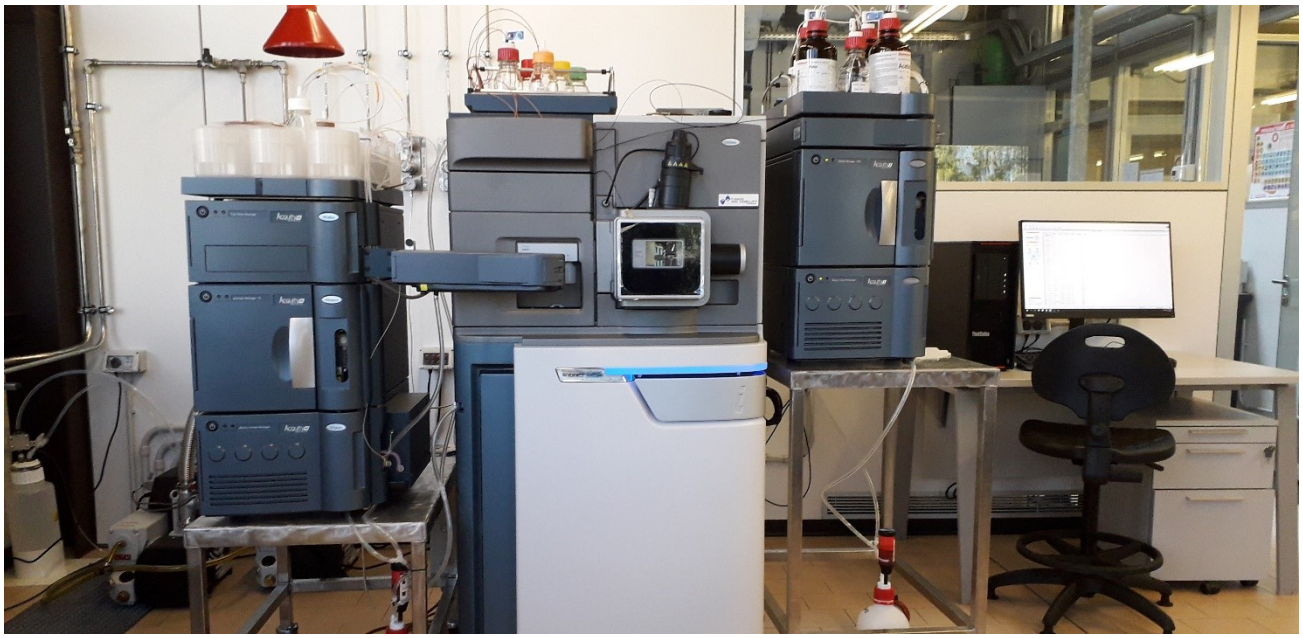
PROCEDURA DI TARATURA DELLO STRUMENTO: Synapt G2-Si HD DESI, I-Class, M-Class HRMS



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	25/10/2021	Prof.ssa F. Bianchi	21/12/2021	Prof.ssa F. Bianchi	21/12/2021

INDICE

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE
2. RIFERIMENTI
3. DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI
4. DEFINIZIONI METROLOGICHE E TECNICHE
5. PERSONALE
6. MATERIALI ED APPARECCHIATURE 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 dello strumento: spettrometro di massa ad alta risoluzione con tecnologia Q-TOF dotato di mobilità ionica interfacciato con un sistema cromatografico nano-HPLC e UPLC ed equipaggiato con sorgenti ESI e DESI (Synapt G2-Si HD DESI, I-Class, M-Class HRMS). Tale strumentazione è ubicata nel plesso Chimico Lab. 13.01.0.079 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)
- 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
- UNI EN ISO 9001:2015: "Sistemi di gestione per la qualità"
- UNI 11063:2017: "Manutenzione – Definizione di manutenzione ordinaria e straordinaria"
- UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2018: "Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura"
- Manuale istruzioni Synapt G2-Si HD DESI, I-Class, M-Class HRMS.

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 del Dipartimento SCVSA che, individualmente o come coordinatore di gruppo, svolge attività didattiche o di ricerca in laboratorio, conformemente al D.M. 363/1998.

