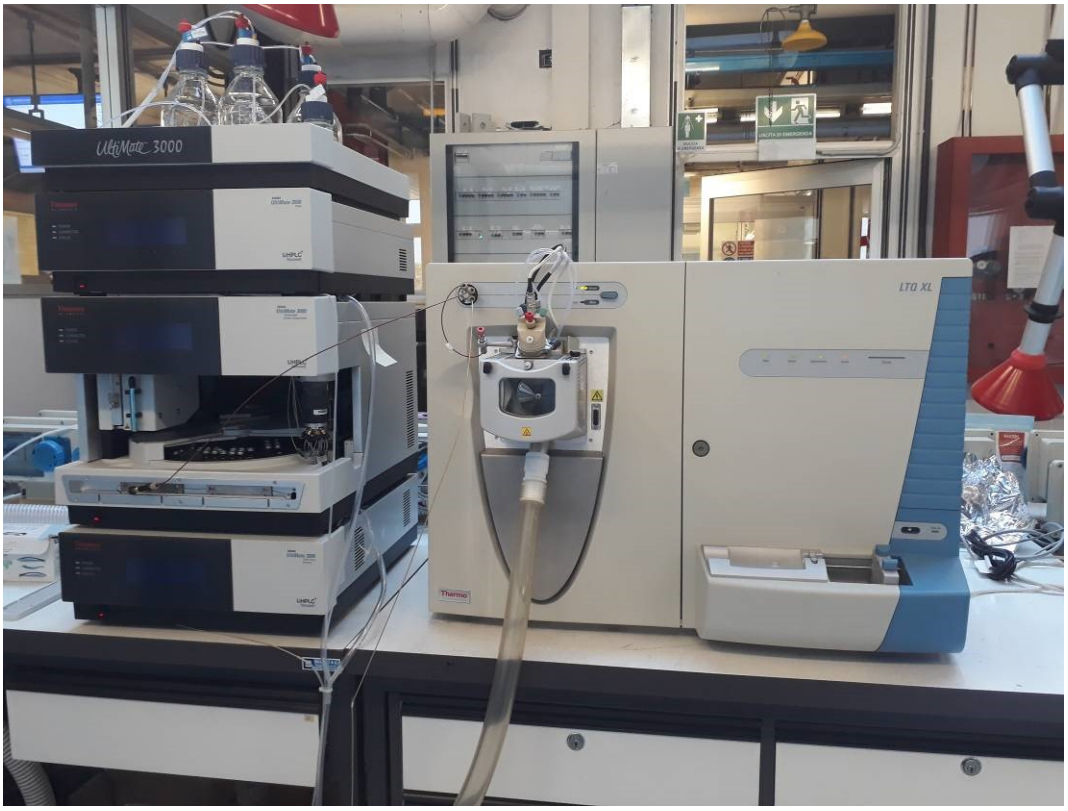
PROCEDURA DI TARATURA DELLA TRAPPOLA IONICA LINEARE DELLO STRUMENTO: HPLC-ESI-MS (LTQ XL)



LISTA DI DISTRIBUZIONE:

La presente SOP verrà inserita nel sito del Dipartimento e sarà accessibile agli utenti autorizzati

PREPARATO	DATA	VERIFICATO	DATA	APPROVATO	DATA
Eleni Laski Paolo Degliesposti	16/09/21	Dott.ssa M. Mattarozzi	22/10/21	Prof.ssa M.Careri	11/01/2022

INDICE

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE
2. RIFERIMENTI
3. DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI
4. DEFINIZIONI METROLOGICHE E TECNICHE
5. PERSONALE
6. MATERIALI DA UTILIZZARE
7. MODALITA' OPERATIVE
8. INDICAZIONI PER LA PRESENTAZIONE DEI RISULTATI DI PROVA
9. PROCEDURE APPLICABILI
10. PRESCRIZIONI DI SICUREZZA

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

La presente procedura ha lo scopo di indicare le modalità operative da utilizzare per la taratura della trappola ionica lineare dello strumento HPLC-ESI-MS (LTQ XL) (Chromatografo liquido accopiato a Spettrometro di massa dotato di sorgente ionizzazione elettrospray (ESI) con analizzatore a trappola ionica lineare LTQ-XL). Tale strumentazione è ubicata nel plesso Chimico Lab. 13.01.0.010 del Dipartimento di Scienze Chimiche, della Vita e della Sostenibilità Ambientale.

