



# Leistungsbewertung des fluidlab R-300

Spektrometer

## Einleitung

Photospektrometer sind ein wichtiges und weit verbreitetes Messinstrument zur Auswertung einer Vielzahl von chemischen, biologischen und medizinischen Tests. Zur Sicherstellung der Messgenauigkeit von Photospektrometern haben sich Referenzmaterialien etabliert, die einerseits die photometrische und andererseits die spektrale Genauigkeit des Messsystems bestimmen können. Dabei handelt es sich um Glasgefäße in Küvettenform, die mit unterschiedlichen Flüssigkeiten gefüllt sind oder Glasfilter beinhalten. Mithilfe der zertifizierten Referenzfilter der Firma Hellma Analytics wird jedes fluidlab R-300 während der Produktion kalibriert und in einer abschließenden Qualitätskontrolle überprüft. Zur besseren Rückverfolgbarkeit werden diese Werte für jedes Geräte in unserer Datenbank hinterlegt.

In der US-Pharmakopöe 857 (USP) sind zulässige Grenzwerte für diese Tests definiert. Pharmaunternehmen in den USA sind gesetzlich dazu verpflichtet, ausschließlich Geräte einzusetzen, die diese Richtlinie erfüllen. Auch europäische Unternehmen arbeiten nach dieser Richtlinie, da diese nur durch Einhaltung dieser Richtlinie auf dem US-Markt aktiv werden dürfen. Die europäische Pharmakopöe 2.2.25 (EP) ist bezüglich der Grenzwerte für Tests weitgehend identisch zur US-Version, enthält jedoch weitere Grenzwerte z.B. hinsichtlich Linearität der Messung, die im Zuge dieser Untersuchung der Vollständigkeit halber mit untersucht werden. Bei anvajo arbeiten wir nach dieser Richtlinie, da die darin beschriebenen Standards für UV/VIS Spektrometer mit zu den anspruchsvollsten Weltweit zählen und diese sowohl in der Pharmabranche die Standards setzen als auch im biotechnologischen Bereich. Dieser stringente Qualitätsanspruch ermöglicht es, das anvajo fluidlab für Analysen auch in regulierten Märkten, wie der in-vitro Diagnostik, Lebensmittel- oder Wasseranalytik zu nutzen.

# Material und Methoden

## Material

Für die photometrischen Messungen mit dem *fluidlab* R-300 wurden die Filter F201, F202, F203 und F4 von Hellma Analytics (Müllheim, Deutschland) verwendet.

Weiterhin wurden verschiedene Farbstoffkonzentrationen von Methylenblau (Sigma, Darmstadt, Deutschland) in Standardküvetten (10x10 mm) aus PMMA zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit und den Vergleich der Linearität zwischen verschiedenen Geräten genutzt.

### Photometrische Parameter

Hierfür wurde ein Neutralglassfilter mit verschiedenen Absorptionscharakteristika verwendet. Die Überprüfung erfolgt dabei an diskreten, zertifizierten Wellenlängen über einen breiten Extinktionsbereich von 0,3 bis 2,1.

	USP Grenzwert	EP Grenzwert
<b>Genauigkeit</b>		
VIS Region	0,01 < 1 A 1 % > 1 A	0,01 < 1 A 1 % > 1 A
<b>Präzision</b>		
VIS Region	0,005	n/a
<b>Bestimmtheitsmaß</b>		
<b>R<sup>2</sup></b>		
VIS Region	n/a	0,999

### Wellenlängenparameter

Hierfür wurde ein Holmium-Didymium Flüssigfilter verwendet. Zertifizierte Absorptionsmaxima dieses Materials können dabei anhand diskreter Wellenlängen über den gesamten VIS Bereich überprüft werden.

