

DIN EN ISO 23783-2



ICS 17.060; 71.040.20

Einsprüche bis 2023-08-02

Entwurf

**Automatisierte Flüssigkeitsdosiersysteme –
Teil 2: Messverfahren zur Bestimmung der volumetrischen Leistung
(ISO 23783-2:2022);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 23783-2:2023**

Automated liquid handling systems –
Part 2: Measurement procedures for the determination of volumetric performance
(ISO 23783-2:2022);
German and English version prEN ISO 23783-2:2023

Systèmes automatisés de manipulation de liquides –
Partie 2: Procédures de mesure pour la détermination des performances volumétriques
(ISO 23783-2:2022);
Version allemande et anglaise prEN ISO 23783-2:2023

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2023-06-02 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an fnla@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Laborgeräte und Laboreinrichtungen (FNLa), 10772 Berlin oder Am DIN-Platz, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 175 Seiten

DIN-Normenausschuss Laborgeräte und Laboreinrichtungen (FNLa)

Nationales Vorwort

Der Text von ISO 23783-2:2022 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 48 „Laboratory equipment“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und vom Technischen Komitee CEN/TC 332 „Laborausrüstungen“ als prEN ISO 23783-2:2023 übernommen, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 055-01-08 AA „Volumenmessgeräte“ im DIN-Normenausschuss Laborgeräte und Laboreinrichtungen (FNLa).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Für die in diesem Dokument zitierten Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 648	siehe	DIN EN ISO 648
ISO 1042	siehe	DIN EN ISO 1042
ISO 3696	siehe	DIN ISO 3696
ISO 4787	siehe	DIN EN ISO 4787
ISO 8655-6	siehe	DIN EN ISO 8655-6
ISO 9000	siehe	DIN EN ISO 9000
ISO 9001	siehe	DIN EN ISO 9001
ISO 23783-1	siehe	E DIN EN ISO 23783-1
ISO 23783-3	siehe	E DIN EN ISO 23783-3

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 648, *Laborgeräte aus Glas — Vollpipetten*

DIN EN ISO 1042, *Laborgeräte aus Glas — Messkolben*

DIN EN ISO 4787, *Laborgeräte aus Glas und Kunststoff — Volumenmessgeräte — Prüfverfahren und Anwendung*

DIN EN ISO 8655-6, *Volumenmessgeräte mit Hubkolben — Teil 6: Gravimetrisches Referenzprüfverfahren zur Bestimmung des Volumens*

DIN EN ISO 9000, *Qualitätsmanagementsysteme — Grundlagen und Begriffe*

DIN EN ISO 9001, *Qualitätsmanagementsysteme — Anforderungen*

DIN ISO 3696, *Wasser für analytische Zwecke — Anforderungen und Prüfungen*

E DIN EN ISO 23783-1, *Automatisierte Flüssigkeitsdosiersysteme — Teil 1: Terminologie und allgemeine Anforderungen*

E DIN EN ISO 23783-3, *Automatisierte Flüssigkeitsdosiersysteme — Teil 3: Bestimmung, Spezifikation und Protokollierung der volumetrischen Leistung*

– *Entwurf* –

E DIN EN ISO 23783-2:2023-07

– Leerseite –

Automatisierte Flüssigkeitsdosiersysteme – Teil 2: Messverfahren zur Bestimmung der volumetrischen Leistung (ISO 23783-2:2022)

Automated liquid handling systems – Part 2: Measurement procedures for the determination of volumetric performance (ISO 23783-2:2022)

Systèmes automatisés de manipulation de liquides – Partie 2: Procédures de mesure pour la détermination des performances volumétriques (ISO 23783-2:2022)

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	7
Vorwort	8
Einleitung	9
1 Anwendungsbereich	10
2 Normative Verweisungen	10
3 Begriffe	10
4 Abkürzungen	10
5 Messverfahren	10
5.1 Überblick über geeignete Verfahren zur Messung der ALHS-Leistung	10
5.2 Photometrische Verfahren	17
5.2.1 Ratiometrisch-photometrisches Verfahren mit zwei Chromophoren	17
5.2.2 Photometrisches Verfahren mit einem Chromophor	17
5.2.3 Fluoreszenzverfahren	17
5.3 Gravimetrische Verfahren	17
5.3.1 Einkanal-Verfahren	17
5.3.2 Regressionsanalyse	18
5.4 Photometrisch-gravimetrisches Hybridverfahren	18
5.5 Maßverfahren	19
5.5.1 Optische Bildanalyse von Tröpfchen	19
5.5.2 Optische Bildanalyse von Kapillaren	19
6 Geräte und Vorbereitung	19
6.1 Prüfgerät	19
6.2 Handbetätigte Ein- und Mehrkanalpipetten	21
6.3 Vorbereitung der Prüfung	21
7 Wärmeausdehnung	21
8 Rückverfolgbarkeit und Messsystemunsicherheit	22
8.1 Rückverfolgbarkeit	22
8.2 Schätzung der Messsystemunsicherheit	22
8.2.1 Ansatz für das gesamte System	22
8.2.2 Messmodell-Ansatz	22
9 Dokumentation	22
Anhang A (normativ) Berechnung von Flüssigkeitsvolumina anhand von Wägewerten	23
A.1 Berechnung des Flüssigkeitsvolumens anhand des Wägewerts	23
A.1.1 Allgemeine Gleichung für das Volumen	23
A.1.2 Berechnung der Luftdichte	23
A.1.3 Berechnung der Wasserdichte	24
A.1.4 Prüfung von anderen Flüssigkeiten als Wasser	24
A.2 Korrekturfaktoren für die Überführung der Wägewerte in Volumen	24
Anhang B (normativ) Ratiometrisch-photometrisches Verfahren mit zwei Chromophoren	27
B.1 Allgemeines	27
B.2 Prüfgerät	27
B.2.1 Allgemeines	27
B.2.2 Mikroplatten-Absorptionslesegerät	27
B.2.3 Spektralphotometer	27
B.2.4 Mikroplatten	28
B.2.5 Kalibrierplatte	28
B.2.6 Mikroplattenschüttler	28
B.2.7 Waage	28
B.2.8 Andere Prüfgeräte	28
B.2.9 Volumenmessgeräte aus Glas, Genauigkeitsklasse A	29
B.3 Reagenzien	29

B.3.1	Allgemeine Anforderungen	29
B.3.2	Wasser	29
B.3.3	Haltbarkeit der Lösungen	29
B.3.4	Herstellung von Reagenzlösungen	29
B.4	Prüfbedingungen	30
B.5	Verfahren	30
B.5.1	Herstellung	30
B.5.2	Prüfverfahren für die Trockenabgabe	31
B.5.3	Prüfverfahren für die Nassabgabe	31
B.6	Volumenberechnungen	32
B.7	Rückverfolgbarkeit	33
Anhang C (normativ) Photometrisches Verfahren mit einem Chromophor		34
C.1	Allgemeines	34
C.2	Anwendbare Volumenbereiche	34
C.3	Prüfgerät	34
C.3.1	Allgemeines	34
C.3.2	Handbetätigte Pipetten	34
C.3.3	Waagen	34
C.3.4	Mikroplattenlesegerät	35
C.3.5	Mikroplatten	35
C.3.6	Volumenmessgeräte aus Glas	35
C.4	Reagenzien	35
C.4.1	Verwendete Chemikalien	35
C.4.2	Puffer 0,1 M	35
C.4.3	Orange-G-Prüfflüssigkeiten 8,0 g/l	35
C.4.4	Orange-G-Prüfflüssigkeit 2,0 g/l	36
C.4.5	Orange-G-Prüfflüssigkeit 1,6 g/l	36
C.4.6	Orange-G-Prüfflüssigkeit 0,2 g/l	36
C.5	Prüfbedingungen	36
C.6	Prüfverfahren	36
C.6.1	Kalibrierkurven	36
C.6.2	Prüfverfahren	38
C.7	Berechnung des Volumens	39
C.8	Rückverfolgbarkeit	39
Anhang D (normativ) Gravimetrisches Verfahren, Einkanalmessung		40
D.1	Allgemeines	40
D.2	Prüfgerät	40
D.2.1	Waage	40
D.2.2	Flüssigkeitsbehälter	40
D.2.3	Wägegefäß	40
D.2.4	Umgebungsbedingungen für die Prüfgeräte	40
D.3	Prüfflüssigkeit	40
D.4	Prüfbedingungen	41
D.5	Verfahren	41
D.5.1	Vorbereitung	41
D.5.2	Verdunstung	41
D.5.3	Volumenmessung	42
D.6	Volumenberechnungen	43
D.6.1	Korrektur bezüglich der Verdunstung	43
D.6.2	Überführung der korrigierten Massen in Volumina	43
D.7	Rückverfolgbarkeit	43
Anhang E (normativ) Gravimetrisches Regressionsverfahren		44
E.1	Allgemeines	44
E.2	Prüfgerät	44
E.2.1	Allgemeine Anforderungen	44
E.2.2	Prüfflüssigkeiten	44
E.3	Umgebungsbedingungen	45

E.4	Messaufbau	45
E.5	Verfahren	45
E.5.1	Massenmessungen	45
E.5.2	Volumenbestimmung	45
E.6	Berechnung des Abgabevolumens	47
E.6.1	Abgabevolumen	47
E.6.2	Systematische Messabweichung	47
E.6.3	Zufällige Messabweichung	47
E.7	Rückverfolgbarkeit	49
Anhang F (normativ) Photometrisch-gravimetrisches Hybridverfahren		50
F.1	Allgemeines	50
F.2	Prüfgerät	50
F.2.1	Allgemeines	50
F.2.2	Laborgeräte	50
F.2.3	Mikroplattenlesegerät	50
F.2.4	Mikroplattenschüttler	51
F.2.5	Waage, Thermometer, Hygrometer, Barometer und Zeitgeber	51
F.3	Reagenzien	51
F.3.1	Allgemeine Anforderungen	51
F.3.2	Verwendete Chemikalien	51
F.3.3	Prüfflüssigkeiten	52
F.4	Prüfumgebung	54
F.5	Verdunstung	54
F.6	Linearität des Systems	54
F.7	Verfahren	54
F.7.1	Schritt der gravimetrischen Messung	54
F.7.2	Schritt der photometrischen Messung	57
F.8	Berechnung des Abgabevolumens	58
F.9	Rückverfolgbarkeit	59
Anhang G (normativ) Optische Bildanalyse von Tröpfchen		60
G.1	Allgemeines	60
G.2	Prüfgerät	60
G.2.1	Anforderungen	60
G.2.2	Bildkontrast	61
G.2.3	Bildunschärfe	61
G.3	Messaufbau	63
G.4	Prüfflüssigkeiten	63
G.5	Umgebungsbedingungen	64
G.6	Verfahren	64
G.6.1	Installation des DUT	64
G.6.2	Kalibrierung der Kamera und des optischen Systems	64
G.6.3	Bilderfassung	65
G.6.4	Bildverarbeitung	66
G.7	Berechnung des Abgabevolumens	67
G.7.1	Allgemeines	67
G.7.2	Abgabevolumen	67
G.7.3	Systematische Messabweichung	68
G.7.4	Zufällige Messabweichung	68
G.8	Rückverfolgbarkeit	68
Anhang H (normativ) Fluoreszenzverfahren		69
H.1	Allgemeines	69
H.2	Prüfgerät	69
H.2.1	Fluoreszenz-Plattenlesegerät	69
H.2.2	Fluoreszenz-Referenzplatte	69
H.2.3	Flüssigkeitsdosierer	69
H.2.4	Mikroplatten	69
H.2.5	Plattenschüttler	70

H.2.6	Plattenzentrifuge	70
H.2.7	Andere Prüfgeräte	70
H.2.8	Geräte aus Glas	70
H.2.9	Pipetten	70
H.2.10	Weitere Materialien	70
H.3	Prüfflüssigkeiten	70
H.3.1	Allgemeines	70
H.3.2	Vorbereitung von Prüfflüssigkeiten	71
H.4	Umgebungsbedingungen	73
H.5	Verfahren	73
H.5.1	Allgemeines	73
H.5.2	Drift- und Linearitätsprüfung eines Fluoreszenz-Mikroplattenlesegeräts	73
H.5.3	Fluoresceinkonzentrationsprüfung	74
H.5.4	ALHS-Prüfverfahren für einen einzelnen DMSO-Hydratationsgrad	77
H.5.5	ALHS-Prüfverfahren für mehrere DMSO-Hydratationsgrade	78
H.5.6	ALHS-Prüfverfahren für Volumina innerhalb des angegebenen Volumenbereichs	79
H.6	Berechnungen	79
H.6.1	Allgemeines	79
H.6.2	Fluoresceinkonzentrationsprüfung	79
H.6.3	Standardkurve	80
H.6.4	Fünf-nl-Volumenprüfung (Prüfflüssigkeit mit einem DMSO-Hydratationsgrad)	81
H.6.5	Fünf-nl-Volumenprüfung (Prüfflüssigkeiten mit verschiedenen DMSO-Hydratationsgraden)	81
H.6.6	Umwandlung von Signalen in Konzentrationswerte	82
H.6.7	Berechnung des Volumens der Prüfflüssigkeit je Vertiefung	82
H.7	Rückverfolgbarkeit	82
Anhang I (normativ) Optische Bildanalyse von Kapillaren		83
I.1	Allgemeines	83
I.2	Prüfgerät	83
I.2.1	Platte mit Kapillaren	83
I.2.2	Prüfflüssigkeit	83
I.2.3	Bilderfassungsgerät	84
I.2.4	Anforderungen an die Bildqualität	85
I.2.5	Software	85
I.3	Prüfbedingungen	86
I.4	Prüfverfahren	86
I.4.1	Prüfflüssigkeitsabgabe	86
I.4.2	Bilderfassung	87
I.4.3	Volumenbestimmung	87
I.5	Volumenberechnung	87
I.6	Rückverfolgbarkeit	88
Literaturhinweise		89

Bilder

Bild C.1	— Beispiel einer Kalibrierkurve für Prüfvolumina von 0,5 µl bis 2,0 µl in Mikroplatten mit 96 Vertiefungen	38
Bild E.1	— Diagramm einer typischen Messung —lineare Regressionen der erfassten Masse vor und nach der Abgabe der Prüfflüssigkeit in Abhängigkeit von der Zeit	46
Bild G.1	— Unterschiedliche Bildqualität bei Tröpfchenbildern	61
Bild G.2	— Qualität der Tröpfchenbilder	62
Bild H.1	— Aufbau einer Mikroplatte zur Prüfung der Einheitlichkeit der Fluoresceinkonzentrationen (DMSO-Gehalt der Prüfflüssigkeiten in 10 ⁻⁵ %)	74
Bild H.2	— Aufbau der Fluorescein-Konzentrationsprüfung bei einem einzigen Hydratationsgrad	75

