

WSTĘPNE BADANIA W CELU OPRACOWANIA NOWEJ METODY WZORCOWANIA CZYTNIKÓW MIKROPŁYTEK W GUM

Dobrochna MATKOWSKA, Iwona OSTROWSKA, Jolanta GĘBICKA, Łukasz LITWINUK

Główny Urząd Miar, Samodzielne Laboratorium Fotometrii i Radiometrii
tel.: 22 5819251 e-mail: dobrochna.matkowska@gum.gov.pl

Streszczenie: Główny Urząd Miar jest krajowym instytutem metrologicznym zajmującym się metrologią wzorców dla potrzeb przemysłu, nauki i systemu laboratoriów wzorcujących. GUM prowadzi szereg prac badawczych, gdzie na odpowiednich stanowiskach pomiarowym dokonywane są badania danego przyrządu pomiarowego i sprawdzanie, czy jego wskazania są wiarygodne i zgodne z wymaganiami prawnymi lub innymi. Samodzielne Laboratorium Fotometrii i Radiometrii prowadzi prace m.in. w dziedzinie pomiarów widmowego współczynnika przepuszczalności (transmitancji) i gęstości optycznej widmowego współczynnika przepuszczalności (absorbancji). Jego podstawowe zadanie to opracowywanie i rozwijanie metod pomiarowych realizujących spójność pomiarową do jednostek miar Międzynarodowego Układu Jednostek Miar dla pomiarów fotometrycznych i radiometrycznych o najwyższej jakości metrologicznej. W najbliższych latach planowane jest opracowanie metody pomiarowej i budowa stanowiska pomiarowego do wzorcowania czytników mikroplątek i ich wzorców kontrolnych, czyli stworzenie mechanizmów powiązania wzorca pierwotnego widmowego współczynnika przepuszczalności (spektrofotometr Cary 5000) z grupą nowoczesnych przyrządów spektrofotometrycznych – czytników mikroplątek.

Słowa kluczowe: czytniki mikroplątek, transmitancja, absorbancja.

1. WPROWADZENIE

Spektrofotometr służy do pomiaru wartości transmitancji - $\tau(\lambda)$ i/lub absorbancji - $D(\lambda)$ w funkcji długości fali λ . Widmowy współczynnik przepuszczalności definiuje się jako stosunek energetycznego strumienia widmowego przepuszczonego do strumienia widmowego padającego, natomiast jego gęstość optyczna jest odwrotnością logarytmu dziesiętnego tego stosunku [1].

Prawidłowość wskazań spektrofotometrów można zbadać m.in. za pomocą filtrów optycznych. Filtry optyczne – wzorce odniesienia (kontrolne), mają wyznaczoną transmitancji lub absorbancji przez spektrofotometri najwyższego rzędu przy co najmniej kilku długościach fal [2]. Wzorce wykonane są różnymi technikami z różnych materiałów optycznych np. szklanych, napyłanych lub ciekłych.

Czytniki mikroplątek są to spektrofotometri nowej generacji służące do pomiaru $\tau(\lambda)$ lub $D(\lambda)$ wielu próbek jednocześnie w szerokim zakresie długości fali. Wykorzystywane są do pomiaru stężenia: dsDNA, ssDNA i RNA, białek oraz pomiarów kinetycznych. Znajdują zastosowanie w diagnostyce in vitro, w kierunku

nietolerancji pokarmowej. Za ich pomocą można prowadzić oznaczenia m.in. ELISA [3], cytotoksyczności, hormonów, cytokin i kinaz dlatego znajdują zastosowania w wielu laboratoriach biologicznych, biotechnologicznych, diagnostycznych i przemysłowych.

Celem Głównego Urzędu Miar jest udostępnienie klientom nowej usługi jaką będzie wzorcowanie spektrofotometrów nowej generacji - czytników mikroplątek i ich wzorców kontrolnych. Planuje się opracowanie metodyki pomiarowej i budowę nowego stanowiska. Przedstawione wyniki są efektem badań przewidzianych do realizacji we wstępnej fazie projektu, którego ostateczne zakończenie zaplanowano na rok 2021.

2. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

Zakupione zostały dwa czytniki mikroplątek. Za pomocą czytnika, który posiada miejsce na kuetę, zmierzono absorbancję różnego typu wzorców stosowanych w Urzędzie jako wzorce robocze. Wzorce te są poddawane ciągłej kontroli metrologicznej.