	USP Grenzwert	EP Grenzwert
<b>Genauigkeit</b>		
VIS Region	±2 nm	±3 nm
<b>Präzision</b>		
VIS Region	±0,5 nm	±0,5 nm

Das Messungsprotokoll ist durch die Pharmakopöe 857 vorgegeben und wurde mit anvajo fluidlab R-300 durchgeführt. Für die photometrische Genauigkeitsmessung wurde eine Blank-Messung (Leermessung, Iblank) mit einem leeren Metallrahmen durchgeführt. Danach wurde die Probenmessung (Iprobe) des Referenzfilters anschließend im gleichen Rahmen mit eingespannten Neutralglas durchgeführt, das bestimmte Absorptionscharakteristika aufweist. Beide Messungen wurden über die mathematische Beziehung:  $E = -\log_{10}(I_{\text{blank}}/I_{\text{probe}})$  miteinander in Beziehung gebracht. Abschließend wurden die Messwerte manuell vom Display in eine Excel Datei übertragen. Die errechneten Extinktionswerte (E) wurden ohne weitere Signalverbesserungen mit dem von Hellma Analytics bereitgestellten Datenblatt verglichen.

# Photometrische Überprüfung

## Genauigkeit

Einer der wichtigsten Tests zur Qualitätskontrolle von Spektrometern, ist die Überprüfung der photometrischen Genauigkeit, da dies direkten Einfluss auf die Güte der Messergebnisse hat. Damit sich Wissenschaftler und Laboranten auf die Messergebnisse verlassen können, müssen alle Referenzmessungen des gesamten Wellenlängenbereichs in der von der Pharmakopöe angegebenen Extinktionstoleranz von 0,01 oder 1 % liegen.

Wie aus Tabelle 1 zu entnehmen ist, erfüllt das anvajo fluidlab R-300 die benötigte Genauigkeit. Mit den Referenzfiltern von Hellma Analytics kann diese Qualitätskontrolle auch unabhängig von jedem Labor, in dem das fluidlab R-300 eingesetzt wird, durchgeführt werden. In der Regel werden Spektrometer alle ein bis zwei Jahre auf diese Weise überprüft.

Wellenlänge [nm]	Soll F201	Ist F201	Differenz	Soll F202	Ist F202	Differenz	Soll F203	Ist F203	Differenz	Soll F4	Ist F4	Differenz
440,0	0,3304	0,325	0,0054	1,6321	1,625	0,0071	2,177	2,157	0,0200	1,0674	1,057	0,0104
465,0	0,2946	0,291	0,0036	1,5121	1,504	0,0081	2,0212	2,011	0,0102	0,9897	0,984	0,0057
546,1	0,3049	0,304	0,0009	1,5066	1,499	0,0076	1,9823	1,971	0,0113	1,0108	1,002	0,0088
590,0	0,3354	0,335	0,0004	1,5409	1,53	0,0109	2,0305	2,014	0,0165	1,0694	1,058	0,0114
635,0	0,3386	0,342	-0,0034	1,4512	1,44	0,0112	1,9193	1,902	0,0173	1,0291	1,018	0,0111

**Tabelle 1:** Übersicht der Referenz- und Messwerte. Die Differenz der beiden Werte sollte nach US-Pharmakopöe 857 unter 0,02 liegen

## Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit von Messungen ist eine wichtige Größe, um den Einfluss von mechanischen Toleranzen im Gerät und vor allem am Probenschacht, zeitliche Stabilität der spektrometrischen Messung und Richtigkeit der Messwertaufnahme zu beurteilen.

Die US-Pharmakopöe verlangt dafür eine Standardabweichung von 0,005 oder 0,5 % des Extinktionswertes über jeweils mindestens 6 Messungen. Diese Werte konnten mit allen Referenzglasfiltern deutlich unterboten werden. In Tabelle 2 sind die Werte noch einmal über  $n = 10$  wiederholte Messungen aufgeführt.

