

Allegato prove tecniche (assegnazione 30/100 punti)

Premessa

Ai fini di una corretta valutazione della strumentazione offerta, si richiede, a pena di esclusione, l'esecuzione di una prova tecnica su campioni predisposti dall'Istituto. Potranno partecipare alla prova tecnica solo gli operatori economici la cui offerta sarà valutata conforme ai requisiti minimi dalla Commissione Giudicatrice. L'ammissione alle prove tecniche e più in generale alla fase di attribuzione dei punteggi tecnico-qualitativi, sarà comunicata nel verbale della Commissione Giudicatrice redatto al termine dell'attività di valutazione riferita alla conformità delle offerte tecniche ai requisiti minimi, pubblicato sulla piattaforma digitale.

Le ditte ammesse dovranno a pena di esclusione:

- Procedere al ritiro dei campioni oggetto di prove tecniche presso la sede di Brescia dell'Istituto (Via Bianchi, 9 - 25124 Brescia) entro 7 giorni solari dalla pubblicazione del verbale sulla piattaforma;
- Procedere, nei 18 giorni solari successivi al ritiro dei campioni, all'esecuzione delle analisi richieste e consegnare i risultati alla Commissione Giudicatrice mediante comunicazione trasmessa tramite la piattaforma digitale.

Si fa presente che le spese e modalità di ritiro dei campioni saranno a carico del singolo operatore economico (l'Istituto non provvederà alla spedizione dei campioni).

Prova 1

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

Entrambe le soluzioni contengono una miscela di molecole con attività antielmintica come indicato in tabella 1: non necessariamente saranno presenti tutti gli analiti.

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

TABELLA 1

NOME ANALITA	PRECURSORE		TRANSIZIONI	
	Formula	<i>m/z</i>	1	2
5-hydroxy-Mebendazole	[M+H] ⁺	298	160	79
Albendazole	[M+H] ⁺	266	234	191
Albendazole-sulfone	[M+H] ⁺	298	159	224
Albendazole-sulfoxide	[M+H] ⁺	282	240	159
Cambendazole	[M+H] ⁺	303	217	190
Febantel	[M+H] ⁺	447	383	415
Fenbendazole	[M+H] ⁺	300	268	159
Flubendazole	[M+H] ⁺	314	282	123
Levamisole	[M+H] ⁺	205	178	123
Mebendazole	[M+H] ⁺	296	264	105
Morantel	[M+H] ⁺	221	164	123
Oxibendazole	[M+H] ⁺	250	218	176
Oxfendazole	[M+H] ⁺	316	159	191
Parbendazole	[M+H] ⁺	248	216	173
Praziquantel	[M+H] ⁺	313	203	174
Thiabendazole	[M+H] ⁺	202	175	131
Clorsulon	[M+H] ⁻	380	344	279
Closantel	[M+H] ⁻	661	127	315
Ketotriclabendazole	[M+H] ⁻	329	182	146
Nitroxinil	[M+H] ⁻	289	162	127

Rafoxanide	[M+H] ⁺	626	127	345
------------	--------------------	-----	-----	-----

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

Eseguire 80 iniezioni totali nelle condizioni operative di seguito descritte.

Condizioni operative del cromatografo e generali dello spettrometro

- Colonna cromatografica C18 Waters X Select HSS T3 1,8 µm (lunghezza 10 cm, diametro interno (ID) 2,1 mm, diametro medio delle particelle 1,8 µm)
- Flusso 0,3 ml/min
- Temperatura di lavoro della colonna: 40 °C
- Volume d'iniezione: 1 µl
- Fase mobile: gradiente binario secondo il seguente schema:

Tempo (m)	Soluzione acquosa di formiato d'ammonio 5 mM e 0,1% acido formico	Acetonitrile contenente 0,1% acido formico	Tipo di gradiente
0	100%	0%	
0,2	100%	0%	lineare
6	50%	50%	
8,5	10%	90%	lineare
13	10%	90%	
13,5	100%	0%	
18	100%	0%	

Il gradiente descritto in tabella è puramente indicativo ed è possibile modificarlo. È obbligatorio utilizzare nelle fasi mobili gli stessi solventi e sali/acidi indicati; è possibile modificarne la concentrazione.

