

Uit de laboratoriumpraktijk

Evaluatie van een atomaire absorptie spectrometer

P.L.M. de GROUW, B. DELZENNE, P. GRUNDEL, M. HECKMAN, W. van den ESHOF, en A.K. STROOBANTS

Om tot een goede keuze te komen voor vervanging van de atomaire absorptie spectrometer (AAS) zijn op basis van vooraf gestelde criteria (gebruiksvriendelijkheid, snelheid, verbruik patiëntenmateriaal, implementatiegemak en onderhoud) diverse AAS systemen vergeleken. Op basis van de management evaluatie is de keuze gevallen op de ContrAA van Analytik Jena. Een van de grote voordelen ten opzichte van andere AAS systemen is het gebruik van een Xenon-lamp. Hierdoor kunnen alle gewenste metalen uit een monster snel na elkaar bepaald worden en kunnen analyses van weinig aangevraagde sporenelementen op een eenvoudige manier uitgevoerd worden. De ContrAA is analytisch geëvalueerd door het bepalen van de within run, de mate van carry-over, de imprecisie, de lineariteit en de minimale detectielimiet. De resultaten van de analytische evaluatie laten zien dat de ContrAA voldoet aan de vooraf gestelde criteria. De ContrAA is in productie genomen en momenteel wordt gewerkt aan het implementeren van analyses van minder frequent aangevraagde sporenelementen.

Trefwoorden: atomaire absorptie spectrometer; AAS; management evaluatie; reproduceerbaarheid; carry-over; imprecisie; lineariteit; minimale detectielimiet

Inleiding

Na 20 jaar trouwe dienst moest de atomaire absorptie spectrometer (AAS) op het Laboratorium Speciale Technieken, onderdeel van het Laboratorium voor Algemene Klinische Chemie in het Academisch Medisch Centrum, vervangen worden. Door de in gebruik name van de nieuwe AAS kunnen niet alleen de reeds gangbare analyses, maar ook analyses van weinig aangevraagde sporenelementen op een eenvoudige manier uitgevoerd worden. Dit artikel beschrijft het keuzeproces in de aanschaf en de evaluatie van de nieuwe AAS.

Inleiding

Atomaire Absorptie Spectrometrie is een analysetechniek die gebaseerd is op de absorptie van elektromag-

netische straling door atomen. Een monster wordt in een vlam bij zeer hoge temperaturen geatomiseerd, waarna er met een lamp licht van een specifieke golflengte in de vlam gestraald wordt. Het ingestraalde licht wordt geabsorbeerd door de atomen. De mate van absorptie wordt bepaald door de concentratie atomen in de vlam en is dus een maat voor de concentratie atomen in het monster. Met deze techniek worden metaal-atomen gemeten in het concentratiegebied van $\mu\text{g/ml}$. Naast detectie in een vlam kan, volgens hetzelfde principe, ook gebruik gemaakt worden van detectie in een oven. Het grote verschil wordt gemaakt door het concentrerend vermogen van de oven. Voorafgaand aan de verhittingsstap vindt een voorstap plaats waarbij het monster langzaam gedurende enkele seconden verwarmd wordt tot ongeveer 110°C om het oplosmiddel te laten verdampen. Hierdoor vindt concentratie van het monster plaats, waardoor er gemeten kan worden in de orde van ng/ml .

Keuzeproces

In het keuzeproces voor de aanschaf van een nieuwe AAS zijn conform de CCKL/RvA procedure vooraf voorwaarden gesteld waar de apparatuur aan moest voldoen. Op basis van harde objectieve argumenten, waaronder kwaliteit, monstervolume, manier van correctie voor interferenties en werkbaarheid, is de keuze gevallen op de ContrAA van Analytik Jena. De ContrAA omvat zowel de vlam- als de ovenmethode.

