

## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

### ODŮVODNĚNÍ VEŘEJNÉ ZAKÁZKY

v souladu s § 156 odst. 1 zákona č. 137/2006 Sb., o veřejných zakázkách,  
ve znění pozdějších předpisů (dále jen „zákon“)

**Zadavatel:** Univerzita Karlova v Praze  
**Sídlo:** Praha 1, Ovocný trh 3/5, 116 36  
**IČ:** 00216208  
**DIČ:** CZ00216208  
**Týká se součásti:** Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
**Sídlo:** Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové 5  
**Osoba oprávněná  
jednat za zadavatele:** Prof. PharmDr. Alexandr Hrabálek, CSc. - děkan

**Název veřejné zakázky:** **Kapalinový chromatograf s hmotnostním detektorem**

Název projektu OP VaVpI: „Revitalizace infrastruktury na FaF UK v HK“, zkráceně REVIFAF, registrační číslo projektu CZ.1.05/4.1.00/11.0254

Název projektu OP VK: „Zvýšení kapacity vědecko-výzkumných týmů Univerzity Karlovy prostřednictvím nových pozic pro absolventy doktorandských studií“, zkráceně Postdoc II UK, registrační číslo projektu CZ.1.07/2.3.00/30.0061

Zadavatel v souladu s ustanovením § 156 odst. 1 zákona a vyhlášky č. 232/2012 Sb. zpracoval a uveřejnil na svém profilu zadavatele toto odůvodnění k výše uvedené nadlimitní veřejné zakázce na služby zadávané formou otevřeného řízení a zveřejněné ve Věstníku veřejných zakázek pod evidenčním číslem 239794 dne 24. 6. 2013.

Toto odůvodnění obsahuje:

- odůvodnění účelnosti veřejné zakázky
- odůvodnění přiměřenosti požadavků na technické kvalifikační předpoklady
- odůvodnění vymezení obchodních a technických podmínek veřejné zakázky ve vztahu k potřebám veřejného zadavatele
- odůvodnění stanovení základních a dílčích hodnotících kritérií a způsobu hodnocení nabídek ve vztahu k potřebám veřejného zadavatele

Odůvodnění je podrobně rozepsáno v příložených tabulkách.

### Odůvodnění účelnosti veřejné zakázky podle § 2 vyhlášky

<p>Veřejný zadavatel popíše změny a) v popisu potřeb, které mají být splněním veřejné zakázky naplněny, b) v popisu předmětu veřejné zakázky, c) vzájemného vztahu předmětu veřejné zakázky a potřeb zadavatele, d) v předpokládaném termínu splnění veřejné zakázky, oproti skutečnostem uvedeným podle § 1.</p>	<p>Oproti skutečnostem uveřejněným v předběžném oznámení došlo ke zpřesnění popisu předmětu veřejné zakázky a předpokládaného termínu splnění VZ, tj.</p> <p>Ad b) Popis předmětu VZ - Předmětem plnění této nadlimitní veřejné zakázky na dodávky je nákup, dodání, instalace, zaškolení obsluhy, zajištění záručního servisu a garance pozáručního servisu sestavy laboratorních přístrojů - HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETR S VYSOKÝM ROZLIŠENÍM A S IONTOVOU MOBILITOU VE SPOJENÍ S ULTRA-VYSOKOÚČINNOU KAPALINOVOU CHROMATOGRAPHIÍ. Kompletní sestava musí zahrnovat hmotnostní spektrometr s vysokým rozlišením pro tandemovou hmotnostní spektrometrii s iontovou mobilitou a dále ultra-vysokoúčinný kapalinový chromatograf jako vstupní zařízení do hmotnostního spektrometru. Součástí sestavy je rovněž PC a specifikovaný licencovaný software, který dovolí sběr a zpracování hmotnostně spektrometrických dat, dále pak vakuový systém, generátor dusíku a záložní zdroj energie. Zařízení musí splňovat veškeré nároky vycházející z technických a bezpečnostních norem platných v ČR pro tento typ zařízení. Součástí plnění je i předání úplné dokumentace k zařízení a prohlášení o shodě.</p> <p>Ad d) Předpokládaný termín splnění VZ – prosinec 2013</p>
<p>Popis rizik souvisejících s plněním veřejné zakázky, která zadavatel zohlednil při stanovení zadávacích podmínek. Jde zejména o rizika nerealizace veřejné zakázky, prodlení s plněním veřejné zakázky, snížení kvality plnění veřejné zakázky, vynaložení dalších finančních nákladů.</p>	<p>Rizikem, které zadavatel zohlednil při stanovení zadávacích podmínek, je především nerealizace veřejné zakázky a nezajištění dodavatele pro požadované plnění. Aby zadavatel eliminoval rizika spojená s plněním veřejné zakázky, tzn., aby byl schopen zajistit požadované plnění pro své účely řádně, včas a v potřebném rozsahu, detailně zpracoval zadávací podmínky a stanovil jako jediné hodnotící kritérium nejnižší nabídkovou cenu.</p>
<p>Veřejný zadavatel může vymežit varianty naplnění potřeby a zdůvodnění zvolené alternativy veřejné zakázky.</p>	
<p>Veřejný zadavatel může vymežit, do jaké míry ovlivní veřejná zakázka plnění plánovaného cíle.</p>	
<p>Zadavatel může uvést další informace odůvodňující účelnost veřejné zakázky.</p>	