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

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 di 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 80 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 80 iniezioni (possibilmente consecutive)
- L'area relativa a ciascuna transizione di ciascun composto in ognuna delle 80 iniezioni.
- Per ogni analita e ogni transizione l'area media ottenuta dalle 80 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 80 iniezioni
- Per ogni analita il rapporto ionico % medio ottenuto dalle 80 iniezioni, la deviazione standard e la deviazione standard relativa (CV%).

Al fine di uniformare la presentazione dei dati verrà fornita in sede di ritiro delle soluzioni per le prove tecniche un'apposita tabella di excel (Allegato B - Tabella Dati) da compilare e consegnare.

Valutazione e attribuzione dei punteggi

NOTA: per la distribuzione dei punteggi verrà applicata la seguente modalità generale:

- 1) Attribuzione del punteggio massimo relativo previsto nel caso di corretta identificazione/non identificazione dell'analita
- 2) Punteggio uguale a 0 nel caso di errata identificazione/non identificazione dell'analita

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

- 1) Valori per la deviazione standard relativa (CV%) dell'area della transizione più intensa (picco base) ottenuta dalle 80 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 80 iniezioni: $\leq 20.0\%$
- 3) Il tempo di ritenzione di ciascun analita non dovrà variare di più di $\pm 0,1$ min 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 80 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 0,1 punti.

(Punteggio massimo attribuibile $\rightarrow (0,40 \times 21) + 0,1 = 8,5$ punti)

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

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

Deviazione standard relativa (CV%) del rapporto ionico % (rapporto % fra area transizione meno intensa contro area transizione più intensa) ottenuto dalle 80 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 0,1 punti.

(Punteggio massimo attribuibile $\rightarrow (0,40 \times 21) + 0,1 = 8,5$ punti)

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

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

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

Il punteggio sarà 8,5 per ogni parametro considerato per un totale di 17 punti.

Prova 2

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

Entrambe le soluzioni contengono una miscela di pesticidi ad azione acaricidica come indicato in tabella 2: non necessariamente saranno presenti tutti gli analiti.

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

NOME ANALITA	PRECURSORE		TRANSIZIONI	
	Formula	m/z	1	2
Fipronil	[M-H] ⁻	435	330	250
Fipronil sulfone	[M-H] ⁻	451	415	282
Methidathion	[M-H] ⁺	303	145	85
Azinphos methyl	[M-H] ⁺	318	132	77
Fenthion	[M-H] ⁺	279	245	169
Coumaphos	[M-H] ⁺	363	307	227

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

- Eseguire 80 iniezioni totali nelle condizioni operative di seguito descritte.
- Colonna cromatografica C18 Waters X Select HSS T3 1,8 µm (lunghezza 10 cm, diametro interno (ID) 2,1 mm, diametro medio delle particelle 1,8 µm
- Flusso 0,3 ml/min
- Temperatura di lavoro della colonna: 40 °C
- Volume d'iniezione: 1 µl
- Fase mobile: gradiente binario secondo il seguente schema:

Tempo (minuti)	Soluzione acquosa tampone di formiato d'ammonio 2mM e acido formico 2mM + 2% di Metanolo	Metanolo per HPLC con formiato d'ammonio 2mM e acido formico 2mM	Tipo di gradiente
0	95	5	
1	95	5	Lineare
11,5	1	99	
16,5	1	99	Lineare
18	95	5	
22	95	5	

Il gradiente descritto in tabella è puramente indicativo ed è possibile modificarlo. È obbligatorio utilizzare nelle fasi mobili gli stessi solventi e sali/acidi indicati; è possibile modificarne la concentrazione.

- 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 di 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 80 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 80 iniezioni (possibilmente consecutive)
- L'area relativa a ciascuna transizione di ciascun composto in ognuna delle 80 iniezioni.
- Per ogni analita e ogni transizione l'area media ottenuta dalle 80 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 80 iniezioni
- Per ogni analita il rapporto ionico % medio ottenuto dalle 80 iniezioni, la deviazione standard e la deviazione standard relativa (CV%).

Al fine di uniformare la presentazione dei dati verrà fornita in sede di ritiro delle soluzioni per le prove tecniche un'apposita tabella di excel (Allegato B - Tabella Dati) da compilare e consegnare.