Bild H.3 — Anordnung der Mikroplatte mit 384 Vertiefungen für die Erstellung von Standardkurven (Fluoresceinkonzentration in nM angegeben)	77
Bild H.4 — Plattenanordnung für ALHS-Prüfungen bei einer Stufe der DMSO-Hydratation (70 % DMSO, 30 % Wasser) — Konzentration von Fluorescein (in nM) in 10 mM NaOH	78
Bild H.5 — Plattenanordnung für ALHS, das sich automatisch an Änderungen des DMSO-Hydratationsgrads anpasst — die DMSO-Konzentration (in %) der ursprünglich abgegebenen Prüfflüssigkeit wird in den Vertiefungen angezeigt	79
Bild I.1 — Veranschaulichung der Position zur Bestimmung der Weglänge für Kapillaren mit unterschiedlichen Querschnitten	88

Tabellen

Tabelle 1 — Prüfverfahren für ALHS	12
Tabelle 2 — Mindestanforderungen für Waagen zum Wägen von Trockenmaterial	20
Tabelle 3 — Mindestanforderungen für Waagen zum Wägen von Flüssigkeiten	20
Tabelle 4 — Mindestanforderungen an die Leistungsfähigkeit von Absorptionslesegeräten für Mikroplatten	20
Tabelle 5 — Mindestanforderungen an die Leistungsfähigkeit anderer Prüfgeräte	21
Tabelle A.1 — Korrekturfaktoren Z für destilliertes Wasser (luftgesättigt) in Einheiten von µl je mg	25
Tabelle B.1 — Mindestanforderungen an die Leistungsfähigkeit des Spektralphotometers	27
Tabelle B.2 — Mindestanforderungen an Mikroplattenschüttler für Standard-ANSI/SLAS-Mikroplatten	28
Tabelle B.3 — Bei dem ratiometrisch-photometrischen Verfahren mit zwei Chromophoren verwendete Chemikalien	29
Tabelle B.4 — Ponceau-S-Prüfflüssigkeiten	30
Tabelle B.5 — Absorptionslinie	31
Tabelle C.1 — Orange-G-Prüfflüssigkeiten	34
Tabelle C.2 — Verwendete Chemikalien	35
Tabelle C.3 — Kalibrierpunkte für alle Volumina in Mikroplatten mit 96 Vertiefungen und 384 Vertiefungen	37
Tabelle D.1 — Prüfbedingungen	41
Tabelle E.1 — Mindestanforderungen für Dichtemessungen	44
Tabelle F.1 — Chromophore für Absorptionsmessungen	50
Tabelle F.2 — Mindestanforderungen an die Leistungsfähigkeit des Mikroplatten-Absorptionslesegeräts	51
Tabelle F.3 — Leistungsmerkmale des Mikroplattenschüttlers mit Orbitalbewegungen	51
Tabelle F.4 — Bei dem photometrisch-gravimetrischen Hybridverfahren verwendete Chemikalien	52
Tabelle F.5 — Prüfvolumina mit Tartrazin als Prüfflüssigkeit	52
Tabelle F.6 — Prüfvolumina mit 4-Nitrophenol als Prüfflüssigkeit	53
Tabelle F.7 — Prüfvolumina mit Orange-G-Prüfflüssigkeiten	53
Tabelle G.1 — Mindestanforderungen an das optische Abbildungssystem	60
Tabelle H.1 — Chemikalien für das Fluoreszenzverfahren	71
Tabelle H.2 — Herstellung von 0,15-mM-Fluorescein-Prüfflüssigkeiten	72
Tabelle I.1 — Abmessungen der Kapillare	83

Europäisches Vorwort

Der Text von ISO 23783-2:2022 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC48 „Laboratory equipment“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und vom Technischen Komitee CEN/TC332 „Laborausrüstungen“ als prEN ISO 23783-2:2023 übernommen, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 23783-2:2022 wurde von CEN als prEN ISO 23783-2:2023 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsinstitute (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird üblicherweise von Technischen Komitees von ISO durchgeführt. Jede Mitgliedsorganisation, die Interesse an einem Thema hat, für welches ein Technisches Komitee gegründet wurde, hat das Recht, in diesem Komitee vertreten zu sein. Internationale staatliche und nichtstaatliche Organisationen, die in engem Kontakt mit ISO stehen, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet bei allen elektrotechnischen Normungsthemen eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC-Directives, Teil 1 beschrieben. Es sollten insbesondere die unterschiedlichen Annahmekriterien für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC-Directives, Teil 2 erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren. Details zu allen während der Entwicklung des Dokuments identifizierten Patentrechten finden sich in der Einleitung und/oder in der ISO-Liste der erhaltenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname dient nur zur Unterrichtung der Anwender und bedeutet keine Anerkennung.

Für eine Erläuterung des freiwilligen Charakters von Normen, der Bedeutung ISO-spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO, en: World Trade Organization) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT, en: Technical Barriers to Trade) berücksichtigt, siehe www.iso.org/iso/foreword.html.

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 48, *Laboratory equipment*, erarbeitet.

Diese erste Ausgabe von ISO 23783-2, zusammen mit ISO 23783-1 und ISO 23783-3, ersetzt IWA 15:2015.

Eine Auflistung aller Teile der Normenreihe ISO 23783 ist auf der ISO-Internetseite abrufbar.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Auflistung dieser Institute ist unter www.iso.org/members.html zu finden.

Einleitung

Die Globalisierung des Laborbetriebs erfordert standardisierte Praktiken für den Betrieb von automatisierten Flüssigkeitsdosiersystemen (ALHS, en: automated liquid handling systems), die Kommunikation von Prüfprotokollen sowie die Analyse und Dokumentation von Leistungskenngrößen. IWA 15:2015 wurde entwickelt, um standardisierte Terminologie, Prüfprotokolle und Analyseverfahren für die Dokumentation von Prüfergebnissen bereitzustellen. Die für die IWA 15 entwickelten und darin beschriebenen Begriffe bilden die Grundlage für die Normenreihe ISO 23783.

Dieses Dokument befasst sich insbesondere mit den Anforderungen von:

- Nutzern von ALHS als Grundlage für Kalibrierung, Verifizierung, Validierung, Optimierung und Routineprüfungen der Richtigkeit und Präzision;
- Herstellern von ALHS als Grundlage für die Qualitätskontrolle, die Mitteilung von Abnahmeprüfungsspezifikationen und -bedingungen und die Ausstellung von Herstellererklärungen (sofern zutreffend);
- Prüfstellen und anderen Einrichtungen als Grundlage für die Zertifizierung, Kalibrierung und Prüfung.

Die in diesem Dokument festgelegten Prüfungen sollten von geschultem Personal durchgeführt werden.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument spezifiziert Verfahren zur Bestimmung der volumetrischen Leistung von automatisierten Flüssigkeitsdosiersystemen (ALHS), einschließlich Rückverfolgbarkeit und Abschätzung der Messunsicherheit von Messergebnissen.

Dieses Dokument gilt für alle ALHS mit vollständigen, installierten Flüssigkeitsdosiersystemen, einschließlich Spitzen und anderer wesentlicher Teile, die für die Dosierung eines bestimmten Volumens benötigt werden und die Flüssigkeitsdosier-Aufgaben ohne menschliches Zutun in Laborgeräten durchführen.

ANMERKUNG Zur Terminologie und den allgemeinen Anforderungen an automatisierte Flüssigkeitsdosiersysteme siehe ISO 23783-1. Die Bestimmung, Spezifikation und Dokumentation der volumetrischen Leistung von automatisierten Flüssigkeitsdosiersystemen wird in ISO 23783-3 beschrieben.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

ISO 3696, *Water for analytical laboratory use — Specification and test methods*

ISO 8655-6, *Piston-operated volumetric apparatus — Part 6: Gravimetric reference measurement procedure for the determination of volume*

ISO 23783-1, *Automated liquid handling systems — Part 1: Terminology and general requirements*

ISO 23783-3, *Automated liquid handling systems — Part 3: Determination, specification, and reporting of volumetric performance*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach ISO 23783-1.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: verfügbar unter <https://www.electropedia.org/>

4 Abkürzungen

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Abkürzungen nach ISO 23783-1.

5 Messverfahren

5.1 Überblick über geeignete Verfahren zur Messung der ALHS-Leistung

Bei der Auswahl eines Prüfverfahrens für ein ALHS ist dessen Eignung für die jeweilige Prüfsituation zu bewerten. Bei dieser Bewertung müssen die Anforderungen an die systematische und zufällige Messabweichung des ALHS, auf das das Prüfverfahren angewendet wird, berücksichtigt werden. Das gewählte Prüfverfahren muss geeignet sein, um zu beurteilen, ob die Leistung des ALHS für den vorgesehenen Zweck geeignet ist.

ANMERKUNG 1 Die Gebrauchstauglichkeit ist ein grundlegender Begriff und steht in engem Zusammenhang mit dem Prozess der metrologischen Bestätigung, wie er in ISO 9000 und ISO 9001 beschrieben ist.

Das Prüfverfahren muss eine ausreichend kleine Messsystemunsicherheit (MSU) für die spezifische Prüfsituation aufweisen. Die MSU sollte nach einem geeigneten Ansatz bestimmt werden (siehe 8.2 für weitere Einzelheiten).

ANMERKUNG 2 Der Messmodellansatz zur Schätzung der MSU ist in ISO/IEC Guide 98-3 und der Messsystemansatz in EURACHEM/CITAG Guide CG 4 [4] beschrieben.

Tabelle 1 soll einen Überblick über Verfahren geben, die zur Bestimmung der volumetrischen Leistung von ALHS geeignet sind. Sie enthält Querverweise zwischen den Verfahrenszusammenfassungen von 5.2 bis 5.5 und den entsprechenden Verfahren in Anhang B bis Anhang I. Ferner werden die Volumenbereiche, Platten- und Flüssigkeitstypen beschrieben, die für die Prüfung der ALHS-Leistung mit einem bestimmten Verfahren verwendet werden können. Außerdem werden typische systematische und zufällige Messabweichungen aufgeführt, die erreicht werden können, wenn ein Prüfverfahren genau wie im jeweiligen Anhang beschrieben durchgeführt wird. Die Eignung eines Verfahrens für eine bestimmte Prüfsituation darf auch durch die erforderliche Ausrüstung oder die Umgebungsbedingungen, unter denen es durchgeführt werden muss, bestimmt werden.

In Tabelle 1 sind nur die wichtigsten Prüfgeräte aufgeführt, während für jedes Verfahren Prüfgeräte zur Überwachung der Flüssigkeits- und Lufttemperatur, der relativen Luftfeuchte und des Luftdrucks erforderlich sind, wie in den entsprechenden Anhängen angegeben.

- Entwurf -

Tabelle 1 — Prüfverfahren für ALHS

Verweisung auf das Verfahren	Verfahren	Flüssigkeitstyp	Plattentyp Vertiefungen	Volumenbereich µl	Typische systematische Messabweichung ^a %	Typische zufällige Messabweichung ^a %	Umgebungsbedingungen ^b	Prüfgerät
Photometrische Verfahren								
5.2.1 Anhang B	Ratiometrisch-photometrisches Verfahren mit zwei Chromophoren	wässrig, DMSO ^c	96	0,1 bis 350,0	2,0 bis 3,0	0,15 bis 0,25	Temperatur: wässrig: 15 °C bis 30 °C; DMSO ^c : 19 °C bis 30 °C; RH ^d : 20 % bis 90 %	— Mikroplatten-Absorptionslesegerät, das die Absorption bei 520 nm und 730 nm messen kann; — maßlich gekennzeichnete Mikroplatten mit 96 bzw. 384 Vertiefungen mit optisch klarem Boden; — Kalibrierplatte für das Plattenlesegerät; — Mikroplattenschüttler; — Waage; — Spektrophotometer, das die Absorption bei 520 nm und 730 nm messen kann; — pH-Messgerät; — Messkolben.
			384	0,01 bis 55,0	2,5 bis 5,5	0,35 bis 0,55		
5.2.2 Anhang C	Photometrisches Verfahren mit einem Chromophor	wässrig	96	1,0 bis 100,0	3	1,5	Temperatur: 15 °C bis 30 °C; RH ^d : 40 % bis 70 %	— Mikroplatten-Absorptionslesegerät, das die Absorption bei 492 nm und 620 nm messen kann; — Mikroplatten mit 96 bzw. 384 Vertiefungen mit optisch klarem Boden; — Waage; — Magnetrührwerk; — Mikroplattenschüttler; — pH-Messgerät; — handbetätigte Pipetten; — Messkolben.
			384	0,25 bis 20,0	3	1,5		

- Entwurf -

Tabelle 1 (fortgesetzt)

Verweisung auf das Verfahren	Verfahren	Flüssigkeitstyp	Plattentyp	Volumenbereich	Typische systematische Messabweichung ^a	Typische zufällige Messabweichung ^a	Umgebungsbedingungen ^b	Prüfgerät
			Vertiefungen	µl	%	%		
5.2.3 Anhang H	Fluoreszenzverfahren	wässrig, DMSO ^c	384	0,001 bis 0,015	< 8	< 8	Temperatur: 17 °C bis 27 °C; RH ^d : nicht-kondensierend	— Mikroplatten-Fluoreszenz-Messgerät mit einer Anregungswellenlänge von 494 nm und einer Emissionsanalyse bei 521 nm; — Fluoreszenz-Mikroplatten mit 384 bzw. 1 536 Vertiefungen; — Waage; — Flüssigkeitsdosierer oder Mehrkanalpipette; — Mikroplattenschüttler; — pH-Messgerät; — handbetätigte Pipetten; — Messkolben.
			1 536	0,001 bis 0,015	< 8	< 8		
Gravimetrische Verfahren								
5.3.1 Anhang D	Einzelkanal-Analyse	alle	keine Angabe	0,5 bis < 20	≤ 1,4	≤ 0,6	Temperatur: 17 °C bis 30 °C; RH ^d : 45 % bis 80 %	— Waage; — Dichtemessgerät; — antielektrostatische Ausrüstung; — Anti-Vibrationstisch; — Temperatur- und Luftfeuchterege- lung für die Umgebung; — Windschutz oder windstille Umgebung für Gleichgewicht.
				20 bis < 200	≤ 0,9	≤ 0,3		
				200 bis 1 000	≤ 0,9	≤ 0,3		