Een van de grootste verschillen van de ContrAA ten opzichte van traditionele AAS-systemen is het gebruik van een Xenon-lamp in plaats van een specifieke holle kathodelamp voor elk te meten element. Door het gebruik van een breedspectrum Xenon-lamp in combinatie met een (hoogwaardige) monochromator kunnen alle gewenste metalen uit een monster snel na elkaar bepaald worden. In feite biedt de nieuwe AAS de analysemogelijkheden van een inductief gekoppelde plasmaspectrometer (ICP), die nauwkeuriger kan meten dan een klassieke AAS, met een lagere detectiegrens dan met ICP-OES (ICP Optical Emission Spectrometry) mogelijk is. Tevens gebruikt deze AAS een kleiner monstervolume dan een ICP. De software is overzichtelijk en bevat mogelijkheden en zelf programmeren is mogelijk, zodat voor elk metaal een optimale instelling geprogrammeerd kan worden.

De correctie van matrixeffecten is gebaseerd op het ICP principe en wordt gedaan door het volledig scannen van het golflengtegebied. Hierdoor worden inter-

Laboratorium Algemene Klinische Chemie, Academisch Medisch Centrum, Amsterdam

Correspondentie: dr. P.L.M. de Grouw, AMC, Laboratorium Algemene Klinische Chemie, Meibergdreef 9, 1105 AZ Amsterdam

E-mail: p.l.degrouw@amc.uva.nl

ferenties zichtbaar en kan zeer efficiënt gecorrigeerd worden voor signalen die door andere elementen veroorzaakt zijn. In de software bestaat de mogelijkheid te compenseren voor interfererende elementen. Om achtergrondabsorptie te onderdrukken wordt hier geen gebruik gemaakt van de Zeemancorrectie welke typisch is voor de klassieke AAS, maar welke gepaard gaat met een luid pulserend geluid. Metingen worden standaard in triplo uitgevoerd waarna de waarden gemiddeld worden. Bij een afwijking in één van de metingen wordt de uitbijterwaarde weggelaten (op basis van de Grubbs outlier test).

De mogelijkheid voor segmented-flow injecties bij de ContraAA voor de vlam-techniek heeft als voordeel de grotere gevoeligheid waardoor men voor een drievoudige analyse voor 2 elementen met 400 µl kan volstaan. Voorheen was de hoeveelheid monster vaak limiterend: voor de enkelvoudige analyse van 2 sporenelementen was minimaal 700 µl nodig. Daarnaast onderscheidt de ContraAA zich gunstig ten opzichte van andere apparatuur, door de gekoppelde autosampler voor de vlam, zoals een gekoppelde autosampler voor de vlam, een camera op de grafietoven en een gefixeerde positie voor de grafietoven waardoor uitlijnen niet meer nodig is.

Technische evaluatie

Alvorens het apparaat in productie te nemen, is er een evaluatie uitgevoerd voor de bepalingen die in de oude situatie door het Laboratorium Speciale Technieken bepaald werden. De evaluatie is onderverdeeld in de evaluatie van de AAS vlam-techniek voor de bepalingen koper, zink en ijzer en de evaluatie van de AAS oven-techniek voor het bepalen van aluminium.

Within run bepalingen

Voor het bepalen van de dupliceerbaarheid werden verschillende pools van patiëntensera gemaakt voor de controle van de koper- en zinkbepaling; terwijl een urinepool diende voor de controle van de analyses van ijzer en aluminium (concentraties zoveel mogelijk binnen de referentiewaarden). Voor elke parameter is de pool 10 maal bepaald. De resultaten zijn geanalyseerd met EP Evaluator (v7, David G. Rhoads Associates, Inc.) en worden weergegeven in tabel 1. De VC's waren 2,9% voor koper, 2,7% voor zink, 1,0% voor aluminium en 1,7% voor ijzer. Hiermee wordt voldaan aan de vooraf gestelde criteria dat voor elke parameter geldt dat de gevonden VC kleiner moet zijn dan 3%.

