

Allegato B – Prove sperimentali

Quesiti analitici

Di seguito vengono specificati i quesiti analitici per l'analisi delle due soluzioni fornite.

SOLUZIONE 1

Esperimenti in MS:

1. identificare gli analiti presenti in MS attraverso la formula bruta; per ognuno di essi devono essere indicate le due formule brute che presentano la migliore rispondenza tra il valore m/z teorico e il valore m/z trovato (minore errore). Per ogni formula bruta indicare risoluzione, massa trovata, massa teorica e differenza di massa (ppm e mDa)
2. per ogni analita individuato si richiede di presentare il cromatogramma (estrazione della traccia in MS) dal quale si possa desumere GRAFICAMENTE il rapporto segnale/rumore del picco (senza smoothing). Come rumore di fondo si richiede di prendere una finestra nell'intorno dell'analita.
3. per ogni analita si richiede di presentare il cromatogramma (estrazione della traccia in MS) dal quale si possa desumere sia la larghezza del picco alla base che il numero di data points registrati dallo strumento (senza smoothing) in tutta la larghezza del picco.

Esperimenti in MS/MS:

1. per ogni analita individuato si richiede di identificare il prodotto di frammentazione più intenso in MS/MS attraverso la formula bruta; per esso devono essere indicate le due formule brute che presentano la migliore rispondenza tra il valore m/z teorico e il valore m/z trovato (minore errore). Per ogni formula bruta indicare risoluzione, massa trovata, massa teorica e differenza di massa (ppm e mDa).
2. per ogni prodotto di frammentazione si richiede di presentare il cromatogramma (estrazione della traccia in MS/MS) dal quale si possa desumere sia la larghezza del picco alla base che il numero di data points registrati dallo strumento (senza smoothing) in tutta la larghezza del picco.

SOLUZIONE 2

Esperimenti in MS:

1. identificare gli analiti presenti in MS attraverso la formula bruta; per ognuno di essi devono essere indicate le due formule brute che presentano la migliore rispondenza tra il valore m/z teorico e il valore m/z trovato (minore errore). Per ogni formula bruta indicare risoluzione, massa trovata, massa teorica e differenza di massa (ppm e mDa)
2. per ogni analita individuato si richiede di presentare il cromatogramma (estrazione della traccia in MS) dal quale si possa desumere GRAFICAMENTE il rapporto segnale/rumore del picco (senza smoothing). Come rumore di fondo si richiede di prendere una finestra nell'intorno dell'analita.
3. per ogni analita si richiede di presentare il cromatogramma (estrazione della traccia in MS) dal quale si possa desumere sia la larghezza del picco alla base che il numero di data points registrati dallo strumento (senza smoothing) in tutta la larghezza del picco.

Condizioni sperimentali

Di seguito vengono specificate le condizioni sperimentali che devono essere TASSATIVAMENTE seguite per l'analisi delle due soluzioni fornite, pena l'esclusione dalla gara.

SOLUZIONE 1

Condizioni cromatografiche

- Colonna cromatografica a fase inversa Waters Xterra MS C18 (lunghezza 15 cm, diametro interno (ID) 2,1 mm e diametro medio delle particelle 3,5 µm) o equivalente
- Precolonna cromatografica a fase inversa Waters Xterra MS C18 (lunghezza 1 cm, diametro interno (ID) 2,1 mm e diametro medio delle particelle 3,5 µm) o equivalente
- Flusso 0,2 ml/min
- Temperatura di lavoro della colonna: 40 °C
- Volume d'iniezione: 20 µl

(timbro della Ditta e firma del Legale Rappresentante)

- Fase mobile: gradiente binario secondo il seguente schema:

Tempo (minuti)	Acetonitrile per HPLC	Soluzione acquosa di acido acetico per HPLC allo 0,1 %	Tipo di gradiente
0	30	70	
1	30	70	
15	60	40	Lineare
16	70	30	Lineare
19	70	30	
20	30	70	Lineare
25	30	70	

Condizioni di massa

- tipo di ionizzazione: ESI
- polarità: negativa
- Tipo di acquisizione: MS e MS/MS
- Range di massa in MS e MS/MS: 100 - 500
- Risoluzione: ≥ 30000