**Odůvodnění požadavků na technické kvalifikační předpoklady pro plnění veřejné zakázky na dodávky podle § 3 odst. 1 vyhlášky**

Veřejný zadavatel odůvodní přiměřenost požadavků na technické kvalifikační předpoklady ve vztahu k předmětu veřejné zakázky a ve vztahu k rizikům souvisejícím s plněním veřejné zakázky

<p>Odůvodnění přiměřenosti požadavků na seznam významných dodávek.</p> <p>(Veřejný zadavatel povinně vyplní, pokud požadovaná finanční hodnota všech významných dodávek činí v souhrnu minimálně trojnásobek předpokládané hodnoty veřejné zakázky.)</p>	<p>Požadavky zadavatele jsou přiměřené, požadovaná finanční hodnota všech významných služeb nečiní v souhrnu trojnásobek předpokládané hodnoty veřejné zakázky (souhrn fin.objemů referenčních zakázek 3 mil. Kč, předpokládaná hodnota VZ 10 389 161,- Kč).</p>
<p>Odůvodnění přiměřenosti požadavku na předložení seznamu techniků či technických útvarů.</p> <p>(Veřejný zadavatel povinně vyplní, pokud požaduje předložení seznamu více než tří techniků nebo technických útvarů.)</p>	<p>Nepožadováno</p>
<p>Odůvodnění přiměřenosti požadavku na předložení popisu technického vybavení a opatření používaných dodavatelem k zajištění jakosti a popis zařízení či vybavení dodavatele určeného k provádění výzkumu.</p>	<p>Nepožadováno</p>
<p>Odůvodnění přiměřenosti požadavku na provedení kontroly výrobní kapacity veřejným zadavatelem nebo jinou osobou jeho jménem, případně provedení kontroly opatření týkajících se zabezpečení jakosti a výzkumu.</p>	<p>Nepožadováno</p>
<p>Odůvodnění přiměřenosti požadavku na předložení vzorků, popisů nebo fotografií zboží určeného k dodání.</p>	<p>Zadavatel požaduje předložení popisu zboží určeného k dodání, konkrétní technické specifikace včetně specifikace výrobce u veškerého zboží, které je předmětem veřejné zakázky, a to z toho důvodu, aby mohl porovnat splnění požadavků zadání u nabízeného zboží.</p>
<p>Odůvodnění přiměřenosti požadavku na předložení dokladu prokazujícího shodu požadovaného výrobku vydaného příslušným orgánem.</p>	<p>Nepožadováno</p>

**Odůvodnění přiměřenosti požadavků na technické kvalifikační předpoklady pro plnění veřejné zakázky na služby podle § 3 odst. 2 vyhlášky**

Veřejný zadavatel odůvodní přiměřenost požadavků na technické kvalifikační předpoklady ve vztahu k předmětu veřejné zakázky a k rizikům souvisejícím s plněním veřejné zakázky

Odůvodnění přiměřenosti požadavků na seznam významných služeb. (Zadavatel povinně vyplní, pokud požadovaná finanční hodnota všech významných služeb činí v souhrnu minimálně trojnásobek předpokládané hodnoty veřejné zakázky).	Nepožadováno
Odůvodnění přiměřenosti požadavku na předložení seznamu techniků či technických útvarů. (Zadavatel povinně vyplní, pokud požaduje předložení seznamu více než tří techniků nebo technických útvarů.)	Nepožadováno
Odůvodnění přiměřenosti požadavku na předložení popisu technického vybavení a opatření používaných dodavatelem k zajištění jakosti a popis zařízení či vybavení dodavatele určeného k provádění výzkumu.	Nepožadováno
Odůvodnění přiměřenosti požadavku na provedení kontroly technické kapacity veřejným zadavatelem nebo jinou osobou jeho jménem, případně provedení kontroly opatření týkajících se zabezpečení jakosti a výzkumu.	Nepožadováno
Odůvodnění přiměřenosti požadavku na předložení osvědčení o vzdělání a odborné kvalifikaci dodavatele nebo vedoucích zaměstnanců dodavatele nebo osob v obdobném postavení a osob odpovědných za poskytování příslušných služeb. (Zadavatel povinně vyplní, pokud požaduje předložení osvědčení o vyšším stupni vzdělání než je středoškolské s maturitou, nebo osvědčení o odborné kvalifikaci delší než tři roky.)	Nepožadováno
Odůvodnění přiměřenosti požadavku na předložení přehledu průměrného ročního počtu zaměstnanců dodavatele či jiných osob podílejících se na plnění zakázek podobného charakteru a počtu vedoucích zaměstnanců dodavatele nebo osob v obdobném postavení.	Nepožadováno
Odůvodnění přiměřenosti požadavku na předložení přehledu nástrojů či pomůcek, provozních a technických zařízení, které bude mít dodavatel při plnění veřejné zakázky k dispozici.	Nepožadováno

