MS spektrá a retenčné indexy jednotlivých analytov v chromatogramoch porovnávané aj so softvérom LECO ChromaTOF<sup>®</sup>. Keď bolo pri konečnej identifikácii analytu detegovaného viackrát zistené, že sa skutočne jedná o jeden a ten istý analyt, boli zlúčené hodnoty jeho kvantitatívneho zastúpenia vo výslednej tabuľke analytov.

Chemický profil ľudského telesného pachu je zobrazený na Obr. 16 ako príklad získaného chromatogramu jednej skúmanej vzorky. Je vidieť, že látky telesného pachu sú rôznorodé a líšia sa svojou prchavosťou, polaritou a intenzitou v jednotlivých vzorkách. Dvojdimenziálny chromatogram je možné vizualizovať v 3D zobrazení tak, ako je to uvedené na Obr. 17 pre lepšiu prehľadnosť. Namerané neupravené chromatogramy (Obr.



16, Obr. 17) obsahovali rádovo tisíce rôznych analytov. Medzi týmito analytmi sa nachádzali aj také, ktoré netvorí ľudský telesný pach. V prvom rade bolo potrebné tieto analyty pred vyhodnotením výsledkov vylúčiť. Patria tu napríklad analyty vymyté z kolóny, siloxány. Detegované boli siloxány ako tetrametyl cyklooktasiloxán či dekametyl cyklopentasiloxán a mnoho ďalších. Siloxány majú charakteristické EI-MS spektrum s výrazným fragmentačným signálom pri  $m/z = 73$ . Sú málo polárne a vyskytujú sa po celej šírke chromatogramu a v oblastiach nižších retenčných časov druhej dimenzie, pod uhl'ovodíkmi. Z celkovej sady analytov bola ručne vylúčená oblasť, ktorá je zobrazená na Obr. 18 v softvéri LECO ChromaTOF<sup>®</sup> software v. 4.72. a presne vymedzená oblasť tak ako ukazuje Tabuľka 1 pre spracovanie pomocou softvéru ChromaTOF- Tile<sup>®</sup> v. 0.27. V týchto oblastiach sa mohlo nachádzať aj zopár ľudských analytov, napríklad ťažké steroly, ktoré neboli schopné vyjsť z druhej kolóny k detektoru v rámci nastavenej modulačnej periódy (5 s) ale z kolóny vyšli až neskôr, čo mohlo mať za následok zmenu retenčného času v druhej kolóne k nižším hodnotám, do vylúčenej oblasti siloxánov.

Predchádzajúce štúdie telesného pachu ukazujú, že medzi látky, ktoré ho tvoria patria voskové estery, étery, steroly, skvalén, uhl'ovodíky a veľké množstvo rôznych mastných kyselín. Tieto a ďalšie skupiny látok boli nájdené vo všetkých skúmaných vzorkách telesného pachu. Najvýraznejším analytom, ktorý je vidieť na Obr. 19 a zároveň najvýraznejším v asi polovici nameraných chromatogramoch je skvalén ( $t_{R,1} = 1940$  s;  $t_{R,2} = 2,44$  s;  $KI = 2842$ ). V ostatných chromatogramoch predstavuje jeden z najintenzívnejších píkov 1-oktadekanol ( $t_{R,1} = 1510$  s;  $t_{R,2} = 1,69$  s;  $KI = 2108$ ), ktorý je vidieť na Obr. 23. Zo sterolov je najkvantitatívnejším analytom cholesterol ( $t_{R,1} = 2100$  s;  $t_{R,2} = 2,74$  s;  $KI = 3162$ ). Ďalšími výraznými píkmi, ktoré je možné v chromatogramoch vidieť sú vnútorné štandardy, bromnonán ( $t_{R,1} = 780$  s;  $t_{R,2} = 1,58$  s;  $KI = 1248$ ) a bromeikozán ( $t_{R,1} = 1700$  s;  $t_{R,2} = 1,74$  s;  $KI = 2409$ ), ktoré boli pridané ku vzorkám pre kontrolu stability retenčných časov analytov a intenzity ich pík. Kvantitatívnymi píkmi sú taktiež aj niektoré mastné kyseliny, ktoré sa zároveň v chromatogramoch rozmývajú a majú tzv. "chvost" čo občas spôsobovalo problém pri ich detekcii a pri detegovaní analytov, ktoré boli nimi prekryté. Jednotlivé skupiny analytov sa líšia vo svojej prechavosti a polarite, takže majú v chromatogramoch

charakteristické miesta. Oblasti výskytu niektorých charakteristických skupín sú znázornené na Obr. 19. Nerozvetvené nasýtené uhľovodíky sú rozťahnuté po celej šírke chromatogramu a s rastúcim reťazcom majú nižšiu prchavosť. Polárnejšou skupinou oproti týmto uhľovodíkom sú karboxylové kyseliny, obsahujúce funkčnú skupinu – COOH. O niečo ťažšie a menej prchavé sú voskové estery, ktoré obsahujú esterovú skupinu – R – COOR' a sú tvorené masťou kyselinou s dĺžkou reťazca C<sub>12</sub> – C<sub>24</sub> a masťou alkoholom obsahujúcim počet uhlíkov C<sub>24</sub> – C<sub>34</sub>. S vyššími retenčnými časmi v kolóne v druhej dimenzii sú amidy s funkčnou skupinou – R – CONH<sub>2</sub>. Najpolárnejšou a najmenej prchavou skupinou vyznačenou na Obr. 19 sú steroly.

Pre vypracovanie metodiky zahrňujúcej odber vzorky, jej meranie s nastavením vhodných chromatografických podmienok, spracovanie získaných chromatogramov softvérom podľa optimalizovaných vstupných parametrov a štatistické spracovanie výsledných dát s následným prevedením PCA analýzy bola prevedená pilotná štúdia. Pre znázornenie variability vzoriek multiplikátov jedného človeka bol vytvorený Obr. 20. Z chromatogramov na Obr. 20 je vidieť, že jednotlivé triplikáty vzoriek daného účastníka sa líšia v intenzite obsiahnutých analytov čo môže byť dôsledkom rozdielného vzorkovania rôznymi rukami. Chromatogramy ľavého podpazušia vyzerajú byť intenzívnejšie ako pravého čo môže byť výsledkom toho, že jedna ruka je dominantnejšia a vzorkuje sa s ňou podpazušie na opačnej strane ľahšie. Z obrázku je taktiež vidieť, že medzi oboma podpazušiami jedného človeka nie sú významné rozdiely v ich zložení. Po prefiltrovaní analytov nepochádzajúcich z podpazušného potu bola získaná konečná sada 418 látok pilotnej štúdie pre ktoré bola prevedená PCA analýza. Z výsledku PCA analýzy pilotnej štúdie (Obr. 21) je vidieť že jednotliví ľudia sa od seba dostatočne oddelili, takže na základe telesného pachu sme schopní rozlíšiť jednotlivcov použitím vypracovanej metodiky. Ľavé a pravé podpazušia sú v rámci jedinca premiešané, takže sú zameniteľné a neskôr, v hlavnej štúdi, je možné pracovať s ich priemernými hodnotami.

Ešte predtým ako boli merané vzorky účastníkov hlavnej štúdie, boli analyzované kontrolné vzorky prostredia. Tie poskytli jednotliví účastníci okrem vzoriek odobraných z podpazušia, mávaním sterilnou vatovou tyčinkou v prostredí okolo seba. Analyty, ktoré predstavujú kontaminanty z vatovej tyčinky alebo prostredia boli

detegované z kontrolnej vzorky prostredia (Obr. 22) a sú uvedené v Prílohe 1. Extrakcia vatovej tyčinky z prostredia poskytuje kontaminanty ako vyššie uhľovodíky či ftaláty. Pre výsledné chromatogramy by mohla byť lepšou metódou napríklad priama tepelná desorpcia, pretože by pravdepodobne dochádzalo k menšej kontaminácii vzoriek v porovnaní s extrakciou vatovej tyčinky. Pre vzorkovanie bola použitá vatová tyčinka s jej následnou extrakciou, kvôli jednoduchosti odberu vzorky a preto, aby mohli byť vzorky viacnásobne použité ak by to bolo potrebné. Napríklad keď sa vzorku nepodarilo po prvýkrát zmerať, kvôli prasknutiu kolóny, nesprávnemu automatickému nadávkovaniu či z iných technických príčin, bolo možné ju zmerať opätovne.

