**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 | |  | |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Formula | *m/z* | 1 | 2 | | 3 |
| 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 |
| Procaterolo | [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)*

1. *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

1. *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: ≤ 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: ≤ 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 🡪 (0,40 x 30) + 0,5 = 12,5 punti)

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

**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 🡪 (0,40 x 30) + 0,5 = 12,5 punti)

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

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:**

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)*

1. *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

1. *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:

1. Valori per la deviazione standard relativa (CV%) dell’area della transizione più intensa (picco base) ottenuta dalle 50 iniezioni: ≤ 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: ≤ 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 risulta avere il maggior numero di deviazioni standard relative (CV%) inferiori tra le ditte concorrenti si attribuiscono ulteriori 0,5 punti.

(Punteggio massimo attribuibile 🡪 (0,40 x 5) + 0,5 = 2,5 punti)

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

.

**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 🡪 (0,4 x 5) + 0,5 = 2,5 punti)

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

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.