Zmierzono również absorbancję wzorców umieszczonych w specjalnej płytce umożliwiającej jednoczesny pomiar ośmiu filtrów w szerokim zakresie UV-VIS na dwóch czytnikach mikroplątek. Uzyskane wartości porównano z wartościami zmierzonymi na wzorcu najwyższego rzędu – wzorcu pierwotnym. Dokonano analizy otrzymanych wyników.

2.1. Aparatura

Zmierzono $D(\lambda)$ dwóch zestawów wzorców służących jako wzorce kontrolne. Zestaw 4 filtrów neutralnych (szarych) G-250 [4] służących do sprawdzania spektrofotometrów w zakresie VIS o nominalnej transmitancji 10 %, 30 %, 50 %, i 70 % w zakresie (410 – 880) nm oraz zestaw filtrów napyłanych [5] służących do sprawdzania spektrofotometrów w zakresie UV-VIS o wartości nominalnej $\tau(\lambda)$ 3 %, 10 %, 30 %, 50 % i 90 % w zakresie (235 – 900) nm.

Wartości $\tau(\lambda)$ i $D(\lambda)$ opisanych zestawów wzorców roboczych wyznaczono za pomocą spektrofotometru firmy VARIAN Australia typu Cary 5000. Dane techniczne spektrofotometru, służącego w Głównym Urzędzie Miar jako wzorec pierwotny, zestawiono w tablicy 1. Wybrane parametry czytników mikroplątek zestawiono w tablicy 2.

Tablica 1. Wybrane parametry techniczne spektrofotometru Cary 5000. [6]

Zakres spektralny	(175 – 3300) nm
Szczelina spektralna	UV-VIS: (0,01 - 5,00) nm (krok co 0,01)
Monochromator	Podwójny monochromator Littrowa 2 x 400 mm
	Siatka dyfrakcyjna: UV-VIS 1200 linii/mm, (70 x 45) mm,
	Detektor: UV-VIS fotopowielacz (PMT) R928,
Dokładność długości fali	UV-VIS: ± 0,08 nm
Światło rozproszone	<0,00007 % T, przy 220 nm (10 g/L NaI, metodyka ASTM) <0,00007 % T, przy 370 nm (50 mg/L NaNO ₂)
Zakres fotometryczny	8,0 Abs (pomiarowy)
Dokładność fotometryczna	± 0,00025 Abs (przy absorbcji 0,3)
Szybkość skanowania	UV-Vis: 2000 nm/min (max.)

Tablica 2. Wybrane parametry techniczne czytników mikroplętek

	Czytnik nr 1	Czytnik nr 2
Typ źródła światła	Lampa halogenowa 6 V /10 W	Lampa ksenonowa
Ustalanie długości fali	3 filtry: 405 nm, 450 nm, 620 nm (maks. 8 filtrów)	Monochromator
Obsługiwane płytki	96, 384	96, 384, kuwety 10mm
Zakres długości fali [nm]	340-850	200-1000
Zakres pomiarowy [Abs]	0-6	0-4
Liniiowość	0-3 ±2% (405 nm)	0-2,5 ±2% (450 nm)
Dokładność pomiaru	±1% (0-3 Abs) lub 0,003 Abs (405 nm)	1% +0,003 (0-2 Abs) (450 nm), 2% (2-2,5 Abs) (450 nm)
Precyzja pomiaru CV	≤0,2 % (0,3-3 Abs) (405 nm)	≤0,5 % lub 0,003 Abs (450 nm)
Szybkość odczytu płytki	96 dołkowej - 7s, 384 dołkowej 13s	96 dołkowej - 6s, 384 dołkowej 10s
Zakres temperatury termostatowania	+4°C powyżej temp. otoczenia do 50°C	+2°C powyżej temp. otoczenia do 45°C

2.2. Wyniki

Absorbancje $D(\lambda)$ dziewięciu filtrów z dwóch zestawów: G-250 (G-250-I, G-250-II, G-250-III, G-250-IV) oraz 27873 (76372, 77515, 76190, 45839, 75272) zmierzono za pomocą czytników mikroplętek: czytnika nr 1 oraz czytnika nr 2. Poszczególne zestawy filtrów umieszczono w specjalnej płytce, która umożliwia jednoczesny pomiar zestawu filtrów, każdy w dwóch miejscach. Płytkę umieszczono w czytniku nr 1 a następnie w czytniku nr 2 i wyznaczono $D(\lambda)$ i $\tau(\lambda)$ przy wybranych długościach fali. Następnie filtry umieszczano kolejno w kuwecie czytnika nr 2 i mierzono ich $D(\lambda)$ przy wybranych długościach fali. Każdy pomiar $D(\lambda)$ na płytce i w kuwecie powtórzono 5 razy. Jako wynik wzięto średnią arytmetyczną wszystkich pomiarów dokonanych na poszczególnych aparatach.