Carry-over

Om uit te sluiten of er carry-over optreedt, zijn er voor

Tabel 1. Within run reproduceerbaarheid van bepalingen van koper, zink, ijzer en aluminium (in µmol/l)

	Koper	Zink	IJzer	Aluminium
Gem	17,2	18,4	7,2	1,598
SD	0,5	0,5	0,1	0,016
VC %	2,9	2,7	1,7	1,0
Min	16,1	17,5	7,0	1,57
Max	17,5	18,9	7,4	1,63
N	10	10	10	10

de bepalingen van koper, ijzer en aluminium pools gemaakt van patiëntenmateriaal met een lage en een hoge concentratie en deze zijn verdeeld over in totaal 21 monsters, 11 met een lage concentratie en 10 met een hoge concentratie. De monsters zijn in de volgende volgorde bepaald (L, L, L, H, H, L, H, H, L, L, L, L, H, H, L, H, H, L, H, H, L). De resultaten zijn geanalyseerd met EP Evaluator en staan weergegeven in tabel 2. Hieruit kan geconcludeerd worden dat er voor de bepalingen koper, ijzer en aluminium geen sprake is van significante carry-over.

Imprecisie

Volgens een afgeleide van het EP5-protocol (1) is in een periode van 10 dagen 1 maal per dag de volgende reeks controles en patiëntenmonsters bepaald:

- Koper/Zink: Radox (Radox Laboratories Ltd, UK) level 2, Radox level 3, 2 patiëntenmonsters, Radox level 3 en Radox level 2.
- IJzer: Radox level 2, 2 patiëntenmonsters, Radox level 2.
- Aluminium: BioRad (Bio-Rad Laboratories B.V., Veenendaal) urine Metal controle level 1, BioRad urine Metal controle level 2, minimaal 2 patiëntenmonsters, BioRad urine Metal controle level 2, BioRad urine Metal controle level 1.

De resultaten van de imprecisiestudies zijn geanalyseerd met EP Evaluator en worden weergegeven in tabel 3. De gevonden VC's voor de koper, zink en ijzer bepalingen voldoen aan de vooraf gestelde criteria (koper VC ≤6%, zink VC ≤6% en ijzer VC ≤5%). De vooraf gestelde criteria zijn gebaseerd op de spreiding die gevonden werd bij analyses op de oude analyser en de biologische variatie (Biological Variation Database specifications - Westgard QC).

Voor aluminium was de vooraf gestelde maximale VC 8,2%. De within run VC en de dag tot dag VC voor de

Tabel 2. Carry-over resultaten van bepalingen van koper, ijzer en aluminium

Element	Lage conc.	Hoge conc.	L-L	H-L	Carry-over	SD L-L	Unit
Koper	17,5	265,0	17,56	17,40	-0,16	0,15	µmol/l
IJzer	9,2	26,0	9,36	9,46	0,10	0,25	µmol/l
Aluminium	0,75	1,65	0,752	0,744	-0,008	0,008	µmol/l

De gemiddelde resultaten van de lage monsters gevolgd door een laag monster (L-L) zijn vergeleken met het gemiddelde van de lage monsters na een hoog monster (H-L). Het verschil tussen beide gemiddelden mag niet groter zijn dan 3x de SD van het L-L gemiddelde.

Tabel 3. Imprecisie van bepalingen van koper, zink, ijzer en aluminium (in $\mu\text{mol/l}$)

		Gem.	Within-run		Between-run		Totaal	
			SD	VC%	SD	VC%	SD	VC%
Koper	Radox level 2	19,9	0,4	2,2	0,2	1,0	0,5	2,5
	Radox level 3	29,1	1,1	3,7	-	-	1,1	3,7
Zink	Radox level 2	28,8	0,6	2,2	0,6	2,0	0,8	2,9
	Radox level 3	33,0	0,7	2,2	0,7	2,0	1,0	3,0
IJzer	Radox level 2	24,1	0,5	1,9	-	-	0,5	1,9
Aluminium	BioRad Metal 1	1,16	0,074	2,3	0,079	6,9	0,108	8,5
	BioRad Metal 2	1,65	0,079	3,4	0,113	6,9	0,138	8,4