Wellenlänge [nm]	s(F201)	s(F202)	s(F203)	s(F4)
440,0	0,0017	0,0008	0,0014	0,0017
465,0	0,0018	0,0010	0,0014	0,0020
546,1	0,0016	0,0010	0,0014	0,0023
590,0	0,0017	0,0009	0,0010	0,0015
635,0	0,0011	0,0016	0,0016	0,0007

**Tabelle 2:** Reproduzierbarkeitsmessungen mit Referenzglasfiltern. Die Standardabweichung  $s$  aller Messreihen liegt unterdem geforderten Grenzwert von 0,005 und entspricht damit der US-Pharmakopöe ( $n=10$ ).

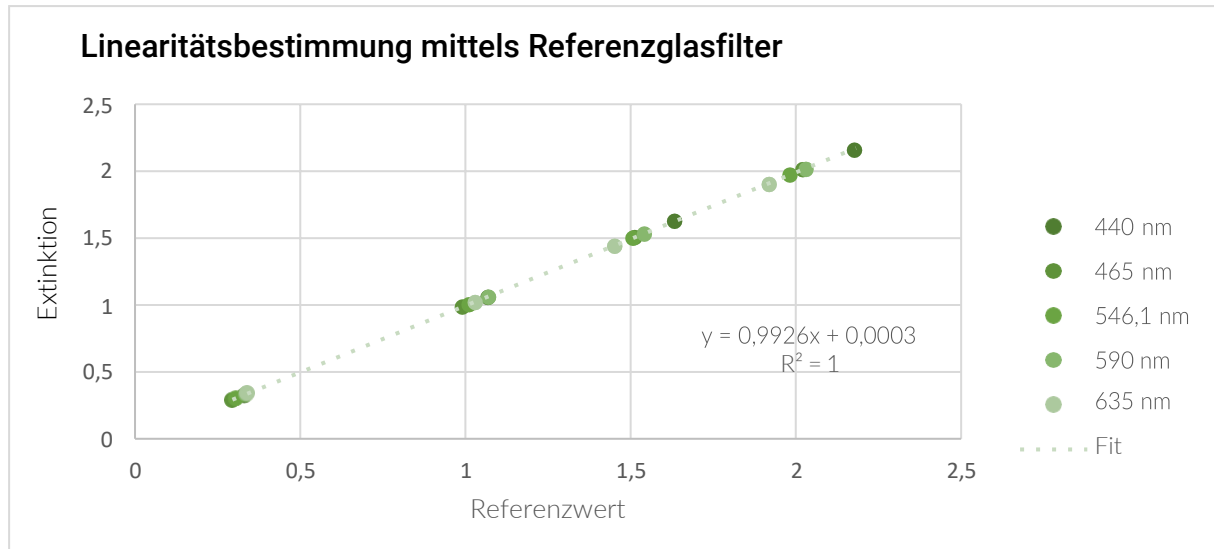
In Tabelle 3 wird die Reproduzierbarkeit in einem weiteren Schritt noch einmal mit einer Farbstoffprobe untersucht. Für diese Untersuchung wurde eine Methylenblau Probe, in einer Küvette, 20 mal hintereinander in das Gerät gestellt und die Messwerte aufgenommen. Die dabei festgestellte Standardabweichung von unter 1 % ist sehr gut, jedoch etwas höher als mit den Referenzglasfiltern. Dies liegt vor allem, an der schlechteren optischen und inhomogenen Oberfläche der Küvetten und Vorgängen in der Probe, welche im Vergleich zu den Referenzglasfiltern ins Gewicht fallen.

N = 20	Methylenblau (33±5%)	Methylenblau (66±5%)
1	1,5	1,905
2	1,494	1,916
3	1,508	1,947
4	1,494	1,904
5	1,508	1,91
6	1,51	1,944
7	1,512	1,947
8	1,518	1,928
9	1,526	1,941
10	1,508	1,968
11	1,512	1,927
12	1,504	1,952
13	1,506	1,919
14	1,504	1,907
15	1,502	1,909
16	1,52	1,925
17	1,517	1,936
18	1,504	1,914
19	1,514	1,93
20	1,512	1,903
Mittelwert	1,509	1,927
Std	0,0054	0,0097
Std %	0,54 %	0,97 %

**Tabelle 3:** Reproduzierbarkeitsmessungen mit einer Methylenblau-Probe, welche 20 Mal in kurzen zeitlichen Abständen in das Gerät gestellt und wieder herausgenommen wurde.