Valutazione e attribuzione dei punteggi

NOTA: per la distribuzione dei punteggi verrà applicata la seguente modalità generale:

- 1) Attribuzione del punteggio massimo relativo previsto nel caso di corretta identificazione/non identificazione dell'analita
- 2) Punteggio uguale a 0 nel caso di errata identificazione/non identificazione dell'analita

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

- Valori per la deviazione standard relativa (CV%) dell'area della transizione più intensa (picco base) ottenuta dalle 80 iniezioni: $\leq 10.0\%$
- Valori per la deviazione standard relativa (CV%) del rapporto ionico % (rapporto % area transizione meno intensa delle monitorate contro area transizione più intensa) ottenuto dalle 80 iniezioni: $\leq 20.0\%$
- Il tempo di ritenzione di ciascun analita non dovrà variare di più del $\pm 0,1$ min 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 80 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 0,1 punti.

(Punteggio massimo attribuibile $\rightarrow (0,40 \times 6) + 0,1 = 2,5$ punti)

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

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

Deviazione standard relativa (CV%) del rapporto ionico % (rapporto % fra area transizione meno intensa contro area transizione più intensa) ottenuto dalle 80 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 0,1 punti.

(Punteggio massimo attribuibile $\rightarrow (0,4 \times 6) + 0,1 = 2,5$ punti)

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

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

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

Il punteggio sarà 2,5 per ogni parametro considerato per un totale di 5 punti.

Prova 3

Vengono fornite a ciascun partecipante due vials contenenti la soluzione 3: 3A, 3B

Le soluzioni contengono gli analiti indicati in tabella 2, una miscela di pesticidi ad azione acaricida. Ciascun partecipante dovrà eseguire le analisi in modalità MRM utilizzando colonna e gradiente utilizzati per la prova 2. Per ciascuna soluzione dovranno essere eseguite 25 iniezioni consecutive iniettando 1 μL

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

Si richiede di iniettare per 25 volte le soluzioni 3A e 3B.

Si richiede inoltre di fornire:

- Evidenza dell'arco temporale durante le quali sono state eseguite le 25 iniezioni (possibilmente consecutive)
- L'area relativa a ciascuna transizione di ciascun composto in ognuna delle 25 iniezioni.
- Per ogni analita e ogni transizione l'area media ottenuta dalle 25 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 25 iniezioni

- Per ogni analita il rapporto ionico % medio ottenuto dalle 25 iniezioni, la deviazione standard e la deviazione standard relativa (CV%).

Al fine di uniformare la presentazione dei dati verrà fornita in sede di ritiro delle soluzioni per le prove tecniche un'apposita tabella di excel (Allegato B - Tabella Dati) da compilare e consegnare.

Valutazione e attribuzione dei punteggi

NOTA: per la distribuzione dei punteggi verrà applicata la seguente modalità generale:

- 1) Attribuzione del punteggio massimo relativo previsto nel caso di corretta identificazione/non identificazione dell'analita
- 2) Punteggio uguale a 0 nel caso di errata identificazione/non identificazione dell'analita

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

- 4) Valori per la deviazione standard relativa (CV%) dell'area della transizione più intensa (picco base) ottenuta dalle 25 iniezioni: $\leq 20.0\%$
- 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 25 iniezioni: $\leq 25.0\%$
- 6) Il tempo di ritenzione di ciascun analita non dovrà variare di più del $\pm 0,1$ min rispetto alla prima iniezione

Per ognuna delle 2 soluzioni i punteggi verranno attribuiti in relazione ai seguenti parametri:

Deviazione standard relativa (CV%) dell'area della transizione più intensa (picco base) ottenuta dalle 25 iniezioni:

per ogni singolo analita punti 0,25 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 $\rightarrow (0,25 \times 6) + 0,5 = 2$ punti)

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

$$\text{Punti partecipante considerato} = \frac{0.25 \times \text{CV \% inferiore ottenuto tra le ditte}}{\text{CV \% ottenuto dalla ditta considerata}}$$

Deviazione standard relativa (CV%) del rapporto ionico % (rapporto % fra area transizione meno intensa contro area transizione più intensa) ottenuto dalle 25 iniezioni:

Per ogni singolo analita punti 0,25 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 $\rightarrow (0,25 \times 6) + 0,5 = 2$ punti)

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

$$\text{Punti partecipante considerato} = \frac{0.25 \times \text{CV \% inferiore ottenuto tra le ditte}}{\text{CV \% ottenuto dalla ditta considerata}}$$

Il punteggio massimo totale sarà di 8 punti.

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

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.