

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**  
katedra biologických a lékařských věd

**Laboratorní diagnostika Smith-Lemli-Opitzova syndromu  
stanovením 7-dehydrocholesterolu**

(bakalářská práce)

Autor:

Bohumila Kudláčková

Vedoucí práce:

Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

Externí školitel:

Mgr. Zdeněk Čánský

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

V Praze dne 7.5. 2008

.....

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu své bakalářské práce Doc. RNDr. Vladimíru Semeckému, CSc. za odborné vedení, dále pak externímu školiteli Mgr. Zdeňku Čánskému, MUDr. Heleně Jahnové a Ing. Petru Chrastinovi za cenné rady a připomínky.

## **Souhrn**

Tato práce se zabývá zavedením a validací metody pro stanovení 7-dehydrocholesterolu v séru nebo plazmě. 7-dehydrocholesterol je metabolit, který hraje velkou roli v diagnostice peroxisomální poruchy v syntéze cholesterolu. Jde o vzácné a závažné dědičné metabolické onemocnění, tzv. Smith-Lemli-Opitzův syndrom. Pro stanovení 7-dehydrocholesterolu jsme použili plynovou chromatografii s hmotnostním spektrometrem. Je to moderní, specifická a citlivá laboratorní technika, která je s úspěchem používána v laboratorní diagnostice dědičných metabolických poruch. Navrženou metodu jsme validovali a stanovili referenční rozmezí pro 7-dehydrocholesterol v séru. Zavedenou metodu jsme následně použili k vyšetření pacientů s klinickými příznaky suspektními pro Smith-Lemli-Opitzův syndrom. U třech pacientů jsme v séru našli patologicky vysoké koncentrace 7-dehydrocholesterolu. Vypracovaná metoda umožňuje stanovit 7-dehydrocholesterol v séru nebo v plazmě pro diagnostiku Smith-Lemli-Opitzova syndromu a pro monitorování léčby pacientů s tímto onemocněním.

## Summary

This thesis consists in implementing and validating of the method for setting 7-dehydrocholesterol in human serum or plasma. 7-dehydrocholesterol is a metabolite important for diagnostics of peroxisomal disorder in cholesterol biosynthesis. It is a rare and serious inherited metabolic disease; so-called Smith-Lemli-Opitz Syndrome. For setting the level of 7-dehydrocholesterol we used gas chromatography/mass spectrometry. It is a modern, specific and high-sensitive laboratory technology, which is successfully used in diagnostics of inherited metabolic diseases. We validated the proposed method and set the reference range of 7-dehydrocholesterol in serum. Afterwards, we used the introduced method to investigate patients with clinical symptoms of Smith-Lemli-Opitz Syndrome. By three patients, we measured abnormally high concentrations of 7-dehydrocholesterol in their serum. The worked out method enables to set 7-dehydrocholesterol in serum and plasma for the diagnostics of Smith-Lemli-Opitz Syndrome and monitoring patients who suffer from this disease.

## Seznam použitých symbolů a zkratek

BSTFA	N, O-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid s 1% trimethylchlorsilanu
7DHC	7-dehydrocholesterol
7DHCR	7-dehydrocholesterolreduktáza
8DHC	8-dehydrocholesterol
<i>DHCHR7</i>	gen pro 7-dehydrocholesterolreduktázu
DMP	dědičné metabolické poruchy
FID	plamenově ionizační detektor
GC	plynová chromatografie
GC/MS	plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
IS	interní standard
iso-7DHC	iso-7-dehydrocholesterol
IUPAC	Mezinárodní unie čisté a užité chemie
MS	hmotnostní detektor
m/Z	poměr hmotnosti a náboje
SLOS	Smith-Lemli-Opitzův syndrom
TCD	tepelně vodivostní detektor
ÚDMP	Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK v Praze

# Obsah

<b>1. Úvod .....</b>	<b>10</b>
<b>2. Teoretická část .....</b>	<b>11</b>
2.1. Dědičné metabolické poruchy .....	11
2.2. Smith-Lemli-Opitzův syndrom.....	12
2.3. Analytické metody .....	16
2.4. Plynová chromatografie .....	17
2.4.1. Schéma plynového chromatografu .....	17
2.4.2. Dávkování vzorku v plynové chromatografii .....	18
2.4.3. Splitování, splitovací poměr (split ratio) .....	18
2.4.4. Chromatografické kolony .....	19
2.4.5. Detektory v plynové chromatografii.....	19
2.4.5.1. Plamenově ionizační detektor .....	19
2.4.5.2. Tepelně vodivostní detektor.....	19
2.4.5.3. Detektor elektronového záchyty .....	20
2.4.5.4. Hmotnostní detektor .....	20
2.4.6. Aplikace plynové chromatografie.....	21
2.4.6.1. Kvalitativní analýza .....	21
2.4.6.2. Kvantitativní analýza .....	22
2.4.6.2.1. Kalibrační graf.....	22
2.4.6.2.2. Metody pro stanovení koncentrace analytu .....	23
2.5. Validace metody .....	25
2.5.1. Měření .....	25
2.5.2. Šum .....	25
2.5.3. Kalibrace .....	25
2.5.4. Regresní analýza .....	26
2.5.5. Mez detekce a mez kvantifikace .....	26
<b>3. Experimentální část .....</b>	<b>28</b>
3.1. Použité přístroje a pomůcky .....	28
3.2. Použité chemikálie.....	28

3.3. Použité roztoky .....	28
3.4. Příprava vzorku.....	29
3.5. GC/MS analýza.....	29
<b>4. Výsledky.....</b>	<b>31</b>
4.1. GC/MS analýza.....	31
4.2. Validace .....	34
4.2.1. Linearita .....	34
4.2.2. Mez detekce, mez kvantifikace a opakovatelnost.....	34
4.2.3. Správnost .....	35
4.2.4. Referenční rozmezí .....	36
4.2.5. Využití v praxi .....	36
<b>5. Diskuze .....</b>	<b>37</b>
<b>6. Závěr .....</b>	<b>38</b>
<b>7. Literatura .....</b>	<b>40</b>



## **Cíl práce**

Cílem práce je zavedení metody pro stanovení 7-dehydrocholesterolu v séru a v plazmě a její validace. Metoda bude sloužit pro diagnostiku Smith-Lemli-Opitzova syndromu a pro monitorování léčby pacientů s tímto onemocněním. Pro stanovení 7-dehydrocholesterolu bude použita plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem. Navržená metoda bude validována, včetně stanovení referenčního rozmezí 7-dehydrocholesterolu v séru, a následně použita k vyšetření pacientů s klinickými příznaky suspektními pro Smith-Lemli-Opitzův syndrom a pro potvrzení diagnózy.

# 1. Úvod

Tato bakalářská práce se zabývá problematikou laboratorní diagnostiky Smith-Lemli-Opitzova syndromu pomocí stanovení 7-dehydrocholesterolu v séru.

Příčinou Smith-Lemli-Opitzova syndromu je snížená aktivita enzymu 7-dehydrocholesterolreduktázy, který katalyzuje poslední krok v biosyntéze cholesterolu. U pacientů s tímto onemocněním jsou v séru a v plazmě přítomny zvýšené koncentrace 7-dehydrocholesterolu. Stanovením tohoto metabolitu lze onemocnění diagnostikovat a také monitorovat následnou léčbu. Poruchy v biosyntéze cholesterolu jsou léčitelné a určení správné diagnózy tak umožní i cílenou léčbu. V rámci selektivního screeningu dědičných metabolických poruch je ročně vyšetřeno cca 3500 dětí v ČR, z nichž více než 2000 má neurologické příznaky. Protože ke klinickému obrazu Smith-Lemli-Opitzova syndromu patří také neurologické postižení, mělo by být u každého neurologicky postiženého pacienta toto onemocnění vyloučeno.

Nejdostupnější analytickou metodou pro stanovení 7-dehydrocholesterolu v séru je plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí. Předložená bakalářská práce se zabývá optimalizací plynové chromatografie pro stanovení 7-dehydrocholesterolu v séru, validací metody a stanovení koncentrací 7-dehydrocholesterolu v séru pacientů se Smith-Lemli-Opitzovým syndromem.

Tato práce rozšiřuje spektrum vyšetřovaných dědičných metabolických poruch v Ústavu dědičných metabolických poruch Všeobecné fakultní nemocnice a 1. LF UK v Praze o Smith-Lemli-Opitzův syndrom.

## 2. Teoretická část

### 2.1. Dědičné metabolické poruchy

Dědičné metabolické poruchy (DMP) jsou skupinou více než 850 různých onemocnění. Příčinou onemocnění je snížená aktivita určitého enzymu, jeho aktivátoru či transportního proteinu<sup>1</sup>. Důsledkem je nahromadění škodlivých metabolitů v tělesných tkáních nebo nedostatek či porucha transportu jiné pro organismus důležité látky (produktu enzymu). DMP jsou dědičné převážně autosomálně recesivně, některé z nich mají i dědičnost X-vázanou, mitochondriální nebo autosomálně dominantní. Incidence jednotlivých DMP je nízká (od 1:5 000 až po více než 1:1 000 000), ale celkový výskyt DMP je vysoký. Incidence všech DMP se odhaduje minimálně na 1:1 000<sup>2</sup>.

