

Allegato II 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 farmaci anabolizzanti 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			1	2	3
	Formula	m/z				
Bromobuterolo	[M+H] ⁺	367		293	214	212
Cimaterolo	[M+H] ⁺	220		160	143	116
Cimbuterolo	[M+H] ⁺	234		160	143	116
Clencicloexerolo	[M+H] ⁺	319		203	168	132
Clenbuterolo	[M+H] ⁺	277		203	168	132
Clenpenterolo	[M+H] ⁺	291		203	168	132
Clenproperolo	[M+H] ⁺	263		203	168	132
Clorbromobuterolo	[M+H] ⁺	323		249	305	168
Fenoterolo	[M+H] ⁺	304		107	152	135
Idrossimetilclenbuterolo	[M+H] ⁺	293		203	168	132
Isossisuprina	[M+H] ⁺	302		284	150	107
Mabuterolo	[M+H] ⁺	311		237	217	202
Mapenterolo	[M+H] ⁺	325		237	217	202
Procterolo	[M+H] ⁺	291		273	231	162
Ractopamina	[M+H] ⁺	302		107	164	121
Salbutamolo	[M+H] ⁺	240		148	222	166
Salmeterolo	[M+H] ⁺	416		398	232	380
Terbutalina	[M+H] ⁺	226		152	170	125
Zilpaterolo	[M+H] ⁺	262		185	157	202
Alfa Boldenone	[M+H] ⁺	287		121	135	173
Beta Bodenone	[M+H] ⁺	287		121	135	173
ADD	[M+H] ⁺	285		121	147	151
Alfa Nandrolone	[M+H] ⁺	275		109	145	239
Beta Nandrolone	[M+H] ⁺	275		109	145	239
Alfa Trenbolone	[M+H] ⁺	271		199	227	165
Beta Trenbolone	[M+H] ⁺	271		199	227	165
17-Metiltestosterone	[M+H] ⁺	303		97	109	285
Desametasone	[M+H] ⁺	393		355	147	237
Betametasone	[M+H] ⁺	393		355	279	147
Beclometasone	[M+H] ⁺	409		391	279	147
Metilprednisolone	[M+H] ⁺	375		161	253	135

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

Condizioni operative del cromatografo e generali dello spettrometro

- Colonna cromatografica C18 Waters X Select HSS T3 2,5 µm (lunghezza 10 cm, diametro interno (ID) 3 mm, diametro medio delle particelle 2,5 µm)
- Flusso 0,4 ml/min
- Temperatura di lavoro della colonna: 40 °C
- Volume d'iniezione: 2 µl
- Fase mobile: gradiente binario secondo il seguente schema:

Tempo (minuti)	Soluzione acquosa acido formico per HPLC 0,05%	Acetonitrile per HPLC	Tipo di gradiente
0	95	5	
16	70	30	
25	5	95	Lineare
27	5	95	Lineare
29	95	5	Lineare
30	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 a scelta tra le transizioni proposte (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 due delle tre 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 C - Tabella Dati Farmaci anabolizzanti) 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: $\leq 10.0\%$;
- 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: $\leq 20.0\%$
- 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 0,40 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 0,5 punti.

(Punteggio massimo attribuibile $\rightarrow (0,40 \times 30) + 0,5 = 12,5$ punti)

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

$$\text{Punti partecipante considerato} = \frac{0,4 \times CV \text{ inferiore ottenuto tra } \leq \text{ditte}}{CV \text{ ottenuto dalla ditta considerata}}$$

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 0,40 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 0,5 punti.

(Punteggio massimo attribuibile $\rightarrow (0,40 \times 30) + 0,5 = 12,5$ punti)

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

$$\text{Punti partecipante considerato} = \frac{0,4 \times CV \text{ inferiore ottenuto tra } \leq \text{ditte}}{CV \text{ ottenuto dalla ditta considerata}}$$

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 lattoni acido resorcilico 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 1: molecole da valutare, ioni padre, quantificatori e qualificatori.

ORDINE DI ELUIZIONE**	NOME ANALITA	PRECURSORE		TRANSIZIONI		
		Formula	m/z	1	2	3
	Taleranolo	[M-H] ⁻	321	277	303	
	Zeranolo	[M-H] ⁻	321	277	303	
	β-Zeraralenolo	[M-H] ⁻	319	275	160	130
	α-Zeraralenolo	[M-H] ⁻	319	275	160	130
	Zearalenone	[M-H] ⁻	317	175	131	273
	Zearalanone	[M-H] ⁻	319	275	205	161

- Colonna cromatografica C18 Waters X Select HSS T3 2,5 µm (lunghezza 10 cm, diametro interno (ID) 3 mm, diametro medio delle particelle 2,5 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)	Acqua deionizzata	Acetonitrile	Tipo di gradiente
0	50	50	
2,50	40	60	Lineare
5	15	85	
6	15	85	Lineare
7	50	50	
10	50	50	

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

- Ciascun partecipante potrà individuare fra quelli elencati il picco quantificatore e quello qualificatore a scelta tra le transizioni proposte (per ogni singolo analita c'è la possibilità di sostituire una sola delle transizioni riportate in Tabella 2 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 D - Tabella Dati Lattoni Acido resorcilico) 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 0,40 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 0,5 punti.

(Punteggio massimo attribuibile $\rightarrow (0,40 \times 5) + 0,5 = 2,5$ punti)

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

$$\text{Punti partecipante considerato} = \frac{0.4 \times CV \text{ inferiore ottenuto tra } \leq \text{ ditte}}{CV \text{ ottenuto dalla ditta considerata}}$$

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 0,4 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 0,5 punti.

(Punteggio massimo attribuibile $\rightarrow (0,4 \times 5) + 0,5 = 2,5$ punti)

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

$$Punti\ participante\ considerato = \frac{0.4 \times CV\ inferiore\ ottenuto\ tra\ \leq\ ditte}{CV\ ottenuto\ dalla\ ditta\ considerata}$$

NOTA: tutti i coefficienti verranno espressi con 2 cifre decimali 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.