<b>Odůvodnění přiměřenosti požadavků na technické kvalifikační předpoklady pro plnění veřejné zakázky na stavební práce podle § 3 odst. 3 vyhlášky</b> Veřejný zadavatel odůvodní přiměřenost požadavků na technické kvalifikační předpoklady ve vztahu k předmětu veřejné zakázky a k rizikům souvisejícím s plněním veřejné zakázky	
Odůvodnění přiměřenosti požadavku na předložení seznamu stavebních prací. (Zadavatel povinně vyplní, pokud požaduje předložení seznamu stavebních prací, ze kterého bude vyplývat, že finanční hodnota uvedených stavebních prací je v souhrnu minimálně dvojnásobek předpokládané hodnoty veřejné zakázky.)	Nepožadováno
Odůvodnění přiměřenosti požadavku na předložení seznamu techniků či technických útvarů. (Zadavatel povinně vyplní, pokud požaduje předložení seznamu více než tří techniků nebo technických útvarů.)	Nepožadováno
Odůvodnění přiměřenosti požadavku na předložení osvědčení o vzdělání a odborné kvalifikaci dodavatele nebo vedoucích zaměstnanců dodavatele nebo osob v obdobném postavení a osob odpovědných za vedení realizace stavebních prací. (Zadavatel povinně vyplní, pokud požaduje osvědčení o odborné kvalifikaci delší než 5 let.)	Nepožadováno
Odůvodnění požadavku na předložení přehledu průměrného ročního počtu zaměstnanců dodavatele či nebo jiných osob podílejících se na plnění zakázek podobného charakteru a počtu vedoucích zaměstnanců dodavatele nebo osob v obdobném postavení.	Nepožadováno
Odůvodnění přiměřenosti požadavku na předložení přehledu nástrojů nebo pomůcek, provozních a technických zařízení, které bude mít dodavatel při plnění veřejné zakázky k dispozici.	Nepožadováno

**Odůvodnění vymezení obchodních podmínek veřejné zakázky na dodávky a veřejné zakázky na služby podle § 4 vyhlášky**

Odůvodnění vymezení obchodní podmínky stanovící delší lhůtu splatnosti faktur než 30 dnů.	Nepožadována delší lhůta splatnosti faktur než 30 dnů
Odůvodnění vymezení obchodní podmínky stanovící požadavek na pojištění odpovědnosti za škodu způsobenou dodavatelem třetím osobám ve výši přesahující dvojnásobek předpokládané hodnoty veřejné zakázky.	Nepožadováno
Odůvodnění vymezení obchodní podmínky stanovící požadavek bankovní záruky vyšší než 5% ceny veřejné zakázky.	Nepožadováno
Odůvodnění vymezení obchodní podmínky stanovící záruční lhůtu delší než 24 měsíců.	Nepožadováno
Odůvodnění vymezení obchodní podmínky stanovící smluvní pokutu za prodlení dodavatele vyšší než 0,2% z předpokládané hodnoty veřejné zakázky za každý den prodlení.	Nepožadována vyšší pokuta
Odůvodnění vymezení obchodní podmínky stanovící smluvní pokutu za prodlení zadavatele s úhradou faktur vyšší než 0,05% z dlužné částky za každý den prodlení.	Nepožadováno
Odůvodnění vymezení dalších obchodních podmínek dle § 5 odst. 2. Veřejný zadavatel odůvodní vymezení obchodních podmínek veřejné zakázky na dodávky a veřejné zakázky na služby ve vztahu ke svým potřebám a k jejich rizikům souvisejícím s plněním veřejné zakázky.	



**Odůvodnění stanovení základních a dílčích hodnotících kritérií podle § 6 vyhlášky**

<b>Hodnotící kritérium</b>	<b>Odůvodnění</b>
nejnižší nabídková cena	Vzhledem k dostatečně přesným technickým specifikacím v zadání veřejné zakázky považuje zadavatel hodnocení na základě nejnižší nabídkové ceny za nejvhodnější a nejtransparentnější.



<b>Odůvodnění předpokládané hodnoty veřejné zakázky podle § 7 vyhlášky</b>	
<b>Hodnota</b>	<b>Odůvodnění</b>
10 389 161,- Kč	Nejedná se o významnou veřejnou zakázku.



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

### ODŮVODNĚNÍ VEŘEJNÉ ZAKÁZKY

Příloha:

Odůvodnění vymezení technických podmínek veřejné zakázky podle § 5 vyhlášky

### **HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETR S VYSOKÝM ROZLIŠENÍM A S IONTOVOU MOBILITOU VE SPOJENÍ S ULTRA-VYSOKOÚČINNOU KAPALINOVOU CHROMATOGRÁFIÍ**

**Tato veřejná zakázka souvisí s realizací projektů:**

- OP VaVpl: „Revitalizace infrastruktury na FaF UK v HK“, zkráceně REVIFAF, registrační číslo projektu CZ.1.05/4.1.00/11.0254
- OP VK: „Zvýšení kapacity vědecko-výzkumných týmů Univerzity Karlovy prostřednictvím nových pozic pro absolventy doktorandských studií“, zkráceně Postdoc II UK, registrační číslo projektu CZ.1.07/2.3.00/30.0061

V rámci synergie obou operačních projektů bude pořízena sestava laboratorních přístrojů - HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETR S VYSOKÝM ROZLIŠENÍM A S IONTOVOU MOBILITOU VE SPOJENÍ S ULTRA-VYSOKOÚČINNOU KAPALINOVOU CHROMATOGRÁFIÍ.