Klinické projevy DPM jsou rozmanité, zahrnují širokou škálu příznaků v různých kombinacích i u onemocnění jedné etiologie. Mohou se objevit v kterémkoli věku, nejčastěji však v dětství, méně časté, ale nikoliv výjimečné jsou první příznaky v adolescenci nebo až v dospělosti. Klinický průběh může být chronický, pro některé DPM jsou typické opakované akutní dekompenzace, způsobené intoxikací patologickými metabolity. Jen zřídka lze určit diagnózu DPM z klinických nálezů. Řada z nich nemá jednoznačný obraz ani na úrovni zobrazovacích metod a standardních bioptických vyšetření. Pro určení diagnózy je zásadní cílené vyšetření metabolitů, aktivity enzymu nebo analýza DNA<sup>3</sup>.

Některé DMP, zvláště poruchy metabolismu aminokyselin včetně organických acidurií, poruchy metabolismu sacharidů a mastných kyselin jsou léčitelné speciálními dietami nebo podáváním vitaminových kofaktorů, jiné jsou jen omezeně léčitelné, některé DMP jsou neléčitelné, mají progresivní průběh a infaustní prognózu<sup>4</sup>.

## 2.2. Smith-Lemli-Opitzův syndrom

Smith-Lemli-Opitzův syndrom (SLOS) je autozomálně recesivní porucha v biosyntéze cholesterolu s incidencí 1:20 000 - 1:40 000, což představuje z hlediska DMP poměrně časté onemocnění<sup>5</sup>.

Poruchu lze definovat po stránce klinické, biochemické a molekulárně genetické. Klinická symptomatologie představuje široké spektrum od mírné formy po těžkou formu s často intrauterinním postižením plodu. Lehké formy se mohou projevovat pouze poruchami učení a chování s lehkou kraniofaciální dysmorfii a typickou syndaktylií 2. a 3. prstu dolní končetiny. Většina pacientů má četné vrozené malformace např. rozštěp patra, syndaktylie (*obr. č. 1*), polydaktylie (*obr. č. 2*), srdeční vady, anomálie urogenitálního systému, hypospádie, atd. Typická je intrauterinní i postnatální růstová retardace, problémy s příjmem stravy a různě těžká mentální retardace<sup>7,8</sup>. Nejtěžší formy mohou být spojeny s těžkými vrozenými vadami CNS např. holoprosencefalií, část těchto pacientů umírá už před porodem. Na podkladě klinických symptomů je někdy možné vyslovit podezření na diagnózu již při narození dítěte<sup>9</sup>. Značná část dětí umírá již v kojeneckém věku. Snáze se diagnostikuje u chlapců, a to vzhledem k abnormalitě zevního genitálu (*obr. č. 3*), u dívek se vyskytují anomálie uteru a vaginy. V urogenitálním systému se vyskytují dysplazie a dystonie ledvin<sup>7</sup>. Objevuje se také fotosenzitivita, způsobená zvýšenými hodnotami 7-dehydrocholesterolu (7DHC) v pokožce, a to u dětí vystavených nejen slunečnímu světlu, ale i zdroji silného osvětlení<sup>10,11</sup>.



*Obr. č. 1: Polydaktylie a syndaktylie prstů nohy<sup>6</sup>*



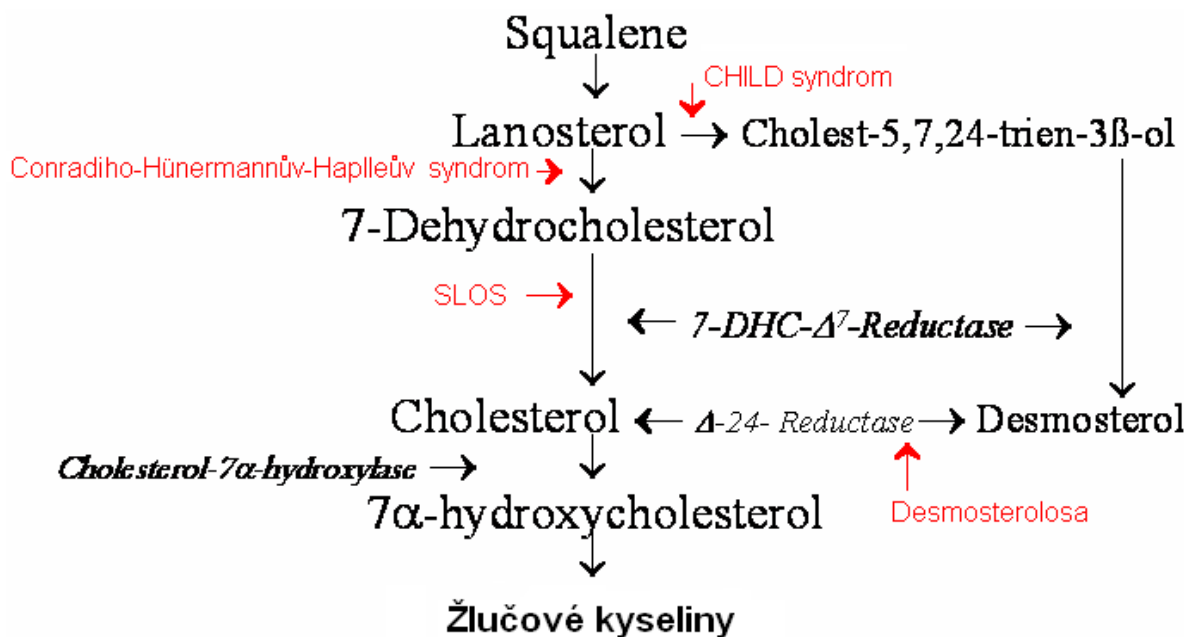
*Obr. č. 2: Polydaktylie prstů ruky<sup>6</sup>*



*Obr. č. 3: Abnormalita zevního genitálu<sup>6</sup>*

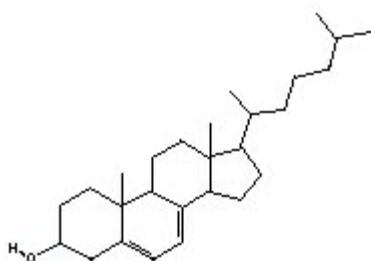
Biochemickou příčinou SLOS je snížená aktivita enzymu 7-dehydrocholesterolreduktázy (7DHCR, EC 1.3.1.21), která katalyzuje poslední krok v biosyntéze cholesterolu (obr. 4). Deficit tohoto enzymu způsobuje snížení koncentrace

cholesterolu a LDL-cholesterolu<sup>12</sup> v krvi a vede k akumulaci prekurzorů 7DHC a 8-dehydrocholesterolu (8DHC).



Obr. č. 4: Schéma biosyntézy cholesterolu<sup>13</sup>

Biochemická diagnostika je založená hlavně na určení koncentrace 7DHC v séru nebo v plasmě, které jsou u pacientů se SLOS výrazně zvýšené. Systematický název 7-dehydrocholesterolu je cholesta-5,7-dien-3beta-ol (obr.5). Podezření na toto onemocnění můžeme získat už při běžném vyšetření lipidogramu, kde je patrný velmi nízký cholesterol, pod 2 mmol/l<sup>14</sup>.



Obr. č. 5: Struktura 7-dehydrocholesterolu<sup>15</sup>

Na úrovni molekulárně genetické jsou příčinou mutace v genu *DHCHR7*, který je lokalizovaný na 11. chromozomu v oblasti 11q12-13. Fenotypická variabilita, patrná

i u členů jedné rodiny, je zřejmě podmíněna nejen charakterem mutace, ale také epigenetickými faktory uplatňujícími se v ontogenezi. Příčina mnohočetných vrozených anomálií charakteristických pro SLOS se připisuje úloze cholesterolu v embryonálním vývoji a morfogenezi<sup>16,17</sup>. To souvisí s funkcí tzv. sonic hedgehog proteinu, tedy signálního proteinu, který zahajuje diferenciaci tkání v embryogenezi a vyžaduje pro svoji funkci přítomnost cholesterolu. Výsledkem je na jedné straně hromadění 7DHC a na straně druhé deficit cholesterolu<sup>18</sup>.

Léčba obecně je kauzální a symptomatická. Kauzální léčba např. genová terapie či enzymoterapie není zatím dostupná a vzhledem k patogenezi je problematická. Funkční příznaky jsou částečně ovlivnitelné léčbou zaměřenou na úpravu dysbalance v profilu cholesterolu a jeho prekurzorů. Využívá se diety bohaté na cholesterol (žloutky, smetana), i uměle vyrobené preparáty s obsahem cholesterolu (Cholesterol Module). U lehkých forem se paradoxně někdy popisuje pozitivní efekt podání statinů, zřejmě na podkladě ovlivnění zpětně vazebných mechanismů<sup>5</sup>.

Symptomatická terapie zahrnuje léčbu konkrétních příznaků např. plastické operace, antiepileptika, gastrostomie, speciální pedagogická péče atd. podle konkrétních problémů pacienta.