Následne boli merané vzorky participantov hlavnej štúdie. Zo všetkých poskytnutých vzoriek hlavnej štúdie, ktorých bolo na začiatku 268 (67 prislúchajúcich párov otec-partner) boli pre výsledné spracovanie použité tie, ktoré sa podarilo zmerať na rovnakej kolóne a ktoré boli participantmi správne odobrané, takže chromatogram nebol prázdny ani nijak výrazne kontaminovaný. Týchto konečných vzoriek bolo dokopy 164 (41 prislúchajúcich otcovsko-partnerských dvojíc). Z výslednej tabuľky analytov hlavnej štúdie boli opäť vylúčené zvyšné siloxány, ktoré sa v nej vyskytovali aj po predchádzajúcom vymedzení oblasti, a spolu s nimi aj ďalšie kontaminanty pochádzajúce z vatovej tyčinky či prostredia podľa detegovaných analytov nachádzajúcich sa v Prílohe 1. Po tomto prefiltrovaní analytov z chromatogramov bola získaná výsledná sada 341 analytov, s ktorou sa ďalej pracovalo (Obr. 23). Medzi týmito analytmi sa aj naďalej môžu vyskytovať ďalšie kontaminanty z používanej kozmetiky, oblečenia či potravín. Príkladom je analyt homosalát čo je látka, ktorá je používaná v niektorých v opaľovacích krémoch. Ďalším takýmto analytom je versalid tvoriaci pižmový zápach a nachádzajúci sa v mydlách a ďalšej kozmetike.

Prislúchajúca dvojica otec-partner sa niekedy už na prvý pohľad zdá byť v ich chromatogramoch viac podobná (Obr. 24) v porovnaní s otcom a cudzím partnerom. Otec 1 a partner 1 majú napríklad väčšie zastúpenie vysoko prechavých a menej polárnych analytov na rozdiel od otca 2 a partnera 2, ktorí majú v tejto oblasti chudobnejšie chromatogramy. Keďže na pilotnej štúdii bolo ukázané, že ľavé a pravé podpazušie jedného človeka sú zameniteľné, pri spracovaní výsledkov hlavnej štúdie obsahujúcej 164 vzoriek otcov a partnerov sa pracovalo s ich priemernými hodnotami. Preto je v grafe na

Obr. 25 namiesto 164 bodov znázornených 82 predstavujúcich jednu hodnotu reprezentujúcu obe podpazušia daného človeka. Hodnoty predstavujúce analyty pravého a ľavého podpazušia boli zlúčené pri štatistickom spracovaní výsledkov v relatívnych percentách. Farebné elipsy znázornené na obrázku ukazujú rozptyl vzoriek, ich 95% konfidenčný interval. Ďalej je vidieť, že otcovia a partneri sa prekrývajú a nie je to tak, že by boli otcovia v PCA grafe na jednej strane a partneri na druhej čo by spôsobovalo problém pri meraní vzdialenosti medzi nimi. Konkrétne PCA koordináty jednotlivých participantov sú uvedené v Prílohe 3.

Následne boli porovnávané Euklidovské vzdialenosti medzi otcami a partnermi. Tie, ktoré predstavujú vzdialenosť medzi otcom a partnerom jednej ženy sú znázornené na Obr. 26. Sú to teda prislúchajúce otcovsko-partnerské dvojice. Z týchto vzdialeností znázornených úsečkami na obrázku bola vypočítaná ich priemerná hodnota, ktorá činila 0,64 a je znázornená modrou šípkou ako pozorovaná hodnota na Obr. 27. Po prevedení permutácie, teda priradení tisíckrát náhodných partnerov k otcom, bol vždy spočítaný priemer Euklidovských vzdialeností medzi vzniknutými náhodnými otcovsko-partnerskými dvojicami a najčastejšia bola vzdialenosť 0,85. Táto vzdialenosť bola pozorovaná konkrétne stokrát. Všetky vzdialenosti medzi náhodnými otcovsko-partnerskými párami sú zobrazené v grafe na Obr. 27 ako permutované dáta. Tento obrázok ukazuje, že ani v jednom prípade nebola Euklidovská vzdialenosť medzi náhodne vzniknutou dvojicou otec-partner menšia ako vzdialenosť prislúchajúcich otcovsko-partnerských dvojíc. Z toho vyplýva, že partner a otec jednej ženy sú si najviac podobní v ich telesnom pachu v porovnaní s otcom a partnerom rôznych žien.

V budúcich štúdiách by mohli byť analyzované vzorky žien. Následne by mohla byť analogicky porovnávaná podobnosť telesného pachu odobraného z podpazušia partneriek mužov a ich matiek.

## 7 Záver

Táto diplomová práca sa zaoberá štúdiom ľudského telesného pachu a bol v nej analyzovaný telesný pach dospelých mužov.

Pri optimalizácii vstupných parametrov potrebných pre softvérové spracovanie chromatogramov bola zvolená modulačná perióda 5 s ako najvhodnejšia. Očakávaná šírka píku analytu pre softvér LECO ChromaTOF<sup>®</sup> software v. 4.72 bola nastavená na hodnotu 20 s. Ako optimálny pomer signálu a šumu pre obidva softvéry bola zvolená hodnota  $S/N = 50$ . Pre spracovanie softvérom ChromaTOF-Tile<sup>®</sup> v. 0.27 bol nastavený vstupný parameter  $F$  pomer na hodnotu 2 a optimálna veľkosť dlaždice  $6\text{ s} \times 10\text{ s}$ .

Bola prevedená pilotná štúdia, ktorej sa zúčastnilo 6 mužov vo veku od 18 – 40 rokov. Na nej bola vypracovaná metodika od odberu vzorky, cez samotné meranie použitím GC×GC–TOFMS až po spracovanie a vyhodnotenie výsledkov za použitia štatistickej metódy PCA. Výsledky pilotnej štúdie ukázali, že sme schopní od seba dostatočne rozlíšiť jednotlivých ľudí na základe ich telesného pachu odobraného z podpazušia.

Hlavným cieľom tejto diplomovej práce bolo analyzovať pachové vzorky otcov a partnerov a vyhodnotiť ich podobnosť medzi sebou. V rámci hlavnej štúdie bola prevedená kvalitatívna a kvantitatívna analýza vzoriek telesného pachu 41 otcovsko-partnerských dvojíc. Výsledky hlavnej štúdie ukázali, že rozdiely medzi pachom otca a partnera jednej ženy sú menšie v porovnaní s rozdielmi medzi pachom otca a náhodným partnerom. Telesný pach otca sa teda viac podobá pachu partnera jeho dcéry než s pachu náhodne vybraného partnera. Výsledky teda naznačujú, že žena si vyberá partnera s podobným telesným pachom k jej otcovi.

## 8 Literatúra

- [1] Mucignat-Caretta, C.: Central Processing of Intraspecific Chemical Signals in Mice. In: *Neurobiology of Chemical Communication*. Boca Raton: CRC Press, 2014, p. 325-345.
- [2] Kadohisa, M.: Effects of odor on emotion, with implications. *Frontiers in Systems Neuroscience* **7**:66, 1-6 (2013).
- [3] Havlicek, J.; Saxton, T. K.; Roberts, S. C.; Jozifkova, E.; Lhota, S.; Valentova, J.; Flegr, J.: He sees, she smells? Male and female reports of sensory reliance in mate choice and non-mate choice contexts. *Personality and Individual Differences* **45**:6, 565-570 (2008).
- [4] Allen, C.; Havlíček, J.; Williams, K.; Roberts, S. C.: Evidence for odour-mediated assortative mating in humans: The impact of hormonal contraception and artificial fragrances. *Physiology & Behavior* **210**:112541 (2019).
- [5] de la Mata, A. P.; McQueen, R. H.; Nam, S. L.; Harynuk, J. J.: Comprehensive two-dimensional gas chromatographic profiling and chemometric interpretation of the volatile profiles of sweat in knit fabrics. *Analytical and bioanalytical chemistry* **409**:7, 1905-1913 (2017).
- [6] Sell, C. S.: *Chemistry and the Sense of Smell*. Hoboken, John Wiley & Sons 2014.
- [7] Selene, C. H.; Chou, J.: Hydrogen sulfide: human health aspects. *World Health Organization* **53**, 2003.
- [8] Schiffman, S. S.: Smell and Taste. In: *Encyclopedia of Gerontology*. 2nd ed. J.E. Birren (Ed.). New York: Elsevier, 2007, p. 515-525.
- [9] Doty, R.; Kamath, V.: The influences of age on olfaction: a review. *Frontiers in Psychology* **5**:20, 1-20 (2014).
- [10] Kindersley, D.: *The Olfactory System and Your Sense of Smell*. Dostupné z URL: < <https://www.thoughtco.com/olfactory-system-4066176> > [cit. 20.4.2021]
- [11] Buettner A.: *Springer Handbook of Odor*. Cham, Springer 2017.
- [12] Javorka, K.: *Lekárska fyziológia: učebnica pre lekárske fakulty*. Martin, Osveta 2001.
- [13] Moran, D. T.; Rowley, J. C.; Jafek, B. W.; Lovell, M. A.: The fine structure of the olfactory mucosa in man. *Journal of Neurocytology* **11**:5, 721-746 (1982).