- Entwurf -

Tabelle 1 (fortgesetzt)

Verweisung auf das Verfahren	Verfahren	Flüssigkeitstyp	Plattentyp	Volumenbereich	Typische systematische Messabweichung ^a	Typische zufällige Messabweichung ^a	Umgebungsbedingungen ^b	Prüfgerät
			Vertiefungen	μl	%	%		
5.3.2 Anhang E	Regressionsanalyse	alle	keine Angabe	< 0,015	20 bis 50	< 10	Temperatur: 17 °C bis 27 °C; RH ^d : 45 % bis 80 % barometrischer Druck: 600 hPa bis 1 100 hPa	— Waage; — Dichtemessgerät, mit dem es möglich ist, auf 6 Dezimalstellen abzulesen; — antielektrostatische Ausrüstung; — Anti-Vibrationstisch; — Temperatur- und Luftfeuchterege lung für die Umgebung; — Windschutz oder windstille Umgebung für Gleichgewicht.
				0,015 bis < 0,050	2 bis 5	2,5 bis 5		
				0,050 bis 1	0,5 bis 2	< 0,5		
Photometrisch-gravimetrisches Hybridverfahren								

- Entwurf -

Tabelle 1 (fortgesetzt)

Verwei- sung auf das Verfahren	Verfahren	Flüssig- keitstyp	Plattentyp	Volumen- bereich	Typische sys- tematische Messab- weichung ^a	Typische zufällige Messab- weichung ^a	Umgebungs- bedingungen ^b	Prüfgerät
			Vertiefungen	µl	%	%		
5.4 Anhang F	Tartrazin als Chromophor	wässrig	96	1,0 bis 300,0	0,2 bis 0,8	0,5 bis 1,0	Temperatur:	— Waage; — Absorptionslesegerät für Mikroplatten, das die Absorption bei folgenden Wellenlängen messen kann, je nach verwendetem Chromophor:
			384	1,0 bis 20,0	0,4 bis 1,0	0,9 bis 1,5	17 °C bis 30 °C;	— 4-Nitrophenol: 405 nm und 620 nm,
	4-Nitrophenol als Chromophor	wässrig	96	10 bis 1 000 5 bis 250	< 1 bis 5	1 bis 2	Temperatur- stabilität: < ±0,5 °C	— Tartrazin: 450 nm und 620 nm,
			96, 384	1 bis 60 0,5 bis 25	< 1 bis 5	1 bis 2	RH ^d : 45 % bis 80 % RH ^d -Stabilität: < ±10 %	— Orange G: 492 nm und 620 nm
			384, 1 536	0,1 bis 8	< 2 bis 10	2 bis 5		— Mikroplattenschüttler; — Mikroplatten mit 96 bzw. 384 Vertiefungen mit optisch klarem Boden; — handbetätigte Pipetten; — Zentrifugenröhrchen 1,5 ml; — Anti-Vibrationstisch;
	Orange G als Chromophor	wässrig	96	1 bis 100	< 1 bis 5	1,5		— Temperatur- und Luftfeuchterege- lung für die Umgebung;
			384	1 bis 50	< 1 bis 5	1,5		— Windschutz oder windstille Umgebung für Gleichgewicht.
Maßverfahren								

- Entwurf -

Tabelle 1 (fortgesetzt)

Verweisung auf das Verfahren	Verfahren	Flüssigkeitstyp	Plattentyp	Volumenbereich	Typische systematische Messabweichung ^a	Typische zufällige Messabweichung ^a	Umgebungsbedingungen ^b	Prüfgerät
			Vertiefungen	μl	%	%		
5.5.1 Anhang G	Optische Bildanalyse von Tröpfchen	alle	keine Angabe	frei fliegende Tröpfchen, V < 0,5 μl	< 5	< 2	Temperatur: (20 ± 3) °C oder (27 ± 3) °C RH ^d : 50 % bis 80 %	— Stroboskopkamera oder Hochgeschwindigkeitskamera; — Software zur automatischen Bilderkennung.
5.5.2 Anhang I	Optische Bildanalyse von Kapillaren	alle	keine Angabe	0,1 bis 1,0	< 10	< 7	Temperatur: 15 °C bis 35 °C RH ^d : 15 % bis 90 %	— Flachbettscanner; — Bildanalyse-Software; — spezialisierte Platten mit Kapillaren.
				> 1,0 bis 1 000	< 5	< 4		
^a In der Regel führen größere Prüfvolumen zu kleineren Messabweichungen.								
^b Die Mindesttemperatur der Prüfumgebung muss über dem Schmelzpunkt der Prüflüssigkeit liegen, so dass sichergestellt ist, dass sie zu keinem Zeitpunkt der Prüfung erstarrt. Die relative Luftfeuchte der Prüfumgebung muss nicht-kondensierend sein.								
^c Dimethylsulfoxid.								
^d Relative Luftfeuchte:								

5.2 Photometrische Verfahren

5.2.1 Ratiometrisch-photometrisches Verfahren mit zwei Chromophoren

Dieses Verfahren ermöglicht die Bestimmung von Volumina wässriger Prüfflüssigkeiten von 0,1 µl bis 350 µl in Platten mit 96 Vertiefungen sowie zwischen 0,01 µl und 55 µl in Platten mit 384 Vertiefungen. Volumina von Dimethylsulfoxid-basierten (DMSO-basierten) Prüfflüssigkeiten können von 0,11 µl bis 10 µl in Platten mit 96 Vertiefungen sowie von 0,01 µl bis 2,5 µl in Platten mit 384 Vertiefungen bestimmt werden.

Dieses Verfahren ist geeignet, um die Leistung von ALHS mit bis zu 384 Kanälen zu bestimmen. Die Betriebsumgebung für dieses Verfahren beträgt 15 °C bis 30 °C (19 °C bis 30 °C für DMSO-Flüssigkeiten), und sie ist unabhängig von der relativen Luftfeuchte und dem Luftdruck am Prüfstandort. Weitere Informationen über die Auswirkungen der relativen Luftfeuchte und des Luftdrucks auf dieses Verfahren können in [5] nachgelesen werden.

Die Rückverfolgbarkeit der Messergebnisse auf das Internationale Einheitensystem (SI) wird durch die Verwendung eines kalibrierten Mikroplatten-Absorptionslesegeräts, maßlich charakterisierter Mikroplatten, einer kalibrierten Waage und kalibrierter Volumenmessgeräte aus Glas erreicht.

Es muss das in Anhang B beschriebene Verfahren für das ratiometrisch-photometrische Verfahren mit zwei Chromophoren angewendet werden.

5.2.2 Photometrisches Verfahren mit einem Chromophor

Dieses Verfahren eignet sich für die Bewertung der volumetrischen Leistung von ALHS mit bis zu 384 Kanälen unter Verwendung wässriger Prüfflüssigkeiten. In Platten mit 96 Vertiefungen können Volumina von 1 µl bis 100 µl, in Platten mit 384 Vertiefungen von 0,25 µl bis 20 µl gemessen werden.

Die Rückverfolgbarkeit der Messergebnisse auf das SI wird durch die Verwendung einer kalibrierten Waage, kalibrierter Pipetten, eines kalibrierten Mikroplatten-Absorptionslesegeräts und kalibrierter Volumenmessgeräte aus Glas erreicht.

Es muss das in Anhang C beschriebene Verfahren für das photometrische Verfahren mit einem Chromophor angewendet werden.

5.2.3 Fluoreszenzverfahren

Dieses Verfahren eignet sich zur Bewertung der volumetrischen Leistung von ALHS mit Abgabevolumen von weniger als 15 nl. Die Fluoreszenz der Prüfflüssigkeit Fluorescein in DMSO wird in Mikroplatten mit 384 Vertiefungen oder 1 536 Vertiefungen gemessen, die speziell für Fluoreszenzmessungen geeignet sind.

Dieses Verfahren ist für berührungslose Flüssigkeitsdosiergeräte (z. B. akustische Geräte, Dosierventile oder Tintenstrahltechnologie) vorgesehen, die das Flüssigkeitsvolumen als frei fliegende Tröpfchen oder Strahlen in die Vertiefungen der Mikroplatte abgeben.

Die Rückverfolgbarkeit der Messergebnisse auf das SI wird durch die Verwendung eines kalibrierten Fluoreszenz-Mikroplattenlesegeräts, einer kalibrierten Waage, kalibrierter Pipetten und kalibrierter Volumenmessgeräte aus Glas erreicht.

Es muss das in Anhang H angegebene Verfahren für das Fluoreszenzverfahren angewendet werden.

5.3 Gravimetrische Verfahren

5.3.1 Einkanal-Verfahren

Dieses Verfahren beschreibt das Gerät, das Verfahren und das Referenzmaterial für die Aufzeichnung von Messungen mit dem gravimetrischen Verfahren. Eine Einzelschwenkwaage wird verwendet, um eine Messung von jeweils einem einzelnen Kanal vorzunehmen. Die folgenden Vorkehrungen müssen getroffen werden:

- Platzierung der Waage und des Wägebehälters, die Zugluft und Vibrationen auf ein geeignetes Maß reduzieren;
- Kontrolle der Umgebungsbedingungen, die sich auf die Umrechnung von Masse in Volumen bei der Messung auswirken (Temperatur und relative Luftfeuchte);
- Überwachung des Luftdrucks, der die Umrechnung von Masse in Volumen beeinflusst.

Die Rückverfolgbarkeit der Messergebnisse auf das SI wird durch die Verwendung einer kalibrierten Waage und die Berücksichtigung der Dichte der Prüfflüssigkeit und des Luftauftriebs erreicht.

Es muss das in Anhang D beschriebene Verfahren für das gravimetrische Einkanal-Verfahren angewendet werden.

5.3.2 Regressionsanalyse

Das gravimetrische Regressionsverfahren (GRM, en: gravimetric regression method) eignet sich für die Messung sehr kleiner Flüssigkeitsvolumina, zwischen 0,005 µl und 1 µl. Das Verfahren basiert auf einer gravimetrischen Waage als primärem Messgerät.

Dieses Verfahren ist für berührungslose Flüssigkeitsdosiergeräte (z. B. Dosierventile, akustische oder Tintenstrahldosierer) vorgesehen, die das Flüssigkeitsvolumen als frei fliegende Tröpfchen oder Strahlen an das Ausgleichsgefäß abgeben.

Der wesentliche Unterschied zu den traditionellen gravimetrischen Verfahren, die für die Messung größerer Volumina verwendet werden, besteht in der Bestimmung des Zielvolumens: Eine Reihe von Waagenablesungen wird über eine bestimmte Zeitspanne aufgezeichnet, bevor und nachdem das zu prüfende Gerät die zu messende Flüssigkeit in das Gefäß auf der Waage abgegeben hat. Das Messergebnis der abgegebenen Prüfflüssigkeit wird dann als Differenz zwischen zwei linearen Regressionsgeraden ermittelt, die an die aufgezeichneten Waagendaten vor und nach der Flüssigkeitsabgabe angepasst werden. Dieses Verfahren ermöglicht die Messung der Waagendrift aufgrund von Verdunstung und anderen Störungen der Messung (z. B. durch Vibrationen während der Datenerfassung), so dass diese in der Messwertberechnung kompensiert werden können (siehe [6] für weitere Einzelheiten).

Es müssen Vorkehrungen für die Aufstellung der Waage und die Umgebungskontrolle und -überwachung nach 5.3.1 getroffen werden.

Die Rückverfolgbarkeit der Messergebnisse auf das SI wird durch die Verwendung einer kalibrierten Waage erreicht.

Es muss das in Anhang E beschriebene Verfahren für das gravimetrische Regressionsverfahren angewendet werden.

5.4 Photometrisch-gravimetrisches Hybridverfahren

Das photometrisch-gravimetrische Hybridverfahren ermöglicht die Bewertung der volumetrischen Leistung von ALHS durch eine Kombination aus einer gravimetrischen Messung mit anschließenden photometrischen Messungen. Die Prüfflüssigkeit, die einen Chromophor enthält, wird in die Mikroplatten mit 96 Vertiefungen oder 384 Vertiefungen gegeben. Die systematische Messabweichung wird durch Gravimetrie der Aggregat-abgaben in die Mikroplatte bestimmt. Anschließend wird die zufällige Messabweichung der Volumenabgaben photometrisch bestimmt, indem die relativen Absorptionswerte der einzelnen Vertiefungen der Mikroplatte gemessen werden.

Für dieses Verfahren geeignete Chromophore sind Tartrazin, Orange G und 4-Nitrophenol. Das in Anhang F beschriebene Verfahren ist im Allgemeinen für Prüfvolumina zwischen 1 µl und 200 µl in Platten mit 96 Vertiefungen sowie zwischen 1 µl und 50 µl in Platten mit 384 Vertiefungen geeignet.

Es müssen Vorkehrungen für die Aufstellung der Waage und die Umgebungskontrolle und -überwachung nach 5.3.1 getroffen werden.

Die Rückverfolgbarkeit der Messergebnisse auf das SI wird durch die Verwendung einer kalibrierten Waage, kalibrierter Pipetten und kalibrierter Volumenmessgeräte aus Glas erreicht.

Es muss das in Anhang F beschriebene Verfahren für das Hybridverfahren angewendet werden.

5.5 Maßverfahren

5.5.1 Optische Bildanalyse von Tröpfchen

Dieses Verfahren misst das Volumen der abgegebenen Flüssigkeiten durch die Analyse von Bildern, die mit einer Hochgeschwindigkeitskamera und stroboskopischer Beleuchtung während des Flüssigkeitsabgabesyklus aufgenommen wurden. Es eignet sich für ALHS, die Flüssigkeitsvolumina als eine Folge diskreter Mikrotröpfchen abgeben (weitere Informationen zur Bestimmung von Tröpfchenvolumina siehe [7]).

Die Rückverfolgbarkeit der Messergebnisse auf das SI wird durch die Kalibrierung des Längenmaßstabs der aufgenommenen Bilder erreicht.

Es muss das in Anhang G beschriebene Verfahren für die optische Bildanalyse von Tröpfchen angewendet werden.

5.5.2 Optische Bildanalyse von Kapillaren

Das Verfahren basiert auf der optischen Analyse von Bildern, die von Kapillaren mit bekannter und kalibrierter Geometrie aufgenommen wurden. Für die Bildaufnahme wird ein Flachbettscanner verwendet. Das Verfahren ermöglicht eine direkte Bestimmung des Volumens durch die optische Messung einer oder mehrerer Längen der kalibrierten Kapillaren.