Cílem projektu Postdoc II UK je podpora akademických a ostatních pracovníků VŠ, pracovníků vědecko-výzkumných organizací a studentů VŠ prostřednictvím absolventů doktorských studijních programů zapojených do činnosti výzkumných a vývojových týmů na postdoktorandských pozicích s důrazem na internacionalizaci, multidisciplinaritu, intersektorální mobilitu a spolupráci. Nákup kapalinového chromatografu - UHPLC je nezbytnou podmínkou úspěšného řešení projektu, který je zaměřen na podporu vytváření kvalitních týmů výzkumu a vývoje a jejich dalšího rozvoje prostřednictvím vzniku pracovních pozic pro začínající vědce (držitele titulu PhD nebo jeho ekvivalentu).

Cílem projektu REVIFAF je zlepšení podmínek pro vzdělání a s ním spojeného výzkumu na Univerzitě Karlově v Praze, konkrétně její součásti Farmaceutické fakultě UK v Hradci Králové. Jedním z dílčích cílů projektu REVIFAF je pořízení špičkového hmotnostního spektrometru s vysokým rozlišením (HRMS) pro podpoření vysoce kvalitní výuky a výzkumu, a tím i zvýšení atraktivity pracoviště pro mezinárodní spolupráci a pro spolupráci se soukromým sektorem. Tento spektrometr, jak je uvedeno



EVROPSKÁ UNIE  
EVROPSKÝ FOND PRO REGIONÁLNÍ ROZVOJ  
INVESTICE DO VAŠÍ BUDOUCNOSTI



## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

v projektové dokumentaci: „**by pod vedením zkušeného akademického pracovníka měl být využíván studenty doktorských programů a postdoktorandy pro experimentální výzkumnou práci s cílem získat kvalitní výsledky jako podklad odborných publikací a disertačních prací tak, aby svou kvalitou uspěly i v náročném mezinárodním měřítku.**“ Aby mohl být naplněn výše uvedený cíl projektu, je třeba pořízení špičkové instrumentace v oboru hmotnostní spektrometrie, protože jedině tak je možné zaručit získání originálních vědecko-výzkumných výsledků splňujících náročná kritéria vyžadovaná na mezinárodním výzkumném poli (např. publikování v prestižní mezinárodní odborné literatuře). Zapojení takovéto instrumentace do výzkumných projektů Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy umožní řešení nejsložitějších výzkumných úkolů a problematik, kde dosud dostupná instrumentace tandemové hmotnostní spektrometrie s nízkým rozlišením, ale i jiná pokročilejší instrumentace selhává a neposkytuje požadované výsledky. Pracovištěm na Faf tak bude umožněno provádění analýz dosud nedostupných, čímž dojde k významnému zvýšení kvality vědecko-výzkumné práce a následně i publikační aktivity a prestiže pracoviště.

Pro výše uvedené účely musí nově pořizovaná instrumentace splňovat řadu náročných požadavků. Základním úkolem hmotnostního spektrometru je získání iontů analyzovaných látek a jejich separace podle poměru hmotnosti ku náboji ( $m/z$ ). Ke vzniku iontů dochází v iontovém zdroji, nejčastěji s použitím měkkých ionizačních technik, jako je ionizace elektrosprejem (ESI) a chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI). K převodu do plynné fáze je zapotřebí také dusíku, který je obvykle získáván s využitím generátoru. Kromě iontového zdroje je důležitá iontová optika, která slouží k fokusaci iontů a k jejich efektivnímu transportu do analyzátoru. Tato by měla kromě transportu iontů zajistit také odstranění balastních látek v co nejvyšší možné míře. Vzniklé ionty jsou pak rozděleny podle poměru  $m/z$  v analyzátoru za přítomnosti vakua se správností a přesností hmoty odpovídající danému typu analyzátoru. Interpretací výsledků lze získat informaci o kvalitativním složení a o kvantitativním zastoupení látek. Čím je však matrice vzorku složitější, počet analytů vyšší a jejich koncentrace nižší, tím je tento úkol náročnější. Takovými maticemi jsou materiály běžně studované v rámci vědeckých projektů na Faf, jako např. biologické materiály (krev, sérum, moč, tkáň), rostlinné materiály nebo environmentální vzorky (např. odpadní vody). Komplikace typu interference s látkami pocházejícími z matrice, nedostačující citlivost a selektivita, nedostatečné rozlišení látek se stejnou nominální hmotností nebo dokonce se stejnou monoizotopickou molekulovou hmotností v případě isomerních látek jsou poměrně běžnými jevy při analýze těchto