Dla zestawu G-250 pomiarów dokonano przy długościach fali λ /nm: 880; 820; 800; 750; 725; 650; 620;

585; 550; 520; 470; 450; 436; 410; 405 natomiast zestaw filtrów napylanych 27873 zmierzono przy długościach fali λ /nm: 900; 820; 750; 635; 620; 590; 550; 546; 500; 465; 450; 405; 400; 375; 360; 340; 280; 250; 235.

Wyznaczone wartości transmitancji i absorbcji porównano z wartościami z aktualnych świadectw wzorcowania wystawionych przez Główny Urząd Miar. Dla zestawu wzorców napylanych dokonano porównania z aktualnym certyfikatem wystawionym przez producenta.

W tablicach 3 i 4 zestawiono względne procentowe odchylenia pomiędzy wartościami wyznaczonymi dla $\tau(\lambda)$ lub $D(\lambda)$ za pomocą wzorca pierwotnego i czytnika mikroplętek. Odchylenie wyznaczono ze wzoru 1 lub 2.

$$U_{wzgl.max.\tau} = 100 \cdot \frac{\tau(\lambda)_{zmierzone} - \tau(\lambda)_{Cary5000}}{\tau(\lambda)_{Cary5000}} \quad (1)$$

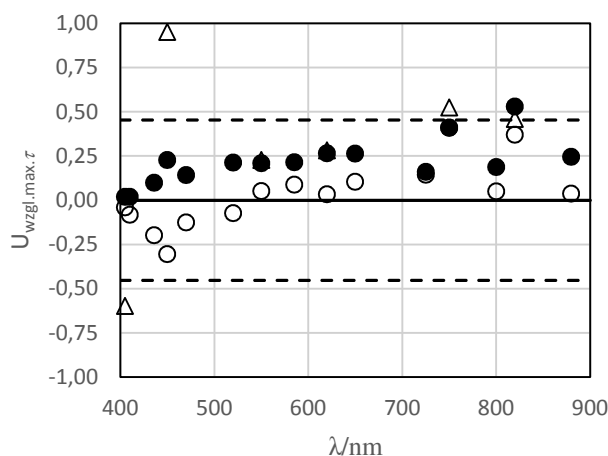
$$U_{wzgl.max.D} = 100 \cdot \frac{D(\lambda)_{zmierzone} - D(\lambda)_{Cary5000}}{D(\lambda)_{Cary5000}} \quad (2)$$

Tablica 3. Odchylenie względne w procentach pomiędzy wartościami transmitancji wyznaczonych za pomocą spektrofotometru Cary 5000 a czytnikami mikroplętek dla zestawu G-250 przy wybranych długościach fali. Względna niepewność pomiaru $U_{wzgl.max}$ w procentach wyznaczona dla zestawu G-250 zmierzonego spektrofotometrem Cary 5000

λ /nm	G-250-I	G-250-II	G-250-III	G-250-IV
$U_{wzgl.max.\tau}$	0,91	0,67	0,45	0,38
Czytnik nr 1 - płytka				
820	-0,07	0,36	0,46	0,58
750	0,38	0,63	0,52	0,65
620	0,55	0,59	0,28	0,42
550	0,61	0,62	0,23	0,39
450	2,24	1,72	0,95	0,77
405	0,00	0,27	-0,60	-0,05
Czytnik nr 2 - płytka				
880	-0,09	0,04	0,04	-0,03
820	0,14	0,43	0,37	0,18
800	0,13	0,24	0,05	-0,10
750	0,55	0,75	0,41	0,19
725	0,53	0,52	0,15	-0,12
650	0,54	0,50	0,11	-0,07
620	0,47	0,55	0,04	-0,14
585	0,66	0,61	0,09	-0,04
550	0,54	0,66	0,05	-0,08
520	0,48	0,60	-0,07	-0,11
470	0,75	0,92	-0,12	-0,07
450	0,00	0,45	-0,30	-0,13
436	0,45	0,69	-0,20	-0,05
410	0,78	0,91	-0,08	0,08
405	0,57	0,76	-0,04	0,08
Czytnik nr 2 - kuweta				
880	0,35	0,17	0,25	-0,03
820	0,55	0,54	0,53	0,25
800	0,57	0,31	0,19	-0,03
750	0,71	0,56	0,41	0,16
725	0,64	0,34	0,16	-0,07
650	0,84	0,47	0,26	0,00
620	0,78	0,51	0,27	0,04
585	0,83	0,49	0,21	0,04
550	0,77	0,54	0,21	0,03
520	0,80	0,64	0,21	0,28
470	0,82	0,88	0,14	0,26
450	0,75	0,90	0,23	0,27
436	0,63	0,61	0,10	0,20
410	0,78	0,73	0,02	0,17
405	0,57	0,58	0,02	0,15