2. RIFERIMENTI

- D. Lgs. 81/2008: Testo unico in materia di salute e sicurezza nei luoghi di lavoro
- D. Lgs 81/2008: Attuazione dell'articolo 1 della legge 3 agosto 2007, n.123, in materia di tutela della salute e della sicurezza nei luoghi di lavoro
- PG 01.03.13-Rev. 3: "Gestione degli Strumenti" del Dipartimento SCVSA plesso Chimico e Polifunzionale
- Istituto Superiore di Sanità: "Guida Eurachem: Terminologia per le misurazioni analitiche – Introduzione al VIM 3" (2013)
- UNI EN ISO 9001:2015: "Sistemi di gestione per la qualità"
- UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2018: "Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura"
- REGOLAMENTO dipartimentale per l'utilizzo delle attrezzature acquisite mediante il finanziamento "Dipartimenti di eccellenza 2017" approvato nelle sedute del CdD del 01/07/2019 e del 06/11/2019. Dipartimento di Scienze Chimiche della Vita e della Sostenibilità Ambientale
- Manuale "LTQ XL – Getting started", Revision A, June 2006

3. DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI

Dipartimento SCVSA: Dipartimento di Scienze Chimiche, della Vita e della Sostenibilità Ambientale

DPI: dispositivi di protezione individuale

Personale qualificato all'uso dello strumento: personale del Dipartimento SCVSA

preventivamente formato e quindi autorizzato all'utilizzo dello strumento dal Responsabile dello strumento

Personale tecnico qualificato all'uso dello strumento: personale tecnico del Dipartimento, che rientra tra il personale qualificato all'uso dello strumento, preventivamente formato e quindi autorizzato all'utilizzo e alla manutenzione dello strumento

Responsabile di Laboratorio: Docente incaricato dal Direttore che, individualmente o come coordinatore di gruppo, svolge attività didattiche o di ricerca in laboratorio, conformemente al D.M. 363/1998.

Responsabile dello strumento: personale Docente del Dipartimento incaricato della gestione dello strumento. Negli strumenti ad uso comune il Responsabile dello Strumento potrebbe non coincidere con il Responsabile di Laboratorio

4. DEFINIZIONI METROLOGICHE E TECNICHE

Accuratezza: esprime il grado di accordo tra un valore misurato e un valore di riferimento accettato del misurando. L'accuratezza è determinata sia dagli errori casuali che da quelli sistematici

Calibrante o campione per la taratura: campione di misura utilizzato per la taratura di uno strumento o sistema di misura.

Campione di riferimento: strumento o campione munito di certificato di taratura emesso da un Laboratorio di Taratura Accreditato (LAT).

Incertezza: Parametro associato con il risultato di una misurazione che caratterizza la dispersione dei valori che possono essere ragionevolmente attribuiti al misurando

Manutenzione: insieme di azioni tecniche e gestionali finalizzate a mantenere lo strumento, o a riportarlo nello stato in cui possa eseguire le funzioni richieste.
La manutenzione può essere ordinaria se eseguita con tempistiche prestabilite oppure straordinaria se eseguita in seguito al riscontro di malfunzionamento dello strumento.