- [14] Figueres-Oñate, M.; Gutiérrez, Y.; López-Mascaraque, L.: Unraveling Cajal's view of the olfactory system. *Frontiers in Neuroanatomy* **8**:55, 1-12 (2014).
- [15] Encyclopædia Britannica: *Olfactory epithelium*. Dostupné z URL: <<https://www.britannica.com/science/chemoreception/Smell>> [cit. 23.4.2021]
- [16] Mammoth memory: *Olfactory bulb*. Dostupné z URL: <<https://mammothmemory.net/biology/coordination-and-response/sensory-receptors/olfactory-bulb.html>> [cit. 23.4.2021]
- [17] Peier, A. M.; Moqrich, A.; Hergarden, A. C.; Reeve, A. J.; Andersson, D. A.; Story, G. M.; Earley, T. J.; Dragoni, I.; McIntyre, P.; Bevan, S., et al.: A TRP Channel that Senses Cold Stimuli and Menthol. *Cell* **108**:5, 705-715 (2002).
- [18] Renner, B.; Schreiber, K.: Olfactory and trigeminal interaction of menthol and nicotine in humans. *Experimental Brain Research* **219**:1, 13-26 (2012).
- [19] Malnic, B.; Hirono, J.; Sato, T.; Buck, L. B.: Combinatorial Receptor Codes for Odors. *Cell* **96**:5, 713-723 (1999).
- [20] Breer, H.: Sense of smell: recognition and transduction of olfactory signals. *Biochemical Society Transactions* **31**:1, 113-116 (2003).
- [21] Saive, A.-L.; Royet, J.-P.; Plailly, J.: A review on the neural bases of episodic odor memory: from laboratory-based to autobiographical approaches. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* **8**:240, 1-13 (2014).
- [22] Hinton, P. B.; Henley, T. B.: Cognitive and affective components of stimuli presented in three modes. *Bulletin of the Psychonomic Society* **31**:6, 595-598 (1993).
- [23] Chu, S.; Downes, J. J.: Proust nose best: Odors are better cues of autobiographical memory. *Memory & cognition* **30**:4, 511-518 (2002).
- [24] Herz, R.; Schooler, J.: A naturalistic study of autobiographical and visual evoked by olfactory memories the Proustian cues: testing hypothesis. *American Journal of Psychology* **115**:1, 21-32 (2002).
- [25] Larsson, M.; Willander, J.: Autobiographical odor memory. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1170**:1, 318-323 (2009).
- [26] Murphy, C.; Schubert, C. R.; Cruickshanks, K. J.; Klein, B. E. K.; Klein, R.; Nondahl, D. M.: Prevalence of olfactory impairment in older adults. *The Journal of the American Medical Association* **288**:18, 2307-2312 (2002).

- [27] Doty, R. L.; Shaman, P.; Applebaum, S. L.; Giberson, R.; Siksorski, L.; Rosenberg, L.: Smell identification ability: changes with age. *Science* **226**:4681, 1441-1443 (1984).
- [28] Duffy, V. B.; Backstrand, J. R.; Ferris, A. M.: Olfactory dysfunction and related nutritional risk in free-living, elderly women. *Journal of the American Dietetic Association* **95**:8, 879-884 (1995).
- [29] Santos, D. V.; Reiter, E. R.; DiNardo, L. J.; Costanzo, R. M.: Hazardous events associated with impaired olfactory function. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery* **130**:3, 317-319 (2004).
- [30] Lundström, J. N.; Olsson, M. J.: Functional neuronal processing of human body odors. *Vitamins & Hormones* **83**, 1-23 (2010).
- [31] Jha, S. K.: Characterization of human body odor and identification of aldehydes using chemical sensor. *Reviews in Analytical Chemistry* **36**:2, 1-16 (2016).
- [32] Mayo Foundation for Medical Education and Research: *Sweat glands*. Dostupné z URL:  
<<https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/hyperhidrosis/multimedia/sweat-glands/img-20007980>> [cit. 25.4.2021]
- [33] Haze, S.; Gozu, Y.; Nakamura, S.; Kohno, Y.; Sawano, K.; Ohta, H.; Yamazaki, K.: 2-Nonenal newly found in human body odor tends to increase with aging. *Journal of Investigative Dermatology* **116**:4, 520-524 (2001).
- [34] Penn, D. J.; Oberzaucher, E.; Grammer, K.; Fischer, G.; Soini, H. A.; Wiesler, D.; Novotny, M. V.; Dixon, S. J.; Xu, Y.; Brereton, R. G.: Individual and gender fingerprints in human body odour. *Journal of the Royal Society Interface* **4**:13, 331-340 (2007).
- [35] Prokop-Prigge, K. A.; Greene, K.; Varallo, L.; Wysocki, C. J.; Preti, G.: The effect of ethnicity on human axillary odorant production. *Journal of Chemical Ecology* **42**:1, 33-39 (2016).
- [36] Thorn, R. M. S.; Greenman, J.: Microbial volatile compounds in health and disease conditions. *Journal of Breath Research* **6**:2, 1-25 (2012).
- [37] Gildersleeve, K. A.; Fales, M. R.; Haselton, M. G.: Women's evaluations of other women's natural body odor depend on target's fertility status. *Evolution and Human Behavior* **38**:2, 155-163 (2017).



- [38] Preti, G.; Leyden, J. J.: Genetic influences on human body odor: from genes to the axillae. *Journal of Investigative Dermatology* **130**:2, 344-346 (2010).
- [39] Fialová, J.; Roberts, S. C.; Havlíček, J.: Consumption of garlic positively affects hedonic perception of axillary body odour. *Appetite* **97**, 8-15 (2016).
- [40] Davies, M.; Barash, O.; Jeries, R.; Peled, N.; Ilouze, M.; Hyde, R.; Marcus, M.; Field, J.; Haick, H.: Unique volatolomic signatures of TP53 and KRAS in lung cells. *British Journal of Cancer* **111**:6, 1213-1221 (2014).
- [41] Broza, Y. Y.; Mochalski, P.; Ruzsanyi, V.; Amann, A.; Haick, H.: Hybrid volatolomics and disease detection. *Angewandte Chemie International Edition* **54**:38, 11036-11048 (2015).
- [42] Havlíček, J.; Lenochová, P.: The effect of meat consumption on body odor attractiveness. *Chemical Senses* **31**:8, 747-752 (2006).
- [43] Zuniga, A.; Stevenson, R. J.; Mahmut, M. K.; Stephen, I. D.: Diet quality and the attractiveness of male body odor. *Evolution and Human Behavior* **38**:1, 136-143 (2017).
- [44] Curran, A. M.; Rabin, S. I.; Furton, K. G.: Analysis of the uniqueness and persistence of human scent. *Forensic Science Communications* **7**:2 (2005).
- [45] de Lacy Costello, B.; Amann, A.; Al-Kateb, H.; Flynn, C.; Filipiak, W.; Khalid, T.; Osborne, D.; Ratcliffe, N. M.: A review of the volatiles from the healthy human body. *Journal of Breath Research* **8**:1, 1-29 (2014).
- [46] Shelley, W. B.; Hurley, H. J.; Nichols, A. C.: Axillary odor: experimental study of the role of bacteria, apocrine sweat, and deodorants. *Ama Archives of Dermatology and Syphilology* **68**:4, 430-446 (1953).
- [47] Martin, A.; Saathoff, M.; Kuhn, F.; Max, H.; Terstegen, L.; Natsch, A.: A functional ABCC11 allele is essential in the biochemical formation of human axillary odor. *Journal of Investigative Dermatology* **130**:2, 529-540 (2010).
- [48] Yoshiura, K.; Kinoshita, A.; Ishida, T.; Ninokata, A.; Ishikawa, T.; Kaname, T.; Bannai, M.; Tokunaga, K.; Sonoda, S.; Komaki, R.: A SNP in the ABCC11 gene is the determinant of human earwax type. *Nature Genetics* **38**:3, 324-330 (2006).
- [49] Nakano, M.; Miwa, N.; Hirano, A.; Yoshiura, K.-i.; Niikawa, N.: A strong association of axillary osmidrosis with the wet earwax type determined by genotyping of the ABCC11 gene. *BMC Genetics* **10**:1, 1-5 (2009).

