

# Zajištění návaznosti optických měření minireadery

L. Dohnal, P. Matějček, M. Šmíd,  
J. Švarcová

## Motto:

*Dubito, ergo sum.*

## Terminologická poznámka

Omlouvám se čtenářům, že používám termín „minireadery“, což je nečeské a nepěkně znějící slovo z odborného slangu. Nechtěl jsem vytvořit neologismus a nepodařilo se mi nalézt jednoduchý, český a přitom dostatečně srozumitelný termín pro pojmenování těchto přístrojů. Budu vděčný za případné návrhy.

## 1. Úvod

Zajištění kvality analytických výsledků laboratoře má typickou strukturu (1):

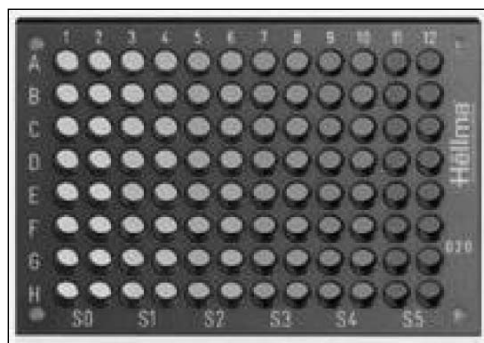
1. Metrologické zajištění návaznosti u měřících přístrojů – např. u spektrofotometrů, mezi které minireadery patří – např. návazáním stupnic absorbance a vlnové délky, v intervalech jednou za rok až několik let.
2. Validace resp. verifikace postupů analýz, vnitřní a vnější kontrola kvality – např. zařazením vzorků ke kontrole linearity, opakovatelnosti a reprodukovatelnosti, míry shody mezi „dáno“ a „nalezeno“ – v intervalech denně až ročně.
3. Nezávislá prověrka (audit) kontrolních systémů laboratoře a jejich využití – např. prostřednictvím GLP, akreditace v intervalech jednou za rok až několik let.
4. Kvalifikace pracovníků laboratoře pregraduální i postgraduální – např. odborná setkání, publikace, postgraduální studium.

V tomto sdělení se zabýváme metrologickou kalibrací a ověřováním měřících přístrojů. Soustředíme se na zajištění návaznosti měření absorbance ve viditelné oblasti a blízké UV u tzv. minireaderů. To jsou spektrofotometry specializované na vertikální měření při krátké optické dráze (kolem 3 mm) v malých objemech kapaliny (kolem 150 mikrolitrů).

(2). Jejich použití je značně rozšířené tam, kde se provádějí imunochemická stanovení typu ELISA, nejen v klinických laboratořích (klinická biochemie, imunologie a mikrobiologie), ale též za účelem detekce a stanovení mikroorganismů v potravinářských laboratořích (3). Technika měření těmito

přístroji se liší od klasické techniky horizontálního měření. Zatímco u horizontálního měření je optická dráha daná napevno vzdáleností planparalelních stěn měřící kvety, u vertikálního měření je dána vzdáleností mezi dnem jamky a hladinou kapaliny v ní. V důsledku toho je u horizontálního měření optická dráha v širokých mezích nezávislá na objemu měřené kapaliny v kvetě, kdežto u měření vertikálního je (ale pouze přibližně) úměrná objemu kapaliny v jamce.

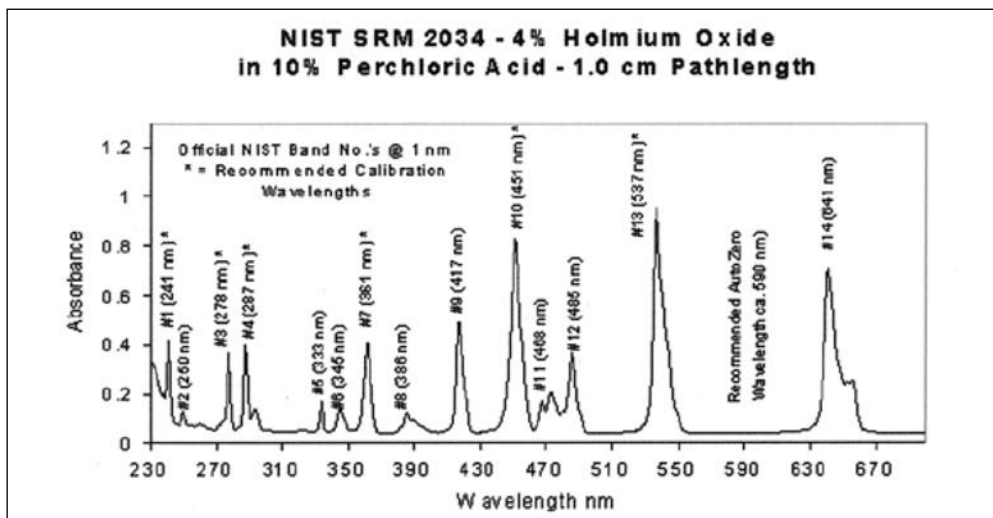
U minireaderů je při zajištění návaznosti měření absorbančí kapalným etalonem problémem optická dráha. Ta je dána jak výše zmíněno vzdáleností mezi dnem jamky a hladinou roztoku. Tato vzdálenost, která není v běžných laboratorních podmínkách exaktně měřitelná, závisí na úplné geometrii jamky a objemu roztoku v ní. Problém je možno řešit tak, že místo kapaliny použijeme etalon v pevném skupenství. Jako příklad může sloužit produkt firmy Hellma, který je označen 666.013 Microplate reader calibration standard (4).