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

složitých matic a značně limitují řešení některých typů projektů. Proto se hmotnostní spektrometrie nejčastěji používá ve spojení se separačními technikami, zejména pak s kapalinovou chromatografií (LC). Kapalinová chromatografie umožňuje separaci komplexních směsí, a tak zjednodušuje práci s daty získanými z hmotnostního spektrometru. Je-li totiž komplexní vzorek analyzován necílenou analýzou pouze hmotnostní spektrometrií, tzv. metodou přímé infúze, získaná data jsou velice komplexní a jejich interpretace je velice složitá. Hledání a identifikace minoritních látek vedle látek vyskytujících se v několikanásobně vyšších koncentracích je tak prakticky téměř nemožné, zejména opět pokud jde o necílený typ analýzy. S využitím separační techniky lze pak tuto interpretaci významně usnadnit, nebo lze oddělit některé složky matrice a zvýšit tak selektivitu metody, citlivost a případně omezit tzv. maticové efekty, které mají významný negativní vliv na kvantifikaci. Čím je tato separace účinnější, tím kvalitnější jsou získaná finální data. Proto se metodou volby stala technika ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC). Kromě již výše uvedené vysoké separační účinnosti poskytuje tato metoda také mnohé další výhody, jako jsou daleko kratší časy analýzy, lepší rozlišení píků či citlivost a nižší spotřeba rozpouštědel ve srovnání s konvenčními LC technikami. Metoda se tak stává daleko ekologičtější a ekonomicky výhodnější.

Vývoj v oblasti hmotnostní spektrometrie jde také velmi rychle kupředu a moderní metody hmotnostní spektrometrie nyní poskytují širší možnosti a flexibilitu, jak řešit analýzu komplexních vzorků. Pro špičkový a originální výzkum tedy nepostačují běžně dostupné řadové přístroje, které se hodí spíše pro rutinní měření na komerčních pracovištích, ale pouze instrumentace umožňující co největší flexibilitu při řešení i těch nejsložitějších vědecko-výzkumných úkolů. Dnes již základními požadavky na hmotnostní spektrometry s vysokým rozlišením jsou chyba měření molekulové hmotnosti < 1 ppm, rozlišení 40.000 (FWHM) a možnost provádění MS/MS experimentů s využitím tandemových hmotnostních spektrometrů. Tyto parametry umožňují identifikaci látek na základě určení sumárního vzorce, izotopického složení a fragmentačních spekter. Díky vysokému rozlišení je docíleno vysoké selektivity a snížení rizika případných interferencí. Pro spojení se separačními technikami je dále velmi důležitá také rychlost vlastního analyzátoru, neboť analyty eluované z chromatografické UHPLC kolony ve formě úzkého píku musí dále být spolehlivě detekovány. Všem výše uvedeným požadavkům v současné době nejlépe vyhovují hybridní analyzátory spojující quadropol a analyzátor doby letu (Q-TOF). To však v mnoha aplikacích stále nejsou dostačující parametry.

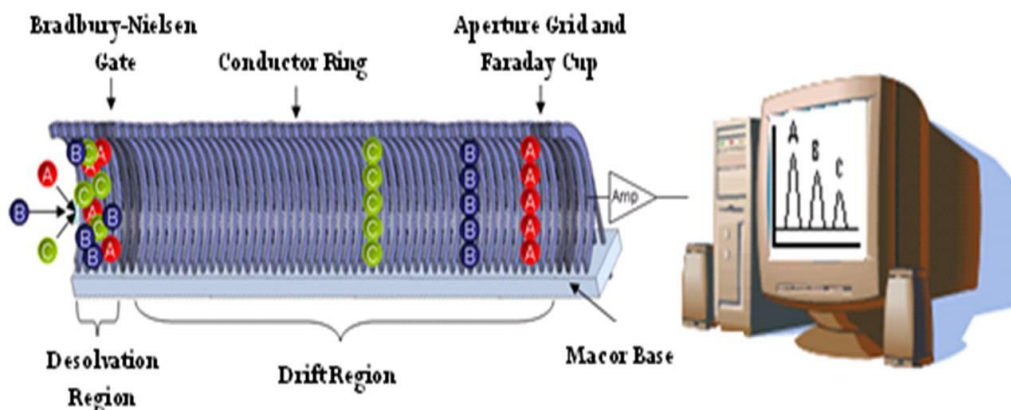


EVROPSKÁ UNIE  
EVROPSKÝ FOND PRO REGIONÁLNÍ ROZVOJ  
INVESTICE DO VAŠÍ BUDOUCNOSTI



## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Nejnovějším směrem v oblasti hmotnostní spektrometrie je **třetí rozměr separace**. Tato separace je umožněna **na základě iontové mobility**, kdy vzniklé ionty jsou separovány v plynné fázi podle odlišnosti v tvaru a ve velikosti molekuly (jak je uvedeno na následujícím obrázku pro ionty A, B, C).



Tento třetí rozměr má významný dopad, jak při identifikaci, tak při selektivní kvantifikaci látek ve složitých maticích. Praktické aspekty zdůvodňující potřebu iontové mobility pro řešení složitých vědecko-výzkumných úkolů jsou shrnuty a diskutovány v následujících bodech:

### (1) Odstranění nežádoucích vlivů matrice.

Jedním z nejzávažnějších problémů při kvantifikaci látek přítomných v komplexních maticích jsou interference vzniklé působením rušivých látek pocházejících z této matrice. I při použití vysokého rozlišení nemusí dojít ke kompletnímu oddělení analytu a interferující látky z matrice, která je svojí molekulovou hmotností velmi blízká sledovanému analytu. Tento problém lze odstranit zmenšením izolační šířky při extrakci iontového chromatogramu pro kvantifikaci, čímž ale zároveň dojde ke snížení citlivosti. **Pomocí iontové mobility je možné separovat takové interferující látky a získat tak lepší selektivitu při zachování citlivosti měření.**

Využití tohoto aspektu pro výzkumné projekty na Faf je klíčové, neboť typy komplexních matic využívané v našich vědeckých studiích obsahující nízké koncentrace biologicky aktivních látek, jejich metabolitů apod. jsou prakticky vždy zatíženy těmito nežádoucími vlivy matrice.