- [50] Rodriguez, S.; Steer, C. D.; Farrow, A.; Golding, J.; Day, I. N.: Dependence of deodorant usage on ABCC11 genotype: scope for personalized genetics in personal hygiene. *Journal of Investigative Dermatology* **133**:7, 1760-1767 (2013).
- [51] Mackenna, R. B.; Wheatley, V.; Wormall, A.: The composition of the surface skin fat ('sebum') from the human forearm. *Journal of Investigative Dermatology* **15**:1, 33-47 (1950).
- [52] Chi, Y. S.; Obendorf, S. K.: Aging of oily soils on textile materials: A literature review. *Journal of Surfactants and Detergents* **1**:3, 407-418 (1998).
- [53] Albone, E. S.: *Mammalian semiochemistry: The investigation of chemical signals between mammals*. Chichester, John Wiley & Sons 1984.
- [54] Nicolaidis, N.: Skin lipids: their biochemical uniqueness. *Science* **186**:4158, 19-26 (1974).
- [55] Munk, S.; Münch, P.; Stahnke, L.; Adler-Nissen, J.; Schieberle, P.: Primary odorants of laundry soiled with sweat/sebum: Influence of lipase on the odor profile. *Journal of Surfactants and Detergents* **3**:4, 505-515 (2000).
- [56] Zeng, X. N.; Leyden, J. J.; Lawley, H. J.; Sawano, K.; Nohara, I.; Preti, G.: Analysis of characteristic odors from human male axillae. *Journal of Chemical Ecology* **17**:7, 1469-1492 (1991).
- [57] Bird, S.; Gower, D.: The validation and use of a radioimmunoassay for 5 $\alpha$ -androst-16-en-3-one in human axillary collections. *Journal of Steroid Biochemistry* **14**:2, 213-219 (1981).
- [58] Natsch, A.; Schmid, J.; Flachsmann, F.: Identification of Odoriferous Sulfanylalkanols in Human Axilla Secretions and Their Formation through Cleavage of Cysteine Precursors by a C-S Lyase Isolated from Axilla bacteria. *Chemistry & Biodiversity* **1**:7, 1058-1072 (2004).
- [59] Spielman, A.; Zeng, X.; Leyden, J.; Preti, G.: Proteinaceous precursors of human axillary odor: isolation of two novel odor-binding proteins. *Experientia* **51**:1, 40-47 (1995).
- [60] Zeng, X.-N.; Leyden, J. J.; Spielman, A. I.; Preti, G.: Analysis of characteristic human female axillary odors: qualitative comparison to males. *Journal of Chemical Ecology* **22**:2, 237-257 (1996).

- [61] Zeng, C.; Spielman, A. I.; Vowels, B. R.; Leyden, J. J.; Biemann, K.; Preti, G.: A human axillary odorant is carried by apolipoprotein D. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**:13, 6626-6630 (1996).
- [62] Penn, D.; Potts, W. K.: Chemical signals and parasite-mediated sexual selection. *Trends in Ecology & Evolution* **13**:10, 391-396 (1998).
- [63] Shirasu, M.; Touhara, K.: The scent of disease: volatile organic compounds of the human body related to disease and disorder. *The Journal of Biochemistry* **150**:3, 257-266 (2011).
- [64] Vas, G.; Vékey, K.: Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal of Mass Spectrometry* **39**:3, 233-254 (2004).
- [65] Havlíček, J.; Dvořáková, R.; Bartoš, L.; Flegr, J.: Non-advertized does not mean concealed: body odour changes across the human menstrual cycle. *Ethology* **112**:1, 81-90 (2006).
- [66] Kohoutová, D.; Rubešová, A.; Havlíček, J.: Shaving of axillary hair has only a transient effect on perceived body odor pleasantness. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **66**:4, 569-581 (2012).
- [67] Shehadeh, N. H.; Kligman, A. M.: The effect of topical antibacterial agents on the bacterial flora of the axilla. *Journal of Investigative Dermatology* **40**:1, 61-71 (1963).
- [68] Dravnieks, A.; Krotoszynski, B.: Influence of an Antibacterial Soap on Various Effluents from Axillae. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* **19**:9, 611- 626 (1968).
- [69] Dravnieks, A.: Evaluation of Human Body Odors: Methods and Interpretations. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* **26**:11, 551-571 (1975).
- [70] Brooksbank, B.; Brown, R.; Gustafsson, J. A.: The detection of 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol in human male axillary sweat. *Experientia* **30**:8, 864-865 (1974).
- [71] Claus, R.; Alsing, W.: Occurrence of 5 $\alpha$ -androst-16-en-3-one, a boar pheromone, in man and its relationship to testosterone. *Journal of Endocrinology* **68**:3, 483-484 (1976).

- [72] Havlicek, J.; Roberts, S. C.; Flegr, J.: Women's preference for dominant male odour: effects of menstrual cycle and relationship status. *Biology Letters* **1**:3, 256-259 (2005).
- [73] Roberts, S. C.; Gosling, L. M.; Spector, T. D.; Miller, P.; Penn, D. J.; Petrie, M.: Body odor similarity in noncohabiting twins. *Chemical Senses* **30**:8, 651-656 (2005).
- [74] Labows, J.: Human odors: what can they tell us. *Perfumer & Flavorist* **4**:4, 12-17 (1979).
- [75] Arthur, C. L.; Pawliszyn, J.: Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry* **62**:19, 2145-2148 (1990).
- [76] Soini, H. A.; Bruce, K. E.; Klouckova, I.; Brereton, R. G.; Penn, D. J.; Novotny, M. V.: In situ surface sampling of biological objects and preconcentration of their volatiles for chromatographic analysis. *Analytical Chemistry* **78**:20, 7161-7168 (2006).
- [77] Platek, S. M.; Burch, R. L.; Gallup, G. G.: Sex differences in olfactory self-recognition. *Physiology & Behavior* **73**:4, 635-640 (2001).
- [78] Mallet, P.; Schaal, B.: Rating and recognition of peers' personal odors by 9-year-old children: an exploratory study. *The Journal of General Psychology* **125**:1, 47-64 (1998).
- [79] Schleidt, M.; Hold, B.; Attili, G.: A cross-cultural study on the attitude towards personal odors. *Journal of Chemical Ecology* **7**:1, 19-31 (1981).
- [80] Lenochová, P.; Roberts, S. C.; Havlíček, J.: Methods of Human Body Odor Sampling: The Effect of Freezing. *Chemical Senses* **34**:2, 127-138 (2008).
- [81] Folstein, M. F.; Luria, R.: Reliability, validity, and clinical application of the visual analogue mood scale. *Psychological Medicine* **3**:4, 479-486 (1973).
- [82] Conti, C.; Guarino, M.; Bacenetti, J.: Measurements techniques and models to assess odor annoyance: A review. *Environment international* **134**:105261, 1-16 (2020).
- [83] Li, S.: *Overview of odor detection instrumentation and the potential for human odor detection in air matrices*. Dostupné z URL: <[https://www.mitre.org/sites/default/files/pdf/09\\_4536.pdf](https://www.mitre.org/sites/default/files/pdf/09_4536.pdf)> [cit. 27.4.2021]