Vzhledem k tomu, že jde o autosomálně recesivní onemocnění, je riziko postižení sourozence týž rodičů Smith-Lemli-Opitzovým syndromem pro každé těhotenství 25%. Řada rodičů má proto zájem o prenatální diagnostiku<sup>14</sup>, která je možná, ale ne zcela spolehlivá, stanovením koncentrace 7DHC a 8DHC a poměru 7DHC ku cholesterolu v plodové vodě. Pokud jsou známy patogenní mutace v *DHCHR7* genu v rodině, je prenatální diagnostika možná molekulárně genetickými metodami v buňkách choriových klků nebo amniocytech.

### **2.3. Analytické metody**

Pro diagnostiku SLO se musí použít analytická metoda, která je schopna stanovit a potvrdit identitu 7DHC v séru od koncentrací  $0,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . To splňují plynová chromatografie a kapalinová chromatografie<sup>19</sup> ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Prvním krokem musí být separace chromatografickou metodou a následně detekce a identifikace pomocí hmotnostní spektrometrie.

Chromatografie je separační metoda založená na postupném ustavování řady fázových rovnováh součástí analyzované směsi mezi dvě popř. i více fázemi, které jsou vůči sobě v pohybu. Jedna fáze, zvaná stacionární, je umístěna v koloně (resp. ve vrstvě), druhá, která unáší separované látky ložem stacionární fáze, je fáze mobilní. Při styku stacionární i mobilní fáze s dělenými látkami dochází k vzájemným interakcím, které jsou základním předpokladem pro jejich úspěšnou separaci. V klinické biochemii jsou chromatografické metody široce využívány. Zejména se využívá plynová chromatografie na kapilárních kolonách a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Tyto metody ve spojení s hmotnostní spektrometrií jsou využívány jako absolutní (definitivní) metody<sup>20</sup>. Nejvíce se v praxi využívá plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem (GC/MS). Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda sloužící k převedení molekul na ionty, rozlišení těchto iontů podle poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ) a následnému záznamu relativních intenzit jednotlivých iontů. Látky jsou fragmentovány specificky podle své struktury, což umožňuje jejich následnou identifikaci. Hmotnostní spektrometrie umožňuje rychlou analýzu i ve složité matici. Nejčastěji jsou používány kvadrupolové analyzátory nebo iontová past.



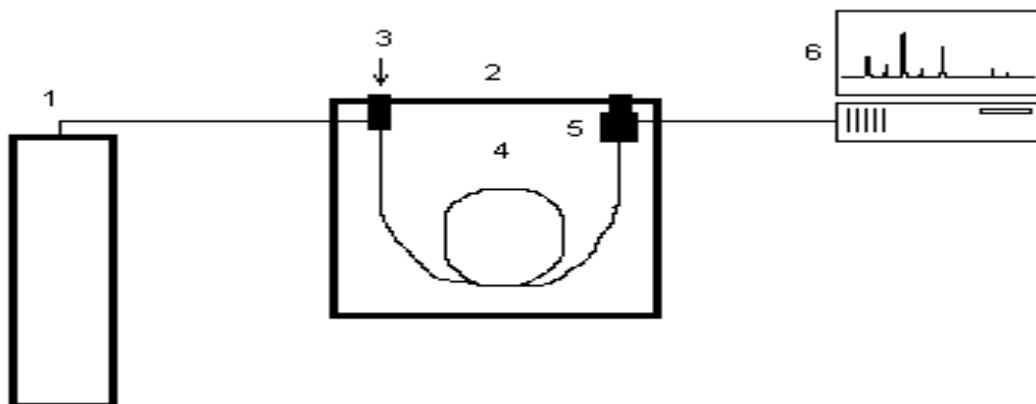
## 2.4. Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC) je chromatografická separační metoda, založená na rozdílu v distribuci látek mezi dvě nemísitelné fáze – mobilní a stacionární. Stacionární fáze je obsažena v koloně a mobilní fází je nosný plyn, který se pohybuje skrz nebo podél stacionární fáze. Jako nosné plyny se nejčastěji používají vodík, dusík, helium, argon. Svým chováním by se měl blížit plynu ideálnímu. K tomu má blízko helium, je ale dosti drahé. Nejčastěji se proto používá dusík, argon nebo vodík. Nosný plyn nesmí obsahovat vodu a kyslík<sup>21</sup>.

Metoda plynové chromatografie dokáže rychle a účinně oddělovat složité směsi a pracovat s malými množstvími vzorků při použití relativně jednoduché aparatury. Vhodná je zejména k analýzám těkavých látek. Předností je vysoká selektivita separačního procesu. V kombinaci s hmotnostní spektrometrií představuje účinné řešení: jde o efektivní separační metodu spojenou s velmi citlivou detekcí<sup>22</sup>.

### 2.4.1. Schéma plynového chromatografu

1. Zdroj a regulace proudu nosného plynu
2. Pec
3. Dávkovací systém (injektor)
4. Chromatografická kolona
5. Detektor
6. Vyhodnocovací zařízení (zapisovač, počítač)



Obr. č. 6: Schéma plynového chromatografu<sup>21</sup>

Plynová chromatografie se skládá z dávkovacího zařízení, chromatografické kolony, která je umístěna v termostatu, detektoru a systému na zpracování dat (př. integrátor, zapisovač, počítač) (obr. 6). Stanovení se provádí při konstantní teplotě, nebo podle daného teplotního programu.

### 2.4.2. Dávkování vzorku v plynové chromatografii

Velmi důležitým krokem je způsob dávkování vzorku. Musí se do kolony vpravit co nejrychleji a musí zaujmout co nejmenší objem, nesmí dojít k rozkladu vzorku v injektoru během odpaření, signál rozpouštědla nesmí ovlivňovat plochu signálů analytů. Součástí injektoru může být skleněná vložka (liner, glass insert), ve které dochází k odpaření vzorku a ke správnému promíchání par vzorku s nosným plynem a ve které se také zachytí netěkavé látky. Septum odděluje prostor injektoru od vnějšího prostoru a přes septum se pomocí injekční stříkačky s jehlou provádí nástřik vzorku.

Kapalné vzorky je zapotřebí bezprostředně zplynit, aby přišly do kolony v podobě par. Teplota nástřiku má být asi 50 °C nad bodem varu analyzované látky<sup>23</sup>.

### 2.4.3. Splitování, splitovací poměr (split ratio)

Splitování je technika nástřiku, při které je směs vzorku a nosného plynu v injektoru rozdělena na dvě nestejně části; menší část vstupuje na kolonu, větší část odchází do odpadu.

Splitovací poměr závisí na relativní velikosti průtoků splitovacím ventilem a kolonou a lze jej vypočítat podle následujícího vztahu:

$$\text{Splitovací poměr} = (\text{průtok splitovacím ventilem} + \text{průtok kolonou}) / \text{průtok kolonou}$$

Nástřik bez splitu (splitless injection) se používá při stopové analýze nebo pro analýzu směsí látek, které se výrazně liší v bodu varu.

## 2.4.4. Chromatografické kolony

V plynové chromatografii se používají náplňové nebo kapilární separační kolony. Náplňové kolony tvoří spirálovitě stočená trubice o délce 2 až 6 metrů a průměru 2 až 4 milimetry, obsahující adsorbent nebo nosič s kapalnou fází. Jsou buď skleněné nebo z nerezové oceli. V kapilárních kolonách se používá křemenná kapilára o průměru 50 - 350  $\mu\text{m}$  a délce 20 až 200 metrů. Na vnitřní stěně kapiláry je zakotvena netěkavá kapalina sloužící jako vlastní stacionární fáze. Kapilární kolony mají ve srovnání s náplňovými velmi vysokou separační účinnost, která představuje několik set tisíc teoretických pater. Jsou však zatížitelné jen malým množstvím dávkovaného vzorku<sup>21</sup>.

## 2.4.5. Detektory v plynové chromatografii

Detektor v GC zviditelňuje analytický signál. Teplota v něm by měla být o něco vyšší než teplota kolony, aby se v něm nekondenzovaly analyty. Objem detektoru se pohybuje v mikrolitrech. Pokud je příliš velký, pak se v něm rozmývají chromatografické píky. Detektory mohou být univerzální, nebo selektivní.

### 2.4.5.1. Plamenově ionizační detektor

Jeden z nejčastějších a nejuniverzálnějších detektorů, který je pomalu nahrazován hmotnostním detektorem. V plamenově ionizačním detektoru (FID) se plyn z kolony zavádí do kyslíko-vodíkového plamene, kde se odehrávají chemoionizační reakce, které vedou ke vzniku nabitých částic. V elektrickém poli pak vzniká elektrický proud. Tato metoda poskytuje odezvu na téměř všechny organické látky, naopak odezvu nedává většina anorganických plynů, par a některé organické látky. Díky zanedbatelné odezvě pro vzduch a vodu se tato metoda dá použít k analýzám nečistot v ovzduší a vodných roztocích<sup>21</sup>.