MRFA (Met-Arg-Phe-Ala acetate salt): componente peptidico della soluzione calibrante costituito da una sequenza di aminoacidi Metionina-Arginina-Fenilalanina-Alanina

m/z: rapporto massa/carica di uno ione

Precisione: grado di accordo tra i risultati indipendenti ottenuti da un set di misurazioni successive eseguite in condizioni ben specificate. La precisione è in relazione all'errore casuale di misura ed è espressa come deviazione standard

Ripetibilità: grado di accordo tra i risultati di misurazioni indipendenti dello stesso misurando effettuate nelle stesse condizioni di misurazione (stesso strumento, metodo, operatore ecc.)

Riproducibilità: grado di accordo tra i risultati ottenuti da misurazioni indipendenti dello stesso misurando effettuate in condizioni di misurazione non omogenee (laboratori diversi, diverso strumento, metodo, operatore ecc.)

Riferibilità e **materiali di riferimento:** nel caso di prove chimiche la riferibilità è garantita, nella maggior parte dei casi, dall'uso di **materiali di riferimento certificati**, i cui valori di una o più proprietà sono certificati da un procedimento che stabilisce la riferibilità ad una accurata realizzazione dell'unità nella quale i valori di proprietà sono espressi e per cui ciascun valore certificato è accompagnato da un'incertezza con un livello di fiducia stabilito

Taratura: insieme di operazioni atte a stabilire la relazione fra i valori di un misurando indicati dallo strumento di misurazione ed i corrispondenti valori noti di un campione di riferimento. Le tarature assicurano nel tempo la riferibilità metrologica ai campioni nazionali o internazionali di strumenti e campioni e sono eseguite attraverso l'utilizzo di adeguata strumentazione e da parte di personale tecnicamente competente

Ultramark 1621: componente della soluzione calibrante

5. PERSONALE

Il Responsabile dello strumento HPLC-ESI-MS (LTQ XL) è la Prof.ssa Maria Careri (contatto mail: maria.careri@unipr.it)
Il Responsabile del laboratorio 13.01.0.010, designato dal Consiglio di Dipartimento è la Dott.ssa Monica Mattarozzi (contatto mail: monica.mattarozzi@unipr.it)

RESPONSABILE DELLO STRUMENTO:

- gestisce la formazione ed identifica sia il personale qualificato all'uso dello strumento che il personale tecnico qualificato ad effettuare analisi e/o operazioni di manutenzione sullo strumento
- gestisce e regolamenta gli accessi al laboratorio del personale qualificato all'uso e alla manutenzione dello strumento
- verifica la preparazione ed il contenuto delle schede strumenti e dei registri di utilizzo
- si assicura che ogni utilizzo dello strumento venga registrato sull'apposita scheda
- verifica la preparazione e l'aggiornamento dell'elenco del personale qualificato all'uso e/o alla manutenzione dello strumento
- verifica che lo strumento sia identificato da etichetta
- verifica ed approva la preparazione e il contenuto dei protocolli di manutenzione preventiva e

verifica funzionale dello strumento anche al fine di rispettare le clausole ed i termini della garanzia fornita dal costruttore
- verifica l'attuazione e la registrazione delle operazioni di taratura e manutenzione dello strumento
- verifica l'attuazione e l'aggiornamento del registro digitale di manutenzione
- verifica e conserva il registro digitale di manutenzione e verifica dei dispositivi di sicurezza associati allo strumento
- in caso di interventi di manutenzione affidati a ditte esterne, presenzia e verifica l'esito dell'intervento e ne conserva la relativa documentazione
- controlla la scheda di "segnalazioni malfunzionamenti" ed anomalie rilevate a seguito di utilizzo dello strumento" e predispone eventuali interventi, evidenziando se ricadenti o meno nel periodo di garanzia fornita dal costruttore
- pianifica azioni correttive per lo strumento risultato non idoneo alla taratura/verifica
- vigila sul buon funzionamento dello strumento disponendo gli interventi di manutenzione ordinaria e straordinaria
- assicura la conservazione di tutte le registrazioni
- valuta le richieste di utilizzo dello strumento
- verifica con gli utenti la fattibilità e definisce i tempi di esecuzione delle prestazioni richieste
- garantisce il supporto tecnico/scientifico
- predispone gli interventi straordinari sullo strumento