Das Verfahren kann zur Messung von Volumina zwischen 0,1 µl und 1 000 µl für ALHS mit 1 bis 384 Kanälen verwendet werden. Die Messunsicherheiten hängen nur geringfügig von den Umgebungsbedingungen ab und sind ohne Messabweichungskorrekturen in einem breiten Bereich von Umgebungsbedingungen zuverlässig.

Die Rückverfolgbarkeit der Messergebnisse auf das SI wird durch die Verwendung kalibrierter Kapillaren und eines kalibrierten Bilderfassungsgeräts erreicht.

Es muss das in Anhang I beschriebene Verfahren für die optische Bildanalyse von Kapillaren angewendet werden.

6 Geräte und Vorbereitung

6.1 Prüfgerät

Prüfgeräte, die für volumetrische Leistungsmessungen nach den in diesem Dokument beschriebenen Verfahren verwendet werden, müssen den in Tabelle 2, Tabelle 3, Tabelle 4 und Tabelle 5 angegebenen Mindestanforderungen an die Leistungsfähigkeit entsprechen, sofern nicht in einem bestimmten Prüfverfahren andere Mindestanforderungen beschrieben sind. Die Waage muss sich mindestens 6 s lang stabilisieren, bevor der angezeigte Wert abgelesen wird.

ANMERKUNG 1 Die in Tabelle 2 angegebene Wiederholpräzision der Waage und die erweiterte Anwendungsunsicherheit werden mit Tabelle 3 harmonisiert, aber die Wägebereiche sind eingeschränkt, um die Genauigkeit beim Wägen einer Menge trockener Chemikalien zu verbessern.

ANMERKUNG 2 Die in Tabelle 3 angegebenen Anforderungen an die Waage beruhen auf ISO 8655-6 und erlauben mehrfache Wiederholabgaben von Prüfliquidität in dasselbe Wägegefäß, ohne dieses zu entleeren.

Tabelle 2 — Mindestanforderungen für Waagen zum Wägen von Trockenmaterial

Kleinste zu wägende Menge	Lesefreundlichkeit	Wiederholpräzision	Erweiterte Anwendungsunsicherheit ^a ($k = 2$)
g	mg	mg	mg
< 1,0	0,001	0,006	0,012
1,0	0,01	0,025	0,05
10	0,1	0,2	0,4
100	1	2	4
1 000	10	20	40

^a Die Anwendungsunsicherheit kann nach ASTM E898-20 [8] und EURAMET CG-18 [9] bei der in der Tabelle aufgeführten Mindestmasse bestimmt werden.

Tabelle 3 — Mindestanforderungen für Waagen zum Wägen von Flüssigkeiten

Abgabevolumen der Prüfflüssigkeit ^a	Lesefreundlichkeit	Wiederholpräzision	Erweiterte Anwendungsunsicherheit ^b ($k = 2$)
μl	mg	mg	mg
< 0,5	0,000 1	0,000 5	0,001
$0,5 \leq V < 20$	0,001	0,006	0,012
$20 \leq V < 200$	0,01	0,025	0,05
$200 \leq V \leq 10\,000$	0,1	0,2	0,4

^a Geht von einer Abgabe von Prüfflüssigkeit aus einem einzigen Kanal aus.

^b Die Anwendungsunsicherheit kann nach ASTM E898-20 [8] und EURAMET CG-18 [9] für den Wert des größten Volumens des aufgeführten Bereichs bestimmt werden, wobei von einer einkanaligen Lieferung ausgegangen wird.

Tabelle 4 — Mindestanforderungen an die Leistungsfähigkeit von Absorptionslesegeräten für Mikroplatten

Parameter	Anforderung
Photometrische Auflösung	0,001 AU ^b
Photometrische Richtigkeit ^a von 0 AU bis 1,0 AU	0,005 AU
Photometrische Richtigkeit ^a von > 1,0 AU bis 2,0 AU	0,010 AU
Photometrische Wiederholpräzision von 0 AU bis 2,0 AU	0,005 AU
Systemlinearität zwischen 0 AU und 2,0 AU	0,010 AU
Wellenlängengenauigkeit	< ± 1,5 nm

^a Die photometrische Richtigkeit wird manchmal auch als photometrische Genauigkeit bezeichnet.

^b Absorptionseinheit.

Tabelle 5 — Mindestanforderungen an die Leistungsfähigkeit anderer Prüfgeräte

Instrument	Auflösung	Erweiterte Unsicherheit ($k = 2$)
Thermometer für Flüssigkeiten	0,1 °C	0,2 °C
Thermometer für Umgebungsluft	0,1 °C	0,2 °C
Hygrometer	1 % RH ^a	5 % RH ^a
Barometer	0,1 kPa	1 kPa
Zeitmessgerät	1 s	nicht relevant
^a Relative Luftfeuchte.		

6.2 Handbetätigte Ein- und Mehrkanalpipetten

Einkanal- und Mehrkanalpipetten müssen kalibriert sein und die in ISO 8655-2 genannten Mindestanforderungen an die Leistungsfähigkeit erfüllen. Der Einfluss des Bedieners auf manuell pipettierte Volumina muss bei der Berechnung der Messabweichung und der Messunsicherheit berücksichtigt werden.

6.3 Vorbereitung der Prüfung

Das zu prüfende ALHS, einschließlich aller austauschbaren Teile, die während der Prüfung verwendet werden sollen, sowie alle Prüfgeräte und Prüfflüssigkeiten müssen mindestens 2 h vor Beginn der Prüfung im thermischen Gleichgewicht (± 2 °C) sein. Während der Prüfung dürfen sich die Umgebungsbedingungen um nicht mehr als ± 1 °C und 5 % relative Luftfeuchte (RH) ändern. Die Anforderungen an die Umgebungsbedingungen sind in jedem Prüfverfahren beschrieben. Laborgeräte sind für den Betrieb unter nicht-kondensierenden Feuchtebedingungen ausgelegt.

Alle Prüfgeräte müssen nach dem in diesem Dokument beschriebenen Prüfverfahren oder nach den Anweisungen des Herstellers kalibriert werden, wenn die Kalibrierung nicht ausdrücklich in dem Verfahren erläutert wird.

Das zu prüfende ALHS und die Prüfgeräte müssen eingeschaltet werden und ausreichend Zeit haben, um sich nach den Anweisungen des Herstellers auf eine ordnungsgemäße Funktion einzustellen.

Die Flüssigkeitsbehälter des ALHS müssen unmittelbar vor Beginn der Prüfung gefüllt werden. ALHS, die eine Grundierung erfordern, müssen unmittelbar vor Beginn der Prüfung nach den Anweisungen des Herstellers grundiert werden.

Die Spitzen von kolbenbetätigten ALHS sollten mindestens fünfmal mit der Prüfflüssigkeit vorgespült werden, wobei die abgegebene Prüfflüssigkeit als Abfall entsorgt wird. Dieser Schritt ist jedes Mal erforderlich, wenn eine Spitze gewechselt wird.

7 Wärmeausdehnung

Wenn die Prüftemperatur von der Einstelltemperatur des ALHS abweicht und der kubische Wärmeausdehnungskoeffizient γ des volumetrischen Geräts bekannt ist, kann Gleichung (1) verwendet werden, um das gemessene Volumen der Prüfflüssigkeit um die Wärmeausdehnung zu korrigieren:

$$V_{L,tc} = V_L \times [1 - \gamma \times (t_T - t_{ref})] \quad (1)$$

Dabei ist

$V_{L,tc}$ das Abgabevolumen der Prüfflüssigkeit, korrigiert um die Wärmeausdehnung des ALHS;

- V_L das Abgabevolumen der Prüfflüssigkeit, gemessen bei Prüftemperatur;
- γ der kubische Wärmeausdehnungskoeffizient des volumetrischen Geräts;
- t_T die Temperatur, bei der die Prüfung durchgeführt wird;
- t_{ref} die Bezugstemperatur für die Einstellung des ALHS.

8 Rückverfolgbarkeit und Messsystemunsicherheit

8.1 Rückverfolgbarkeit

Alle Messungen von relevanten Prüfmitteln, die für die Kalibrierung eines ALHS verwendet werden, müssen auf das Internationale Einheitensystem (SI) rückführbar sein. Die Unsicherheit der jeweiligen Prüfgeräte wirkt sich auf die Messabweichung der angegebenen volumetrischen Ergebnisse aus.

ANMERKUNG Zu den relevanten Prüfmitteln gehören unter anderem: Waagen, Thermometer, pH-Messgerät, Hygrometer, Plattenlesegeräte, Spektralphotometer, kalibrierte Pipetten, Volumenmessgeräte aus Glas, Größenkalibrierkarten und Zeitmessgeräte.

8.2 Schätzung der Messsystemunsicherheit

8.2.1 Ansatz für das gesamte System

Die Messsystemunsicherheit (MSU) kann durch statistische Auswertung der Ergebnisse des gesamten Messsystems geschätzt werden. Zu den Mitteln, mit denen dies erreicht wird, gehören Studien zur Präzision und Verzerrung, Analysen von Messsystemen und Vergleiche zwischen Laboratorien. Detaillierte Ansätze sind in [4] beschrieben.

8.2.2 Messmodell-Ansatz

Bei diesem Ansatz wird die MSU auf der Grundlage einer Analyse der einzelnen Eingaben für ein Messmodell geschätzt. Dieser Ansatz wird in [3] ausführlich beschrieben.

9 Dokumentation

Die Messergebnisse, die Rückverfolgbarkeit und die Messunsicherheit müssen nach ISO 23783-3 angegeben werden.

Anhang A (normativ)

Berechnung von Flüssigkeitsvolumina anhand von Wägewerten

A.1 Berechnung des Flüssigkeitsvolumens anhand des Wägewerts

A.1.1 Allgemeine Gleichung für das Volumen

Für die Überführung des Wägewerts der Masse m in das Volumen V bei Prüftemperatur ist eine Korrektur hinsichtlich der Flüssigkeitsdichte und des Luftauftriebs erforderlich. Die Berechnung des Flüssigkeitsvolumens bei Prüftemperatur geht aus Gleichung (A.1) hervor.

Handelt es sich bei der Prüfflüssigkeit um Wasser und sind die Berechnungen nach Abschnitt A.1 nicht durchführbar, so können die Wägewerte unter Verwendung der in Abschnitt A.2 angegebenen Korrekturfaktoren in Volumen umgerechnet werden.

ANMERKUNG 1 Gleichung (A.1) basiert auf Gleichung (1) in ISO 4787:2021, jedoch wird die Wärmeausdehnung des ALHS vernachlässigt und nur die Wärmeausdehnung der Prüfflüssigkeit berücksichtigt.

$$V_L = (m_L - m_E) \times \frac{1}{\rho_L - \rho_A} \times \left(1 - \frac{\rho_A}{\rho_B}\right) \quad (\text{A.1})$$

Dabei ist

V_L das berechnete Volumen der Prüfflüssigkeit bei Prüftemperatur, in ml;

m_L der Wägewert des Wägegefäßes nach Abgabe der Prüfflüssigkeit, in g;

m_E der Wägewert des Wägegefäßes vor der Prüfflüssigkeitsabgabe, in g ($m_E = 0$, falls die Waage mit dem Wägegefäß tariert wurde);

ρ_A die Dichte von Luft, in g/ml, siehe Gleichung (A.2);

ρ_B die tatsächliche oder angenommene Dichte der Gewichte, die zur Kalibrierung der Waage verwendet werden, in g/ml;

ANMERKUNG 2 Zur Kalibrierung von Waagen werden in der Regel Gewichte aus nichtrostendem Stahl mit einer Dichte von 8,0 g/ml verwendet.

ρ_L die Dichte der Prüfflüssigkeit bei Prüftemperatur t (in °C), in g/ml.

Für Wasser kann ρ_L mit der „Tanaka“-Gleichung (A.3) berechnet werden; die Dichte anderer Prüfflüssigkeiten sollte mit ausreichend kleiner Unsicherheit bestimmt werden (siehe A.1.4).

A.1.2 Berechnung der Luftdichte

Gleichung (A.2) für die Luftdichte kann für Temperaturen zwischen 15 °C und 27 °C, einen Luftdruck zwischen 600 hPa und 1 100 hPa sowie eine relative Luftfeuchte zwischen 20 % und 80 % verwendet werden.

$$\rho_A = \frac{1}{1\,000} \times \frac{0,348\,48 \times p - 0,009 \times h_r \times e^{(0,061 \times t)}}{t + 273,15} \quad (\text{A.2})$$

Dabei ist

- ρ_A die Luftdichte, in g/ml;
 t die Umgebungstemperatur, in °C;
 p der Luftdruck, in hPa;
 h_r die relative Luftfeuchte, in %.

Die Unsicherheit dieser Gleichung kann nach OIML R 111-1:2004, C.6.3.6 [11], berechnet werden. Bei abweichenden Umgebungsbedingungen muss Gleichung (A.2) durch die aktuelle CIPM-Luftdichtegleichung ersetzt werden.

ANMERKUNG Die zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieses Dokuments gültige Berechnung der Luftdichte ist CIPM-2007 und wird in [12] beschrieben.

A.1.3 Berechnung der Wasserdichte

Die Dichte von reinem Wasser wird üblicherweise durch Gleichungen aus der Literatur berechnet. Die Gleichung (A.3), veröffentlicht von Tanaka [13], bietet eine gute Grundlage für die Normung:

$$\rho_W = a_5 \times \left[1 - \frac{(t_W + a_1)^2 \times (t_W + a_2)}{a_3 \times (t_W + a_4)} \right] \quad (A.3)$$

Dabei ist

- ρ_W die Dichte von Wasser, in g/ml;
 t_W die Wassertemperatur, in °C;
 $a_1 = -3,983\,035\,^{\circ}\text{C}$;
 $a_2 = 301,797\,^{\circ}\text{C}$;
 $a_3 = 522\,528,9\,(^{\circ}\text{C})^2$;
 $a_4 = 69,348\,81\,^{\circ}\text{C}$;
 $a_5 = 0,999\,974\,950\,\text{g/ml}$.

A.1.4 Prüfung von anderen Flüssigkeiten als Wasser

Handelt es sich bei der Prüfflüssigkeit nicht um reines Wasser, kann die Dichte der Prüfflüssigkeit ρ_L nicht nach Gleichung (A.3) berechnet werden. Für diese Prüfflüssigkeiten muss die Dichte gemessen oder aus Literaturwerten ermittelt werden.