### 2.4.5.2. Tepelně vodivostní detektor

U tepelně vodivostního detektoru (TCD, katarometru) je využíván ten princip, kdy zahřáté těleso se ochlazuje rychlostí závislou na složení okolního prostředí, které

odvádí teplo. Obsahuje zahříváné odporové vlákno, které ochlazuje protékající plyn a mění tak jeho elektrický odpor. Pokud prochází pouze nosný plyn, vlákno se ochlazuje rovnoměrně a jeho odpor je konstantní. Pokud plyn obsahuje eluovanou látku, změní se teplota vlákna a tím i jeho elektrický odpor. Jako nosný plyn se nejčastěji používá vodík nebo helium<sup>21</sup>.

#### **2.4.5.3. Detektor elektronového záchytu**

Tento detektor využívá ionizace pomocí  $\beta$ -záření, které ionizuje nosný plyn a tím vzniká proud pomalých elektronů. Elektronegativní atomy halogenů tyto pomalé elektrony zachytávají a tím snižují ionizační proud. A právě toto snížení je měřítkem koncentrace daných elektronegativních atomů. Tento typ detektoru je vhodný například pro stopovou analýzu pesticidů v životním prostředí<sup>21</sup>.

#### **2.4.5.4. Hmotnostní detektor**

Hmotnostní detektor (*obr. 7*) je vhodný pro identifikaci jednotlivých složek analyzované směsi. Spojení chromatografu s hmotnostním spektrometrem (MS) má nezastupitelný význam. Ionty analyzuje kvadrupólový analyzátor nebo iontová past, kde je prostor analýzy iontů společný s iontovým zdrojem. Tento detektor je nepostradatelný při analýze neznámých složek směsi. Pro každou složku získá její hmotnostní spektrum a identifikuje ji porovnáním jejího spektra s databází spekter uloženou v počítači<sup>21,24</sup>.



Obr. č. 7: Plynový chromatograf s hmotnostním detektorem GCQ

## 2.4.6. Aplikace plynové chromatografie

Plynovou chromatografií lze použít u plyných látek, látek snadno těkavých a látek těkavých po derivatizaci. Ta mění původní chemické složení vzorku na těkavější. Původně se používala v biochemii pro analýzy mastných kyselin a aminů i analýzách plynů. Její další rozvoj nastal po aplikaci v petrochemickém průmyslu, v současné době se hojně využívá v průmyslu organických syntéz. Díky derivatizaci se rozšířila na lékařské, biologické a biochemické obory a standardně se používá při sledování kvality ovzduší. Pomáhá také určovat stopová množství pesticidů v půdě, vodách a potravinách<sup>21</sup>.

### 2.4.6.1. Kvalitativní analýza

Chromatografie je separační metoda a jako taková neposkytuje informace o struktuře látek ve vzorku. Při kvalitativní analýze v chromatografii se identifikace analytu provádí na základě srovnání retenčních dat analytu a standardu. Retenční data analytu odrážejí specifické interakce analytu se stacionární a mobilní fází. Např. retenční čas lze považovat za specifickou vlastnost analytu v daném chromatografickém systému, a tedy

retenční časy mohou sloužit jako prostředek pro identifikaci látek v daném chromatografickém systému.

Je však nutno si uvědomit, že retenční čas není neměnnou vlastností analytu, ale je důsledkem jeho retence v daném systému, přičemž změny chromatografického systému způsobují změny retenčního času. Také je jasné, že retenční čas sám o sobě nemůže sloužit k identifikaci daného analytu a že bez předchozí částečné znalosti vzorku se retenční čas nedá obecně použít pro identifikaci látek. Z toho vyplývá, že 100% identifikace v chromatografii není možná. Existuje vždy předpoklad o identitě, který závisí na předběžné znalosti analytu, efektivnosti systému a použité identifikační metodě.

#### **2.4.6.2. Kvantitativní analýza**

Výška nebo *plocha* chromatografického píku příslušející dané komponentě jsou měřítkem množství této komponenty ve vzorku. Za předpokladu lineární odezvy detektoru je plocha či výška píku úměrná množství látky. To umožňuje určovat množství či koncentraci dané látky v neznámém vzorku na základě použití vzorku dané látky o známém množství či koncentraci, tzv. standardu.

Kvalita kvantitativní analýzy je především ovlivněna přípravou vzorků, správnou funkcí přístroje a kvalitou zpracování dat, s čímž také souvisí správná volba kalibrační metody.

##### **2.4.6.2.1. Kalibrační graf**

Za určitých podmínek (tj. v lineární oblasti odezvy detektoru) je plocha píku dané komponenty přímo úměrná množství této komponenty ve vzorku. V praxi to znamená, že se změní závislost ploch piků dané látky na známém množství či koncentraci této komponenty a sestrojí se příslušný graf. V určité oblasti je tato závislost lineární a platí vztah:

$$y = a + b \cdot x$$

$x$  = nezávislá proměnná (= koncentrace standardu)

$y$  = závislá proměnná (= odezva)

a = úsek na ose y

b = směrnice přímky

Pomocí této lineární závislosti lze stanovovat neznámá množství nebo koncentrace dané komponenty ve vzorku<sup>22</sup>.

#### **2.4.6.2.2. Metody pro stanovení koncentrace analytu**

##### *1. Metoda vnitřní normalizace*

Touto metodou se určuje obsah látek ve směsích, je počet komponent relativně nízký a všechny komponenty jsou známy. Tento typ kalibrace se většinou provádí při rutinních stanoveních. Množství určité komponenty se pak vyjadřuje jako relativní frakce z celku. Tedy, v určité směsi je x % látky A, y % látky B, z % látky C atd. Výsledky při použití této metody nezávisí na přesnosti objemu při nástřiku vzorku.

##### *2. Absolutní kalibrace*

Touto metodou se určuje absolutní koncentrace nebo absolutní množství látky na základě kalibrační závislosti. Protože u této metody je kritický objem nástřiku, závisí správnost metody na dobré reprodukovatelnosti dávkovaných objemů; často se doporučuje pracovat s autosamplerm.

##### *3. Metoda vnitřního standardu*

Při této metodě se ke vzorku přidává určité množství známé látky, tzv. interní standard (IS). Tato látka nesmí být přítomna v původním vzorku, nesmí reagovat s žádnou složkou vzorku, musí být dobře oddělena od všech složek v původním vzorku a musí se eluovat v blízkosti stanovované složky.

Výhodou metody je to, že není třeba znát přesný objem nástřiku vzorku. Navíc, s použitím IS se eliminuje vliv změn pracovních podmínek, protože jak stanovovaná složka tak IS jsou těmito změnami stejně ovlivněny

#### *4. Metoda standardního přídatku*

Při použití této metody se ke známému množství vzorku přidává definované množství standardu dané látky, jejíž obsah se má stanovovat. V závislosti na typu komponenty se tento přídatek může provést buď ve formě čisté látky nebo jako roztok dané látky ve vhodném rozpouštědle. Stanovení může být založeno na jednom nebo několika přídavných známého množství analytu k neznámému vzorku<sup>22</sup>.



## **2.5. Validace metody**

### **2.5.1. Měření**

Při měření vyjadřujeme kvantitativně, to znamená číselnou formou a v určitých jednotkách, úroveň určité kardinální veličiny, která charakterizuje vlastnost daného objektu. Naměřená hodnota může buď rovnou představovat požadovanou informaci, nebo je ji zapotřebí na tuto informaci převést. Další možností je nutnost výpočtu hodnoty požadované veličiny z výsledků různých měření<sup>25</sup>. Důležitou vlastností měřícího přístroje je citlivost, která je definována jako změna odezvy, výstupu, se změnou měřené veličiny, jak ukazuje vztah:

$$S = dy/dx ,$$

kde  $y$  značí odezvu a  $x$  měřenou veličinu.

### **2.5.2. Šum**

Šum oscilující kolem základní linie je charakterizován frekvencí a amplitudou. Jak vyplývá ze statistického pojetí, je součet pozitivních a negativních výchylek v dostatečně dlouhém časovém intervalu roven nule. Šum, jehož suma je nulová v časovém intervalu našeho pozorování, se označuje jako tzv. bílý šum. Šum, jehož suma je nenulová, je tzv. náhodný šum měření, a šum, jehož suma vykazuje časovou závislost v následných intervalech pozorování, se označuje jako drift<sup>26</sup>.

### **2.5.3. Kalibrace**

Kalibrace je empirický postup zjištění závislosti mezi měřenou veličinou a požadovanou informací. Nejčastěji se uplatňuje při instrumentální analýze, kdy se z intenzity signálu hledá odpovídající obsah stanovované složky (analytu). Současně by se měla odstranit soustavná složka chyby způsobená případnou nedokonalostí průběhu jednotlivých operací předcházejících vlastnímu měření, a to tak, aby se při tom příliš nezvětšila náhodná složka chyby. Kalibrace se vždy provádí pomocí standardů se známým obsahem analytu nebo pomocí referenčních materiálů se známým celkovým složením<sup>25</sup>.