PERSONALE QUALIFICATO all'uso dello strumento:

- esegue le analisi per sé o richieste da utenti interni od esterni al Dipartimento aggiornando il registro di utilizzo dello strumento
- in caso di malfunzionamento avvisa il Responsabile dello strumento ed il Personale tecnico qualificato all'uso dello strumento ed aggiorna il registro per le segnalazioni anomalie rilevate

PERSONALE TECNICO QUALIFICATO all'uso dello strumento:

- esegue le analisi richieste aggiornando il registro di utilizzo dello strumento
- esegue e registra i controlli eseguiti sugli strumenti affidati
- redige ed aggiorna le schede dello strumento e i registri di utilizzo
- predispone e registra sull'apposita scheda ogni intervento effettuato sullo strumento
- predispone ed aggiorna periodicamente l'elenco del personale qualificato all'uso e/o alla manutenzione dello strumento
- identifica tramite etichetta lo strumento
- predispone i protocolli di manutenzione preventiva e verifica funzionale dello strumento ed il registro digitale di manutenzione, sulla base delle indicazioni fornite dal costruttore e dal

Responsabile

- esegue le operazioni di manutenzione sullo strumento di competenza, in seguito a specifica qualifica (D.Lgs. 81/2008 art.71-c.7b), ed aggiorna il registro digitale di manutenzione
- predispone e conserva il registro digitale di manutenzione e verifica dei dispositivi di sicurezza associati allo strumento
- in caso di interventi di manutenzione affidati a ditte esterne, presenzia e verifica l'esito dell'intervento e ne conserva la relativa documentazione in accordo con il Responsabile dello strumento
- in caso di malfunzionamento registra gli eventuali malfunzionamenti rilevati e informa tempestivamente il Responsabile dello strumento
- conserva tutte le registrazioni
- può, in accordo con, e sotto la supervisione del Responsabile, svolgere attività di formazione per l'utilizzo dello strumento.

6. MATERIALI DA UTILIZZARE

- **Calibrante:** Pierce™ LTQ ESI Positive Ion Calibration Solution 10 mL, Nr.88322, ThermoScientific

Questo calibrante è una miscela commerciale pronta all'uso adatta per la taratura dello strumento in modalità positiva. Risulta composto da Caffeina, MRFA (Met-Arg-Phe-Ala acetate salt) e Ultramark 1621 in soluzione acquosa di acetonitrile, metanolo e acido acetico.

Figure 1. Calibrante Pierce™ LTQ ESI Positive Ion Calibration Solution

- Metanolo (MeOH)
- Siringa Hamilton 250 µL

7. MODALITÀ OPERATIVE

Prima di procedere con la taratura è possibile verificare l'effettiva necessità di questa operazione tramite verifica con la "Calibration Check".

La "Calibration Check" deve essere effettuata periodicamente al fine di controllare le prestazioni e la stabilità della trappola ionica lineare del LTQ XL.

A. CALIBRATION CHECK

La **"Calibration Check"** viene effettuata attraverso la seguente operazione:

1. caricare la siringa con la soluzione calibrante (Fig.1) e inserirla nell'apposito alloggiamento sulla parte frontale dello strumento (Fig.6)
2. predisporre lo strumento per l'infusione diretta inserendo il connettore, tubo di peak, e selezionando "Load Detector" sullo strumento (Fig.2 e 4)
3. spostare il probe ESI in posizione A (Fig.3)
4. assicurarsi che il capillare in silice fusa sia posizionato all'interno del needle dell'ESI, rientrando di circa 1 mm

Sul PC:

1. dal desktop aprire "LTQ Tune"
2. mettere l'MS detector in On mode

3. a destra della schermata verificare che tutti i parametri siano corretti (flag verde ✓)
4. regolare la velocità del flusso a 5 µL/min e far partire l'infusione
5. "LTQ Tune"
   - "Control"
     - "Calibrate"
       - "Check"
         - "Select All" ➔ START

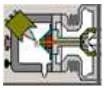
B. TARATURA SEMI-AUTOMATIC DEL LTQ XL IN ESI MODE

La taratura della trappola ionica lineare dello strumento LC-ESI-MS (LTQ XL) è prevista con frequenza almeno trimestrale, a seguito di esito negativo della "Calibration Check" oppure ogni volta che viene eseguito un intervento di manutenzione che richieda lo spegnimento completo dello strumento.

Attenzione: Per le misurazioni attualmente eseguite con lo specifico strumento dal personale qualificato la taratura necessaria viene fatta in modalità semi-automatic.

Per eseguire la Taratura in modalità Semi-Automatic il Personale qualificato dovrà seguire i passi sotto indicati:

1. controllare che la valvola di iniezione sullo strumento sia posizionata in "LOAD DETECTOR" (Fig.2)
2. spostare il Probe in posizione A (Fig.3)
3. controllare la posizione del capillare all'interno del probe ed eventualmente regolarlo (Fig.3) in modo che si trovi all'interno del needle, rientrando di circa 1 mm .
4. inserire il connettore (tubo di Peak rosso con adattatore per iniezione) con etichetta "per calibrazione" (Fig.4) pulendolo precedentemente con qualche iniezione di metanolo effettuata manualmente con la siringa
5. sul desktop del PC aprire "LTQ Tune" (Fig.5)
6. mettere l'MS detector in "On mode"

7. sul PC verificare, a destra della schermata, che tutti i parametri siano corretti (flag verde ✓)
8. preparare la siringa per l'infusione (Hamilton da 250 µL) prima lavandola con metanolo e successivamente riempendola con la soluzione calibrante (Fig.1)
9. inserire la siringa nell'alloggiamento posto sulla parte frontale dello strumento (Fig.6)
10. dal PC aprire il "Tune method File": File ➔ Open ➔ Selezionare il Tune file più recente ➔ Open
11. quindi cliccare sull'immagine dell'ESI Source  (Fig.7) e controllare che i seguenti parametri siano impostati correttamente:

    Sheat Gas Flow Rate (arb): 5
    Aux Gas Flow Rate: 0
    Sweep Gas Flow Rate: 0
    Spray Voltage (kV): 4.5
    Capillary Temp (°C): 275.00
    Capillary Voltage: 13.00
    Tube lens Offset: 150.00

se uno o più parametri vengono modificati, prima di chiudere la finestra, bisogna cliccare prima su "APPLY" e successivamente su "OK".
Regolare opportunamente i parametri di tune in modo da massimizzare e stabilizzare il segnale.
A questo punto cliccare sull'icona per far partire una acquisizione del segnale per un paio di minuti, salvando il file come "Pre-calibrazione (anno.mese.giorno)".

12. quindi cliccare sull'immagine del Define Scan e controllare che i seguenti parametri siano impostati correttamente:

    Scan History: ITMS + c Full ms [150.00-2000.00]
    Scan Description: Mass range: Normal
    Scan Rate: Normal
    Scan Type: Full
    Scan Time: Microscans: 1
    Max Inject Time: 200.000
    Scan Ranges: 150.00-2000.00

    se uno o più parametri vengono modificati, prima di chiudere la finestra, bisogna cliccare prima su "APPLY" e successivamente su "OK"

13. verificare sulla schermata che lo strumento sia impostato in "positive ion polarity mode" (Fig.5)

14. impostare sul software il tipo di siringa usata per l'infusione e la velocità del flusso:

    "LTQ Tune"
    Cliccare sull'immagine "Syringe Pump" " (Fig.8)
    scegliere: Type "Hamilton", Volume "250 µL",
    ed impostare il Flow Rate: 5 µL/min*
    avviare l'infusione tramite Flow Control "On"
    "Apply" ➔ "OK"

    ***Attenzione**: Se la calibrazione non avviene con successo per l'intensità dei segnali troppo bassi si può ripetere l'operazione aumentando la velocità di infusione del calibrante senza superare i 10 µL/min.