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

### (2) Separace izobarických iontů.

Při práci s biologickými systémy je analytické hodnocení často komplikováno vysokou variabilitou sledovaných analytů, ale daleko větším analytickým problémem jsou tzv. izobarické látky. Jedná se o látky, které mají stejnou monoizotopickou molekulovou hmotnost a také stejný sumární vzorec, ale liší se pouze polohou určitých funkčních skupin či jejich typem. Separace takových látek může v některých případech být řešena s využitím předřazených separačních technik. Pokud však látky nejsou oddělitelné separačními technikami (např. chromatografickými), neexistuje možnost jejich separace s využitím hmotnostní spektrometrie (MS) ani tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS) neboť výsledný záznam bude stále kombinovaným záznamem obou látek. Není tedy možné říci, který ze dvou isomerů a v jakém množství je přítomen v analyzovaném vzorku. **Separaci těchto látek však umožňuje třetí separační dimenze, a to separace látek s využitím iontové mobility získaných iontů, které jsou pak separovány podle tvaru a velikosti molekul.** Mnoho současných studií na Faf se zabývá různými látkami ze skupiny antioxidantů. Mezi ně patří přírodní látky ze skupiny flavonoidů. Právě tyto látky jsou typické výskytem mnoha isomerních struktur, často obtížně dělitelnými chromatografickými technikami z důvodu strukturní podobnosti a variability těchto isomerních struktur. Jejich separace pomocí iontové mobility již byla v odborné literatuře popsána, z čehož jasně vyplývají pozitiva a přínosy možností využití iontové mobility ve stávajících výzkumných projektech Faf.

### (3) Zvýšení celkové účinnosti separačního procesu a získání dalšího rozměru dat.

Pro účinnou separaci, identifikaci a kvantifikaci látek v komplexních směsích je důležitá vysoká separační účinnost a kombinace co nejvíce identifikačních údajů, které lze ze záznamu získat. Při použití předřazené chromatografické separační techniky se tedy jedná o následující rozměry separace a identifikační charakteristiky:

- chromatografická separace → **retenční čas**
- iontově mobilní separace → **migrační čas**
- hmotnostně spektrometrická separace podle poměru  $m/z$  → **přesná a správná hmota iontů prekurzorů i fragmentů** a dále intenzita odezvy, která slouží pro kvantitativní hodnocení



EVROPSKÁ UNIE  
EVROPSKÝ FOND PRO REGIONÁLNÍ ROZVOJ  
INVESTICE DO VAŠÍ BUDOUCNOSTI

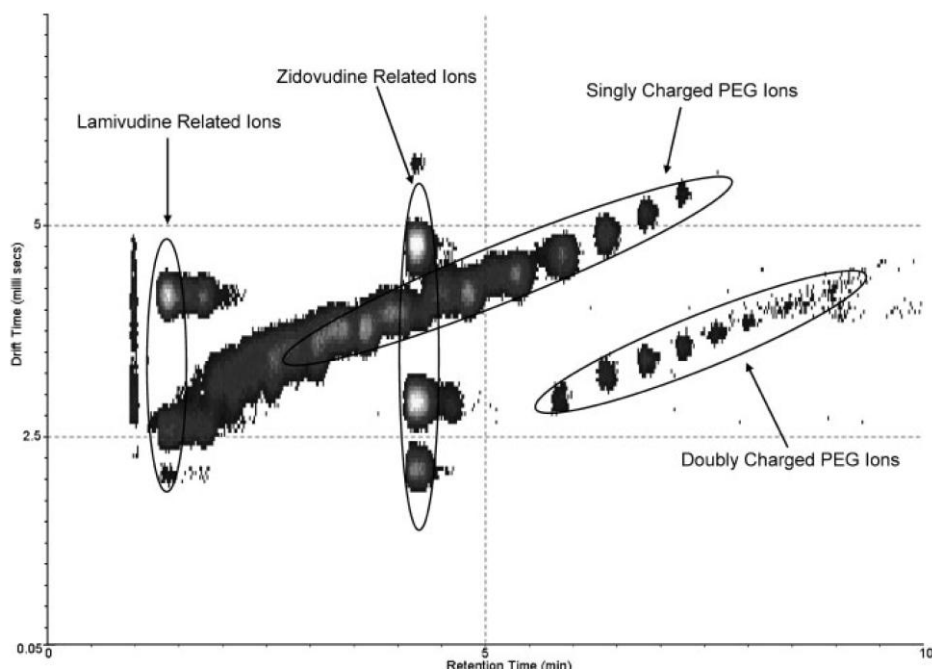


OP Výzkum a vývoj  
pro inovace

## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Získání třetího rozměru separace pomocí iontové mobility umožňuje např. snazší interpretaci spekter a určení struktur látek v případě, kdy dojde ke koeluci ať již dvou analytů nebo analytu a interferující látky z matrice. Tento způsob využití iontové mobility nalezne široké uplatnění při identifikaci přírodních látek v rostlinných extraktech, které obsahují vysoké množství komponent, jejichž kompletní chromatografická separace je prakticky nemožná. Dále bude významně usnadněna identifikace metabolitů biologicky aktivních látek při farmakokinetických studiích.