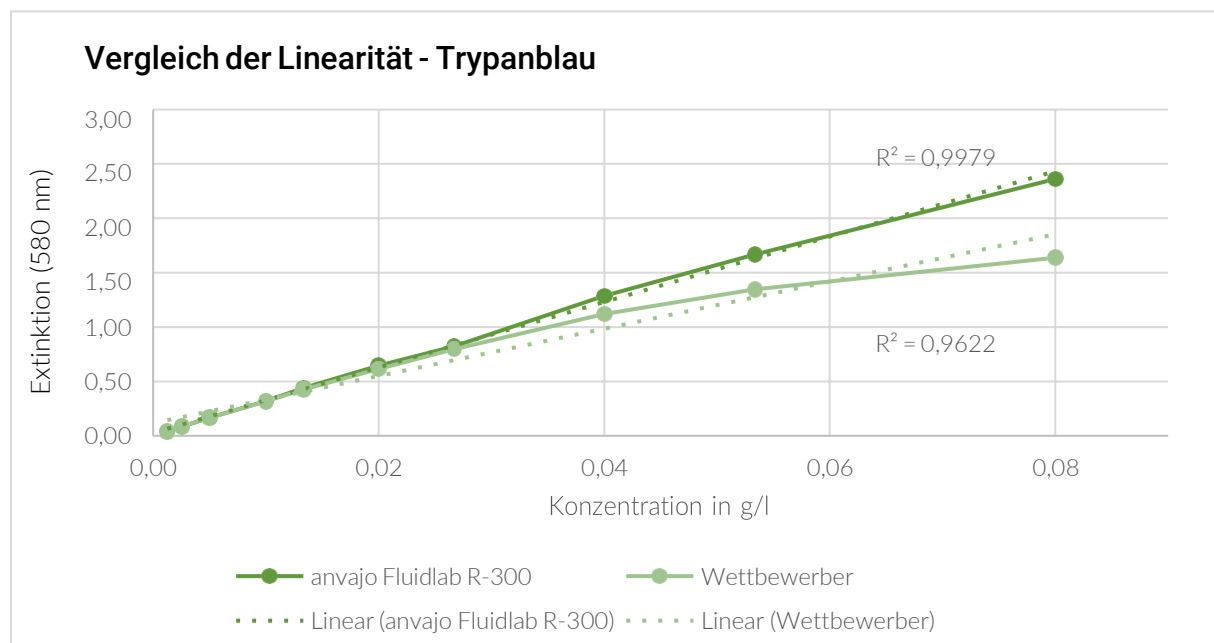
## Linearität

Die Linearität lässt sich anhand Genauigkeitsmessungen mit den Referenzfiltern ableiten. Wenn Messungen eine hohe Genauigkeit aufweisen, kann geschlussfolgert werden, dass die Linearität ebenfalls sehr hoch ist, was in Abbildung 1 belegt wird. Das Bestimmtheitsmaß des linearen Fits durch die Messwerte beträgt  $R^2 = 1$  und liegt über dem Grenzwert der europäischen Pharmakopöe von  $R^2 = 0,999$ . In der amerikanischen Pharmakopöe liegt für die Linearität kein Sollwert vor. Die Linearität erreicht somit das theoretische Maximum über den Extinktionsbereich von 0,3 bis 2,15. Der lineare Bereich spiegelt folglich den Wertebereich des Spektrometers wider, der mindestens eine Extinktion zwischen 0 und 2,0 aufweisen muss. Der lineare Bereich der meisten biochemischen und chemischen Assays liegt ebenfalls zwischen diesen Grenzwerten.