15. una volta iniziata l'infusione del calibrante bisogna controllare sul cromatogramma l'intensità e la stabilità dei segnali cliccando sul pulsante "Display Spectrum View" :

Caffeina = 195 m/z: controllare la presenza del picco e l'intensità di almeno e^6 NL*

MRFA = 524 m/z: controllare la presenza del picco e l'intensità di almeno e^6 NL*
*NL: Normalization level

Ultramark: 1022 - 1822 m/z: controllare la presenza del segnale a forma di campana

Se i picchi risultano visibili, sono stabili e d'intensità sufficiente si può procedere con la taratura dello strumento

16. "LTQ Tune"
    ■ "Control"
    ■ "Calibrate", selezionare "Semi-Automatic" (Fig.9)
    ■ Selezionare tutti i parametri tranne la modalità non desiderata (ion polarity mode)
    ■ "Start"

17. la taratura dello strumento richiede all'incirca 40 minuti di tempo e potrebbe non essere sufficiente una sola infusione di 250 µL di soluzione calibrante. Man mano che la taratura procede è possibile osservare il risultato aggiornato in tempo reale nella finestra "Calibrate" (Fig.9). I parametri che superano il test vengono flaggati in verde ✓ e la data viene aggiornata.

    I parametri che non superano il test vengono contrassegnati con una X ; in questo caso bisognerà ripetere il processo di taratura selezionando solo i parametri che non hanno superato il test.

    Se la taratura si conclude con successo si prosegue con i seguenti passaggi:

18. far partire una acquisizione del segnale per un paio di minuti, salvando il file come "Post-calibrazione (anno.mese.giorno)".

19. salvare il TUNE: File ➔ Save as: Q:/Tune:/Tune Calibrazioni ➔ Save (anno.mese.giorno)

Una volta terminata la taratura bisogna:

a. recuperare la soluzione di calibrazione avanzata all'interno della siringa, mettendolain una vial di vetro, opportunamente etichettata e conservata in frigo

b. rimettere l'MS Detector in "standby mode" ➔

c. riposizionare il probe in posizione B o C

d. togliere il connettore utilizzato per la taratura (tubo di Peak)

e. lavare la siringa e il tubo di Peak con metanolo

f. pulire la sorgente. La procedura da seguire è descritta in modo dettagliato nella SOP 01.00.010.17 "ESI-MS Pulizia della sorgente"

Figure 2. Pulsante "Load Detector"

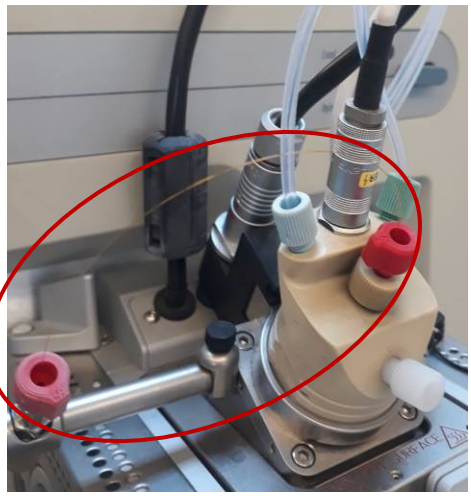


Figure 3. Probe e Capillare

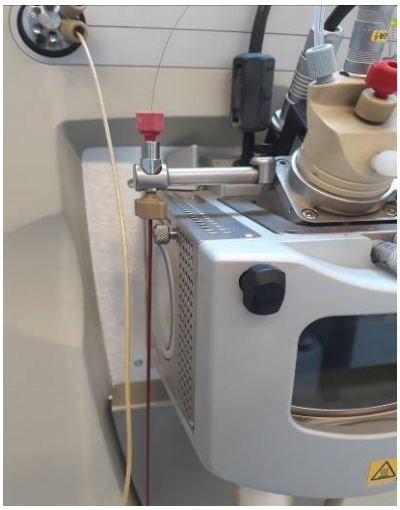


Figure 4. Connettore (Tubo di Peak)