λ/nm	76372	77515	76190	45839	75272
$U_{\text{wzgl.max.D}}$	0,94	1,24	1,74	2,90	20,19
Certyfikat					
900	0,71	-0,18	-0,69	-0,98	-6,01
635	-0,15	0,06	-0,19	-0,39	-5,46
590	-0,15	0,06	-0,19	-0,39	-5,47
546,1	-0,16	0,04	-0,23	-0,36	-5,33
500	-0,17	0,06	-0,24	-0,34	-5,21
465	-0,19	0,04	-0,26	-0,30	-5,08
400	-0,21	0,09	-0,24	-0,22	-4,70
360	-0,17	0,04	-0,42	0,01	-3,92
340	-0,16	0,14	-0,34	0,16	-3,55
280	-0,21	0,24	-0,39	0,13	-3,98
250	-0,19	0,29	-0,38	0,15	-3,47
235	-0,18	0,29	-0,42	0,10	-3,52
Czytnik nr 1 - płytka					
820	-1,26	-1,38	-0,81	-1,74	-8,98
750	-1,14	-1,29	-0,82	-1,58	-8,95
620	-0,90	-1,07	-0,62	-1,35	-9,15
550	-0,77	-0,98	-0,67	-1,40	-9,04
450	-0,60	-0,81	-0,65	-1,29	-9,38
405	-0,54	-0,72	-0,66	-1,34	-9,83
375	-0,56	-0,92	-0,95	-1,72	-11,02
340	-0,53	-0,99	-1,19	-1,68	-11,61
Czytnik nr 2 - płytka					
900	0,67	-1,43	-1,74	1,29	-4,13
820	-0,09	-1,68	-1,82	1,61	-5,88
750	0,05	-1,69	-1,91	1,71	-6,17
635	0,09	-1,63	-2,02	1,90	-3,40
620	0,12	-1,67	-1,91	1,69	-3,66
590	0,13	-1,64	-2,02	1,95	-3,07
550	0,12	-1,62	-1,91	1,54	-2,71
546	0,16	-1,60	-1,93	1,47	-2,11
500	0,13	-1,61	-2,05	1,54	0,30
465	0,11	-1,61	-2,00	1,57	1,20
450	0,11	-1,61	-1,91	1,20	-0,29
405	0,06	-1,58	-1,93	0,85	-0,58
400	0,02	-1,62	-2,06	1,08	0,58
375	0,01	-1,53	-1,87	0,50	-1,69
360	0,03	-1,59	-2,10	0,83	0,57
340	-0,01	-1,56	-2,05	0,68	-0,57
280	-0,17	-1,44	-2,04	-0,47	-1,82
250	-0,19	-1,37	-2,05	-0,90	-3,41
235	-0,40	-1,22	-2,11	-1,03	-4,20
Czytnik nr 2 - kuweta					
900	0,71	-0,03	-0,90	-0,06	-1,59
820	-0,38	-0,19	-1,03	-0,81	-2,17
750	-0,38	-0,23	-1,04	-0,85	-3,09
635	-0,47	-0,30	-1,32	-0,69	-4,63
620	-0,48	-0,49	-1,20	-0,92	-5,49
590	-0,46	-0,50	-1,33	-0,77	-3,99
550	-0,48	-0,54	-1,32	-1,02	-5,72
546	-0,44	-0,52	-1,31	-1,06	-5,72
500	-0,47	-0,59	-1,44	-0,85	-4,53
465	-0,48	-0,64	-1,51	-0,84	-4,49
450	-0,46	-0,61	-1,47	-1,14	-6,16
405	-0,51	-0,69	-1,59	-1,19	-5,78
400	-0,52	-0,72	-1,71	-0,89	-4,39
375	-0,63	-0,83	-1,74	-1,37	-5,65
360	-0,56	-0,96	-2,04	-0,83	-3,45
340	-0,49	-0,93	-2,00	-0,76	-3,40
280	-0,60	-1,38	-1,60	-1,03	-3,38
250	-0,31	-1,33	-2,31	-0,88	-2,68
235	-0,43	-1,22	-2,31	-0,94	-3,03