Tabel 4. Minimale detectielimiet, lineariteit en meetbereik voor bepalingen van koper, zink, ijzer en aluminium (in $\mu\text{mol/l}$)

Element	Minimale detectielimiet (gem, + SD)	Lineariteit	Meetbereik
Koper	0,55 (-0,12 + 0,22)	0,0 tot 38,7	0,55 tot 39,3
Zink	0,37 (0,14 + 0,08)	0,0 tot 30,7	0,37 tot 38,2
IJzer	0,20 (0,01 + 0,06)	0,0 tot 48,3	0,20 tot 34,8
Aluminium	-0,009 (-0,0024 + 0,005)	0,0 tot 1,74	-

aluminium bepaling voldoen aan deze vooraf gestelde criteria, echter de totaal VC is hoger, namelijk 8,4 en 8,5%. Een verklaring voor deze hogere totaal VC's voor aluminium is niet gevonden. Het is mogelijk dat het gebruik van standaard naalden bij de afname van materiaal van invloed kan zijn. Echter, dan zou er ook een hogere VC verwacht worden bij de within- en dag tot dag VC. Het materiaal voor analyse wordt afgenomen en bewaard in aluminiumvrije buizen.

Lineariteit

Voor de bepaling van de lineariteit werden twee methoden toegepast. Enerzijds door een monster met een zo hoog mogelijke concentratie in vastgestelde verhoudingen te mengen met een monster met een zo laag mogelijke concentratie. Anderzijds door een monster met een concentratie in het normale gebied in verschillende verhoudingen te verdunnen met spoelvloeistof (0,1% HCl, Triton), zodat specifiek het meten van concentraties in het lage gebied geanalyseerd kon worden.

De gemaakte verdunningen zijn in enkelvoud aangeboden. De resultaten van de lineariteitsbepalingen zijn weergegeven in figuur 1. De gevonden resultaten voldoen aan de vooraf gestelde criteria, namelijk dat de gevonden lineaire regressielijn niet meer dan 5% mag afwijken van $Y=X$ en dat de asafsnede niet meer dan 5% van de gemiddelde uitslagen mag zijn.

Detectieondergrens

Voor het vaststellen van de minimale detectielimiet werd in de spoelvloeistof 21 maal achter elkaar de concentratie van het betreffende element bepaald, waarbij de detectieondergrens vastgesteld werd met de volgende formule: detectieondergrens = gemiddelde + 3SD (analytische sensitiviteit). Voor de koper-, zink-, ijzer- en aluminiumbepalingen worden de vastgestelde detectielimiet, de lineariteit en het meetbereik weergegeven in tabel 4. De gevonden resultaten komen goed

overeen met de waarden vastgesteld door de firma.

