

Allegato I prove tecniche (assegnazione 30/100 punti)

soluzione 1

Vengono fornite a ciascun partecipante due vial contenenti la soluzione 1: 1A e 1B

Entrambe le soluzioni contengono gli analiti indicati in tabella: miscela di alcaloidi pirrolizidinici come indicato in tabella 1: non necessariamente saranno presenti tutti gli analiti.

Tabella 1: molecole da valutare, ioni padre, quantificatori e qualificatori.

NOME ANALITA	PRECURSORE			
	Formula	m/z	1	2
Senecionina	[M-H] ⁺	336	120	138
Senecivernina	[M-H] ⁺	336	120	138
Erucifolina	[M-H] ⁺	350	94	120
Lasiocarpina	[M-H] ⁺	412	120	336
Licopsamina	[M-H] ⁺	300	138	156
Intermedina	[M-H] ⁺	300	138	156
Monocrotalina	[M-H] ⁺	326	120	237
Senecifillina	[M-H] ⁺	334	120	138
Eliotrina	[M-H] ⁺	314	138	156
Jacobina	[M-H] ⁺	352	120	280
Echimidina	[M-H] ⁺	398	120	220
Europina	[M-H] ⁺	330	138	254
Retrorsina	[M-H] ⁺	352	120	138
Tricodesmina	[M-H] ⁺	354	120	222
Senkirkina	[M-H] ⁺	366	122	167
Senecionina Nox	[M-H] ⁺	352	118	136
Senecivernina Nox	[M-H] ⁺	352	118	136
Erucifolina Nox	[M-H] ⁺	366	94	119
Lasiocarpina Nox	[M-H] ⁺	428	138	254
Licopsamina Nox	[M-H] ⁺	316	138	155
Intermedina Nox	[M-H] ⁺	316	138	155
Monocrotalina Nox	[M-H] ⁺	342	119	137
Senecifillina Nox	[M-H] ⁺	350	120	136
Eliotrina Nox	[M-H] ⁺	330	138	172
Jacobina Nox	[M-H] ⁺	368	120	296
Echimidina Nox	[M-H] ⁺	414	120	220
Europina Nox	[M-H] ⁺	345	172	328
Retrorsina Nox	[M-H] ⁺	368	120	136

Ciascun partecipante dovrà eseguire le determinazioni richieste seguendo le condizioni operative di seguito indicate:

Condizioni operative del cromatografo e generali dello spettrometro

- Colonna cromatografica Acquity UPLC BEH C8 100 cm x 2.1 mm, 1.7 µm
- Flusso 0,3 ml/min
- Temperatura di lavoro della colonna: 40 °C
- Volume d'iniezione: 2 µl
- Fase mobile: gradiente binario secondo il seguente schema:

Tempo (minuti)	Ammonio formiato 5Mm in H ₂ O 0.1% acido formico	Ammonio formiato 5Mm in MeOH 0.1% acido formico	Tipo di gradiente
0	95	5	
1	95	5	
10	80	20	Lineare
15	50	50	Lineare
15.5	95	5	Lineare
17	95	5	

- tipo di ionizzazione: ESI
- polarità: positiva

Ciascun partecipante dovrà eseguire le analisi in modalità MRM valutando lo ione molecolare ed i frammenti come indicati in tabella 1

- Ciascun partecipante potrà individuare fra quelli elencati il picco quantificatore e quello qualificatore (per ogni singolo analita c'è la possibilità di sostituire una sola delle transizioni riportate in Tabella 1 con un'altra trovata durante l'eventuale ottimizzazione dei parametri di frammentazione).
- Tutte le transizioni dovranno essere inserite in un unico evento temporale senza alcuna suddivisione della corsa cromatografica in "segmenti" o "MRM dinamici"
- Pena esclusione, lo spettrometro deve essere settato in modo tale che il picco cromatografico sia identificato da un minimo di 12 punti da acquisizione (senza smoothing)

NOTA: è possibile utilizzare la soluzione 1B per la messa a punto e ottimizzazione dei parametri dello strumento

Quesiti analitici e presentazione dei risultati

Di seguito viene specificato quanto richiesto nell'analisi delle soluzioni fornite

Soluzione 1 A:

1. Valutazione dei parametri utilizzati per l'acquisizione dei dati:

Si richiede di presentare stampa (o file formato pdf) dei parametri del metodo strumentale usato per l'acquisizione dei dati. Devono essere presenti le condizioni di lavoro UHPLC e le condizioni di lavoro dello spettrometro di massa. Si deve dare prova che la stampa derivi da quanto memorizzato dallo strumento durante una delle iniezioni fatte per produrre i dati richiesti al seguente punto 3 (Valutazione della sensibilità/ripetibilità e stabilità di frammentazione).