**Obr. 1 Schematické znázornění etalonu 666.013 Microplate reader calibration standard firmy Hellma**

Jeho schema je uvedeno na obr. 1, má rozměry stejně jako měřící mikrotitrační destička s 8 x 12 okénky o průměru 6.6 mm. Okénka jsou ve stejných pozicích, jako jamky (kvety) na mikrotitrační destičce. Každé dva sloupce (2 x 8 okének) jsou překryty obdélníkovým šedým sklem, které má výrobcem absorbančí garantovanou pro vlnové délky 405, 450, 490 a 650 nm. K dispozici jsou skla s absorbancemi: 0,25, 0,5, 1,0, 1,5, 2,5.

Pokud se šedá skla nahradí skly holmiovými, lze kalibrovat vlnové délky. Holmium má totiž absorpční spektrum s mnoha ostrými maximy v rozmezí 241 až 641 nm. Pro ilustraci je na obr. 2 uvedeno absorpční spektrum 4% oxidu holmia v 10% kyselině chloristé (5).



Obr. 2 Absorpční spektrum 4% oxidu holmia v 10% kyselině chloristé, optická dráha 1 cm

## 2. Materiál a metody

K zajištění návaznosti absorbancí měřených minireadery byly na pracovišti Českého metrologického institutu v Laboratorii primární metrologie v Praze v r. 2012 zkonstruovány dva etalony v pevném skupenství. První etalon je navázaný pro oblast 400 až 780 nm po 1 nm je realizován šedými skleněnými filtry č. 1 až 4 s průměrnými hodnotami absorbance 0,2, 0,6, 1,0 a 2,0 s relativní nejistotou 0,2 %. Druhý etalon je určený primárně pro vlnovou délku 340 nm, je však navázan od 250 do 850 nm. Je realizován metalickými filtry č. 5 a 6 s průměrnými hodnotami absorbance 0,5 a 1,5. Relativní nejistota pro 340 nm je 0,2 %. Poněvadž každý z obou filtrů tohoto etalonu zabírá téměř polovinu jamek na destičce, lze jej použít též ke kontrole homogenity (opakovatelnosti) měření absorbancí na destičce.

K zajištění návaznosti stupnice vlnových délek byl na též pracovišti zkonstruován etalon s holmiovým sklem. Jeho použití má smysl jen v případě, že minireader měří spektrálně, že není jen filtrovým fotometrem. Pokud je absorbance měřeného vzorku závislá na vlnové délce, způsobí posun vlnových

délek chybu při měření absorbance. V takovém případě je tedy kontrola nastavení správné vlnové délky rovněž důležitá.

Etalony mají standardní formát mikrotitrační destičky. Filtry jsou odnímatelné, aby bylo možné jejich proměření na primární monochromátorové aparatuře, a tím zajištěna potřebná metrologická návaznost.

Etalony byly testovány na přístrojích Infinite 200, výrobce Tecan, výr. č. 711003843 a Sunrise, výrobce Tecan, výr. č. 705001453 v laboratorii imunochemie a molekulární diagnostiky v Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. lékařské fakulty University Karlovy v Praze a Všeobecné fakultní nemocnici v Praze. Etalon absorbancí byl navíc testován na přístroji výrobce Dynex Technologies a Multiscan RC 351, výrobce Labsystems v laboratorii Ústavu klinické imunologie a alergologie ve FN v Hradci Králové.

## 3. Výsledky a diskuse

Kompletní výsledky jsou k dispozici u autorů. Pro ilustraci jsou v následujících tabulkách uvedeny výsledky ověření absorbancí filtry č. 1 a 4 při 450, 620 a 630 nm (tab. 1 a 2), filtry č. 5 a 6 při 340 nm (tab. 3) a ověření vlnových délek holmiovým filtrem (tab. 4).

Tab. 1 Ověřování absorbance filtrem č. 1

	Infinite	Sunrise	Dynex	Multiscan
$\lambda=450$ nm, $n=10$ , $A_{ref}=0,1674$ , $U_{cREF}=0,00080$				
A	0,1703	0,1631	0,1648	0,1666
SD	0,00087	0,00115	0,00231	0,00289
U <sub>c</sub>	0,0019	0,0024	0,0047	0,0058