## 2.5.4. Regresní analýza

Pro způsob zpracování regresní závislosti je podstatné, zda známe nebo z teorie můžeme předpokládat tvar závislosti: pak jde vlastně pouze o hledání parametrů této závislosti. Pokud tento tvar neznáme, hledáme vhodný model pro jeho vyjádření. Častým modelem je případ, kdy se jedná o lineární závislost na neznámých parametrech. Tyto modely se označují jako lineární vzhledem k parametrům. Velmi častá je lineární závislost dvou proměnných. V tomto případě hovoříme o jednoduché lineární regresi, pro niž platí:

$$y_I = \alpha + \beta x_I + \varepsilon_I$$

$\varepsilon_i$  náhodná chyba

$\alpha, \beta$  parametry lineární regresní rovnice

Odhady parametrů  $\alpha, \beta$  lze za podmínky nejmenšího součtu čtverců určit podle rovnic:

$$b = \frac{(\sum_i x_i)(\sum_i y_i) - n \sum_i x_i y_i}{(\sum_i x_i)^2 - n \sum_i x_i^2}$$

$$a = \frac{1}{n} \left( \sum_i y_i - b \sum_i x_i \right)$$

## 2.5.5. Mez detekce a mez kvantifikace

Mez detekce a mez kvantifikace jsou základní charakteristiky metody stopové analýzy pro její použití při kvalitativní resp. kvantitativní analýze. Kvalitativně lze prokázat pouze takové množství analytu, které odpovídá minimálnímu signálu, právě rozlišitelnému od šumu nulového vzorku nebo slepého pokusu  $y_0$ .

Výpočet hodnot meze detekce a meze kvantifikace je závislý na použitém deskriptoru „nejistého“ signálu a použité hladině pravděpodobnosti. To vede ke vzniku více metod výpočtu, jejichž číselné koeficienty zpravidla nemají statisticky podloženou platnost,

ale jsou založeny na dohodě. Volba metody určení meze detekce a meze kvantifikace je tedy určena záměrem, ke kterému budou vypočítané hodnoty použity. Předmětem dohody může být kterákoli metoda<sup>25</sup>.

Podle definice IUPAC je mez kvantifikace koncentrace analytu, které odpovídá signál rovný desetinasobku směrodatné odchylky ( $10\sigma$ ) signálu nulového vzorku.

Mez detekce je nejmenší koncentrace analytu ve vzorku, kterou můžeme danou analytickou metodou detekovat. Podle definice IUPAC je mez detekce koncentrace analytu, které odpovídá signál rovný trojnásobku směrodatné odchylky ( $3\sigma$ ) signálu nulového vzorku<sup>26</sup>.

Experimentálně se mez detekce a mez kvantifikace určuje takto: za podmínek konkrétní spektrometrické metody se změří desetkrát nejtěsněji za sebou signál téhož nulového vzorku a vypočítá se standardní směrodatná odchylka  $\sigma$  v tomto souboru měření. Současně se sestrojí kalibrační přímka pro uvažované vzorky v oboru nízkých koncentrací a mez detekce, resp. mez kvantifikace se určí z této přímky jako koncentrace analytu odpovídající signálu  $3\sigma$ , resp.  $10\sigma$ <sup>25</sup>.

## **3. Experimentální část**

### **3.1. Použité přístroje a pomůcky**

skleněné zkumavky 16 x 100 mm s teflonovým uzávěrem

automatické pipety

termoregulační blok (Techne, USA)

plynový chromatograf s hmotnostním detektorem GCQ (Thermo, USA)

Vortex Genie 2 (Scientific Industries, USA)

orbitální třepačka

centrifuga Janetzki T5 (LAB system, ČR)

### **3.2. Použité chemikálie**

5- $\alpha$ -cholestan (vnitřní standart) ( $M_w = 372,7$ ) (Sigma)

7-dehydrocholesterol ( $M_w = 384,6$ ) (Sigma)

N, O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid s 1% trimethylchlorsilanu (BSTFA) (Sigma)

pyridin p.a. (Merck)

n-hexan p.a. (Penta)

ethanol 96% (Penta)

methanol p.a. (Penta)

hydroxid draselný (Fluka)

demineralizovaná voda

### **3.3. Použité roztoky**

5- $\alpha$ -cholestan (1 mg/ml směsi chloroform-methanol /1:1/ v/v)

7-dehydro-cholesterol (1 mg/ml směsi chloroform-methanol /1:1/ v/v)

0,5 M KOH ve směsi ethanol – voda (9:1 v/v)

### **3.4. Příprava vzorku**

1. Do skleněné zkumavky nadávkovat 2 ml roztoku KOH ve směsi ethanol-voda
2. Přidat 20  $\mu$ l vnitřního standartu 5- $\alpha$ -cholestanu
3. Přidat 50  $\mu$ l séra
4. Zkumavku uzavřít a promíchat na vortexu 5 sekund
5. Zahřívát v termobloku při 80 °C po dobu 65 min
6. Ochladit (volně nebo pod tekoucí studenou vodou)
7. Přidat 0,5 ml vody a promíchat na vortexu 5 sekund.
8. Přidat 5 ml hexanu
9. Třepat na třepačce 5 minut, cetrifugovat při 2300 g (4000 rpm) 5 minut.
10. Přenést horní hexanovou vrstvu. V přenesené hexanové vrstvě nesmí být voda.
11. Hexan odfoukat dusíkem při 40°C na objem přibližně 100  $\mu$ l.
12. Omýt vnitřní stěny zkumavky s asi 200  $\mu$ l hexanu
13. Hexan odfoukat dusíkem do sucha a ihned přidat 40  $\mu$ l pyridinu a 40  $\mu$ l BSTFA
14. Zkumavku uzavřít, promíchat na vortexu 5 sekund a zahřívát v termobloku při 60°C po dobu 35 minut
15. Ochladit, přidat 420  $\mu$ l hexanu a uzavřené uskladnit při -20 °C do doby GC/MS analýzy.

### **3.5. GC/MS analýza**

Analýzy jsou prováděny na kapilární koloně délky 30 m, vnitřní průměr 0,25 mm s nanosenou fází tloušťky 0,25  $\mu$ m obsahující 5 % difenyl a 95 % dimethylpolysiloxanu. Objem nastříkovaného vzorku 1  $\mu$ l

#### **Plynová chromatografie**

Nosný plyn: helium, čistota 5.6

Rychlost průtoku helia: 38 cm.s<sup>-1</sup>

Split poměr 1:30

Proplachovací rozpouštědlo: 2-propanol pro UV spektroskopii

Teplota injektoru: 250 °C

Teplotní program:

Rychlost (°C/min)	Koncová teplota (°C)	Hold time (min)	Koncový čas (min)
0	80	5	5,0
10	160	0	13,00
8	260	0	25,50
35	300	3	29,64

### **Hmotnostní spektrometrie**

EI ionizace

Teplota iontového zdroje: 200 °C

Teplota transfer-line: 275 °C

Emission current: 150 V

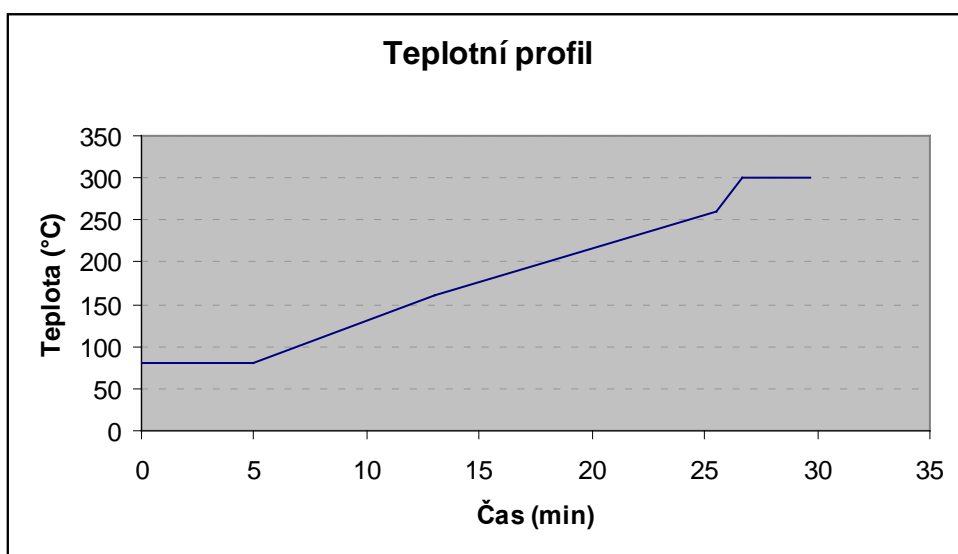
Počet  $\mu$ -scanů: 5 (interval scenování 0,72 s)