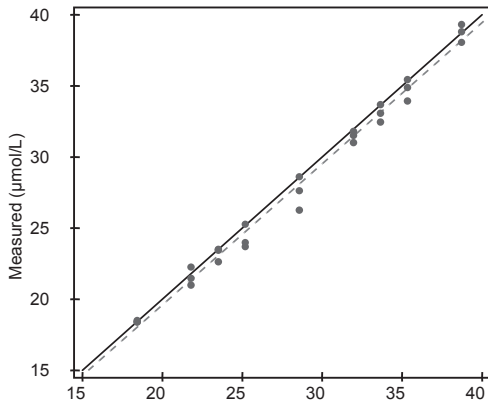
Evaluatie autosampler

Aan zowel de AAS-vlam als de AAS-oven is een autosampler gekoppeld voor de automatische verdunning van standaarden en monsters. Alvorens deze autosamplers in productie te nemen zijn deze eerst geëvalueerd, door de within run VC's te vergelijken waarbij de ijklijnen vanuit een stockoplossing met de autosampler dan wel manueel werden uitverdund. De verdunningsreeks gemaakt door de autosampler is als standaard aangeboden waarna de handmatig verdunde reeks als monster aangeboden is. Er werd bij de autosampler van de vlam-techniek een te hoge VC (4% afwijking) gevonden in de verwachte concentratie en de gemeten concentratie. Wanneer de verdunningen van zowel het monster als de standaard door de autosampler gemaakt worden, functioneert de autosampler wel reproduceerbaar. Een mogelijke oorzaak voor de discrepantie tussen handmatig verdunde monsters versus de verdunningen verkregen met de autosampler zou kunnen zijn dat de autosampler gebruik maakt van een 5 ml spuit, waardoor een grotere afwijking mogelijk is in de pipetteerstap. Daarnaast speelt mee dat de autosampler voor een 5x verdunning 1 ml monster gebruikt. In veel gevallen, met name bij kindermonters, is hiervoor niet voldoende materiaal beschikbaar. Op basis van deze resultaten is besloten geen gebruik te maken van de autosampler voor de AAS-vlam voor het verdunnen van standaarden en monsters. De autosampler voor de vlam-techniek wordt wel gebruikt voor het automatisch aanbieden van de monsters aan de analyser. De autosampler voor de AAS-oven wordt gebruikt voor zowel het maken van verdunningen als voor het automatisch aanbieden van monsters.

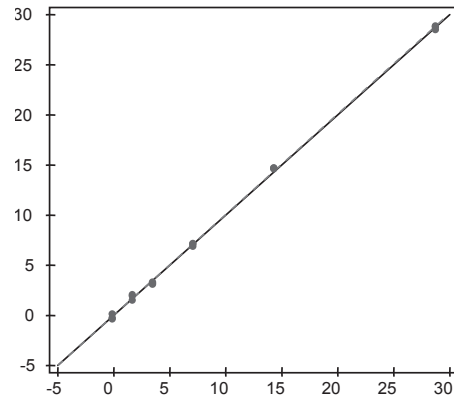
Management evaluatie

Naast de technische validatie is voor een volledige evaluatie een beoordeling nodig van managementza-