2. Valutazione dei picchi cromatografici:

Si richiede di presentare stampa (o file formato pdf) di almeno 2 cromatogrammi, registrati durante le iniezioni fatte per produrre i dati richiesti al seguente punto 3 (Valutazione della sensibilità/ripetibilità e stabilità di frammentazione).

Nei cromatogrammi, per ogni analita, vanno visualizzate entrambe le transizioni. Si richiede di riportare per ogni transizione

- larghezza alla base in secondi [si deve desumere anche visivamente]
- il numero di "data points" registrati dallo strumento (senza smoothing) in tutta la larghezza del picco [si deve desumere anche visivamente]
- l'area
- il valore del rapporto di segnale rumore (*s/n*) della transizione più elevata utilizzando come rumore una porzione di cromatogramma attigua al picco dell'analita considerato (senza smoothing).
- Riportare inoltre un cromatogramma in cui siano visibili tutti i picchi degli analiti presenti in TIC in un'unica corsa cromatografica

3. Valutazione della sensibilità/ripetibilità e stabilità di frammentazione:

Si richiede di iniettare per 50 volte la soluzione settando lo strumento secondo quanto descritto nelle Tabelle precedenti relative alle condizioni strumentali

Si richiede inoltre di fornire:

- Evidenza dell'arco temporale durante le quali sono state eseguite le 50 iniezioni (possibilmente consecutive)
- L' area relativa a ciascuna transizione di ciascun composto in ognuna delle 50 iniezioni.
- Per ogni analita e ogni transizione l'area media ottenuta dalle 50 iniezioni, la deviazione standard e la deviazione standard relativa (CV%) calcolate.
- Il rapporto ionico % (rapporto % area transizione meno intensa delle monitorate contro area transizione più intensa) ottenuto per ogni analita in ognuna delle 50 iniezioni
- Per ogni analita il rapporto ionico % medio ottenuto dalle 50 iniezioni, la deviazione standard e la deviazione standard relativa (CV%).

Al fine di uniformare la presentazione dei dati viene fornita un'apposita tabella di excel (Allegato A - Tabella Dati Alcaloidi Pirrolizidinici) da compilare e consegnare.

Valutazione e attribuzione dei punteggi

Pena esclusione, tutti gli analiti presenti nella soluzione dovranno essere individuati e dovranno rispettare i seguenti vincoli:

- 1) Valori per la deviazione standard relativa (CV%) dell'area della transizione più intensa (picco base) ottenuta dalle 50 iniezioni: $\leq 15.0\%$;
- 2) Valori per la deviazione standard relativa (CV%) del rapporto ionico % (rapporto % area transizione meno intensa delle monitorate contro area transizione più intensa) ottenuto dalle 50 iniezioni: $\leq 25.0\%$
- 3) Il tempo di ritenzione di ciascun analita non dovrà variare di più del 2,5% rispetto alla prima iniezione

I punteggi verranno attribuiti in relazione ai seguenti parametri:

Deviazione standard relativa (CV%) dell'area della transizione più intensa (picco base) ottenuta dalle 50 iniezioni:

per ogni singolo analita punti 0.30 al partecipante che ha ottenuto la deviazione standard relativa (CV%) inferiore. Al partecipante che risulterà avere il maggior numero di deviazioni standard relative (CV%) inferiori tra le ditte concorrenti si attribuiscono ulteriori 0.6 punti.

(Punteggio massimo attribuibile $\rightarrow (0.3 \times 28) + 0.6 = 9$ punti)

Il punteggio agli altri partecipanti verrà assegnato mediante il seguente calcolo:

$$\text{Punti partecipante considerato} = \frac{0.3 \times CV \text{ inferiore ottenuto tra } \leq \text{ditte}}{CV \text{ ottenuto dalla ditta considerata}}$$

NOTA: nel caso di assenza di uno o più analiti a tutti i partecipanti che individueranno correttamente l'assenza verranno assegnati 0.3 punti

Deviazione standard relativa (CV%) del rapporto ionico % (rapporto % fra area transizione meno intensa contro area transizione più intensa) ottenuto dalle 50 iniezioni:

Per ogni singolo analita punti 0,3 alla ditta che ha ottenuto la deviazione standard relativa (CV%) inferiore. Al partecipante che risulterà risulta avere il maggior numero di deviazioni standard relative (CV%) inferiori tra le ditte concorrenti si attribuiscono ulteriori 0.6 punti.