ANMERKUNG Die Messabweichung bei Dichtemessungen oder bei der Verwendung von Literaturwerten kann von vernachlässigbar bis erheblich reichen.

A.2 Korrekturfaktoren für die Überführung der Wägewerte in Volumen

Wenn es sich bei der Prüfflüssigkeit um destilliertes Wasser handelt, ist eine weitere mögliche Vorgehensweise für die Umrechnung von Masse in Volumen die Verwendung der in Tabelle A.1 angegebenen Korrekturfaktoren Z .

Jede aus den Wägewerten erhaltene Masse m_i wird umgerechnet, indem die Korrekturfaktoren Z bei der mittleren Temperatur und dem mittleren Luftdruck, die während des Messvorgangs gemessen wurden, angewendet und Gleichung (A.4) verwendet wird:

$$V_i = m_i \times Z \quad (\text{A.4})$$

Dabei ist

V_i das abgegebene Prüfvolumen, in μl ;

m_i die gemessene Masse des abgegebenen Prüfvolumens, in mg;

Z der Korrekturfaktor Z aus Tabelle A.1, in $\mu\text{l}/\text{mg}$.

Tabelle A.1 — Korrekturfaktoren Z für destilliertes Wasser (luftgesättigt) in Einheiten von μl je mg

Temperatur °C	Luftdruck						
	hPa						
	800	850	900	950	1 000	1 013	1 050
15,0	1,001 7	1,001 8	1,001 9	1,001 9	1,002 0	1,002 0	1,002 0
15,5	1,001 8	1,001 9	1,001 9	1,002 0	1,002 0	1,002 0	1,002 1
16,0	1,001 9	1,002 0	1,002 0	1,002 1	1,002 1	1,002 1	1,002 2
16,5	1,002 0	1,002 0	1,002 1	1,002 1	1,002 2	1,002 2	1,002 2
17,0	1,002 1	1,002 1	1,002 2	1,002 2	1,002 3	1,002 3	1,002 3
17,5	1,002 2	1,002 2	1,002 3	1,002 3	1,002 4	1,002 4	1,002 4
18,0	1,002 2	1,002 3	1,002 3	1,002 4	1,002 5	1,002 5	1,002 5
18,5	1,002 3	1,002 4	1,002 4	1,002 5	1,002 5	1,002 6	1,002 6
19,0	1,002 4	1,002 5	1,002 5	1,002 6	1,002 6	1,002 7	1,002 7
19,5	1,002 5	1,002 6	1,002 6	1,002 7	1,002 7	1,002 8	1,002 8
20,0	1,002 6	1,002 7	1,002 7	1,002 8	1,002 8	1,002 9	1,002 9
20,5	1,002 7	1,002 8	1,002 8	1,002 9	1,002 9	1,003 0	1,003 0
21,0	1,002 8	1,002 9	1,002 9	1,003 0	1,003 1	1,003 1	1,003 1
21,5	1,003 0	1,003 0	1,003 1	1,003 1	1,003 2	1,003 2	1,003 2
22,0	1,003 1	1,003 1	1,003 2	1,003 2	1,003 3	1,003 3	1,003 3
22,5	1,003 2	1,003 2	1,003 3	1,003 3	1,003 4	1,003 4	1,003 4
23,0	1,003 3	1,003 3	1,003 4	1,003 4	1,003 5	1,003 5	1,003 6
23,5	1,003 4	1,003 5	1,003 5	1,003 6	1,003 6	1,003 6	1,003 7
24,0	1,003 5	1,003 6	1,003 6	1,003 7	1,003 7	1,003 8	1,003 8
24,5	1,003 7	1,003 7	1,003 8	1,003 8	1,003 9	1,003 9	1,003 9
25,0	1,003 8	1,003 8	1,003 9	1,003 9	1,004 0	1,004 0	1,004 0
25,5	1,003 9	1,004 0	1,004 0	1,004 1	1,004 1	1,004 1	1,004 2
26,0	1,004 0	1,004 1	1,004 1	1,004 2	1,004 2	1,004 3	1,004 3
26,5	1,004 2	1,004 2	1,004 3	1,004 3	1,004 4	1,004 4	1,004 4
27,0	1,004 3	1,004 4	1,004 4	1,004 5	1,004 5	1,004 5	1,004 6
27,5	1,004 5	1,004 5	1,004 6	1,004 6	1,004 7	1,004 7	1,004 7

Tabelle A.1 (*fortgesetzt*)

Temperatur °C	Luftdruck						
	hPa						
	800	850	900	950	1 000	1 013	1 050
28,0	1,004 6	1,004 6	1,004 7	1,004 7	1,004 8	1,004 8	1,004 8
28,5	1,004 7	1,004 8	1,004 8	1,004 9	1,004 9	1,005 0	1,005 0
29,0	1,004 9	1,004 9	1,005 0	1,005 0	1,005 1	1,005 1	1,005 1
29,5	1,005 0	1,005 1	1,005 1	1,005 2	1,005 2	1,005 2	1,005 3
30,0	1,005 2	1,005 2	1,005 3	1,005 3	1,005 4	1,005 4	1,005 4

Anhang B (normativ)

Ratiometrisch-photometrisches Verfahren mit zwei Chromophoren

B.1 Allgemeines

Die in die Vertiefungen der Mikroplatten abgegebenen Volumina werden unter Verwendung von zwei Chromophorlösungen mit bekannten Konzentrationen der einzelnen Chromophore bestimmt. Ponceau S und Kupfer(II)-chlorid haben Absorptionsmaxima bei 520 nm bzw. 730 nm. Alle Flüssigkeiten enthalten die gleiche Konzentration an Kupfer(II)-chlorid, das zur Bestimmung der Füllhöhe jeder Vertiefung verwendet wird. Das Prüfvolumen der Ponceau S-Prüfflüssigkeit wird in jede Vertiefung gegeben, gemischt und die Absorption bei 520 nm und 730 nm abgelesen, um das abgegebene Prüfflüssigkeitsvolumen zu berechnen.

B.2 Prüfgerät

B.2.1 Allgemeines

Alle Prüfgeräte müssen so gewählt werden, dass die verlangte Messunsicherheit (MSU) erreicht werden kann. Die MSU kann nach dem in ISO/IEC Guide 98-3 beschriebenen Ansatz geschätzt werden.

B.2.2 Mikroplatten-Absorptionslesegerät

Es muss ein Mikroplatten-Absorptionslesegerät verwendet werden, das die Mindestanforderungen an die Leistungsfähigkeit nach Tabelle 4 erfüllt. Bandpassfilter mit mittleren Wellenlängen von (520 ± 1) nm und (730 ± 2) nm müssen in das Plattenlesegerät eingesetzt werden. Alternativ dürfen auch Plattenlesegeräte mit Monochromatoren verwendet werden, die (520 ± 1) nm und (730 ± 2) nm als zentrale Wellenlängen auswählen können.

B.2.3 Spektralphotometer

Die Absorptionswerte der Flüssigkeiten Kupfer(II)-chlorid und Ponceau S müssen mit einem Spektralphotometer gemessen werden, das die in Tabelle B.1 aufgeführten Mindestleistungsdaten aufweist. Bandpassfilter mit mittleren Wellenlängen von (520 ± 1) nm und (730 ± 2) nm müssen in das Spektralphotometer eingesetzt werden.

Für die Absorptionsmessungen muss eine kalibrierte Küvette mit einer optischen Weglänge von 10 mm verwendet werden.

Tabelle B.1 — Mindestanforderungen an die Leistungsfähigkeit des Spektralphotometers

Parameter	Anforderung
Photometrische Auflösung	0,000 1 AU ^c
Wiederholpräzision des Photometers bei A = 0,0 AU ^a	0,000 15 AU
Wiederholpräzision des Photometers bei A = 0,5 AU ^a	0,000 15 AU
Wiederholpräzision des Photometers bei A = 1,0 AU ^a	0,000 15 AU

Tabelle B.1 (fortgesetzt)

Parameter	Anforderung
Wiederholpräzision des Photometers bei $A = 1,5 \text{ AU}^a$	0,000 15 AU
Systemlinearität zwischen 0 AU und $1,5 \text{ AU}^b$	0,000 25 AU
^a Die Mittelungsdauer von Bandpass und Signal darf erhöht werden, um die Anforderung an die Wiederholpräzision des Photometers zu erfüllen. ^b Um der Anforderung an die Linearität des Systems zu entsprechen, dürfen Korrekturen durchgeführt werden. ^c Absorptionseinheit.	

B.2.4 Mikroplatten

Es müssen hochwertige ANSI/SLAS-Platten mit 96 oder 384 Vertiefungen und einem flachen, optisch klaren Boden verwendet werden. Mikroplatten müssen auf Losbasis bestimmt werden, um den Bodendurchmesser oder die Breite (je nach Plattentyp) und den Kegelwinkel der Seitenwand zu bestimmen. Darüber hinaus sollten die Vertiefungen bestimmt werden, um etwaige Unregelmäßigkeiten in den Vertiefungsabmessungen zu korrigieren und so eine vertiefungsspezifische Korrektur für die gesamte Plattenlos zu ermöglichen.

B.2.5 Kalibrierplatte

Zur Kalibrierung der täglichen Leistung des Mikroplattenlesegeräts muss eine Kalibrierplatte verwendet werden. Die in der Kalibrierplatte verwendeten optischen Standards müssen stabile Absorptionswerte bei 520 nm und 730 nm aufweisen und regelmäßig nach den Anweisungen des Herstellers neu kalibriert werden.

B.2.6 Mikroplattenschüttler

Der Mikroplattenschüttler, der zum Mischen der abgegebenen Flüssigkeiten verwendet wird, muss die in Tabelle B.2 angegebenen Mindestanforderungen erfüllen.

**Tabelle B.2 — Mindestanforderungen an Mikroplattenschüttler für
Standard-ANSI/SLAS-Mikroplatten**

Plattentyp	Geschwindigkeit min^{-1}	Orbit mm
96 Vertiefungen	1 300	1
384 Vertiefungen	2 600	1

B.2.7 Waage

Waagen, die für das genaue Wägen von Trockenreagenzien und die Zubereitung von Lösungen verwendet werden, müssen den Anforderungen in Tabelle 2 und Tabelle 3 entsprechen.

Bei der Volumenbestimmung müssen die Wägewerte für Flüssigkeiten bezüglich Dichte, Temperatur und Luftauftrieb korrigiert werden (siehe Anhang A).

B.2.8 Andere Prüfgeräte

Die in diesem Verfahren verwendete Prüfeinrichtung muss den in Tabelle 5 angegebenen Mindestanforderungen an die Leistungsfähigkeit entsprechen.

B.2.9 Volumenmessgeräte aus Glas, Genauigkeitsklasse A

Bekannte Volumina von Reagenzlösungen oder Prüfflüssigkeiten müssen auf volumetrischem oder gravimetrischem Wege hergestellt werden. Bei gravimetrischer Herstellung müssen die Dichten der Flüssigkeiten bekannt sein und angemessen berücksichtigt werden. Für die Herstellung der Flüssigkeiten können kalibrierte Messgeräte aus Glas der Genauigkeitsklasse A verwendet werden.

ANMERKUNG Festlegungen für volumetrische Pipetten mit einer Marke können ISO 648 und ASTM E969 [15] und für Messkolben mit einer Marke ISO 1042 und ASTM E 288 [17] entnommen werden.

B.3 Reagenzien

B.3.1 Allgemeine Anforderungen

Alle Inhaltsstoffe für die Herstellung von Reagenzlösungen müssen, sofern nicht anders angegeben, eine analytische Reinheit von mindestens 99 % aufweisen. Die CAS-Nummern (Chemical Abstracts Service) der in diesem Verfahren verwendeten Chemikalien sind in Tabelle B.3 zusammengefasst.

Tabelle B.3 — Bei dem ratiometrisch-photometrischen Verfahren mit zwei Chromophoren verwendete Chemikalien

Benennung	Formel	CAS-Nummer
Kupfer(II)-chlorid-Dihydrat	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10125-13-0
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10028-24-7
Salzsäure	HCl	7647-01-0
Ponceau S	$\text{C}_{22}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{Na}_4\text{O}_{13}\text{S}_4$	6226-79-5
Kaliumhydrogenphthalat	$\text{HOOC}_6\text{H}_4\text{COOK}$	877-24-7
Natriumhydroxid	NaOH	1310-73-2
Tetranatrium-Ethylendiamin-Tetraessigsäure-Dihydrat (EDTA)	$(\text{NaOOCCH}_2)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{COONa})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10378-23-1
Wasser	H_2O	7732-18-5

B.3.2 Wasser

Das Wasser für Chromophorlösungen muss der Qualität 1 nach ISO 3696 entsprechen.

B.3.3 Haltbarkeit der Lösungen

Wenn Reagenzien oder Prüfflüssigkeiten über eine längere Zeitspanne gelagert werden sollen, müssen sie auf ihre chemische Stabilität geprüft werden. Konservierungsmittel dürfen, soweit notwendig, hinzugefügt werden, um mikrobielles Wachstum zu vermeiden. Diese Konservierungsmittel dürfen nicht die Flüssigkeitseigenschaften verändern oder die Absorptionseigenschaften der Flüssigkeiten beeinträchtigen. Alle Flüssigkeiten müssen lichtgeschützt aufbewahrt werden.

B.3.4 Herstellung von Reagenzlösungen

B.3.4.1 Puffer

Der Phthalatpuffer wird aus 4,08 g/l Kaliumhydrogenphthalat und 3,74 g/l Tetranatrium-EDTA hergestellt. Der pH-Wert wird nach Bedarf entweder mit HCl oder mit NaOH auf pH = 6,0 eingestellt und die Lösung wird durch einen 0,2 µm Filter filtriert.

B.3.4.2 Kupfer(II)-chloridlösung

Die Kupfer(II)-chloridlösung wird durch Auflösen von 1,12 g $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ je Liter Phthalatpuffer (B.3.4.1) und anschließende Filtration durch einen 0,2 μm Filter hergestellt. Die Absorption wird bei 730 nm in einer Küvette mit einer Schichtdicke von 10 mm gemessen und aufgezeichnet.