Tab. 1 - pokračování

	<b>Infinite</b>	<b>Sunrise</b>	<b>Dynex</b>	<b>Multiscan</b>
UcREL	1,1%	1,4%	2,8%	3,5%
vychýlení	0,0029	-0,0043	-0,0026	0,0008
$\lambda=620$ nm, n=10, Aref=0,1916, UcREF=0,00054				
A	0,1914	0,1883	---	0,1891
SD	0,00064	0,0012	---	0,00231
Uc	0,0014	0,0024	---	0,0047
UcREL	0,7%	1,3%	---	2,5%
vychýlení	-0,0002	-0,0033	---	-0,0025
$\lambda=630$ nm, n=10, Aref=0,1933, UcREF=0,00054				
A	---	---	0,1858	---
SD	---	---	0,0029	---
Uc	---	---	0,0058	---
UcREL	---	---	3,0%	---
vychýlení	---	---	-0,0075	---

Tab. 2 Ověřování absorpance filtrem č. 4

	<b>Infinite</b>	<b>Sunrise</b>	<b>Dynex</b>	<b>Multiscan</b>
$\lambda=450$ nm, n=10, Aref=2,2518, UcREF=0,00783				
A	2,2614	2,2462	2,2677	2,2551
SD	0,00739	0,00462	0,00289	0,02252
Uc	0,0167	0,0121	0,0097	0,0457
UcREL	0,7%	0,5%	0,4%	2,0%
vychýlení	0,0096	-0,0056	0,0159	0,0033
$\lambda=620$ nm, n=10, Aref=2,0862, UcREF=0,00533				
A	2,0876	2,0905	---	2,0891
SD	0,00497	0,00231	---	0,01674
Uc	0,0113	0,0071	---	0,0339
UcREL	0,5%	0,3%	---	1,6%
vychýlení	0,0014	0,0043	---	0,0029
$\lambda=630$ nm, n=10, Aref=2,0572, UcREF=0,00603				
A	---	---	2,0529	---
SD	---	---	0,0029	---
Uc	---	---	0,0084	---
UcREL	---	---	0,4%	---
vychýlení	---	---	-0,0043	---

Tab. 3 Ověřování absorbance filtrem č. 5 a 6,  $\lambda=340$  nm,  $n=20$

	Infinite	Sunrise	Infinite	Sunrise
	Aref=0,4763, UcREF=0,00099		Aref=1,5346, UcREF=0,00087	
A	0,4753	0,4668	1,4950	1,4686
SD	0,00912	0,00924	0,01605	0,01328
Uc	0,0183	0,0185	0,0321	0,0266
UcREL	3,8%	3,9%	2,1%	1,7%
vychýlení	-0.0010	-0,0095	-0,0396	-0,0661

Tab. 4 Ověřování vlnové délky holmiovým filtrem

T	REF	Infinite		Sunrise	
	$\lambda$ (nm)	naměřeno $\lambda$ (nm)	odchylka $\lambda$ (nm)	naměřeno $\lambda$ (nm)	odchylka $\lambda$ (nm)
max	378,7	377,8	-0,9	---	---
min	385,9	384,8	-1,1	---	---
min	418,3	419,4	1,2	417,0	-1,3
max	431,6	432,5	0,9	429,4	-2,2
max	478,8	478,8	0,1	---	---
min	485,7	487,0	1,3	---	---
min	536,9	538,0	1,1	538,0	1,1
min	640,0	641,3	1,3	642,2	2,2

#### 4. Závěr

Popsané pevné etalony pro zajišťování návaznosti absorbance a vlnové délky při měření na minireaderech se osvědčily. Etalony pevné jsou pro minireadery vhodnější než etalony kapalné. Především proto, že na rozdíl od etalonů kapalných nevzniká při měření absorbancí problém s optickou dráhou. Jejich použití lze doporučit pro metrologickou kontrolu minireaderů zejména na pracovištích, která se ucházejí o certifikaci resp. akreditaci nebo jsou již certifikována resp. akreditována.

Naše poděkování za měření na přístrojích výrobců Dynex Technologies a Labsystems patří doc. RNDr. Ctiradu Andrášovi, Ph.D.

#### 6. Zkratky a symboly

A	absorbance
ČMI	Český metrologický institut
n	počet paralelních měření
REF	referenční
SD	směrodatná odchylka
T	transmittance

Uc	kombinovaná rozšířená nejistota, faktor rozšíření=2
UcREF	kombinovaná rozšířená nejistota etalonu, faktor rozšíření=2
UcREL	relativní kombinovaná rozšířená nejistota, faktor rozšíření=2

#### 7. Literatura

1. Dohnal L.: Metrologické zajištění jakosti spektrometrie, FONS No. 2, 29-31 (2001)
2. Štern P.: Základy instrumentální analýzy v klinické biochemii, <http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/biochem/text11.htm> (stav dne 13. 11. 2012)
3. Demnerová K.: Mikrobiologická bezpečnost potravin: Současné strategie pro efektivní kontrolu, Chem. Listy 106, 920-925 (2012)
4. Calibration standard for microplate readers <http://www.hellma-analytics.com/text/159/en/calibration-standard-for-microplate-readers.html> (stav dne 21. 12. 2011)
5. UV calibration kit for PQ compliance [http://www.microsolvttech.com/PDF/PQKit10\\_7.pdf](http://www.microsolvttech.com/PDF/PQKit10_7.pdf) (stav dne 21. 12. 2011)