(Punteggio massimo attribuibile $\rightarrow (0.3 \times 28) + 0.6 = 9$ punti)

Il punteggio agli altri partecipanti verrà assegnato mediante il seguente calcolo:

$$\text{Punti partecipante considerato} = \frac{0.3 \times CV \text{ inferiore ottenuto tra } \leq \text{ditte}}{CV \text{ ottenuto dalla ditta considerata}}$$

NOTA: nel caso di assenza di uno o più analiti a tutti i partecipanti che individueranno correttamente l'assenza verranno assegnati 0.3 punti.

NOTA: tutti i coefficienti verranno espressi con 2 cifre decimali senza arrotondamenti sulla seconda

soluzione 2

Vengono fornite a ciascun partecipante due vial contenenti la soluzione 2: 2A e 2B

Entrambe le soluzioni contengono gli analiti indicati in tabella: miscela biotossine come indicato in tabella 2: non necessariamente saranno presenti tutti gli analiti. Ciascun partecipante dovrà eseguire le analisi in modalità MRM valutando lo ione molecolare ed i frammenti come indicati in tabella

Tabella 2: molecole da valutare, ioni padre, quantificatori e qualificatori.

ORDINE DI ELUIZIONE**	NOME ANALITA	PRECURSORE	TRANSIZIONI	
		<i>m/z</i>	1	2
	Azaspiracid 1	(MH+ 842,7)	806,7	824,5
	Azaspiracid 2	(MH+ 856,7)	820,7	838,7
	Azaspiracid 3	(MH+ 828,7)	792,7	810,7
	Pectenotossina 2	(MH+ 876,7)	213,4	823,7
	Acido okadaico	(M- 803,7)	113,0	255,2
	Dinofisistossina 1	(M- 817,7)	113,1	255,2
	Dinofisistossina 2	(M- 803,6)	113,0	255,2
	Yessotossina	(M- 1141,7)	855,5	1061,8
	Homoyessotossina	(M- 1155,7)	869,6	1075,8

- Colonna cromatografica Acquity BEH C18 1,7 μ m 2,1 x 100 mm
- Flusso 0,35 ml/min
- Temperatura di lavoro della colonna: 40 °C
- Volume d'iniezione: 2 μ l
- Fase mobile: gradiente binario secondo il seguente schema:

Tempo (minuti)	Acqua 0,05% ammoniacale	Acetonitrile 0,05% ammoniacale	Tipo di gradiente
0	90	10	
0,1	90	10	Lineare
5	5	95	
5,5	5	95	Lineare
6	90	10	
8,5	90	10	

- tipo di ionizzazione: ESI
- polarità: positiva/negativo

- Ciascun partecipante potrà individuare fra quelli elencati il picco quantificatore e quello qualificatore (per ogni singolo analita c'è la possibilità di sostituire una sola delle transizioni riportate in Tabella 1 con un'altra trovata durante l'eventuale ottimizzazione dei parametri di frammentazione)
- Tutte le transizioni dovranno essere inserite in un unico evento temporale senza alcuna suddivisione della corsa cromatografica in "segmenti" o "MRM dinamici"
- Pena esclusione lo spettrometro deve essere settato in modo tale che il picco cromatografico sia identificato da un minimo di 12 punti da acquisizione (senza smoothing)

NOTA: è possibile utilizzare la soluzione 2B per la messa a punto e ottimizzazione dei parametri dello strumento

Quesiti analitici e presentazione dei risultati

Di seguito viene specificato quanto richiesto nell'analisi delle soluzioni fornite

Soluzione 2 A:

4. Valutazione dei parametri utilizzati per l'acquisizione dei dati:

Si richiede di presentare stampa (o file formato pdf) dei parametri del metodo strumentale usato per l'acquisizione dei dati. Devono essere presenti le condizioni di lavoro UHPLC e le condizioni di lavoro dello spettrometro di massa. Si deve dare prova che la stampa derivi da quanto memorizzato dallo strumento

durante una delle iniezioni fatte per produrre i dati richiesti al seguente punto 3 (Valutazione della sensibilità/ripetibilità e stabilità di frammentazione).

5. Valutazione dei picchi cromatografici:

Si richiede di presentare stampa (o file formato pdf) di almeno 2 cromatogrammi, registrati durante le iniezioni fatte per produrre i dati richiesti al seguente punto 3 (Valutazione della sensibilità/ripetibilità e stabilità di frammentazione).