B.3.4.3 Ponceau-S-Prüfflüssigkeiten

Ponceau S wird in Kupfer(II)-chloridlösung (siehe B.3.4.2) aufgelöst. In Tabelle B.4 sind Ponceau-S-Prüfflüssigkeiten für verschiedene Bereiche von Prüfvolumina (V_T , en: test volumes) je nach verwendetem Plattentyp aufgeführt und die Menge an Ponceau-S-Chromophor (das bis zu 15 % Wasser enthalten kann) je Liter Ponceau-S-Prüfflüssigkeit angegeben. Die Ponceau-S-Prüfflüssigkeiten Nr. 5 und Nr. 6 können durch direktes Auflösen von Ponceau S in Phthalatpuffer (B.3.4.1) hergestellt werden. Die Ponceau-S-Prüfflüssigkeit wird durch einen 0,2- μm -Filter filtriert.

Tabelle B.4 — Ponceau-S-Prüfflüssigkeiten

Ponceau-S- Prüfflüssigkeit Nr.	Prüfvolumenbereich in Platten mit 96 Vertiefungen μl	Prüfvolumenbereich in Platten mit 384 Vertiefungen μl	Ponceau-S- Chromophor^a g/1 000 ml
1	$200 < V_T \leq 350$	keine Angabe	0,040 0
2	$50 \leq V_T \leq 200$	$10 \leq V_T \leq 55$	0,079 7
3	$10 \leq V_T < 50$	$2,5 \leq V_T < 10$	0,318 8
4	$2 \leq V_T < 10$	$0,5 \leq V_T < 2,5$	1,594 1
5	$1 \leq V_T < 2$	$0,3 \leq V_T < 0,5$	3,936 7
6	$0,1 \leq V_T < 1$	$0,03 \leq V_T < 0,3$	15,697 0
^a Die in dieser Tabelle aufgeführten Mengen sind Zielwerte. Die tatsächlichen Mengen können um bis zu ± 5 % vom Zielwert abweichen.			

Für jede Ponceau-S-Prüfflüssigkeit wird die Absorption je Längeneinheit (a_r) bei 520 nm bestimmt, indem die Absorption in einer Küvette mit einer Schichtdicke von 10 mm gemessen wird. Ponceau-S-Prüfflüssigkeiten können für diese Messungen vorsichtig verdünnt werden, damit a_r berechnet werden kann.

B.4 Prüfbedingungen

Die Umgebungstemperatur sollte zwischen 15 °C und 30 °C und die relative Luftfeuchte zwischen 20 % und 90 % (nicht-kondensierend) liegen. Bei Verwendung von DMSO als Lösemittel für die Prüfflüssigkeiten sollte die Umgebungstemperatur zwischen 19 °C und 30 °C liegen, um zu verhindern, dass das DMSO erstarrt.

B.5 Verfahren

B.5.1 Herstellung

- Das Plattenlesegerät wird mit der Kalibrierplatte kalibriert. Das Plattenlesegerät wird neu kalibriert, wenn sich die Temperatur seit der letzten Kalibrierung um mehr als ± 2 °C geändert hat.
- Eine Mikroplatte wird mit dem klaren Puffer gefüllt und auf dem Mikroplattenschüttler nach Tabelle B.5 geschüttelt. Die Absorptionslinie wird in jeder Vertiefung bei 520 nm und 730 nm gemessen. Für jede Kalibrierung des Plattenlesegeräts wird ein neuer Satz von Absorptionslinien gemessen.

Tabelle B.5 — Absorptionslinie

Plattentyp	Füllvolumen μl	Schüttelzeit s
96 Vertiefungen	200	60
384 Vertiefungen	55	60

- c) Die Kupfer(II)-chloridlösung wird in einen für das zu prüfende ALHS geeigneten Flüssigkeitsbehälter und die Ponceau-S-Prüfflüssigkeiten in einen oder mehrere Flüssigkeitsbehälter entsprechend den zu prüfenden Volumina gefüllt (siehe Tabelle B.4). Die Behälter bleiben abgedeckt, wenn sie nicht in Gebrauch sind, um sie vor Verdunstung zu schützen. Flüssigkeiten sollten nicht länger als 20 min bis 60 min exponiert werden, abhängig von der exponierten Oberfläche, dem Füllvolumen des Behälters und den Umgebungsbedingungen.

B.5.2 Prüfverfahren für die Trockenabgabe

- a) Mit dem zu prüfenden ALHS wird das Zielvolumen der Ponceau-S-Prüfflüssigkeit in die leeren Vertiefungen der Mikroplatte abgegeben.
- b) Die Kupfer(II)-chloridlösung wird so in die Mikroplatte nachgefüllt, dass das Gesamtvolumen etwa 200 μl je Vertiefung in Platten mit 96 Vertiefungen und etwa 55 μl je Vertiefung in Platten mit 384 Vertiefungen beträgt. Die benötigte Menge an Kupfer(II)-chloridlösung ist nur ein Richtwert und kann um ±10 % schwanken.

ANMERKUNG Die Kupfer(II)-chloridlösung kann aus jedem ALHS oder einem anderen Gerät abgegeben werden, das in der Lage ist, die ungefähr benötigte Menge abzugeben.

- c) Die gefüllten Platten werden auf übermäßige Lösungströpfchen in der Nähe der Vertiefungen oder auf Blasen in den Vertiefungen untersucht. In diesem Fall sollte die Platte 30 s bis 60 s lang bei 1 000 bis 2 000 min⁻¹ zentrifugiert werden, oder bis die Tröpfchen in die Vertiefungen gedrückt und die Blasen herausgedrückt wurden.
- d) Die gefüllten Platten werden auf einem Mikroplattenschüttler mit einer Rotationsbahn von 1 mm bei einer Geschwindigkeit von 1 300 min⁻¹ bis 1 500 min⁻¹ 60 s lang geschüttelt (für Platten mit 96 Vertiefungen). Bei Mikroplatten mit 384 Vertiefungen werden die Platten 120 s lang mit einer Geschwindigkeit von 2 600 min⁻¹ bis 2 700 min⁻¹ geschüttelt.
- e) Die Mikroplatten werden in das Plattenlesegerät eingesetzt und die Absorptionswerte bei 520 nm und 730 nm gemessen.

B.5.3 Prüfverfahren für die Nassabgabe

- a) Die Kupfer(II)-chloridlösung wird so in die Mikroplatte gefüllt, dass das Gesamtvolumen nach Zugabe der Ponceau-S-Prüfflüssigkeit etwa 200 μl je Vertiefung in Platten mit 96 Vertiefungen und etwa 55 μl je Vertiefung in Platten mit 384 Vertiefungen beträgt. Die benötigte Menge an Kupfer(II)-chloridlösung ist nur ein Richtwert und kann um ±10 % schwanken.

ANMERKUNG Die Kupfer(II)-chloridlösung kann aus jedem ALHS oder einem anderen Gerät abgegeben werden, das in der Lage ist, die ungefähr benötigte Menge abzugeben.

- b) Mit dem zu prüfenden ALHS wird das Zielvolumen der Ponceau-S-Prüfflüssigkeit in die vorgefüllten Vertiefungen der Mikroplatte abgegeben.
- c) Die Schritte c), d) und e) werden nach B.5.2 ausgeführt.

B.6 Volumenberechnungen

Die Menge des abgegebenen Prüfflüssigkeitsvolumens wird in drei Schritten berechnet:

- a) Da die Konzentration von Kupfer(II)-chlorid in den Ponceau-S-Prüfflüssigkeiten und der Kupfer(II)-chloridlösung gleich ist, kann Gleichung (B.1) zur Bestimmung der Flüssigkeitstiefe (l) in jeder Vertiefung verwendet werden.

$$l = \frac{A_{730}}{a_b} \quad (\text{B.1})$$

Dabei ist

l die Pfadlänge;

A_{730} die gemessene Absorption bei 730 nm;

a_b die Absorption je Pfadlängeneinheit der Kupfer(II)-chloridlösung.

- b) Mit Gleichung (B.2) wird das Gesamtvolumen der Flüssigkeit in den Vertiefungen berechnet, wenn die Vertiefungen der Mikroplatte rund sind. An diesem Punkt können vertiefungsspezifische geometrische Korrekturen vorgenommen werden, um die Variabilität von Vertiefung zu Vertiefung zu verringern.

$$V_W = \pi \times l \times \frac{D^2}{4} + \pi \times D \times l^2 \times \frac{\tan \theta}{2} + \pi \times l^3 \times \frac{\tan^2 \theta}{3} \quad (\text{B.2})$$

Dabei ist

V_W das gesamte Flüssigkeitsvolumen in der Vertiefung;

D der Durchmesser des Bodens der Vertiefung;

θ der Kegelwinkel der Seitenwand.

- c) Mit Gleichung (B.3) wird das Gesamtvolumen der Flüssigkeit in den Vertiefungen berechnet, wenn die Vertiefungen der Mikroplatte über eine quadratische Form verfügen. An diesem Punkt können vertiefungsspezifische geometrische Korrekturen vorgenommen werden, um die Variabilität von Vertiefung zu Vertiefung zu verringern.

$$V_W = l \times w_B^2 + \frac{l^2 \times w_B \times (w_T - w_B)}{h} + \frac{l^3 \times (w_T - w_B)^2}{3 \times h^2} \quad (\text{B.3})$$

Dabei ist

w_B die Bodenbreite der Vertiefung;

w_T die obere Breite der Vertiefung;

h die Höhe der Vertiefung.

- d) Die Berechnung des abgegebenen Volumens der Ponceau-S-Prüfflüssigkeit (V_T) ergibt sich aus Gleichung (B.4):

$$V_T = V_W \times \left(\frac{a_b}{a_r} \right) \times \left(\frac{A_{520}}{A_{730}} \right) \quad (\text{B.4})$$

Dabei ist

V_t das Volumen der abgegebenen Prüfflüssigkeit;

a_r die Absorption je Pfadlängeneinheit bei 520 nm der verwendeten Ponceau-S-Prüfflüssigkeit;

A_{520} die gemessene Absorption bei 520 nm.

B.7 Rückverfolgbarkeit

Die Rückverfolgbarkeit der Messergebnisse aus diesem ratiometrischen photometrischen Verfahren auf das Internationale Einheitensystem (SI) erfolgt über drei Hauptmesswege:

- a) Gekennzeichnete Mikroplatten. Mikroplatten müssen durch rückverfolgbare Messungen der Abmessungen der einzelnen Vertiefungen bestimmt werden.
- b) Gekennzeichnete Reagenzlösungen. Rückführbare Absorptionsmessungen müssen mit einem Spektralphotometer durchgeführt werden, dessen Leistung anhand von kalibriertem Neutralglas (ND, en: neutral density) und kalibrierten Wellenlängenstandards aufrechterhalten wird. Eine Küvette mit kalibrierter innerer Weglänge muss verwendet werden, um eine bekannte Pfadlänge zu erhalten.
- c) Kalibrierte Absorptionsmessungen des Plattenlesegeräts. Eine Kalibrierplatte muss verwendet werden, um die Rückverfolgbarkeit der gemessenen Absorptionswerte des Plattenlesegeräts sicherzustellen.

Anhang C (normativ)

Photometrisches Verfahren mit einem Chromophor

C.1 Allgemeines

Dieses Verfahren eignet sich für die Prüfung von ALHS mit bis zu 384 Kanälen, wobei wässrige, Dimethylsulfoxid- (DMSO-) oder Wasser/DMSO-Gemische als Prüfflüssigkeiten verwendet werden. Die Löslichkeit von Orange G in Wasser/DMSO-Gemischen und DMSO ist ähnlich wie die Löslichkeit in wässrigen Flüssigkeiten. Dieses Verfahren kann für Prüfvolumina zwischen 1 µl und 100 µl in Platten mit 96 Vertiefungen sowie zwischen 0,25 µl und 20 µl in Platten mit 384 Vertiefungen verwendet werden.

Es ist wichtig, alle Lösungen auf pH = 7 zu puffern, da die Absorptionseigenschaften von Orange G pH-Wert-abhängig sind.

C.2 Anwendbare Volumenbereiche

Je nach Prüfvolumen und verwendetem Mikroplattentyp müssen die entsprechenden Orange-G-Prüfflüssigkeiten nach Tabelle C.1 hergestellt werden.

Tabelle C.1 — Orange-G-Prüfflüssigkeiten

Orange-G-Konzentration	Prüfvolumen in Mikroplatten mit 96 Vertiefungen	Prüfvolumen in Mikroplatten mit 384 Vertiefungen
0,2 g/l	10 µl bis 100 µl	2 µl bis 20 µl
1,6 g/l	2 µl bis 10 µl	—
2,0 g/l	—	0,25 µl bis 2 µl
8,0 g/l	1 µl bis 2 µl	—

C.3 Prüfgerät

C.3.1 Allgemeines

Alle Prüfgeräte, die zur Durchführung dieses Verfahrens verwendet werden, müssen nach den Angaben des Herstellers kalibriert und gewartet werden. Die Unsicherheit der Prüfgeräte muss bekannt sein, damit die MSU dieses Verfahrens geschätzt werden kann. Die Prüfgeräte müssen die in Tabelle 5 angegebenen Mindestanforderungen erfüllen.

C.3.2 Handbetätigte Pipetten

Es müssen Pipetten mit einem Nennvolumen verwendet werden, das dem gewünschten Transfervolumen möglichst nahe kommt.

C.3.3 Waagen

Die in diesem Verfahren verwendeten Waagen müssen die in Tabelle 2 angegebenen Mindestanforderungen erfüllen.

C.3.4 Mikroplattenlesegerät

Das Mikroplatten-Absorptionslesegerät muss die in Tabelle 4 angegebenen Mindestanforderungen erfüllen. Es müssen Bandpassfilter mit einer mittleren Wellenlänge von 492 nm und 620 nm verwendet werden. Alternativ können auch Plattenlesegeräte mit Monochromatoren verwendet werden, die 492 nm und 620 nm als Zentralwellenlängen auswählen können.

C.3.5 Mikroplatten

Es müssen qualitativ hochwertige ANSI/SLAS-Mikroplatten mit flachem und optisch klarem Boden verwendet werden.

C.3.6 Volumenmessgeräte aus Glas

Für die Herstellung der Lösungen können kalibrierte Messgeräte aus Glas der Genauigkeitsklasse A verwendet werden.

ANMERKUNG Festlegungen für Messkolben mit einer Marke sind in ISO 1042 und ASTM E 288 [17] zu finden.

C.4 Reagenzien

C.4.1 Verwendete Chemikalien

Alle Inhaltsstoffe für die Herstellung von Reagenzlösungen müssen, sofern nicht anders angegeben, eine analytische Reinheit von mindestens 99 % aufweisen. Die in diesem Verfahren verwendeten Chemikalien sind in Tabelle C.2 aufgeführt.