Skenování rozsah 50 - 450 amu

## 4. Výsledky

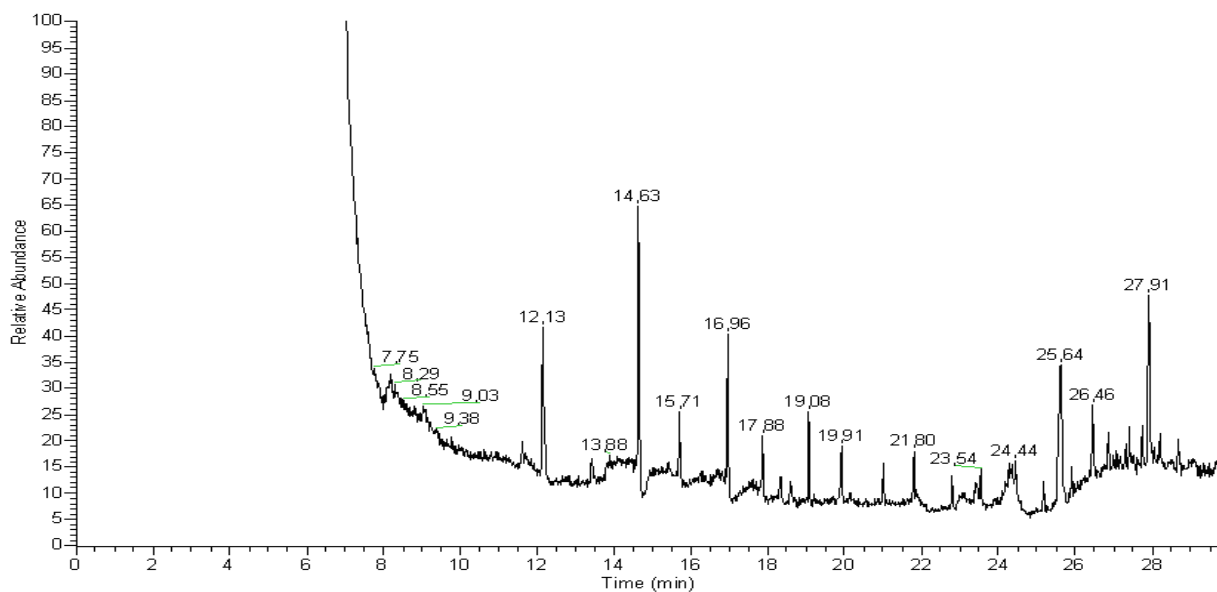
### 4.1. GC/MS analýza

Testovali jsme různé modifikace teplotního profilu na vzorku séra zdravé kontroly a na vzorku séra s přidavkem 1,3 mmol/l 7DHC a 2,68 mmol/l vnitřního standardu 5- $\alpha$ -cholestanu. Jako předlohu jsme si vzali již používaný teplotní profil pro analýzu mastných kyselin v séru. Nejvhodnější se ukázal teplotní profil uvedený na obr. č. 8.

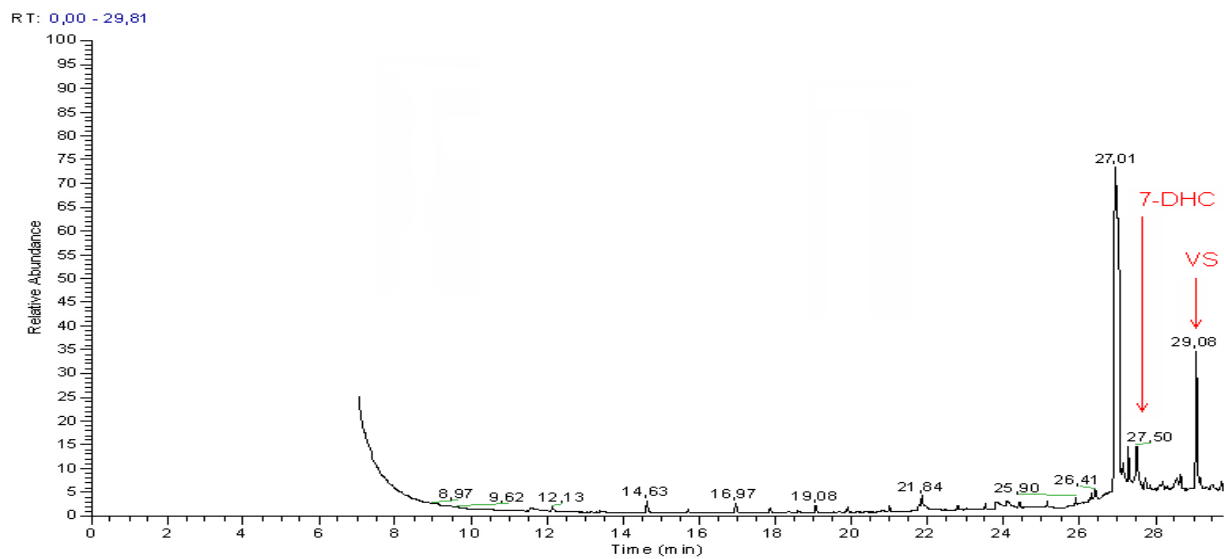


Obr. č. 8: Teplotní profil pro stanovení 7-dehydrocholesterolu na GC/MS

Porovnáním záznamu zdravého kontroly bez přidavku vnitřního standardu a 7-dehydrocholesterolu (obr. 9a) se záznamem vzorku, ke kterému byl přidán vnitřní standard a 7-dehydrocholesterol (obr. 9b) jsme zjistili retenční časy analytů: pro vnitřní standard 29,1 minut a pro 7DHC 27,5 minut. Zjistili jsme také jejich hmotnostní spektra (obr. 10a, 10b).