- [84] Wongchoosuk, C.; Lutz, M.; Kerdcharoen, T.: Detection and classification of human body odor using an electronic nose. *Sensors* **9**:9, 7234-7249 (2009).
- [85] Bernier, U. R.; Booth, M. M.; Yost, R. A.: Analysis of Human Skin Emanations by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 1. Thermal Desorption of Attractants for the Yellow Fever Mosquito (*Aedes aegypti*) from Handled Glass Beads. *Analytical Chemistry* **71**:1, 1-7 (1999).
- [86] James, A. T.; Martin, A. J. P.: Gas-liquid partition chromatography: the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid. *Biochemical Journal* **50**:5, 679-690 (1952).
- [87] Smolková-Keulemansová, E.: A Few Milestones on the Journey of Chromatography. *Journal of High Resolution Chromatography* **23**:7-8, 497-501 (2000).
- [88] Wikipedia: *Schéma plynového chromatografu*. Dostupné z URL: <<https://sk.wikipedia.org/wiki/S%C3%BAbor:SchemaGC.png>> [cit. 10.5.2021]
- [89] Bartle, K. D.; Myers, P.: History of gas chromatography. *Trends in Analytical Chemistry* **21**:9, 547-557 (2002).
- [90] Gross, J. H.: *Mass spectrometry: A textbook*. 3rd ed. Cham, Springer 2006.
- [91] Millar, J. G.; Haynes, K.: *Methods in chemical ecology*. New York, Springer 1998.
- [92] Mark, T.: Fundamental aspects of electron impact ionization. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics* **45**, 125-145 (1982).
- [93] Edwards, M.; Mostafa, A.; Górecki, T.: Modulation in comprehensive two-dimensional gas chromatography: 20 years of innovation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **401**:8, 2335-2349 (2011).
- [94] Liu, Z.; Phillips, J. B.: Comprehensive two-dimensional gas chromatography using an on-column thermal modulator interface. *Journal of Chromatographic Science* **29**:6, 227-231 (1991).
- [95] Libardoni, M.: Utilizing GCxGC for Advanced Analytical Analysis of Volatile and Semi-Volatile Organic Compounds. *Volatile Analysis Corporation*, 1-11 (2010).

- [96] Mostafa, A.; Edwards, M.; Górecki, T.: Optimization aspects of comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **1255**, 38-55 (2012).
- [97] Kopperi, M.: *Dissertation*. Applicability of comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry to environmental non-target screening: Special emphasis on wastewater. Faculty of Science, University of Helsinki, Helsinki 2016.
- [98] da Silva Maciel, G. P.; da Silva, J. M.; Bispo, M. D.; Krause, L. C.; Jacques, R. A.; Zini, C. A.; Caramão, E. B.: Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography and Its Application to the Investigation of Pyrolytic Liquids. In: *Pyrolysis*. M. Samer (Ed.) London: IntechOpen, 2017, p. 89-125.
- [99] Kovats, E. S.: Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. *Advances in Chromatography*. **1**, 229-247 (1965).
- [100] Khorasheh, F.; Gray, M. R.; Selucky, M. L.: Correlation for Kovats retention index of C<sub>9</sub>–C<sub>26</sub> mono-alkyl and polymethyl alkanes and alkenes. *Journal of Chromatography A* **481**, 1-16 (1989).
- [101] Kuncová, L.: *Diplomová práce*. Výběr partnera na základě čichového imprinting- like efektu. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha 2018.
- [102] Dimandja, J.-M. D.; Clouden, G. C.; Colón, I.; Focant, J.-F.; Cabey, W. V.; Parry, R. C.: Standardized test mixture for the characterization of comprehensive two-dimensional gas chromatography columns: the Phillips mix. *Journal of Chromatography A* **1019**:1-2, 261-272 (2003).

# Prílohy

## Príloha 1 – Tabuľka analytov kontrolných vzoriek

Tabuľka 1: Analyty, ktoré boli nájdené v kontrolných vzorkách prostredia. Symbol  $t_{R,1}$  značí retenčný čas analytu v prvej, nepolárnej kolóne a  $t_{R,2}$  v semi-polárnej kolóne. Keďže sa jedná o dvojdimenzionálne chromatogramy, kvantitatívne zastúpenia analytov sú vyjadrené pomocou objemov ich pík a pre ich výpočet boli potrebné kvantifikačné hmoty uvedené v tabuľke.

Č.	Zlúčenina	$t_{R,1}$ / s	$t_{R,2}$ / s	Hmota	Objem
1	3-metyl-2-heptanón	405	1,32	43	87 061
2	neznáma	410	1,55	43	25 189
3	neznáma	440	1,37	43	181 995
4	vinyl butanoát	450	1,69	43	11 480
5	metyl 2-metylcyklopropyl ketón	455	1,51	43	126 256
6	dipropylénglykol metyl éter	495	1,55	59	14 195
7	neznáma	510	1,56	59	87 697
8	neznáma	645	1,52	43	9 306
9	1-brómnonán*	775	1,51	137	202 632
10	neznáma	850	1,27	57	7 815
11	triacetín	860	1,98	43	66 825
12	neznáma	925	1,30	57	4 680
13	neznáma	1015	2,18	99	11 682
14	neznáma	1070	2,24	99	5 653
15	1-izopropyl-2,2-dimetyltrimetyléndiizobutyrát	1100	1,62	71	14 460
16	neznáma	1110	1,33	57	6 183
17	neznáma	1150	1,32	57	4 334
18	neznáma	1195	1,34	57	11 783
19	neznáma	1230	1,34	57	10 911
20	neofytadién	1305	1,41	68	3 244
21	hexahydrofarnesyl acetón	1310	1,54	43	7 511
22	dipropylftalát	1330	2,06	149	13 548
23	7,9-di-terc-butyl-1-oxaspiro(4,5)deka-6,9-dién-2,8-dión	1365	2,09	57	9 271
24	neznáma	1385	1,37	57	3 197
25	dibutylftalát	1400	2,14	149	12 836
26	1-nonadecén	1420	1,42	55	27 555
27	eikozán	1425	1,39	57	6 747
28	neznáma	1430	1,43	55	4 589
29	neznáma	1440	1,44	55	4 324
30	heneikozán	1495	1,41	57	4 469
31	neznáma	1505	1,99	85	9 695
32	dokozán	1560	1,43	57	16 778
33	neznáma	1580	1,64	57	3 892
34	trikozán	1625	1,45	57	27 799
35	neznáma	1625	1,59	57	131 969
36	neznáma	1645	2,00	85	4 053
37	neznáma	1665	1,86	99	22 077
38	bromeikozán*	1685	1,67	135	1 019 880
39	bis(2-etylhexyl)ester kyseliny hexándiovej	1685	1,75	129	610 999
40	tetrakozán	1690	1,46	57	80 693
41	neznáma	1725	1,46	57	11 552
42	pentakozán	1745	1,48	57	240 547
43	neznáma	1745	1,62	70	3 534
44	neznáma	1755	1,74	57	12 363
45	neznáma	1770	1,48	57	9 221
46	diisooktylftalát	1770	2,07	149	22 242
47	neznáma	1780	1,49	57	29 176
48	hexakozán	1805	1,51	57	324 326
49	neznáma	1805	1,72	137	2 473
50	neznáma	1820	1,49	57	10 726
51	neznáma	1840	1,50	57	37 117
52	neznáma	1855	1,62	68	2 387
53	heptakozán	1860	1,53	57	348 776
54	neznáma	1860	1,66	82	3 048
55	neznáma	1875	1,51	57	5 121

56	neznáma	1890	1,53	57	41 905
57	oktakožán	1910	1,56	57	283 654
58	neznáma	1910	1,65	68	3 005
59	neznáma	1915	1,68	82	4 511
60	neznáma	1945	1,56	57	34 709
61	nonakožán	1960	1,59	57	262 305
62	neznáma	1960	1,69	68	3 675
63	neznáma	1970	1,70	82	5 282
64	neznáma	1980	1,67	83	4 320
65	neznáma	1990	1,60	57	34 536
66	triakontán	2010	1,62	57	180 080
67	neznáma	2020	1,75	82	6 757
68	neznáma	2035	1,84	57	10 536
69	neznáma	2040	1,63	57	23 131
70	hentriakontán	2060	1,66	57	155 261
71	neznáma	2070	1,79	82	4 050
72	neznáma	2075	1,88	59	5 881
73	neznáma	2085	1,68	57	21 086
74	dotriakontán	2105	1,74	57	95 135
75	neznáma	2135	1,82	57	13 020
76	tritriakontán	2155	1,90	57	65 195
77	tetratriakontán	2215	2,11	57	37 272
78	neznáma	2235	4,20	55	15 809
79	neznáma	2250	4,07	43	8 745
80	pentatriakontán	2275	2,34	57	21 877

*\*vnútorný štandard*



## Príloha 2 – Tabuľka identifikovaných významných analytov hlavnej štúdie

Tabuľka 2: Významné analyty hlavnej štúdie, ktoré boli identifikované. Symbol  $t_{R,1}$  značí retenčný čas analytu v prvej, nepolárnej kolóne a  $t_{R,2}$  v semi-polárnej kolóne.  $F$  predstavuje hodnotu  $F$  pomeru a  $M_w$  molekulovú hmotnosť zlúčenín. ADBE a KAPO sú skratky dvoch skupín participantov; skratka OL znamená ľavé podpazušie otca a PL ľavé podpazušie partnera. ADBE-OL a ADBE-PL predstavujú takisto ako aj KAPO-OL a KAPO-PL prislúchajúcu otcovsko-partnerskú dvojicu. Kvantitatívne zastúpenie analytov vo vzorkách je vyjadrené objemami píkov jednotlivých analytov. Hmota uvádza kvantifikačnú hmotu fragmentu, ktorá bola použitá pre výpočet kvantitatívneho zastúpenia analytov.