Responsabile dello strumento: 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

SYNAPT G2-Si: Spettrometro di massa ad alta risoluzione con tecnologia Q-TOF dotato di mobilità ionica interfacciato con un sistema cromatografico nano-HPLC ed UPLC ed equipaggiato con sorgenti ESI e DESI (Synapt G2 Si HD DESI, I-Class, M-Class HRMS)

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: sostanza in soluzione a concentrazione nota 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

Lock mass: sostanza che fornisce un valore di massa stabile e che quindi può essere considerato come valore di massa di riferimento

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

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 concordanza tra i risultati di misurazioni successive dello stesso misurando effettuate nelle stesse condizioni di misurazione (stesso strumento, metodo, operatore ecc.)

Riproducibilità: grado di concordanza tra i risultati di misurazioni successive 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

5. PERSONALE (compiti e responsabilità)

Il Docente Responsabile dello strumento SYNAPT G2-Si e del laboratorio 13.01.0.079, designato dal Consiglio di Dipartimento è la Prof.ssa Federica Bianchi (E-mail: federica.bianchi@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, in accordo con il Responsabile del laboratorio, gli accessi allo strumento 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 delle 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 dello Strumento
- 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 ED APPARECCHIATURE DA UTILIZZARE

- **Leucina Encefalina ($C_{28}H_{37}N_5O_7$)**: amminoacido utilizzato come Lock mass cioè come massa di riferimento in quanto fornisce un valore di massa stabile

- **Calibrante**:
  - Sodio formiato (HCOONa) per calibrazioni fino a 2000
  - Sodio ioduro (NaI) per calibrazioni fino a 5000
  - Glu-fibrinopeptide GFP ($C_{66}H_{95}N_{19}O_{25}$) per calibrazioni da 50-1200

- **Soluzione di Strong Wash**: soluzione di lavaggio così composta: 50% Acetonitrile – 25% Acqua – 25% Alcool isopropilico + 0,1% Acido formico

7. MODALITÀ OPERATIVE

Premessa: Prima di eseguire la taratura è necessario procedere alla verifica della necessità della taratura stessa attraverso l'esecuzione del calibration check.

Infondere la lock mass dal pannello della fluidica ed attendere che sia stabile, quindi

MassLynx
[redacted] Intellistart
[redacted] + SYNAPT G2-Si
[redacted] Intellistart
[redacted] Configure
[redacted] Normal Mode

☑ **Calibration Check** Spegnere l'infusione della lock mass.

Si tratta di una verifica strumentale sull'ultima taratura effettuata. Tale operazione consente di stabilire se l'ultima taratura eseguita può essere ancora considerata valida. Se l'operazione di "Calibration Check" si conclude con esito positivo la taratura non risulta necessaria. Se, al contrario, si conclude con esito negativo sarà necessario procedere con la taratura.

Sempre in "Normal Mode" oltre al Check della taratura il software consente di effettuare altri tipi di check e precisamente:

☑ **Lock Mass Check**

Utile per effettuare una verifica sul segnale fornito dalla Lock Mass (Leucina Encefalina).

☑ **Detector Check**

Utile per il controllo dell'area dei picchi della Leucina Encefalina

TARATURA DELLO STRUMENTO

N.B. Per eseguire la taratura lo strumento deve essere in modalità "OPERATE" da **almeno 1h**.

Deve essere utilizzata la Leucina Encefalina come REFERENCE in posizione B e, in posizione C (canale per infusione) deve essere posizionato il CALIBRANTE.
Prima di procedere alla taratura verificare che i segnali della lock mass e del calibrante siano stabili (vedasi punto l della procedura)

La taratura viene effettuata secondo la seguente procedura:

a) MassLunx
   - Intellistart
     - + SYNAPT G2-Si
       - Intellistart
         - Configure
           - Reference File Editor

Compaiono i File con i CALIBRANTI, normalmente vengono usati:

- Na formiato per taratura fino a 2000
- NaI per taratura fino a 5000
- GFP per taratura da 50-1200

Nei file compaiono le specifiche m/z dei frammenti che produce il calibrante.