Tabelle C.2 — Verwendete Chemikalien

Chemikalien/Lösungen	CAS-Nummer ^a	Formel	Molekulare Masse
Orange G	1936-15-8	C ₁₆ H ₁₀ N ₂ Na ₂ O ₇ S ₂	452,36 g/mol
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	10028-24-7	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	177,99 g/mol
Natriumhydroxid, 1 M	1310-73-2	NaOH	40,0 g/mol
Deionisiertes Wasser	7732-18-5	H ₂ O	18,0 g/mol
^a Chemical Abstracts Service Registry Number.			

C.4.2 Puffer 0,1 M

In einen 2 000-ml-Messkolben werden (35,6 ± 0,1) g Dinatriumhydrogenphosphat-Dehydrat und 2 000 µl 1 M Natriumhydroxidlösung gegeben. Die Lösung wird mit deionisiertem Wasser auf 2 000 ml aufgefüllt und mit einem Magnetrührer umgerührt, bis das Dinatriumhydrogenphosphat-Dehydrat vollständig gelöst ist (dies kann bis zu 30 min dauern), um einen endgültigen pH-Wert von etwa 7 zu erreichen. Der Puffer wird durch einen 0,2 µm Filter filtriert und in einer Polyethylenflasche gesammelt.

Der pH-Wert des Puffers wird gemessen und aufgezeichnet, bevor er für die Zubereitung der Orange-G-Prüfflüssigkeiten verwendet wird.

C.4.3 Orange-G-Prüfflüssigkeiten 8,0 g/l

In einen 500-ml-Messkolben werden (4,0 ± 0,05) g Orange G gegeben und mit Puffer versetzt, bis der Meniskus gerade den Hals des Kolbens erreicht. Ein Magnetrührer wird hinzugefügt und die Flüssigkeit wird gerührt, bis das Orange G vollständig aufgelöst ist. Der Magnetrührstab wird entfernt, mit Puffer in den Kolben gespült

und Puffer bis zur Markierung des Kolbens hinzugefügt. Der Messkolben wird verschlossen und die Flüssigkeit wird durch vorsichtiges Umschwenken des Kolbens mehrmals gemischt. Die Prüflüssigkeit wird durch einen 0,2 µm Filter filtriert und in einer Braunglasflasche aufbewahrt.

C.4.4 Orange-G-Prüflüssigkeit 2,0 g/l

In einen 1 000-ml-Messkolben werden $(2,0 \pm 0,01)$ g Orange G gegeben und mit Puffer versetzt, bis der Meniskus gerade den Hals des Kolbens erreicht. Ein Magnetrührer wird hinzugefügt und die Flüssigkeit wird gerührt, bis das Orange G vollständig aufgelöst ist. Der Magnetrührstab wird entfernt, mit Puffer in den Kolben gespült und Puffer bis zur Markierung des Kolbens hinzugefügt. Der Messkolben wird verschlossen und die Flüssigkeit wird durch vorsichtiges Umschwenken des Kolbens mehrmals gemischt. Die Prüflüssigkeit wird durch einen 0,2 µm Filter filtriert und in einer Braunglasflasche aufbewahrt.

C.4.5 Orange-G-Prüflüssigkeit 1,6 g/l

100 ml der 8 g/l Orange-G-Prüflüssigkeit werden mit einem Messkolben abgemessen. Diese Menge wird in einen 500-ml-Messkolben umgefüllt. Der 100-ml-Kolben wird mit Puffer gespült und diese Spülungen werden in den 500-ml-Kolben gegeben. Der Puffer wird bis zur Markierung zugegeben, der Messkolben verschlossen und die Flüssigkeit durch vorsichtiges Schwenken des Kolbens mehrmals gemischt. Die Orange-G-Prüflüssigkeit wird in eine Braunglasflasche gegeben.

C.4.6 Orange-G-Prüflüssigkeit 0,2 g/l

50 ml der 2 g/l Orange-G-Prüflüssigkeit werden mit einem Messkolben abgemessen. Diese Menge wird in einen 500-ml-Messkolben umgefüllt. Der 50-ml-Kolben wird mit Puffer gespült und diese Spülungen werden in den 500-ml-Kolben gegeben. Der Puffer wird dann bis zur Markierung zugegeben, der Messkolben verschlossen und die Flüssigkeit durch vorsichtiges Schwenken des Kolbens mehrmals gemischt. Die Orange-G-Prüflüssigkeit wird in eine Braunglasflasche gegeben.

C.5 Prüfbedingungen

Die Umgebungstemperatur im Prüfraum sollte zwischen 15 °C und 30 °C und die relative Luftfeuchte zwischen 40 % und 70 % (nicht-kondensierend) liegen.

C.6 Prüfverfahren

C.6.1 Kalibrierkurven

Die Kalibrierkurven werden wie folgt hergestellt:

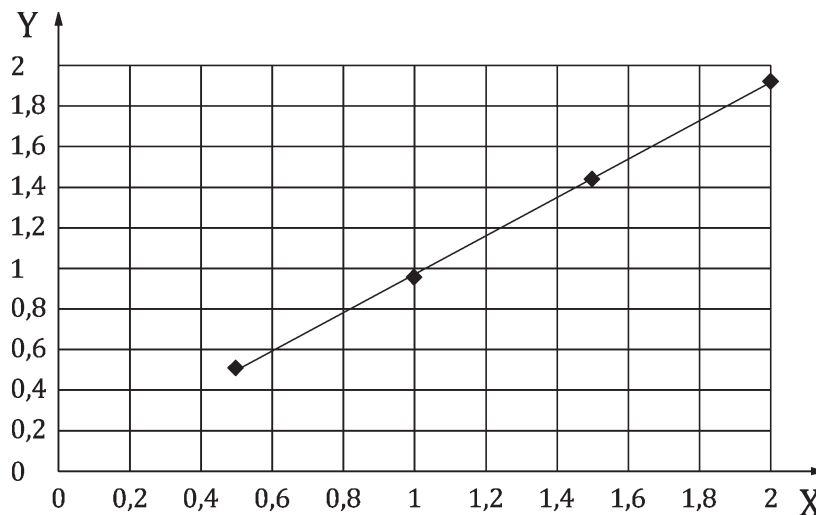
- a) Die in Tabelle C.3 angegebenen Volumina der Orange-G-Prüflüssigkeiten und des Puffers werden vorsichtig in Reagenzgläser pipettiert, die fest verschlossen werden können. Die Inhalte der einzelnen Reagenzgläser werden vorsichtig gemischt.
- b) Für Platten mit 384 Vertiefungen werden mindestens 5 Wiederholungen von 75 µl jeder Flüssigkeit in einer Reihe einer Mikroplatte mit 384 Vertiefungen mit einer kalibrierten manuellen Pipette pipettiert.
- c) Für Platten mit 96 Vertiefungen werden mindestens 5 Wiederholungen von 200 µl jeder Flüssigkeit in einer Reihe einer Mikroplatte mit 96 Vertiefungen mit einer kalibrierten manuellen Pipette pipettiert.
- d) Die Platte wird 60 s bei 164 rcf (relative Zentrifugalkraft) zentrifugiert.
- e) Die Absorption der Mikroplatte wird bei 492 nm für Orange G und bei 620 nm als Referenz gemessen. Die Referenzabsorption bei 620 nm wird von der Absorption bei 492 nm subtrahiert.
- f) Der Durchschnitt von 5 Wiederholungen der gleichen Flüssigkeit wird berechnet.

- g) Die Prüfvolumina werden gegen die Absorptionswerte für dieselbe Konzentration von Orange G einem Diagramm aufgetragen. Die gemessene Absorption darf 2,0 AU nicht überschreiten.
- h) Die Regressionskurve wird für jeden Volumenbereich berechnet, d. h. für die gleiche Konzentration von Orange G.
- i) Jeder Punkt stellt den Durchschnitt von 5 Wiederholungen dar, die manuell pipettiert wurden.

Bild C.1 zeigt ein Beispiel für eine Kalibrierkurve für den Volumenbereich 0,5 µl bis 2,0 µl in einer Platte mit 96 Vertiefungen.

Tabelle C.3 — Kalibrierpunkte für alle Volumina in Mikropplatten mit 96 Vertiefungen und 384 Vertiefungen

Platten-format	Konzentration der Orange-G-Prüfflüssigkeit g/l	Volumen der Orange-G-Prüfflüssigkeit µl	Puffer	Kombiniertes Volumen ml	Prüfvolumen-Äquivalent µl
384	0,2	50	1 ml + 450 µl	1,5	2,5
384	0,2	60	1 ml + 440 µl	1,5	3,0
384	0,2	100	1 ml + 400 µl	1,5	5,0
384	0,2	200	1 ml + 300 µl	1,5	10,0
384	0,2	400	1 ml + 100 µl	1,5	20,0
384	2,0	10	2 ml + 990 µl	3,0	0,25
384	2,0	20	2 ml + 980 µl	3,0	0,50
384	2,0	40	2 ml + 960 µl	3,0	1,00
384	2,0	80	2 ml + 920 µl	3,0	2,00
96	0,2	100	1 ml + 900 µl	2,0	10,0
96	0,2	300	1 ml + 700 µl	2,0	30,0
96	0,2	500	1 ml + 500 µl	2,0	50,0
96	0,2	700	1 ml + 300 µl	2,0	70,0
96	0,2	1 000	1 ml	2,0	100,0
96	1,6	20	1 ml + 980 µl	2,0	2,0
96	1,6	30	1 ml + 970 µl	2,0	3,0
96	1,6	50	1 ml + 950 µl	2,0	5,0
96	1,6	70	1 ml + 930 µl	2,0	7,0
96	1,6	100	1 ml + 100 µl	2,0	10,0
96	8,0	5	1 ml + 995 µl	2,0	0,5
96	8,0	10	1 ml + 990 µl	2,0	1,0
96	8,0	15	1 ml + 985 µl	2,0	1,5
96	8,0	20	1 ml + 980 µl	2,0	2,0
96	8,0	25	1 ml + 975 µl	2,0	2,5



Legende

X Zielvolumen in µl

Y Absorption in AU

Bild C.1 — Beispiel einer Kalibrierkurve für Prüfvolumina von 0,5 µl bis 2,0 µl in Mikroplatten mit 96 Vertiefungen

C.6.2 Prüfverfahren

Mit dem zu prüfenden ALHS muss das folgende Protokoll durchgeführt werden.

C.6.2.1 Mikroplatten mit 96 Vertiefungen

- Das Zielvolumen der entsprechenden Orange-G-Prüfflüssigkeit wird in die Mikroplatte mit 96 Vertiefungen abgegeben.
- Die entsprechende Menge Puffer wird hinzugegeben, um die Vertiefung auf ein Endvolumen von 200 µl zu füllen; z. B. mit einer kalibrierten Mehrkanalpipette.
- Die Platte wird 30 s lang auf einem Mikroplattenschüttler bei $1\,000\text{ min}^{-1}$ (Umdrehungen je Minute) geschüttelt, um eine vollständige Durchmischung der Lösungen zu erreichen.
- Die Mikroplatte wird 60 s lang bei 164 rcf (relative Zentrifugalkraft) zentrifugiert, um Luftblasen zu entfernen und einen definierten Meniskus herzustellen.
- Die Absorption jeder Vertiefung wird bei 492 nm und 620 nm für Orange G bzw. die Referenz gemessen (wenn das Plattenlesegerät eine gepulste Lichtquelle verwendet, werden mindestens 10 Blitze je Messung verwendet). Die Absorption je Messung darf 2,0 AU nicht überschreiten.

C.6.2.2 Mikroplatte mit 384 Vertiefungen

- Das Zielvolumen der entsprechenden Orange-G-Prüfflüssigkeit wird in die Mikroplatte mit 384 Vertiefungen abgegeben.
- Die entsprechende Menge Puffer wird hinzugegeben, um die Vertiefung auf ein Endvolumen von 75 µl zu füllen; z. B. mit einer kalibrierten Mehrkanalpipette.
- Die Platte wird 15 s lang auf einem Mikroplattenschüttler bei $2\,000\text{ min}^{-1}$ (Umdrehungen je Minute) geschüttelt, um eine vollständige Durchmischung der Lösungen zu erreichen.

- d) Die Mikroplatte wird 60 s lang bei 164 rcf (relative Zentrifugalkraft) zentrifugiert, um Luftblasen zu entfernen und einen definierten Meniskus herzustellen.
- e) Die Absorption jeder Vertiefung wird bei 492 nm und 620 nm für Orange G bzw. die Referenz gemessen. Wenn das Plattenlesegerät eine gepulste Lichtquelle verwendet, werden mindestens 10 Blitze je Messung verwendet). Die Absorption je Messung darf 2,0 AU nicht überschreiten.

C.7 Berechnung des Volumens

Das abgegebene Volumen der Prüflüssigkeit in jeder Vertiefung wird mit Hilfe der linearen Regressionsgleichung der für das abgegebene Volumen geeigneten Kalibrierungskurve zusammen mit dem gemessenen Absorptionswert bestimmt. Die Regressionsgleichung für x wird gelöst, um das Abgabevolumen in jeder Vertiefung zu bestimmen.

BEISPIEL Auf der Grundlage der in Bild C.1 gezeigten Kalibrierkurve wurde die Absorption einer Vertiefung mit 1,442 6 AU gemessen. Die Gleichung für die lineare Regression lautet in diesem Beispiel: $y = 0,944\ 2x + 0,026\ 3$. Die Lösung der Gleichung für x ergibt in diesem Fall $x = 1,5\ \mu\text{l}$ der Prüflüssigkeit.

C.8 Rückverfolgbarkeit

Die Messergebnisse der photometrischen Verfahren mit einem Chromophor müssen mit Hilfe der kalibrierten Waage, der kalibrierten Messkolben und der kalibrierten Pipetten auf das Internationale Einheitensystem (SI) rückführbar sein.

Anhang D (normativ)

Gravimetrisches Verfahren, Einkanalmessung

D.1 Allgemeines

Dieses Verfahren beschreibt das Gerät, das Verfahren und das Referenzmaterial für die Bestimmung der Messabweichung nach dem gravimetrischen Verfahren. Eine Einzelschwenkwaage wird verwendet, um eine Messung von jeweils einem einzelnen Kanal vorzunehmen.

D.2 Prüfgerät

D.2.1 Waage

Es muss eine Waage verwendet werden, deren Fassungsvermögen dem Prüfvolumen entspricht und die die Mindestanforderungen in Tabelle 3 erfüllt.