Podobně může iontová mobilita napomoci při detekci stopového obsahu nečistot v léčivých přípravcích. Detekce těchto stopových koncentrací je v mnoha případech komplikována vysokými koncentracemi pomocných látek použitých pro tvorbu léčivého přípravku. Příklad možnosti využití iontové mobility pro takový účel, kdy dojde k oddělení účinných látek lamivudinu nebo zidovudinu od pomocných látek typu PEG pomocí iontové mobility, je uveden na následujícím záznamu (převzato ze C. Eckers et al., Rapid Commun. Mass Spectrom. 21 (2007) 1255):



#### (4) Využití protonace iontů těžé látky na různých místech.

Při procesu ionizace v iontovém zdroji hmotnostního spektrometru dochází k protonaci molekuly v kladném modu ionizace a k její deprotonaci v záporném modu ionizace. K protonaci molekuly může



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

docházet na jednom nebo na více místech u molekuly téže látky, **což lze dále využít pro zvýšení selektivity, pokud je možné tyto dvě protonované molekuly oddělit. Iontová mobilita v některých případech takovou separaci umožňuje.** Selektivita je důležitým parametrem, jak při identifikaci látek pomocí hmotnostní spektrometrie, tak při jejich kvantifikaci. Pro kvantifikaci látek je často využíván velmi selektivní experiment – monitorování vybraného iontového přechodu (selected reaction monitoring, SRM). Takový iontový přechod by měl být charakteristický pro danou strukturu látky, protože jde o selektivní přechod vybraného prekurzoru na vybraný produktový iont (fragment). Pokud má být dále zvýšena selektivita kvantifikace i ve složitých maticích, jsou takové SRM přechody pro kvantifikaci vyžadovány dva a je dále počítán také jejich poměr. Mnohé látky však při fragmentaci poskytují pouze jeden výrazný fragment, s jehož využitím lze provést citlivou kvantifikaci. Další fragmenty přítomné ve spektru mohou poskytovat až o řád či více nižší citlivost, což nežádoucím způsobem zvyšuje hodnoty LOQ (limitu kvantifikace metody) a následně snižuje citlivost vyvíjené metody. Využití parametru iontové mobility rozšiřuje možnosti využití SRM přístupu kvantifikace. **Pro hodnocení tak může být použit stejný iontový přechod, který ale vychází z různých míst protonace molekuly. Tím dojde k zajištění jak dostatečné citlivosti, tak selektivity metody.** Tento způsob zvýšení selektivity a citlivosti metody může být velmi užitečný pro stávající i budoucí projekty Faf. V minulosti byla právě nízká citlivost dostupných stávajících metod komplikací či dokonce limitujícím faktorem některých projektů.

### (5) Fragmentace látek s následnou iontově mobilní separací vzniklých produktových iontů.

Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS) s vysokým rozlišením využívající prekurzorových iontů pro fragmentaci a získání produktových iontů, které jsou charakteristické pro danou látku a slouží k objasnění její struktury, je nezbytným nástrojem pro identifikaci látek. **Uspořádání s iontovou mobilitou pak umožňuje daleko jednoznačnější identifikaci neznámých látek s využitím údaje o přesné a správné hmotě a mobilního rozdělení fragmentů vzniklých v kolizní cele.** Pro provádění takových experimentů je však nutné, aby provedení separace s využitím iontové mobility bylo možné mezi dvěma analyzátoři. Dále je nutná přítomnost nezávisle programovatelné třísektorové kolizní cely skládající se ze dvou kolizních cel a iontové mobility umístěné mezi oběma kolizními celami. Tento typ iontové mobility je pak nazýván travelling wave ion mobility spektrometry (TWIMS). Jiné uspořádání nedovoluje tuto mobilní separaci fragmentů vzniklých po selekci



EVROPSKÁ UNIE  
EVROPSKÝ FOND PRO REGIONÁLNÍ ROZVOJ  
INVESTICE DO VAŠÍ BUDOUCNOSTI







evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

vybraného prekursoru. Spolehlivá identifikace neznámých látek přítomných ve vzorcích ve stopových množstvích je pro analytiku neustálou výzvou. V těchto případech není možné použít klasické identifikační techniky, jako je IČ nebo NMR. Samotná hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením nemusí poskytnout dostatečně kvalitní spektra a všechny reprezentativní fragmenty podporující určení a potvrzení struktury neznámé látky. Navíc může být daleko snazší rozdělit pomocí iontové mobility vzniklé fragmenty, neboť změna ve srážkovém průřezu iontu mezi dvěma isobarickými látkami může být větší u fragmentů než u vlastní protonované molekuly. Proto způsob identifikace využívající separace pomocí iontové mobility fragmentů může tedy být naprosto klíčový při popisu nových minoritních metabolitů vznikajících při biologických pokusech s novými typy léčiv nebo při použití nových lékových forem. Podobně, identifikace minoritních obsahových látek léčivých rostlin je často problematická díky přítomnosti širokého množství dalších komponent, a proto možnost mobilní separace fragmentů specificky vybraného prekursoru je unikátním přístupem k jednoznačnému určování těchto struktur.