Č.	Zlúčenina	Skupina	$t_{R,1}$ / s	$t_{R,2}$ / s	$KI$	$F$	$M_w$	Hmota	ADBE-OL	ADBE-PL	KAPO-OL	KAPO-PL
1	nonán	uhľovodík	410	1,15	<b>917,4</b>	6249,5	–	85	50,24	46,55	35,25	131,0
2	2(5H)-furanón	laktón	410	2,35	<b>918,4</b>	6,5	84	39	1031	120,6	37,10	4612
3	2,5-hexándión	ketón	415	1,96	<b>922,4</b>	93,1	114	42	1053	1176	966,4	696,2
4	1-metylylbenzén	arén	420	1,45	<b>926,3</b>	189,9	120	77	583,8	647,3	637,6	480,7
5	$\alpha$ -pinén	terpén	435	1,29	<b>939,2</b>	466,9	136	93	195,4	227,4	285,9	245,6
6	3-hexén-2,5-diol	alkohol	460	1,62	<b>961,2</b>	45,6	–	79	161,6	169,0	158,3	84,15
7	laktón kyseliny mevalonovej	laktón	460	1,77	<b>961,4</b>	43,3	130	43	3502	3884	1973	1338
8	kyselina hexánová	kyselina	465	1,56	<b>965,5</b>	23,4	116	42	1309	870,7	685,8	1456
9	benzaldehyd	aldehyd	465	1,94	<b>965,9</b>	24,5	106	50	148,0	203,6	291,3	223,7
10	2-pentylfuran	–	490	1,49	<b>987,2</b>	20,3	138	69	120,2	56,19	50,08	412,1
11	maleimid	–	495	2,21	<b>992,2</b>	8,9	97	69	241,1	54,60	25,49	718,5
12	limonén	–	540	1,47	<b>1030,6</b>	9,3	136	53	92,32	119,1	87,50	116,4
13	3-metyl-2-hexénová kyselina	kyselina	545	1,69	<b>1035,2</b>	16,7	128	85	90,26	62,40	51,70	116,5
14	benzylalkohol	arén	545	2,03	<b>1035,5</b>	16,6	108	79	50,83	37,26	49,56	71,92
15	4-metylhex-5-én-4-olid	–	550	2,15	<b>1039,9</b>	17,2	126	83	96,46	35,66	59,49	225,5
16	tetrahydro-2,2,5,5-tetrametylfuran	–	565	1,73	<b>1052,6</b>	23,4	–	70	227,2	163,2	263,3	347,7
17	4-hexánolid	laktón	565	2,27	<b>1053,0</b>	5,6	114	41	46,96	29,84	140,6	145,4
18	kyselina heptánová	kyselina	585	1,55	<b>1069,8</b>	19,2	130	42	185,4	120,4	121,5	345,2
19	acetofenón	arén	585	2,07	<b>1070,3</b>	6,3	120	120	27,12	5,923	24,18	69,53
20	2-nonanón	ketón	605	1,61	<b>1087,2</b>	8,9	142	111	34,47	61,74	94,21	103,2
21	undekán	uhľovodík	620	1,31	<b>1100,0</b>	228804,1	–	57	378,3	297,8	197,6	426,0
22	nonanal	aldehyd	625	1,59	<b>1104,8</b>	13,4	142	54	93,42	72,75	89,56	97,22
23	kyselina oktánová (kyselina kaprylová)	kyselina	685	1,61	<b>1159,4</b>	18,3	144	83	121,4	52,17	18,60	128,7
24	uracil	–	690	2,33	<b>1164,6</b>	6,8	112	69	71,24	23,55	13,70	83,02
25	butylidiglykol	–	715	1,81	<b>1186,8</b>	22,3	162	41	802,1	1069	206,6	551,5
26	dodekán	uhľovodík	730	1,34	<b>1200,0</b>	278344,5	–	57	302,5	271,3	259,0	711,6
27	dekanal	aldehyd	735	1,61	<b>1205,0</b>	21,6	156	83	106,2	76,13	68,10	117,8
28	1,3-ditiolo[4,5-b]furan, tetrahydro-3 $\alpha$ -metyl-	zlúčenina síry	770	1,86	<b>1238,6</b>	11,1	162	84	90,97	102,6	166,7	355,9
29	4-oxononanal	aldehyd	775	2,01	<b>1243,5</b>	12,2	156	81	183,7	21,87	16,35	40,67