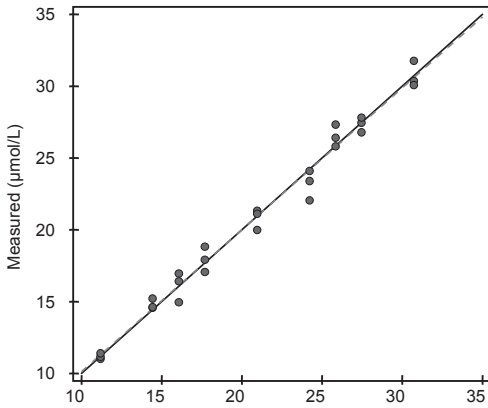
1a: Koper gehele range



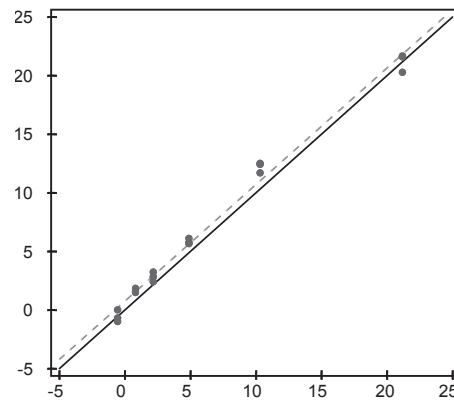
Koper lage range



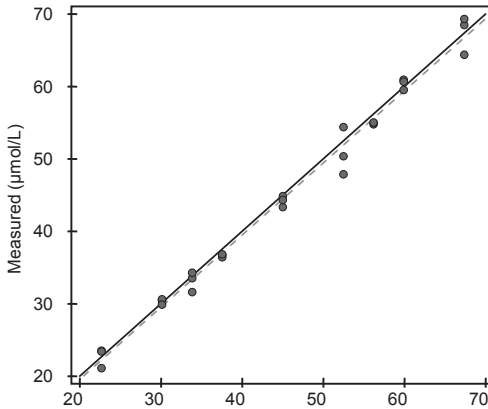
1b: Zink gehele range



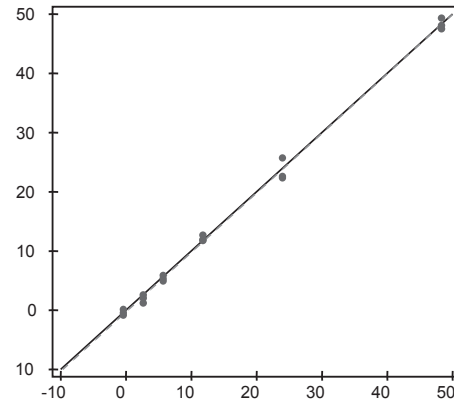
Zink lage range



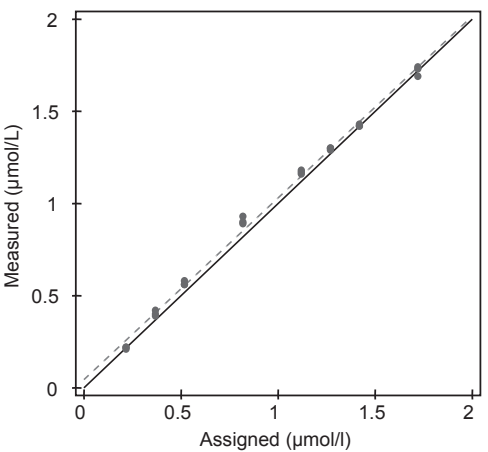
1c: IJzer gehele range



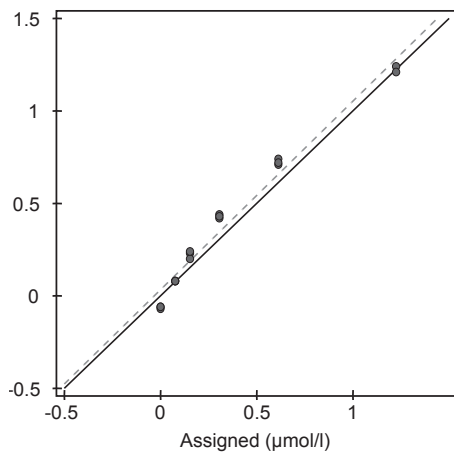
IJzer lage range



1d: Aluminium gehele range



Aluminium lage range



Figuur 1. Lineariteit bepaling van koper, zink, ijzer en aluminium. — 1:1 - - - - Lineaire regressie

ken zoals gebruiksvriendelijkheid, snelheid, materiaalverbruik, implementatiegemak en onderhoud. Aangezien het hier om een vergelijking gaat met een 20 jaar oud apparaat scoorde de ContrAA op alle bovenstaande punten beter. Door de gebruikers wordt vooral aangegeven dat het een gebruiksvriendelijk apparaat is met overzichtelijke software. Wat betreft de snelheid is vooral de analyse met de AAS-vlam vele malen sneller, voornamelijk veroorzaakt door het gebruik van de autosampler. Voordeel hierbij is ook dat na voorbewerking, de optie met de AAS-vlam een "walk-away" mogelijk maakt. De bepalingstijd per monster in de AAS-oven is vergelijkbaar met die van de conventionele methode aangezien de tijd voor het indampen van het materiaal niet verkort kan worden. Qua monsterverbruik is er door de aanschaf van de ContrAA een winst behaald van 300 µl per twee bepalingen. Dit voordeel komt vooral door het gebruik van het segmented flow injectiesysteem, waardoor het minimaal benodigde volume verminderd is. Het minimale volume voor een bepaling op de ContrAA is nu 400 µl in plaats van 700 µl in de oude situatie. Door deze vermindering is het bepalen van sporenelementen in microcupjes, welke gebruikt worden bij kinderen, mogelijk geworden.

