**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 H2O 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)*

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 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: ≤ 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: ≤ 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 🡪 (0.3 x 28) + 0.6 = 9 punti)

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

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 🡪 (0.3 x 28) + 0.6 = 9 punti)

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

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 | |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| *m/z* | 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 µm 2,1 x 100 mm
* Flusso 0,35 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 0,05% ammoniaca | Acetonitrile 0,05% ammoniaca | 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:**

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 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:

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 0.6 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 🡪 (0.6 x 9) + 0.6 = 6 punti)

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

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 x 9) + 0.6 = 6 punti)

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

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.