30	kyselina nonánová	kyselina	790	1,64	<b>1257,4</b>	18,7	158	87	962,9	153,1	13,10	163,7	
31	2-azepanón (kaprolaktám)	laktám	790	2,62	<b>1258,4</b>	11,2	113	51	195,8	108,6	65,98	130,1	
32	2-undekanón	ketón	825	1,64	<b>1290,8</b>	9,3	170	59	95,87	22,80	5,856	116,2	
33	tridekán	uhľovodík	835	1,36	<b>1300,0</b>	262664,7	–	57	285,8	374,1	314,3	1072	
34	kyselina dekánová (kyselina kaprinová)	kyselina	890	1,65	<b>1355,3</b>	8,2	172	41	809,8	205,9	57,36	1115	
35	2,2-butoxyetoxyetylacetát	–	895	1,84	<b>1360,5</b>	30,1	204	29	1043	993,9	621,0	423,9	
36	2-metyl-3-hydroxy-2,4,4-trimetylpentylester kyseliny propánovej	–	910	1,73		20,4	216	41		1126	1451	117,1	356,6
					<b>1375,4</b>								
37	oktyl butanoát	ester	915	1,69	<b>1380,3</b>	7,6	200	82	33,04	17,75	10,91	57,76	
38	tetradekán	uhľovodík	935	1,38	<b>1400,0</b>	224395,7	–	85	212,1	200,3	185,8	279,1	
39	2,4,7,9-tetrametyl-5-decín-4,7-diol	–	940	1,65	<b>1405,6</b>	22,8	226	29	346,2	339,9	150,9	580,6	
40	(5E)-6,10-dimetyl-5,9-undekadien-2-ón (geranylacetón)	terpén	980	1,78		16,6	194	83		102,4	62,15	38,64	67,29
					<b>1447,8</b>								
41	kyselina undekánová	kyselina	990	1,64	<b>1458,2</b>	6,2	186	73	217,0	109,1	19,99	244,1	
42	1-chlórdodekán (lauryl chlorid)	–	1005	1,56	<b>1473,9</b>	6,2	204	109	57,00	15,21	0,4950	24,51	
43	pentadekán	uhľovodík	1030	1,40	<b>1500,0</b>	181275,7	–	85	206,0	100,2	127,5	275,0	
44	butylovaný hydroxytoluén (BHT)	–	1035	1,83	<b>1506,1</b>	6,6	220	115	67,44	72,03	54,11	63,78	
45	tridekanal	aldehyd	1040	1,65	<b>1511,4</b>	7,6	198	69	169,7	123,8	36,10	213,9	
46	etyl 4-etoxybenzoát	–	1055	2,11	<b>1528,6</b>	19,3	194	43	76,58	80,10	119,1	234,6	
47	dekánamid	amid	1085	2,04	<b>1561,8</b>	20,0	171	59	225,8	144,2	85,59	175,8	
48	kyselina dodekánová (laurylová)	kyselina	1090	1,64	<b>1566,9</b>	15,2	200	91	151,5	65,47	21,90	40,73	
49	izoutyl ester kyseliny 2,2,4-trimetyl-3-karboxyisopropylpentanovej	–	1110	1,69		19,7	–	111		134,7	88,63	36,89	36,43
					<b>1589,2</b>								
50	hexadekán	uhľovodík	1120	1,41	<b>1600,0</b>	93629,0	–	85	256,7	152,2	248,7	453,2	
51	tetradekanal	aldehyd	1130	1,65	<b>1612,1</b>	20,7	212	95	68,33	64,31	31,43	94,89	
52	izopropyl dodekanoát (izopropyl laurát)	ester	1140	1,57	<b>1623,7</b>	13,5	214	97	127,3	42,91	54,12	78,78	
53	kyselina tridekánová	kyselina	1165	1,68	<b>1653,3</b>	8,5	214	59	64,36	105,6	22,41	161,2	
54	metyl dihydrojasmonát	–	1165	2,14	<b>1653,8</b>	6,8	226	89	38,29	32,54	5,810	14,81	
55	1-chlórtetradekán	–	1185	1,65	<b>1676,8</b>	7,9	–	168	38,20	6,481	10,07	29,54	
56	hexyl salicylát	–	1190	1,92	<b>1683,0</b>	4,6	222	222	232,3	40,12	10,62	63,95	
57	heptadekán	uhľovodík	1205	1,43	<b>1700,0</b>	47219,4	–	85	412,5	143,7	153,6	387,4	
58	1H-indén, 2,3-dihydro-1,1,3-trimetyl-3-fenyl-	–	1225	2,11	<b>1725,9</b>	11,9	236	43	401,9	320,9	98,68	263,1	
59	kyselina tetradecénová	kyselina	1240	1,76	<b>1744,2</b>	8,4	–	138	96,10	34,43	12,27	279,4	
60	kyselina tetradekánová (kyselina myristová)	kyselina	1255	1,69	<b>1762,8</b>	13,6	228	121	56,95	67,10	5,560	287,3	
61	dodekánamid	amid	1260	2,04	<b>1769,5</b>	16,0	199	59	635,8	196,0	191,1	535,4	
62	octadekán	uhľovodík	1285	1,44	<b>1800,0</b>	30930,2	–	85	459,2	275,1	190,1	756,8	
63	dikumén	–	1285	2,21	<b>1801,1</b>	8,8	–	51	133,4	80,86	28,45	46,65	
64	kyselina pentadekánová	kyselina	1330	1,73	<b>1860,4</b>	14,2	242	108	6,318	26,72	2,369	100,6	
65	versalid	–	1330	2,07	<b>1860,9</b>	6,5	258	74	10,19	0,7310	–	36,91	
66	diizobutylftalát	–	1340	2,13	<b>1874,3</b>	25,5	278	104	330,5	108,1	124,8	199,2	
67	1-hexadekanol	alkohol	1350	1,66	<b>1887,0</b>	15,4	–	109	140,1	40,90	14,62	146,6	

68	nonadekán	uhľovodík	1360	1,46	<b>1900,0</b>	16330,5	–	85	426,1	275,7	146,8	1050
69	homosalát	–	1360	1,98	<b>1900,7</b>	9,6	262	109	79,93	152,7	20,38	58,68
70	springén	terpén	1370	1,70	<b>1913,7</b>	19,1	–	91	351,1	555,3	197,8	812,6
71	7,9-di-terc-butyl-1-oxaspiro(4,5)deka-6,9-dién-2,8-dión	–	1375	2,16		21,2	276	149				
					<b>1921,0</b>				108,5	45,44	686,3	698,0
72	kyselina 9-hexadecénová	kyselina	1395	1,78	<b>1947,1</b>	12,5	–	122	124,1	127,9	8,304	617,8
73	kyselina hexadekánová	kyselina	1410	1,73	<b>1967,0</b>	22,6	256	107	343,6	504,9	93,11	1213
74	dibutylftalát	–	1410	2,20	<b>1967,7</b>	19,6	278	50	99,44	59,45	55,16	337,8
75	eikozán	–	1435	1,48	<b>2000,0</b>	8697,3	–	85	598,4	422,7	223,7	1045
76	heneikozán	uhľovodík	1505	1,49	<b>2100,0</b>	1080,7	–	169	15,51	40,21	18,97	98,21
77	1-oktadekanol	alkohol	1510	1,69	<b>2108,0</b>	8,0	270	165	271,7	10,60	11,33	38,83
78	dodecyl benzoát	–	1540	1,86	<b>2154,4</b>	11,4	290	104	64,05	25,87	15,36	66,57
79	kyselina olejová	–	1560	1,74	<b>2185,0</b>	11,5	282	163	246,5	184,8	145,9	320,8
80	hexadekánamid	amid	1560	2,07	<b>2185,5</b>	14,6	255	59	1566	648,8	603,8	4050
81	dokozán	uhľovodík	1570	1,52	<b>2200,0</b>	109,7	–	127	347,8	218,3	74,73	416,8
82	dodecylester kyseliny benzoovej	–	1585	1,94	<b>2223,8</b>	5,9	–	93	657,0	94,13	13,80	111,2
83	trikozén	–	1630	1,72	<b>2292,6</b>	21,1	–	135	161,9	145,5	94,87	127,8
84	trikozán	uhľovodík	1635	1,53	<b>2300,0</b>	117,8	–	113	1319	656,2	213,8	1189
85	1-eikozanol	alkohol	1635	1,68	<b>2300,3</b>	14,8	298	133	166,6	59,71	56,92	85,06
86	2-etylhexyl trans-4-metoxycinamát	–	1655	2,23	<b>2334,5</b>	11,3	290	162	135,2	85,01	16,91	48,42
87	tetradecylester kyseliny benzoovej	–	1715	1,99	<b>2434,1</b>	8,9	318	108	145,3	28,72	16,44	33,33
88	1-pentakozén	–	1755	1,77	<b>2500,3</b>	19,6	–	135	164,8	180,3	157,0	150,9
89	heptadecylester kyseliny hexánovej	–	1755	1,82	<b>2500,4</b>	26,6	–	203	67,84	175,0	13,52	123,4
90	1-dokozanol	–	1760	1,70	<b>2508,6</b>	11,3	–	70	283,5	675,6	374,3	6603
91	pentadecylester kyseliny benzoovej	ester	1775	2,02	<b>2534,1</b>	4,8	332	93	408,3	51,29	27,97	158,5
92	diizooktylftalát	–	1780	2,12	<b>2542,6</b>	21,6	–	85	562,0	319,6	1114	965,9
93	hexakozán	uhľovodík	1815	1,73	<b>2600,3</b>	12,8	–	133	65,74	128,3	54,85	148,3
94	hexadecylester kyseliny benzoovej	ester	1835	2,05	<b>2640,9</b>	11,5	346	81	165,0	189,7	42,65	215,7
95	heptakozán	uhľovodík	1870	1,65	<b>2709,2</b>	4,5	–	137	19,44	18,80	23,46	56,84
96	bis(2-etylhexyl)ester kyseliny 1,3-benzéndikarboxylovej	ester	1895	2,01		21,9	–	82				
					<b>2755,3</b>				117,5	105,6	82,34	697,4
97	skvalén	terpén	1935	1,94	<b>2830,6</b>	51,6	410	67	72845	110417	8587	107892
98	nonakozán	–	1970	1,67	<b>2900,0</b>	2,9	–	195	23,81	23,44	53,01	69,47
99	cholesta-4,6-dién-3-ol, (3β)-	sterol	2075	2,47	<b>3111,5</b>	37,1	394	141	389,7	238,7	341,4	498,8
100	hexakozánamid	amid	2080	2,33	<b>3121,2</b>	9,0	–	69	442,5	244,5	63,97	1370
101	α-tokoferol	–	2095	2,48	<b>3151,4</b>	7,3	430	164	84,62	63,48	11,04	850,0
102	cholesterol	sterol	2100	2,74	<b>3161,9</b>	37,4	386	40	1843	1166	126,5	3199
103	oktadecyl dodekanoát	voskový ester	2105	1,98	<b>3170,4</b>	17,6	452	228	77,61	113,9	12,54	230,5
104	lathosterol	sterol	2130	2,99	<b>3222,3</b>	18,7	386	43	659,6	959,4	201,2	4410
105	heptakozánamid	amid	2135	2,57	<b>3231,4</b>	5,0	409	59	1688	298,1	78,08	2082
106	cholesta-3,5-dien-7-ón	sterol	2145	3,29	<b>3252,7</b>	13,1	382	161	80,07	61,38	44,27	107,0