### (6) Měření efektivních srážkových průřezů iontů.

Srážkový průřez iontu (collision cross-section, CCS) je reprezentován efektivní plochou pro interakci individuálního iontu a neutrálního plynu, přes který tento iont cestuje. **CCS je důležitou rozlišující charakteristikou iontu v plynné fázi a má přímý vztah k jeho chemické struktuře a trojrozměrné konformaci. Ovlivňuje také mobilitu iontu, a proto ionty mohou být efektivně separovány podle CCS s využitím iontové mobility. Hodnoty CCS pak mohou být pomocí iontové mobility měřeny.** Protože k měření CCS dochází v plynné fázi, nejsou tyto experimenty ovlivněny maticí vzorku a jsou tak přenositelné mezi jednotlivými přístroji a různými experimentálními podmínkami. Těchto údajů lze využít pro další zvýšení selektivity identifikace neznámých látek.

### (7) Možnost další fragmentace mobilně rozdělených fragmentů.

K dalšímu zvýšení selektivity identifikace látek a k napodobení experimentu MS<sup>3</sup> pak slouží možnost fragmentace již mobilně rozdělených fragmentů prekursoru vybraného prvním analyzátozem. Také pro provádění těchto experimentů je nutné umístění iontové mobility mezi dvěma analyzátozem a přítomnost nezávisle programovatelné třísektorové kolizní cely skládající se ze dvou kolizních cel a iontové mobility umístěné mezi oběma kolizními celami. V této kolizní cele pak dojde nejprve



EVROPSKÁ UNIE  
EVROPSKÝ FOND PRO REGIONÁLNÍ ROZVOJ  
INVESTICE DO VAŠÍ BUDOUCNOSTI



## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

k fragmentaci vybraného prekursoru, vzniklé fragmenty jsou pak rozděleny pomocí iontové mobility a poté znovu fragmentovány. Tím dojde k získání detailnějších fragmentačních spekter důležitých pro ověření identity látky a k potvrzení předpokládaných struktur vzniklých fragmentů. Tento typ experimentu napodobující experiment MS<sup>3</sup> má obdobné využití, jako je uvedeno v bodě 5, pouze s rozšířením na fragmenty s menšími hodnotami  $m/z$ , a tak získání širší škály fragmentů a dalších strukturních informací.

Hmotnostní spektrometry s iontovou mobilitou typu FAIMS (Fast Asymmetric Waveforms Ion Mobility Spectrometry) nebo spektrometry s podobným typem iontové filtrace umístěné hned za iontovým zdrojem mnohé z uvedených možností neposkytují. Je tomu tak, protože tato mobilitní separace funguje pouze jako filtr, určitým způsobem obdobně jako quadrupolový analyzátor. Nastavení se provádí pomocí kompenzačního napětí, které však není určitou charakteristikou látky zajišťující zvýšení selektivity identifikace tak, jak je tomu např. u migračního času při umístění iontové mobility mezi analyzátoři. Tím údaje získané z analýzy přichází o čtvrtý rozměr. Porovnání možností experimentů poskytnutých jednotlivými druhy iontové mobility je uvedeno v následující tabulce (+ = funkce je dostupná, - = funkce není dostupná):

Typ experimentu	TWIMS	FAIMS nebo podobné typy iontové mobility
(1) Odstranění nežádoucích vlivů matrice	+	+
(2) Separace izobarických iontů	+	+
(3) Zvýšení celkové účinnosti separačního procesu a získání dalšího rozměru dat	+	-/+*
(4) Rozlišení protonace iontů téže látky na různých místech	+	+
(5) Fragmentace látek s následnou iontově mobilitní separací vzniklých produktových iontů	+	-
(6) Měření efektivních srážkových průřezů molekul	+	-
(7) Možnost další fragmentace mobilně rozdělených fragmentů	+	-



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

- z dostupných zdrojů nevyplývá možnost skenování, která by umožnila použití charakteristiky kompenzačního napětí jako další identifikační charakteristiky, ke zvýšení účinnosti separace zde však dochází.

Nedílnou součástí LC-MS systémů jsou specializované softwary, které umožňují sběr dat s využitím různých typů experimentů a následně jejich interpretaci. Jednotlivé typy softwarů pak jsou specificky zaměřeny dle aplikací. Pro účely projektů na Faf jsou potřebné softwary umožňující identifikaci látek s využitím správné a přesné hmoty, softwary pro kvantifikaci látek, pro práci s metabolity a metabolomické softwary umožňující také základní i pokročilejší statistická zpracování dat.



EVROPSKÁ UNIE  
EVROPSKÝ FOND PRO REGIONÁLNÍ ROZVOJ  
INVESTICE DO VAŠÍ BUDOUCNOSTI



OP Výzkum a vývoj  
pro inovace