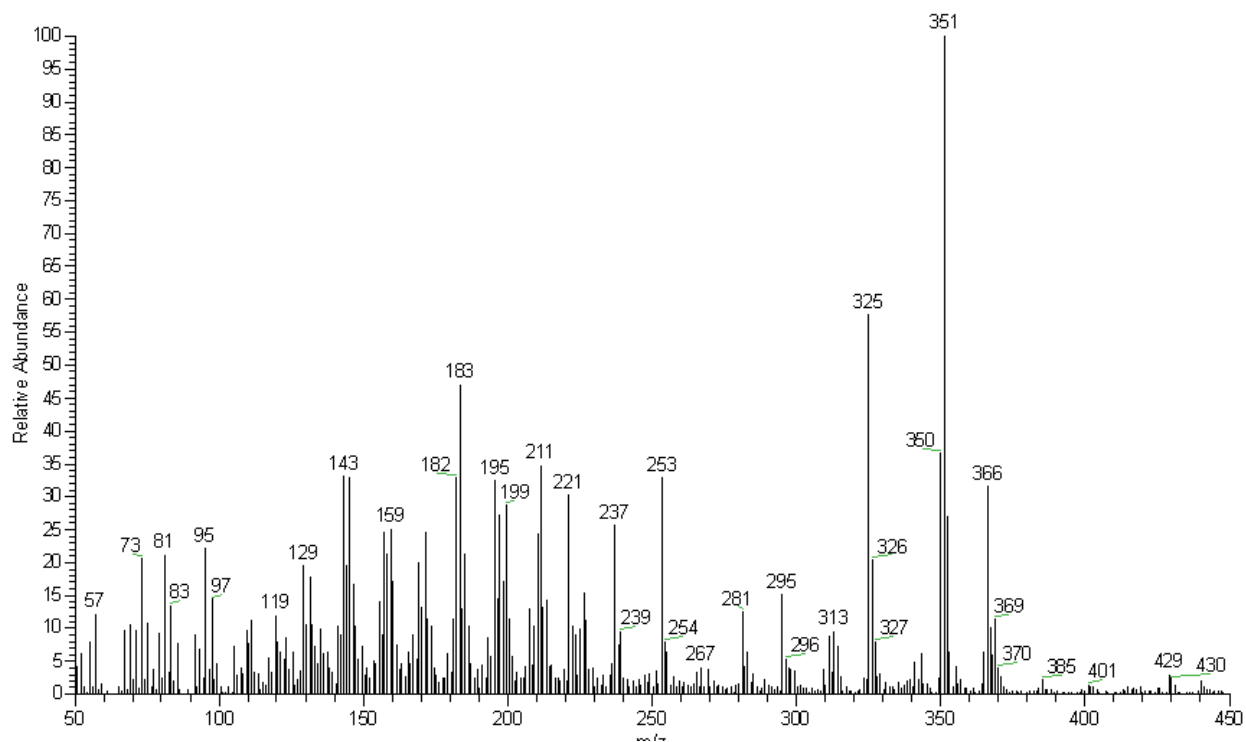


Obr. č. 9a: GC/MS analýza séra zdravé kontroly

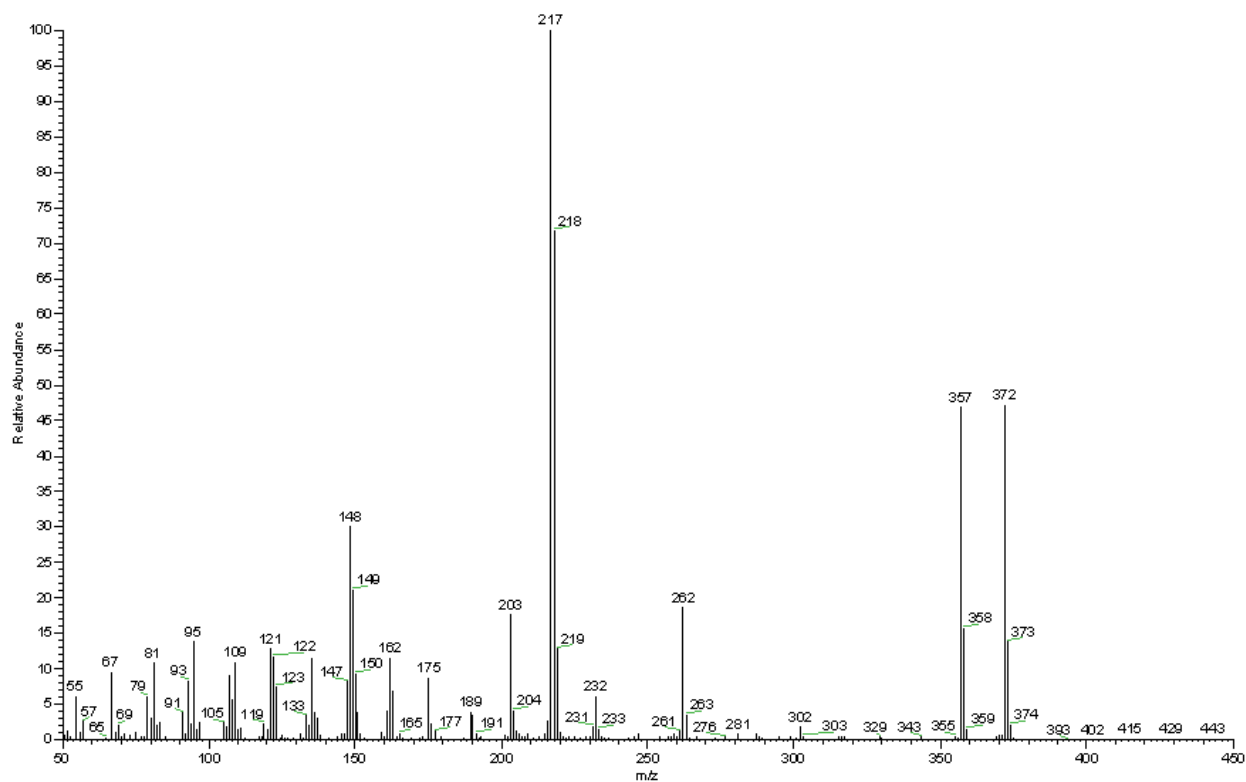


Obr. č. 9b: GC/MS analýza séra zdravé kontroly s přidavkem 7DHC a vnitřního standardu





Obr. č. 10a: Hmotnostní spektrum 7-dehydrocholesterolu



Obr. č. 10b: Hmotnostní spektrum 5- $\alpha$ -cholestanu

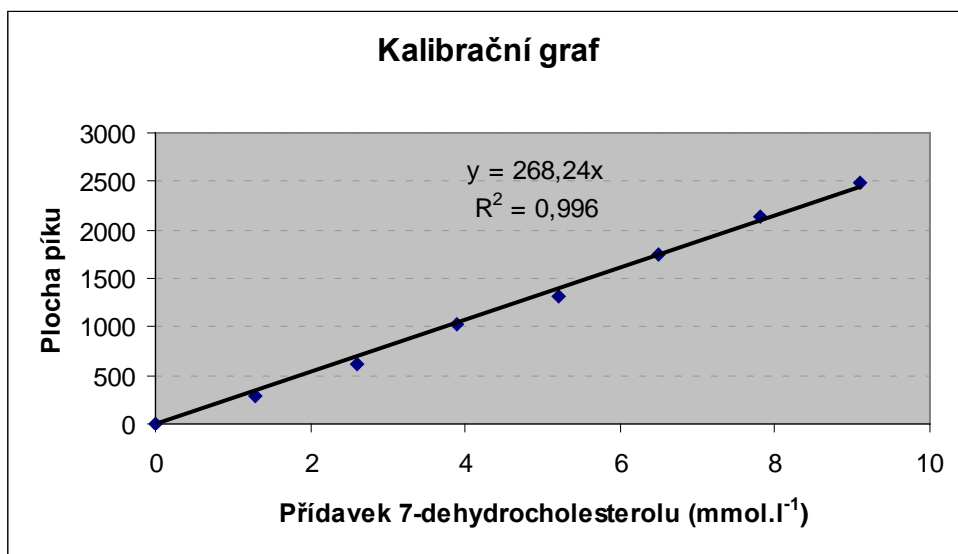
## 4.2. Validace

Při validaci metody jsme zjišťovali následující parametry metody:

- A) Linearitu
- B) Správnost
- C) Mez detekce a kvantifikace
- D) Opakovatelnost
- E) Referenční rozmezí

### 4.2.1. Linearita

Pro zjištění linearity v pracovním rozmezí jsme proměřili vzorky s přidavkem 7DHC v rozmezí 0 – 9,1 mmol.l<sup>-1</sup> (viz obr. 11). Metoda je v pracovním rozsahu lineární.



Obr. č. 11: Kalibrační křivka pro 7-dehydrocholesterolu v séru

### 4.2.2. Mez detekce, mez kvantifikace a opakovatelnost

Na základě velikosti šumu a intenzity signálu 7DHC jsme určili mez detekce a mez kvantifikace, které jsou uvedeny v tabulce č. 1. Pro mez detekce jsme použili trojnásobek šumu a pro mez kvantifikace desetinásobek šumu.

	Mez detekce		Mez kvantifikace	
	$\mu\text{mol.l}^{-1}$	$\mu\text{g.ml}^{-1}$	$\mu\text{mol.l}^{-1}$	$\mu\text{g.ml}^{-1}$
7-dehydrocholesterol	0,47	0,18	1,56	0,6

Tab. č. 1: Mez detekce a mez kvantifikace pro 7-dehydrocholesterol v séru

Opakovatelnost analýzy vzorku na nízké hladině o koncentraci  $1 \text{ mmol.l}^{-1}$  byla 0,82 % (n=20) a vzorku na vysoké hladině o koncentraci  $6 \text{ mmol.l}^{-1}$  byla 1,11 % (n=20).

Dále jsme sledovali vzorky na nízké i vysoké hladině během 1 měsíce uskladněné při  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pokles koncentrace ani na jedné hladině jsme nezaznamenali.

#### 4.2.3. Správnost

Správnost naší metody jsem si ověřila v rámci externí kontroly kvality ze systému ERNDIM (European Research Network for evaluation and improvement of screening, Diagnosis and treatment of Inherited disorders of Metabolism). Použili jsme certifikovaný materiál, jehož deklarovaná koncentrace 7-dehydrocholesterolu je  $122 \mu\text{mol.l}^{-1}$  (deklarované rozmezí  $112 - 132 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ). Výsledky mých opakovaných měření jsou uvedeny v tabulce č. 2.

měření	7DHC [ $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ]
1.	121,3
2.	120,8
3.	119,2
4.	125,5
5.	122,5
6.	124,8
7.	121,1
8.	120,1
9.	118,5
10.	121,5

Tab. č. 2: Stanovení koncentrace 7-dehydrocholesterolu v certifikovaném materiálu.

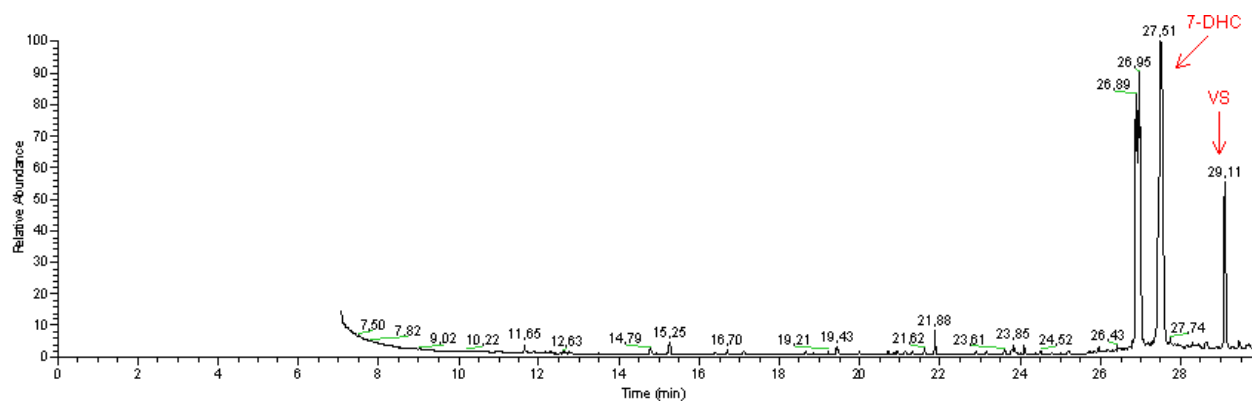
Průměr stanovení koncentrace 7-dehydrocholesterolu je  $121,53 \mu\text{mol.l}^{-1}$ , při cílové hodnotě  $122 \mu\text{mol.l}^{-1}$  a vychýlení metody (bias) je  $-0,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ .

#### 4.2.4. Referenční rozmezí

Referenční rozmezí jsme stanovili na skupině 30 zdravých jedinců. Koncentrace 7-dehydrocholesterolu v séru u nich byla pod mezí detekce (pod  $0,47 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ).

#### 4.2.5. Využití v praxi

Takto vytvořeno metodu jsem použila na vzorky u pacientů s klinickým podezřením na SLOS. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 3. U tří pacientů byla diagnóza SLOS potvrzena (obr. 12).



Obr. č. 12: GC/MS analýza u pacienta se SLOS při záchytu.