107	kampesterol	sterol	2155	3,12	<b>3272,3</b>	37,0	400	95	79,93	152,7	20,38	58,68
108	cholest-4-en-3-ón	sterol	2165	3,42	<b>3292,8</b>	21,4	–	145	75,63	69,90	57,64	105,0
109	tritriakontán	uhľovodík	2170	2,04	<b>3300,0</b>	10,3	–	100	98,18	30,20	150,5	148,3
110	cholesta-4,6-dien-3-ón	sterol	2185	3,69	<b>3327,7</b>	27,7	–	43	481,0	425,9	292,1	632,3
111	β-sitosterol	sterol	2210	3,49	<b>3368,9</b>	68,5	414	233	210,3	230,1	96,13	146,7
112	tetratriakontán	uhľovodík	2225	2,25	<b>3391,7</b>	63,6	–	113	644,0	105,9	461,0	549,0
113	alfa/beta-amyrín	sterol	2240	4,11	<b>3419,7</b>	41,5	426	189	184,5	181,8	58,99	48,35
114	alfa/beta-amyrón	sterol	2250	4,39	<b>3436,8</b>	39,7	424	134	454,6	458,5	119,9	97,87
115	stigmasta-3,5-dien-7-ón	sterol	2265	4,26	<b>3461,5</b>	95,7	410	161	605,8	564,3	392,2	412,7
116	pentatriakontán	uhľovodík	2290	2,50	<b>3500,0</b>	165,3	–	141	205,8	34,43	86,79	104,3
117	hexatriakontán	uhľovodík	2370	2,81	<b>3600,0</b>	451,4	–	141	247,6	5,411	45,53	51,94
118	heptatriakontán	uhľovodík	2465	3,15	<b>3700,0</b>	679,3	–	113	245,0	19,45	31,05	48,28
119	octatriakontán	uhľovodík	2565	3,60	<b>3800,0</b>	1365,0	–	113	260,2	13,19	4,360	–
120	nonatriakontán	uhľovodík	2695	4,13	<b>3902,9</b>	538,2	–	99	148,1	–	8,623	3,256

Kompletná tabuľka 341 analytov všetkých 82 zúčastnených mužov, ktorá zahrňuje aj neznáme a čiastočne identifikované zlúčeniny, je dostupná v online verzii ako samostatná príloha k diplomovej práci v digitálnom repozitári Univerzity Karlovej.

### Príloha 3: PCA koordináty jednotlivých participantov

Tabuľka 2: PCA súradnice zúčastnených mužov hlavnej štúdie, na základe ktorých boli zostrojené PCA grafy na Obr. 25 a Obr. 26. Počítalo sa s priemernými hodnotami ľavého a pravého podpažšia participantov. Jednotlivé otcovsko-partnerské dvojice participantov sú označené štvorpísmenkovou skratkou (ADBE, ADIL, ...). Písmeno za pomlčkou ukazuje či sa jedná o otca (O) alebo partnera (P). V zátvorkách za hlavným komponentom je uvedená variabilita, pričom všetky tri hlavné komponenty spolu pokrývali 41 % variability.

Participant	PC 1 (21%)	PC 2 (16%)	PC 3 (6%)
ADBE-O	0,4607	0,5537	-0,0597
ADBE-P	0,4041	0,5371	0,2078
ADIL-O	-0,6681	-0,0945	0,1529
ADIL-P	0,3923	-0,1868	0,3688
ADPO-O	-0,6285	-0,1424	-0,0744
ADPO-P	-0,3551	-0,2539	0,0211
ADST-O	0,4509	0,6920	0,1653
ADST-P	0,5153	0,5267	0,1483
ALBI-O	0,4623	0,5568	-0,2730
ALBI-P	-0,2309	0,9941	-0,0965
ANDU-O	0,4583	-0,1703	0,3547
ANDU-P	-0,0351	-0,1578	-0,1689
ANSI-O	-0,1307	-0,2505	-0,1169
ANSI-P	0,1474	-0,2676	-0,2001
ANSM-O	0,3870	-0,3460	0,1569
ANSM-P	0,0082	-0,2487	0,4966
ASLA-O	-0,0546	-0,1816	-0,0025
ASLA-P	-0,0247	-0,2511	0,1628
BAPR-O	-0,1263	-0,0889	0,1467
BAPR-P	-0,1187	0,0668	0,6098
BAVO-O	-0,5664	-0,1649	0,0156
BAVO-P	-0,3347	-0,1641	0,0179
BETE-O	-0,4286	0,1226	-0,0258
BETE-P	0,6787	-0,2228	0,5199
CLDU-O	0,4777	-0,2367	-0,0571
CLDU-P	-0,2215	-0,2350	0,0393
DOGR-O	-0,4527	-0,1827	-0,1044
DOGR-P	-0,3482	-0,1939	0,0192
HLKI-O	-0,5200	-0,1568	-0,0514
HLKI-P	-0,2303	-0,2369	0,5147
JAKO-O	0,0241	0,9832	0,0468
JAKO-P	0,4427	0,5647	0,1534
JAKR-O	0,1379	-0,2215	-0,0073
JAKR-P	0,7826	-0,4258	-0,1293
JAVE-O	-0,1546	-0,2058	0,4966
JAVE-P	0,0615	-0,2810	-0,4716
JAZI-O	0,7768	-0,2661	0,5076
JAZI-P	0,2754	-0,0715	0,6503
KANA-O	-0,4495	-0,2912	0,2398

KANA-P	-0,3682	-0,1156	0,0756
KAPO-O	-0,7764	-0,1538	-0,1011
KAPO-P	0,6482	-0,3000	-0,0206
KAVO-O	0,2993	0,5940	0,0432
KAVO-P	0,2825	0,6795	-0,1769
KNKR-O	-0,7538	-0,1914	-0,1697
KNKR-P	-0,4028	-0,2794	0,0652
KRBA-O	0,3895	0,5753	0,0361
KRBA-P	-0,1554	1,0181	-0,0548
KRKD-O	0,3357	0,6416	-0,1125
KRKD-P	-0,2478	0,9092	-0,1723
KRNA-O	-0,3228	1,1487	-0,0188
KRNA-P	0,1814	0,4588	-0,1518
MABE-O	-0,8476	-0,1411	-0,1433
MABE-P	-0,2861	-0,2494	0,2564
MAHO-O	0,3791	-0,2204	-0,2462
MAHO-P	0,2506	-0,2367	-0,0920
MAKY-O	-0,4404	0,1337	-0,0457
MAKY-P	-0,7794	0,0659	-0,3216
MANE-O	-0,2652	-0,1065	0,0733
MANE-P	-0,2702	-0,1332	0,0562
MAUR-O	0,5390	-0,2247	-0,1446
MAUR-P	0,0373	-0,0847	-0,0517
MIBU-O	-0,3255	0,9662	-0,0221
MIBU-P	0,7970	0,2821	-0,1729
NIMA-O	0,6084	-0,2656	-0,1912
NIMA-P	0,9718	-0,4165	-0,5251
NTUT-O	-0,5886	-0,2349	-0,2368
NTUT-P	-0,0126	-0,3224	0,0356
PAZE-O	-0,4466	-0,2084	-0,2552
PAZE-P	-0,2633	-0,2557	0,1745
RARI-O	0,6179	-0,3146	-0,0177
RARI-P	-0,6705	-0,0746	0,0344
SAPA-O	0,0611	-0,1182	-0,0545
SAPA-P	-0,1806	-0,1254	-0,0840
TRCY-O	-0,7642	-0,0062	-0,0205
TRCY-P	0,1441	-0,1782	-0,3640
TRZB-O	-0,7334	-0,1335	-0,3600
TRZB-P	0,2886	-0,2645	0,0772
VALU-O	0,9174	-0,5253	-0,5443
VALU-P	0,3723	-0,3823	-0,1920
ZANE-O	0,0342	-0,2314	0,1922
ZANE-P	0,4813	-0,3794	-0,4300