Tablica 4. Odchylenie względne w procentach pomiędzy wartościami absorpcji wyznaczonych za pomocą spektrofotometru Cary 5000 a certyfikatem producenta oraz czytnikami mikroplatek dla zestawu wzorców napylanych przy wybranych długościach fali. Wyznaczona względna niepewność pomiaru $U_{\text{wzgl.max}}$ w procentach dla zestawu filtrów napylanych zmierzonych spektrofotometrem

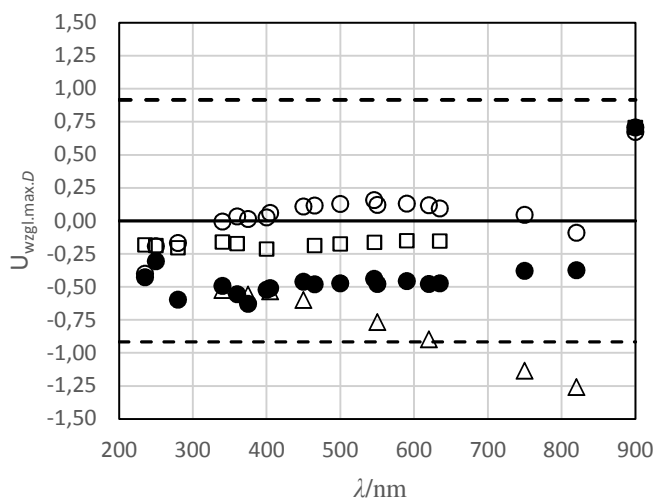


Rys. 1. Względne odchylenie w procentach pomiędzy wartościami transmitancji wyznaczonych za pomocą spektrofotometru Cary 5000 a czytnikami mikroplatek: Δ – Czytnik nr 1 – płytka, \circ – Czytnik nr 2 – płytka, \bullet – czytnik nr 2 – kuweta dla wzorca G-250-III przy wybranych długościach fali. Linia przerywana zaznaczono względną niepewność pomiaru w procentach dla wybranego wzorca

Na rysunku 1 i 2 zaprezentowano względne odchylenie w procentach pomiędzy wartościami widmowych współczynników przepuszczania oraz jego gęstości optycznej wyznaczonych za pomocą spektrofotometru Cary 5000 a czytnikami mikroplatek dla wybranych filtrów przy danej długości fali.

Średnie względne odchylenie pomiędzy wartościami transmitancji zmierzonymi za pomocą spektrofotometru Cary 5000 a czytnikami mikroplatek dla zestawu wzorców napylanych jest najniższe dla pomiarów dokonanych za pomocą płytki na czytniku nr 2 i wynosi 1,1 % i najwyższe dla czytnika nr 1 (ok. 1,6 %). Najniższą różnicę dla pomiarów $\tau(\lambda)$ dla wzorców napylanych zaobserwowano dla wzorca 45839, która wynosi 0,3 %, najwyższą natomiast dla wzorca 77515 – 2,4 %.

Średnie odchylenie pomiędzy wartościami $D(\lambda)$ zmierzonymi za pomocą spektrofotometru Cary 5000 a czytnikami mikroplatek dla zestawu wzorców napylanych jest najniższe dla pomiarów dokonanych za pomocą płytki czytnika nr 2 i wynosi 0,9 % a najwyższe dla płytki czytnika nr 1 (ok. 2,8 %). Najniższą różnicę dla pomiarów $D(\lambda)$ dla wzorców napylanych zaobserwowano dla wzorca 76372, która wynosi 0,4 %, najwyższą natomiast dla wzorca 75272 – 5 %.