Pacient	Koncentrace 7DHC [ $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ]
1	2105,6
2	2074,9
3	788,1
4	nedetekován
5	nedetekován
6	nedetekován
7	nedetekován

Tab. č. 3: Stanovení koncentrace 7-dehydrocholesterolu v séru u pacientů

## 5. Diskuze

Pro stanovení 7DHC jsme zvolili metodu GC/MS, která je dnes přístrojově nejdostupnější a výrazně specifitější a citlivější než plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem. GC/MS se dnes již desítky let rutinně využívá v analytických laboratořích a je to vysoce specifická a robustní technika. Do budoucna se jeví jako vhodnější použití HPLC ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Tato technika je citlivější a nevyžaduje tak komplikovanou přípravu vzorku, ale zatím je pro její vysokou cenu (7-10 mil. Kč) málo rozšířena.

Pro správné chromatografické rozdělení analytů a tedy jejich dobrou kvantifikaci je kritický teplotní profil plynové chromatografie. U naší metody je to dobré rozdělení 7DHC, vnitřního standardu 5- $\alpha$ -cholestan a cholesterolu. Kritickou dvojicí je 7DHC a cholesterol, který je v séru obsažen ve velmi vysokých koncentracích a strukturně je blízký 7DHC. Námí zvoleným teplotním profilem se nám je podařilo dobře oddělit.

Metoda je v pracovním rozsahu lineární, což umožňuje použít jednobodovou kalibraci v sérii. Vzhledem k tomu, že mez detekce 7DHC je  $0,47 \mu\text{mol.l}^{-1}$ , a dle literárně publikovaných údajů<sup>27</sup> je rozhodovací hladina pro diagnózu SLOS  $0,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ , můžeme metodu použít pro diagnostiku SLOS a pro monitorování kompenzace u pacientů se SLOS na léčbě. Na druhé straně nelze tuto metodu použít pro prenatální diagnostiku. Při ní se stanovuje 7DHC v plodové vodě, kde fyziologické koncentrace jsou menší než  $0,013 \mu\text{mol.l}^{-1}$  a koncentrace 7DHC u postižených plodů je od  $0,3 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . Omezení této metody je dáno používaným přístrojem a ionizační technikou, pro prenatální diagnostiku by jsme museli použít citlivější přístroj s chemickou ionizací nebo HPLC ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií.

Metoda je velmi stabilní při opakovatelnosti na nízké i vysoké hladině do 1,5 % a plně vyhovuje použití v klinické biochemii. Vynikající stabilita 7DHC v séru při jeho zamražení na  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  umožňuje, aby v laboratoři byly zpracovávány i vzorky z jiných pracovišť z celé ČR, pro které ÚDMP zajišťuje diagnostiku SLOS.

Koncentrační rozmezí 7DHC v séru pro zdravé kontroly dle literatury<sup>27</sup> je  $0 - 0,4 \mu\text{mol.l}^{-1}$ , což odpovídá našim výsledkům. Koncentrační rozmezí pro pacienty se

SLOS uváděné v literatuře je 0,5 – 2100  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . U našich pacientů se SLOS jsme našli vysoce zvýšené koncentrace 7DHC.

## 6. Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo otestovat metodu na stanovení 7-dehydrocholesterolu v séru nebo plazmě. Navržená metoda byla validována a pro sledovaný metabolit bylo stanoveno referenční rozmezí. Zavedená metoda byla následně použita k vyšetření pacientů s klinickými příznaky suspektními pro SLOS.

V první části jsme vytvořili teplotní profil pro plynovou chromatografii s hmotnostním spektrometrem. Zjistili jsme retenční časy pro 7-dehydrocholesterol, který je 27,5 minuty a pro vnitřní standart 5- $\alpha$ -cholestan, který činil 29,1 minut.

Následně jsme proměřili kalibrační závislost a určili mez detekce a mez kvantifikace. Mez detekce byla 0,47  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  a mez kvantifikace 1,56  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . Opakovatelnost byla pod 1,5 %.

Dále jsme zjistili, že vzorek, který je uskladněn při teplotě -20 °C, byl stabilní po celou dobu měření.

Referenční rozmezí koncentrace 7-dehydrocholesterolu v séru pro naši metodu je do 0,47  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ .

Tuto metodu jsme použili na stanovení vzorků pacientů s klinickým podezřením na SLOS, kde jsme diagnostikovali 3 pacienty se SLOS.

## 7. Literatura

1. HOFFMANN, F., NYHAN, W. et al. *Dědičné metabolické poruchy*. 1. vyd. Praha: Grada, 2006. 416 s. ISBN 80-247-0831-0.
2. ŠŤASTNÁ, S. Screening dědičných metabolických poruch aneb co by měl pediatr vědět o dědičných metabolických poruchách a možnostech jejich diagnostiky. *Pediatric pro praxi*. 2001, roč. 4, č. 2, s. 183-189.
3. HYÁNEK, J. a kol. *Dědičné metabolické poruchy*. 1.vyd. Praha: Avicenum, 1990. 344 s. ISBN 80-201-0064-4.
4. KOŽICH, V., POUPĚTOVÁ, H. Dědičné metabolické poruchy ve fetální medicíně. *Moderní gynekologie a porodnictví*. 2000, roč.9, č. 3, s. 86-90.
5. SCRIVER, CH., BEAUDET, A. et al. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 7. vyd. New York: 1995. 1665 s. ISBN 0-07-113689-4.
6. SMITH-LEMLI-OPITZ-SYNDROME:[online]. 2004 [cit. 2008-03-30]. Dostupný z WWW: <<http://www.humphath.com/Smith-Lemli-Opitz-syndrome>>.
7. ŽIŽKA, J. *Diagnostika syndromů a malformací*. 1. vyd. Praha: Galén, 1994. 414s. ISBN 80-85824-04-3.
8. KELLEY, R. Diagnosis of Smith-Lemli-Opitz syndrome by gas chromatography/mass spectrometry of 7-dehydrocholesterol in plasma, amniotic fluid and cultured skin fibroblasts. *Clinica Chimica Acta* .1995, roč. 15, č. 6, s. 45-58.
9. SMITH-LEMLI-OPITZ/RSH FOUNDATION: *About Smith-Lemli-Opitz/Rsh syndrome* [online]. 2005 [cit. 2008-03-28]. Dostupný z WWW: <<http://www.smithlemliopitz.org/>>.
10. STEINER, R. *Smith-Lemli-Opitz syndrome* [online]. 2007 [cit. 2008-03-27]. Dostupný z WWW: <<http://www.emedicine.com/ped/topic2117.htm>>.
11. WATERHAM, H., WANRERS, D. Biochemical and genetic aspects of 7-dehydrocholesterol reductase and Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2000, roč. 14, č. 9, s. 340 – 356.
12. JIRA, P. et al., Pitfalls in measuring plasma cholesterol in the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Clinical Chemistry*. 1997, roč. 43, č. 1, s. 129-133.
13. SALWAY, J. *Medical biochemistry at a glance*, 2. vyd. Surrey: Blackwell Publishing,



2006. 144 s. ISBN 1-4051-1322-7.
14. JAHNOVÁ, H.: ústní sdělení, 2008.
15. MURRAY, R. et al. *Harperova biochemie*. 4. vyd. Praha: H & H, 2002. 872 s. ISBN 80-7319-013-3.
16. RACEK, J. et al. *Klinická biochemie*. 2. vyd. Praha: Galén, 2006, 329 s. ISBN 80-7262-324-9.
17. VOET, D., KOTYK, A. *Biochemie*. 1. vyd. Praha: Victoria Publishing, 1995. 1325 s. ISBN 80-85605-44-9.
18. KALOUSOVÁ, M. *Patobiochemie*. 1.vyd. Praha: Grada, 2006. 264 s. ISBN 80-247-1522-8.
19. ŠTULÍK, K. a kol. *Analytické separační metody*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2005. 264 s. ISBN 80-246-0852-9.
20. ŠTULÍK, K., FETL, L. *Teorie separačních metod*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1980. 153 s. ISBN 80-351-0914-7.
21. ŠÍMA, J. *Vybrané kapitoly a aplikace plynové chromatografie*. [online]. 2005 [cit.2008-03-27]. Dostupný z WWW: < [http://tomcat.bf.jcu.cz/sima/analyticka\\_chemie/separb.htm](http://tomcat.bf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/separb.htm)>.
22. PACÁKOVÁ, V., FELTL, L. *Retenční indexy v plynové chromatografii*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1986. 231 s. ISBN 80-7314-652-8.
23. SMOLKOVÁ, V., PACÁKOVÁ, L. *Plynová chromatografie I*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1976. 123 s. ISBN 80-7055-365-8.
24. VOLKA, K. a kol. *Analytická chemie II*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1995. 236 s. ISBN 80-7080-227-8.
25. ECKSCHLAGER, K. *Chemometrie*, 1.vyd. Praha: Karolinum, 1991. 156 s. ISBN 80-7066-487-8.
26. ŠEVČÍK, J. *Metodologie měření v analytické chemii*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1996. 140 s. ISBN 80-7184-271-0.
27. BLAU, N., DURAN, M., et al. *Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases*. 2. vyd.. Heidelberg: Springer-Verlag, 2005. 716 s. ISBN 3-540-42542.