SOLUZIONE 2

Condizioni cromatografiche

- Colonna cromatografica a fase inversa Phenomenex Synergi Fusion-RP 80A (lunghezza 15 cm, diametro interno (ID) 2 mm e diametro medio delle particelle 4 μm) o equivalente.
- Precolonna cromatografica a fase inversa Phenomenex Fusion-RP (lunghezza 4 mm, diametro interno (ID) 2mm e diametro medio delle particelle 4 μm) o equivalente.
- Flusso 0,2 ml/min.
- Temperatura di lavoro della colonna: 40°C
- Volume d'iniezione: 10 μl
- Fase mobile: gradiente binario secondo il seguente schema:

Tempo (minuti)	Metanolo per HPLC con formiato d'ammonio 5mmol	Soluzione acquosa di formiato d'ammonio 5 mmol	Tipo di gradiente
0	10	90	
3	10	90	
24	90	10	Lineare
34	90	10	
35	10	90	Lineare
40	10	90	
45	10	90	

Condizioni di massa

- tipo di ionizzazione: ESI
- polarità: positiva
- Tipo di acquisizione: MS
- Range di massa in MS: 100 - 500
- Risoluzione: ≥ 30000

Informazioni chimiche

Di seguito vengono specificate le informazioni chimiche fornite per l'identificazione dei componenti costituenti le soluzioni 1 e 2.

(timbro della Ditta e firma del Legale Rappresentante)

SOLUZIONE 1

Gli analiti presenti sono costituiti da atomi di:

- Carbonio
- Idrogeno
- Ossigeno

SOLUZIONE 2

Gli analiti presenti sono costituiti da atomi di:

- Carbonio
- Idrogeno
- Ossigeno
- Azoto
- Zolfo
- Fosforo

Presentazione dei risultati e attribuzione dei punteggi

Al fine della presentazione dei risultati ottenuti, con conseguente attribuzione di punteggio come previsto dall'Allegato C, per ogni composto/prodotto di frammentazione delle SOLUZIONI 1 e 2 compilare in ogni sua parte la scheda di seguito riportata, oltre ove previsto allegare i cromatogrammi.

Al fine di meglio specificare quanto previsto nell'Allegato C si riportano le seguenti informazioni:

- Per quanto riguarda i composti delle SOLUZIONI 1 e 2:
 - 1) Per il calcolo del "Valor medio del rapporto segnale/rumore calcolato sui picchi cromatografici dei composti" verrà attribuito valore zero al rapporto segnale/rumore dei composti non correttamente individuati;
 - 2) Per il calcolo del "Valor medio del numero di data points calcolato sui picchi cromatografici dei composti" verrà attribuito valore zero al numero di data points dei composti non correttamente individuati.
- Per quanto riguarda i prodotti di frammentazione della SOLUZIONE 1:
 - 1) Per l'individuazione dei prodotti di frammentazione si prenderanno in considerazione solo quelli relativi a precursori correttamente individuati e si farà riferimento alle frammentazioni conosciute delle singole molecole;
 - 2) Per il calcolo del "Valor medio del numero di data points calcolato sui picchi cromatografici dei prodotti di frammentazione" verrà attribuito valore zero al numero di data points dei prodotti di frammentazione non correttamente individuati.

SCHEDA DA UTILIZZARE PER FORNIRE LA RISPOSTA ANALITICA PER OGNI ANALITA/PRODOTTO DI FRAMMENTAZIONE

SOLUZIONE NUMERO:	
ANALITA/PRODOTTO DI FRAMMENTAZIONE NUMERO:	
FORMULA BRUTA CON MIGLIORE RISPONDEZZA:	
RISOLUZIONE:	
MASSA TROVATA:	
MASSA TEORICA:	
DIFFERENZA DI MASSA (ppm E mDa):	
FORMULA BRUTA CON SECONDA MIGLIORE RISPONDEZZA:	
RISOLUZIONE:	
MASSA TROVATA:	
MASSA TEORICA:	
DIFFERENZA DI MASSA (ppm E mDa):	
RAPPORTO SEGNALE/RUMORE (GRAFICO) [allegare cromatogramma]:	
TEMPO DI RITENZIONE (XX,XX min) [allegare cromatogramma]:	
LARGHEZZA DEL PICCO ALLA BASE (YY sec) [allegare cromatogramma]:	
NUMERO DI DATA POINTS [allegare cromatogramma]:	

(timbro della Ditta e firma del Legale Rappresentante)