Rys. 2. Względne odchylenie w procentach pomiędzy wartościami gęstości optycznych widmowego współczynników przepuszczania wyznaczonych za pomocą spektrofotometru Cary 5000 a czytnikami mikropłytek: Δ – Czytnik nr 1 – płytka, \circ – Czytnik nr 2 – płytka, \bullet – czytnik nr 2 – kuweta i certyfikatem - \square dla wzorca 76372 przy wybranych długościach fali. Linia przerywaną zaznaczono względną niepewność pomiaru w procentach dla wybranego wzorca

Średnia różnica $\alpha(\lambda)$ i $D(\lambda)$ dla zestawu wzorców napyłanych pomiędzy pomiarami dokonanymi na spektrofotometrze najwyższego rzędu a certyfikatem dostarczonym razem z filtrami wynosi odpowiednio 0,2 % i 1 %.

Dla zestawu filtrów szarych G-250 najniższe średnie odchylenie pomiędzy wartościami $\alpha(\lambda)$ i $D(\lambda)$ zmierzonymi za pomocą spektrofotometru Cary 5000 a czytnikami zaobserwowano dla pomiarów dokonanych na płycie czytnika nr 2: 0,03 % i 0,08 % a najwyższe dla czytnika nr 1: 0,5 % i 1,3 %. Wszystkie wzorce szare wykazują dość podobne odchylenie dla wartości widmowego współczynnika transmitancji i absorbancji i wahają się od 0,2 % do 0,6 %.

Nie zaobserwowano wyraźnego wpływu zakresu długości fali na różnicę w pomiarach.

3. WNIOSKI

Przedstawione wyniki są fazą wstępną przewidzianego na najbliższe lata projektu. Badania miały za zadanie sprawdzić jak w zależności od badanego aparatu, długości fali oraz wzorca kształtuje się różnica pomiędzy wartościami transmitancji i absorbancji zmierzonej na spektrofotometrze najwyższego rzędu a pomiarami uzyskanymi z dwóch czytników mikropłytek. Większość z uzyskanych różnic nie przekracza wartości względnych niepewności pomiaru użytych wzorców. Przekroczenia odnotowane zwłaszcza dla filtrów napyłanych będą przedmiotem dalszych pomiarów, w których niezbędne wydaje się udoskonalenie warunków pomiarowych. Deklarowane niepewności są wynikiem błędów wynikających m.in. z niedokładności przyrządu, nieliniowości i różnicy temperatury. Docelowo przewiduje się wyznaczenie nowego budżetu niepewności dla czytników mikropłytek, który będzie brał pod uwagę dodatkowe parametry charakterystyczne dla specyfiki pomiarowej tych przyrządów.

4. BIBLIOGRAFIA

1. Nowicka-Jankowska T., Wieteska E., Goczyńska K.; Michalik A., Spektrofotometria UV-VIS w analizie chemicznej, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 1988.
2. Gębicka J., Rębecka A., Żórawski A., Wzorcowanie Spektrofotometrów – Źródła Błędów (Cz. 1). Prace Instytutu Elektrotechniki, zeszyt 237, 2008.
3. Weiland G., (1978-11-03). "[The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)--a new serodiagnostic method for the detection of parasitic infections (author's transl)]". MMW, Munchener Medizinische Wochenschrift. 120 (44)
4. Materiał wytworzony przez Zakład Optyki na użytek GUM
5. <https://www.starna.com/uv-absorbance>
6. <https://www.agilent.com/en/products/uv-vis-uv-vis-nir/uv-vis-uv-vis-nir-systems/cary-5000-uv-vis-nir>

PRELIMINARY RESEARCH FOR DEVELOPING THE NEW METHOD OF THE CALIBRATION OF MICROPLATE READERS IN GUM - COMPARATIVE ANALYSIS OF THE RESULTS.

The Central Office of Measures, National Metrology Institute for the Republic of Poland, is responsible for ensuring uniformity of measures and required accuracy of the results of measurements carried out in the Republic of Poland as well as their traceability to the International System of Units (SI). The Photometry and Radiometry Laboratory performs the tasks specified in the inner regulations related to measurements in the field of spectrophotometry - in the transmitted light.

In the coming years, it is planned to develop measurement methods and measurement stand for the calibration of microplate readers and control standards thereof i.e. to create mechanisms linking the spectral transmittance with reference to the primary measurement standard (Cary 5000 spectrophotometer) with a group of modern spectrophotometric devices - microplate readers.

Keywords: microplate readers, spectral transmittance, spectral absorbance.