Nei cromatogrammi, per ogni analita, vanno visualizzate entrambe le transizioni. Si richiede di riportare per ogni transizione

- larghezza alla base in secondi [si deve desumere anche visivamente]
- il numero di "data points" registrati dallo strumento (senza smoothing) in tutta la larghezza del picco [si deve desumere anche visivamente]
- l'area
- il valore del rapporto di segnale rumore (s/n) della transizione più elevata utilizzando come rumore una porzione di cromatogramma attigua al picco dell'analita considerato (senza smoothing).
- Riportare inoltre un cromatogramma in cui siano visibili tutti i picchi degli analiti presenti in TIC in un'unica corsa cromatografica

6. Valutazione della sensibilità/ripetibilità e stabilità di frammentazione:

Si richiede di iniettare per 50 volte la soluzione settando lo strumento secondo quanto descritto nelle Tabelle precedenti relative alle condizioni strumentali

Si richiede inoltre di fornire:

- Evidenza dell'arco temporale durante le quali sono state eseguite le 50 iniezioni (possibilmente consecutive)
- L'area relativa a ciascuna transizione di ciascun composto in ognuna delle 50 iniezioni.
- Per ogni analita e ogni transizione l'area media ottenuta dalle 50 iniezioni, la deviazione standard e la deviazione standard relativa (CV%) calcolate.
- Il rapporto ionico % (rapporto % area transizione meno intensa delle monitorate contro area transizione più intensa) ottenuto per ogni analita in ognuna delle 50 iniezioni
- Per ogni analita il rapporto ionico % medio ottenuto dalle 50 iniezioni, la deviazione standard e la deviazione standard relativa (CV%).

Al fine di uniformare la presentazione dei dati viene fornita un'apposita tabella di excel (Allegato B - Tabella Dati Biotossine Algali) da compilare e consegnare.

Valutazione e attribuzione dei punteggi

Pena esclusione, tutti gli analiti presenti nella soluzione dovranno essere individuati e dovranno rispettare i seguenti vincoli:

- 4) Valori per la deviazione standard relativa (CV%) dell'area della transizione più intensa (picco base) ottenuta dalle 50 iniezioni: $\leq 10.0\%$;
- 5) Valori per la deviazione standard relativa (CV%) del rapporto ionico % (rapporto % area transizione meno intensa delle monitorate contro area transizione più intensa) ottenuto dalle 50 iniezioni: $\leq 20.0\%$
- 6) Il tempo di ritenzione di ciascun analita non dovrà variare di più del 2,5% rispetto alla prima iniezione

I punteggi verranno attribuiti in relazione ai seguenti parametri:

Deviazione standard relativa (CV%) dell'area della transizione più intensa (picco base) ottenuta dalle 50 iniezioni:

per ogni singolo analita punti 0.6 al partecipante che ha ottenuto la deviazione standard relativa (CV%) inferiore. Al partecipante che risulterà risulta avere il maggior numero di deviazioni standard relative (CV%) inferiori tra le ditte concorrenti si attribuiscono ulteriori 0.6 punti.

(Punteggio massimo attribuibile $\rightarrow (0.6 \times 9) + 0.6 = 6$ punti)

Il punteggio agli altri partecipanti verrà assegnato mediante il seguente calcolo:

$$\text{Punti partecipante considerato} = \frac{0.6 \times CV \text{ inferiore ottenuto tra } \leq \text{ditte}}{CV \text{ ottenuto dalla ditta considerata}}$$

NOTA: nel caso di assenza di uno o più analiti a tutti i partecipanti che individueranno correttamente l'assenza verranno assegnati 0.6 punti.

Deviazione standard relativa (CV%) del rapporto ionico % (rapporto % fra area transizione meno intensa contro area transizione più intensa) ottenuto dalle 50 iniezioni:

Per ogni singolo analita punti 0,6 alla ditta che ha ottenuto la deviazione standard relativa (CV%) inferiore. Al partecipante che risulterà avere il maggior numero di deviazioni standard relative (CV%) inferiori tra le ditte concorrenti si attribuiscono ulteriori 0.6 punti.

(Punteggio massimo attribuibile → $(0.6 \times 9) + 0.6 = 6$ punti)

Il punteggio agli altri partecipanti verrà assegnato mediante il seguente calcolo:

$$Punti\ partecipante\ considerato = \frac{0.6 \times CV\ inferiore\ ottenuto\ tra\ \leq\ ditte}{CV\ ottenuto\ dalla\ ditta\ considerata}$$

NOTA: nel caso di assenza di uno o più analiti a tutti i partecipanti che individueranno correttamente l'assenza verranno assegnati 0.6 punti.

NOTA: tutti i coefficienti verranno espressi con 1 cifra decimale senza arrotondamenti sulla seconda

Le offerte che avranno ottenuto nella presente prova sperimentale un punteggio inferiore a 12,00 non saranno considerate e non saranno ammesse alla successiva fase di valutazione economica.