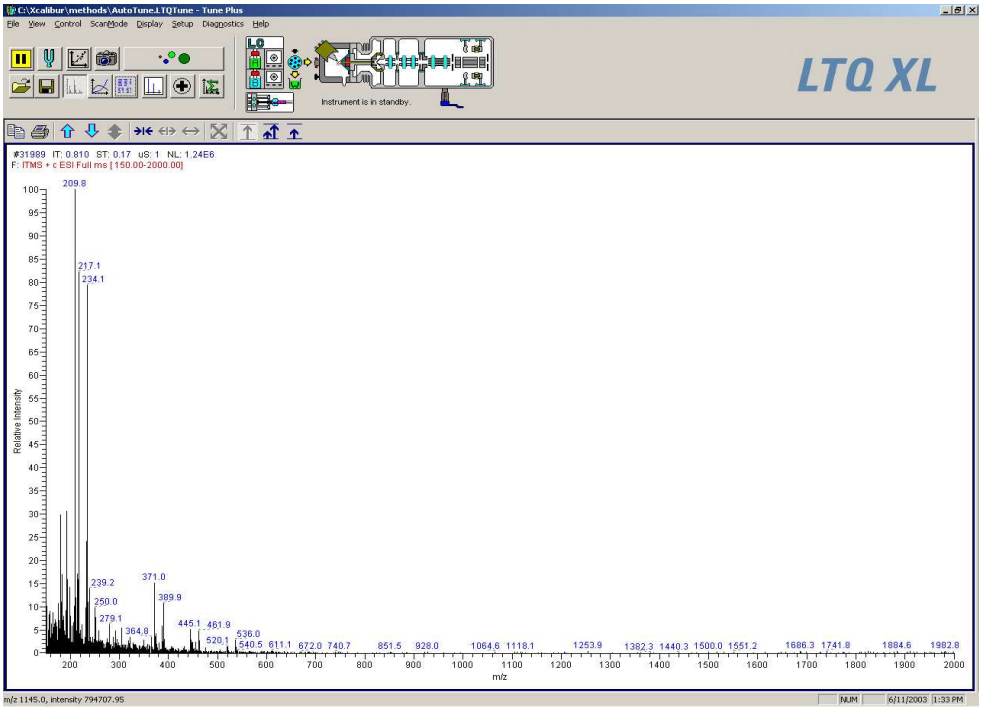


Figure 5. Finestra LTQ Tune (Tune Plus), con il MS Detector in modalità Standby

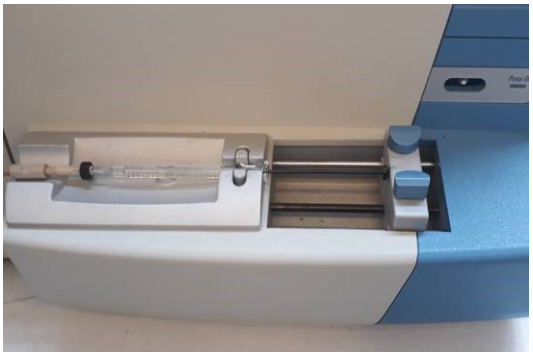


Figure 6. Syringe pump

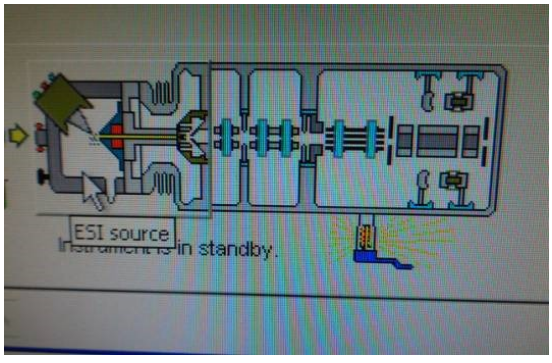


Figure 7. Figura ESI Source

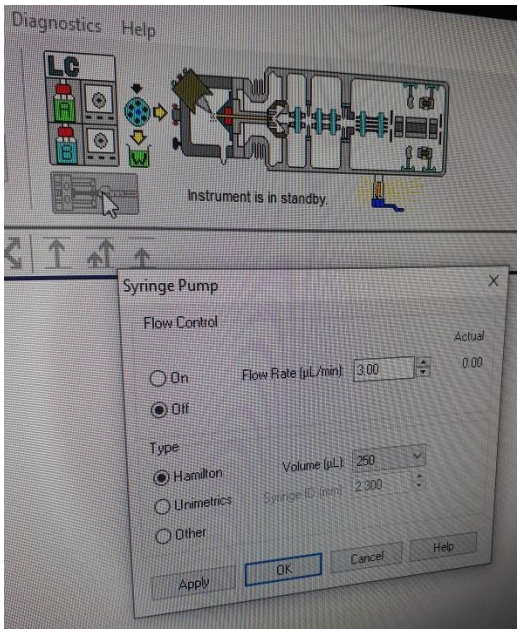


Figure 8. Finestra Syringe Pump Figure

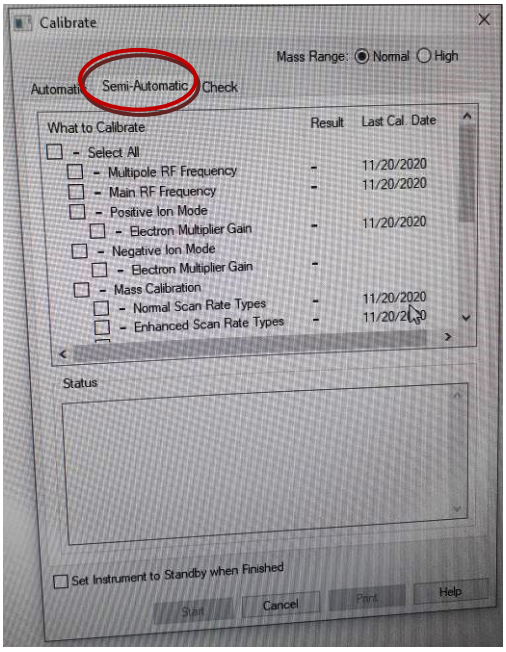


Figura 9. Finestra di Taratura "Calibrate"

8. INDICAZIONI PER LA PRESENTAZIONE DEI RISULTATI DI PROVA

I risultati della taratura devono essere salvati all' interno del pc collegato allo strumento come riportato nei punti 18 e 19 del capitolo 7 "MODALITÀ OPERATIVE".
Inoltre, il personale qualificato che ha eseguito la taratura sarà tenuto a registrare l'operazione nel registro elettronico di manutenzione dello strumento.

9. PROCEDURE APPLICABILI

- SOP n. 01.01.010.21 "Manutenzione ESI-MS Pulizia della sorgente"
- PG n. 01.00.010.21 "Gestione dello strumento HPLC-ESI-MS (LTQ XL)"

10. PRESCRIZIONI DI SICUREZZA

Tutte le operazioni descritte devono essere eseguite utilizzando gli idonei Dispositivi di Protezione Individuale e Collettivi disponibili in laboratorio (guanti in nitrile, occhiali para-schizzi e cappe aspiranti) ed indossando il camice.