**Abbildung 1:** Gegenüberstellung der Referenzwerte von Hellma Analytics und der gemessenen Werte des fluidlab R-300. Die Linearität erreicht mit dem Bestimmtheitsmaß von  $R^2=1$  einen exzellenten Wert. Der Schnittpunkt mit der y-Achse liegt mit einem Wert von 0,0003 unter der Messgenauigkeit des Systems.

Im folgenden Diagramm (Abbildung 2) sind die Linearitätsmessungen einer Verdünnungsreihe aufgetragen. Dafür wurde eine Verdünnungsreihe mit Trypanblau (ein häufig benutzter Farbstoff zum Anfärben von Zellen) sowohl mit dem fluidlab R-300 und mit einem der am häufigsten eingesetzten Spektrometer weltweit gemessen. Anhand der Kurvenverläufe ist erkennbar, dass das anvajo fluidlab R-300 über einer Extinktion von 1 bis etwa 2,4 wesentlich linearer als das Wettbewerbsgerät ist ( $R^2 = 0,998$  und  $R^2 = 0,962$ ). Je linearer die Messergebnisse eines Geräts über einen großen Wertebereich sind, umso genauer können Assays in hohen Konzentrationsbereichen ausgewertet werden.



**Abbildung 2:** Vergleich der Linearität einer Trypanblau-Verdünnungsreihe zwischen dem anvajo fluidlab R-300 und einem weitverbreiteten Wettbewerber. Die Linearität des fluidlab R-300 ist über den betrachteten Wertebereich höher als beim Wettbewerbergerät.

## Gerät-zu-Gerät Reproduzierbarkeit

Jedes Spektrometer, das wir bei anvajo produzieren, muss die Toleranzbedingungen erfüllen, welche bereits in Abschnitt ‚Genauigkeit‘ vorgestellt wurden. Eine Geräte-zu-Geräte Reproduzierbarkeit mit geringen Abweichungen der Messergebnisse ist ein wichtiger Faktor zur Vergleichbarkeit von Messungen, die mit unterschiedlichen Geräten durchgeführt wurden. Dies trifft für mehrere Anwendungsbeispiele zu: in einer Produktionsanlage werden häufig mehrere Geräte an unterschiedlichen Stationen für Messungen platziert oder unterschiedliche Labore möchten Ihre Erkenntnisse und Ergebnisse austauschen, wobei auch hier die Vergleichbarkeit der Ergebnisse garantiert sein muss. Tabelle 4 zeigt die Abweichung von Gerät zu Gerät, wobei eine Messreihe mit 4 zufälligen Geräten aus der Produktion durchgeführt wurde. Die Abweichung zwischen den Messpunkten beträgt maximal 0,6 %. Die Gerät-zu-Gerät Abweichung ist folglich gering und erlaubt eine zuverlässige Vergleichbarkeit von Messergebnissen zwischen unterschiedlichen Geräten.

Wellenlänge [nm]	F201	F202	F203	F4
440,0	0,26%	0,29%	0,59%	0,48%
465,0	0,33%	0,22%	0,49%	0,33%
546,1	0,40%	0,33%	0,46%	0,29%
590,0	0,31%	0,50%	0,59%	0,37%
635,0	0,43%	0,57%	0,65%	0,40%

**Tabelle 4:** Gerät-zu-Gerät Toleranz von 4 zufällig ausgewählten fluidlab R-300 bei verschiedenen Wellenlängen und mit unterschiedlichen Extinktionswerten.

## Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass das anvajo fluidlab R-300 alle Anforderungen der US-Pharmakopöe und europäischen Pharmakopöe erfüllt und somit potentiell im Bereich der Medikamentenproduktion eingesetzt werden darf. Dies bildet eine sehr gute und verlässliche Grundlage für qualitativ hochwertige spektrometrische Messung mit dem fluidlab und darüber hinaus für die Etablierung von POC-Tests im medizinischen oder lebenswissenschaftlichen Bereich, in für den Nutzer gewohnter Laborqualität.