Si procede quindi:

b) Configure

■ Normal mode

☑ **Use calibration profile**

■ START ▶

c) Si apre la finestra per impostare la taratura
N.B: se la taratura dovrà essere effettuata con lo stesso profilo di taratura già caricato ed utilizzato in precedenza, quest'ultimo dovrà essere eliminato.

d) Nell'elenco dei profili di taratura possono apparire diversi stati contrassegnati dai seguenti simboli:

✓ = taratura già effettuata
➢ = taratura preparata ma non utilizzata
! = Uncal

e) Per eliminare la taratura precedente si seleziona "! Uncal" e poi OK

f) Una volta eliminato il profilo della taratura nella "TUNE PAGE" in basso a destra compare la scritta "Calibration Uncal"

g) Si procede quindi con:

Configure

■ Configure mode

☑ **Create Calibration**

■ START ▶

h) Cliccare su "NEXT"

i) Scegliere "Calibration Profile Editor"

File

New

Si può costruire il profilo di taratura che potrà essere usato:

- **Name**: calibrante, intervallo m/z (esempio: sodium formiate_50_1200)
- **Mass range**: è bene impostare gli stessi range settati nella TUNE PAGE (low mass/high mass)
- **Type of calibration**:
  - **Automatic**: lo strumento esegue in autonomia
  - **Assisteted**: lascia all'utente la possibilità di scegliere i picchi manualmente includendoli o meno **(consigliato)**
  - **Manual**: l'utente procede manualmente sia all'acquisizione sia al riconoscimento dei picchi **(sconsigliato)**
  - **Polarity**: per l'impostazione della polarità con cui effettuare la taratura in "+", in "-"o in entrambe
  - **Calibrante**: selezionare quale calibrante utilizzare (esempio: Na formiato)

j) Nella finestra iniziale della taratura compare il nuovo profilo appena costruito con il simbolo ▶

k) Per la regolazione della fluidica si può utilizzare la "TUNE PAGE"

l) Il segnale del calibrante non dovrebbe essere troppo elevato per non saturare il detector, max 10^6; nel caso sia troppo elevato bisogna agire abbassando il voltaggio del capillare ed eventualmente attivando le energie di collisione

m) Infine, si può lanciare la taratura:

Intellistart

Calibration

START ▶

- Selezionare il profilo di taratura che è stato appena creato (Attenzione: deve avere il simbolo ▶)
- Lo strumento utilizzerà i setting e la fluidica della TUNE PAGE (flusso 5 µl/min)

N.B. Assicurarsi che sia stato eseguito il refill della siringa.

ATTENZIONE: Se si sceglie di effettuare la taratura utilizzando un profilo già esistente, e non uno creato ex-novo, si dovrà precedentemente effettuare il Reset in Editor

n) Terminata la taratura lo strumento mostra lo spettro acquisito confrontandolo con quello di riferimento. Nel caso in cui sia stata selezionata precedentemente la modalità "Assisted" l'operatore può decidere quali segnali conservare od aggiungere.

- Per selezionare i segnali mostrati nella taratura procedere con:

  Tasto DX mouse

  ■ Calibration

  ■ unselected

- Si potranno togliere 1 o 2 segnali se eventualmente escono dai limiti di tolleranza mostrati nel grafico sottostante gli spettri, in questo modo si potrà abbassare l'errore e si potrà **accettare la taratura**: Residual Mass < 0.5-1 ppm.

  N.B: Non si possono eliminare più di 2 segnali consecutivi

o) Terminate le operazioni di taratura, fermare l'infusione della lock mass e del calibrante dal pannello della fluidica e procedere con il lavaggio accurato delle linee e dello strumento utilizzando la soluzione strong wash.

p) Il personale qualificato che ha eseguito la taratura sarà tenuto a compilare il registro di interventi e manutenzioni strumento.

8. INDICAZIONI PER LA PRESENTAZIONE DEI RISULTATI DI PROVA

Lo strumento salva automaticamente la taratura eseguita con esito positivo, se questa è stata accettata

9. PROCEDURE APPLICABILI

- PG: 01.01.079.21 "Gestione dello strumento Synapt G2-Si"
- SOP: 01.00.079.21 "Procedura di accensione e spegnimento dello strumento Synapt G2-Si"

10. PRESCRIZIONI DI SICUREZZA

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