Dit is een nieuwe analyser waarmee de leverancier in Nederland nog geen ervaring had. In dit kader werden slechts weinig problemen geconstateerd, nl enkele softwareproblemen en een probleem met de printplaat van de monochromator welke het prisma foutief aanstuurde. Daarnaast hadden we in de opstartfase last van een vervuilde oven. Door onbekendheid van de firma met het gebruikte materiaal (bloed) en onbekendheid van de gebruiker met deze nieuwe analyser is lang onduidelijk geweest hoe en waarmee de oven gereinigd kon worden. Ook constateerden we tijdens het gebruik van de analyser dat de controlewaarden niet meer juist bleken te zijn, de oorzaak was een kleine verschuiving van het prisma. De medewerkers van de firma zijn actief betrokken geweest bij het oplossen van de ondervonden problemen en hebben intensief contact gehad met het kenniscentrum in Duitsland. Het feit dat het kenniscentrum in Duitsland gestationeerd is, had in principe een nadelige werking op het serviceniveau kunnen hebben. Dit is door ons zeker niet zo ervaren, de service was goed en de communicatie verliep erg laagdrempelig. Bovendien zijn de bepalingen die uitgevoerd worden op de ContrAA niet van een spoedeisend karakter en is de benodigde reistijd in geval van problemen acceptabel. Gezien deze kleine opstartproblemen is een positieve beoordeling van de ContrAA gerechtvaardigd.

Discussie

Bij de evaluatie bleek dat de ContrAA voldeed aan de vooraf gestelde analytische criteria en dat deze bovendien positief scoorde in de managementparameters. De lopende bepalingen zijn dus overgezet op de ContrAA. In de praktijk is een AAS specialist onontbeerlijk op een gespecialiseerd laboratorium, zeker als het nieuw ontwikkelde apparaat betreft. Deze apparatuur is moeilijk standaard te installeren. Vaak wordt er gestart vanuit een standaard protocol, maar verdere finetuning is noodzakelijk om de bepalingen te optimaliseren. Naar eigen inzicht moet een programma op maat gemaakt kunnen worden.

Een van de belangrijkste redenen om voor de ContrAA te kiezen is het feit geweest dat met één lamp alle elementen gemeten kunnen worden. Nu de lopende bepalingen overgezet zijn, is de tijd rijp voor de introductie van minder frequent aangevraagde sporenelementen (waaronder selenium, molybdeen en mangaan). Op deze manier hopen we niet alleen te kunnen voldoen aan verzoeken vanuit de eigen kliniek, maar ook snel in te kunnen spelen op vragen van onderzoekers en ontvangstcentrum te worden voor andere (klinisch chemische) laboratoria voor bepalingen op de AAS.

Dankwoord

De auteurs bedanken Marco Kuipers, Dennis Huiskamp van de firma Beun de Ronde (Abcoude) en Oliver Buettel van de firma Analytic Jena (Jena) voor de geleverde inspanningen.

Referentie

1. NCCLS Evaluation Protocols. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villa Nova USA, 1992.

Summary

Grouw PLM de, Delzenne B, Grundel P, Heckman M, Eschhof W van den, Stroobants AK. Evaluation of an atomic absorption spectrometer. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2011;36:134-8.

In order to come to a well defined choice of replacement of the atomic absorption spectrometer (AAS) various AAS systems were compared based on predefined criteria (user-friendliness, fastness, volume of patient materials tested, easiness of implementation and maintenance). Based on these criteria the choice was made for the ContrAA of Analytik Jena. One of the main advantages, compared to the other AAS systems, is the use of a Xenon-bulb which allows the rapid analysis of different elements in a single sample as well as analysis of rare elements. The ContrAA was evaluated with regard to analytical performance including the within run and total imprecision, the extent of carry-over, linearity and sensitivity. For all, the ContrAA scored well which explains its introduction in the laboratory to analyse current requests while implementation of assays for less frequently requested elements is ongoing.

Keywords: atomic absorption spectrometer; AAS; management evaluation; reproducibility; carry-over; imprecision; linearity; analytical sensitivity