D.2.2 Flüssigkeitsbehälter

Der Flüssigkeitsbehälter muss groß genug sein, um die gesamte Prüfflüssigkeit aufzunehmen, die für die gesamte Prüfreihe benötigt wird.

D.2.3 Wägegefäß

Bei der Auswahl eines geeigneten Wägegefäßes muss der Massenverlust durch Verdunstung berücksichtigt werden.

Es wird empfohlen, das Wägegefäß mit einem Deckel zu versehen, um den Massenverlust durch Verdunstung zu verringern. Dies ist besonders wichtig, wenn das Gefäß während des Wägevorgangs zu irgendeinem Zeitpunkt bewegt wird. Bleibt das Gefäß während des gesamten Wägevorgangs stehen und wird kein Deckel verwendet, so wird ein Verhältnis von Höhe über der Flüssigkeit zu Durchmesser von 3 : 1 empfohlen.

Das gravimetrische Regressionsverfahren kann auch zur Quantifizierung des Massenverlustes aufgrund von Verdunstung verwendet werden. Dieses Verfahren wird nur empfohlen, wenn ein offenes Wägegefäß verwendet wird, das während des Messvorgangs nicht bewegt wird. Weitere Details sind Anhang E zu entnehmen.

D.2.4 Umgebungsbedingungen für die Prüfgeräte

Die Umgebungsbedingungen des Prüfraums müssen mit Hilfe von Prüfgeräten nach Tabelle 5 überwacht werden.

D.3 Prüfflüssigkeit

Die Referenzprüfflüssigkeit für das gravimetrische Verfahren ist destilliertes oder deionisiertes Wasser der Qualität 3 nach ISO 3696, entgast oder im Gleichgewicht mit Luft. Die Prüfflüssigkeit muss sich im thermischen Gleichgewicht mit dem zu prüfenden ALHS und dem Prüfgerät befinden.

Es können auch andere Prüfflüssigkeiten verwendet werden, sofern die Empfindlichkeit der jeweiligen Prüfflüssigkeit gegenüber Umgebungsbedingungen bekannt ist und berücksichtigt wird, sofern dies von Bedeutung ist.

D.4 Prüfbedingungen

Um die Variabilität der Ergebnisse zu kontrollieren, sollte die Prüfumgebung so stabil wie möglich gehalten werden. In Tabelle D.1 sind die empfohlenen Bereiche für Temperatur und relative Luftfeuchte sowie die zulässigen Änderungen während der Prüfung angegeben. Die Änderung des aufgezeichneten Wertes über die Dauer der Prüfsitzung sollte innerhalb des empfohlenen Wertes bleiben.

Tabelle D.1 — Prüfbedingungen

Umgebungsbedingung	Bereich	Änderung während der Prüfung
Wassertemperatur	17 °C bis 30 °C;	≤ 1 °C
Lufttemperatur	17 °C bis 30 °C;	≤ 3 °C
Relative Luftfeuchte	45 % bis 70 %	≤ 10 %

Die Waage muss in einer windstillen Umgebung auf einer stabilen, schwingungsfreien Oberfläche in derselben Prüfumgebung wie das zu prüfende ALHS aufgestellt werden.

D.5 Verfahren

D.5.1 Vorbereitung

Die Umgebungsbedingungen müssen zu Beginn und am Ende des Wägevorgangs aufgezeichnet werden. Die Differenz zwischen den beiden Messwerten muss mit Tabelle D.1 verglichen werden.

D.5.2 Verdunstung

D.5.2.1 Wägegefäß

Um bei allen Messungen einen gleichbleibenden Massenverlust durch Verdunstung zu erhalten, muss das Wägegefäß mit einem Anfangsvolumen an Prüflüssigkeit vorbereitet werden, das ausreicht, um den Boden des Gefäßes vollständig zu bedecken.

D.5.2.2 Der Massenverlust durch Verdunstung wird bestimmt

Die Umgebungsbedingungen im Prüfraum, die Zeit, die für eine einzelne Messung benötigt wird, und die Handhabung des Wägegefäßes während einer Messung beeinflussen den Massenverlust durch Verdunstung.

Bevor das ALHS zur Abgabe der Prüflüssigkeit verwendet wird, muss eine Reihe von mindestens 10 Blindmessungen durchgeführt werden.

- Das Leergewicht des Wägegefäßes b_0 wird festgehalten, alternativ wird die Waage auf Null gestellt ($b_0 = 0$).
- Wenn das Wägegefäß in eine Abgabeposition gebracht werden muss, wird es in diese Position gebracht und der Deckel entfernt, falls ein Deckel verwendet wird. Bei der Positionierung des Wägegefäßes müssen die folgenden Bedingungen erfüllt sein:
 - die Prüflüssigkeit darf nicht in das Wägegefäß abgegeben werden;
 - das ALHS-Flüssigkeitsabgabegerät darf nicht mit dem Wägegefäß in Berührung kommen;
 - wenn es nicht möglich ist, die Flüssigkeitsabgabe oder den Kontakt des Flüssigkeitsabgabegeräts mit dem Wägegefäß zu vermeiden, um eine Leerwertmessung durchzuführen, wird das Wägegefäß neben die Abgabestelle gestellt und die Leerwertmessung in ein Abfallgefäß abgegeben.

- c) Es wird eine Leerabgabe durchgeführt. Es wird die gleiche Zykluszeit wie bei der Abgabe einer Prüfflüssigkeit eingehalten.
- d) Die Masse des Wägegefäßes wird als b_i angegeben. Eine einzelne Messung des Massenverlustes durch Verdunstung wird mit Gleichung (D.1) berechnet:

$$b'_i = b_i - b_0 \quad (D.1)$$

Dabei ist

b'_i der Massenverlust aufgrund von Verdunstung;

b_i die Masse des Wägegefäßes;

b_0 die Taramasse des Wägegefäßes.

- e) Der durchschnittliche Massenverlust durch Verdunstung wird durch Berechnung des Durchschnitts aller Leerwertmessungen nach Gleichung (D.2) ermittelt.

$$\overline{b'} = \sqrt{\left(\frac{\sum_{i=1}^n b'_i}{n}\right)^2} \quad (D.2)$$

Dabei ist

$\overline{b'}$ der durchschnittliche Massenverlust durch Verdunstung;

n die Anzahl der Leerwertmessungen.

D.5.3 Volumenmessung

- a) Die Umgebungsbedingungen im Prüfraum (Temperatur, relative Luftfeuchte und Luftdruck) und die Temperatur der Prüfflüssigkeit zu Beginn der Prüfung werden aufgezeichnet.
- b) Wenn das Wägegefäß von der Waagschale abgenommen werden muss, damit das ALHS die Prüfflüssigkeit abgeben kann, wird das Wägegefäß entfernt und an die für das ALHS geeignete Stelle gestellt.
- c) Falls das Wägegefäß einen Deckel hat, wird dieser entfernt. Die Prüfflüssigkeit wird mit dem aktuell gewählten Prüfvolumen in das Wägegefäß gegeben. Der Deckel wird gegebenenfalls wieder aufgesetzt.
- d) Wenn das Wägegefäß zur Waagschale gebracht werden muss, um eine Messung durchzuführen, wird das Wägegefäß zur Waagschale gebracht.
- e) Der Wägewert wird als m_i aufgezeichnet.
- f) Die Waage wird tariert oder auf Null gestellt und eine neue Messung beginnt.
- g) Es werden so viele Messungen wie nötig durchgeführt.
- h) Die Umgebungsbedingungen im Prüfraum und die Temperatur der Prüfflüssigkeit müssen am Ende der Prüfung aufgezeichnet werden.

D.6 Volumenberechnungen

D.6.1 Korrektur bezüglich der Verdunstung

Der durchschnittliche Massenverlust aufgrund von Verdunstung muss zu jeder Waagenmessung addiert werden. Die resultierende Masse wird als korrigierte Masse oder m'_i bezeichnet, wie in Gleichung (D.3) dargestellt:

$$m'_i = m_i + \overline{b'} \quad (\text{D.3})$$

Dabei ist

m'_i die Masse der Prüfflüssigkeit, korrigiert um die Verdunstung;

m_i der Wägewert.

D.6.2 Überführung der korrigierten Massen in Volumina

Die nach D.5.3 erhaltenen Werte m_i sind Wägewerte. Zur Überführung der Wägewerte m_i in Volumina V_i ist eine Korrektur notwendig, die Wasserdichte und Luftauftrieb der Prüfflüssigkeit berücksichtigt. Die Wägewerte müssen nach Maßgabe von Anhang A in Volumen umgerechnet werden.

D.7 Rückverfolgbarkeit

Die Messergebnisse der gravimetrischen Verfahren sind auf das Internationale Einheitensystem (SI) rückführbar, wenn eine kalibrierte Waage, kalibrierte Prüfgeräte zur Überwachung der Umgebungsbedingungen und eine ordnungsgemäße Berücksichtigung der Dichte und des Luftauftriebs der Prüfflüssigkeit verwendet werden.

ANMERKUNG 1 In Anhang A wird die Umrechnung von Masse in Volumen für Wasser beschrieben.

ANMERKUNG 2 EURAMET CG-19 [18] enthält Informationen über die Schätzung der MSU für dieses Verfahren.

Anhang E (normativ)

Gravimetrisches Regressionsverfahren

E.1 Allgemeines

Das gravimetrische Regressionsverfahren ist auf Flüssigkeitsvolumina anwendbar, die in Form von Tröpfchen oder Strahlen vom zu prüfenden Gerät (DUT, en: device under test) abgegeben werden, z. B. durch berührungslose Nanodosierungstechnologien oder Tintenstrahl Druckköpfe. Dieses Verfahren eignet sich für Volumina zwischen 1 nl und 100 µl je Tröpfchen oder Strahl.

Dieses Verfahren basiert auf den in ASTM E542 [19] und ISO 4787 beschriebenen gravimetrischen Prinzipien zur quantitativen Volumenbestimmung, die an den Nano- und Mikroliterbereich angepasst sind. Bei diesem Verfahren wird eine lineare Regression der Waagenablesungen durchgeführt, die vor und nach der Zugabe der abgegebenen Prüfflüssigkeit kontinuierlich erfasst werden. Dieser Ansatz korrigiert den Massenverlust aufgrund von Verdunstung während der Messung, der bei sehr kleinen Abgabemengen erheblich ist.

E.2 Prüfgerät

E.2.1 Allgemeine Anforderungen

Die für dieses Verfahren verwendeten Waagen müssen den in Tabelle 3 angegebenen Mindestanforderungen an die Leistungsfähigkeit entsprechen. Andere Prüfgeräte müssen den in Tabelle 5 genannten Anforderungen entsprechen.

E.2.2 Prüfflüssigkeiten

Die gravimetrische Messung ist weitgehend unabhängig von der verwendeten Prüfflüssigkeit. Die effektive Dichte der Prüfflüssigkeit ρ_L bei der Temperatur t muss bekannt sein, um die gemessene Masse auf das Abgabevolumen zu beziehen. Die Dichte kann entweder aus der Literatur oder durch direkte Messung bestimmt werden. Da die Temperatur die Dichte der Flüssigkeit beeinflusst, sollte sie während der Messung präzise gemessen und aufgezeichnet werden. Für Dichtemessungen müssen die Prüfgeräte die in Tabelle E.1 angegebenen Mindestanforderungen an die Leistungsfähigkeit erfüllen.

Tabelle E.1 — Mindestanforderungen für Dichtemessungen

Gerät	Auflösung	Erweiterte Unsicherheit ($k = 2$)
Thermometer	0,2 °C	1 °C
Hygrometer	0,1 % RH	3 % RH
Barometer	0,5 hPa	4 hPa
Dichtemessgerät	0,000 01 g/ml	$3,04 \times 10^{-6}$ g/ml

Die Prüfflüssigkeiten sollten einen niedrigen Dampfdruck haben, um die Verdunstung der Flüssigkeit aus dem Tröpfchen während der gesamten Messzeit zu verringern.

ANMERKUNG Eine geeignete Prüfflüssigkeit ist Wasser der Klasse 1 nach ISO 3696.

E.3 Umgebungsbedingungen

Die Messungen sollten unter folgenden Bedingungen durchgeführt werden: Luftdruck zwischen 600 hPa und 1 100 hPa, Umgebungstemperatur zwischen 17 °C und 27 °C und relative Luftfeuchte zwischen 45 % und 80 %. Die Umgebungsbedingungen (Temperatur, Luftfeuchte, Druck) müssen aufgezeichnet werden, damit sie bei der Berechnung des Volumens berücksichtigt werden können.

ANMERKUNG Die Umgebungsbedingungen beeinflussen die gravimetrische Messung hauptsächlich durch die Bestimmung der Luftdichte ρ_A und die Verdunstungsrate der Flüssigkeit aus dem Tröpfchen sowie aus der Waage.

E.4 Messaufbau

Der gravimetrische Aufbau muss aus einer hochpräzisen Labor-Mikrowaage bestehen. Sowohl die Waage als auch das DUT müssen auf einem schwingungs isolierten oder -kompensierten Tisch aufgestellt werden, um mechanische Schwingungen zu reduzieren.

- a) Ein Mikro-Wägegefäß muss mit mindestens 200 µl der verwendeten Prüfflüssigkeit so gefüllt werden, dass der Boden des Wägegefäßes vollständig bedeckt ist, und muss in die Mitte der Waagschale gestellt werden. Das Gefäß und die Waagschale sollten mit einem Schild mit runder Öffnung abgedeckt werden.

ANMERKUNG Wägegefäße aus elektrisch leitfähigem Material (z. B. Metall) sind vorzuziehen, um elektrostatische Aufladung zu vermeiden.

- b) Die Düse des DUT muss sich konzentrisch über der Waagschale befinden.
- c) Über dem gesamten Messaufbau muss ein Windschutz angebracht werden, um ihn vor dem Luftzug der Umgebung zu schützen.

E.5 Verfahren

E.5.1 Massenmessungen

Für die Durchführung der Massenmessungen müssen die folgenden Schritte befolgt werden.

- a) Die Umgebungsbedingungen (Temperatur, relative Luftfeuchte und Luftdruck) zu Beginn des Wägevorgangs werden festgehalten.
- b) Die Wägewerte werden n -mal vor, während und nach der Abgabe der Prüfflüssigkeit festgehalten. Dies führt zu einer Reihe von Waagenablesungen I_i zum Zeitpunkt t_i . Jede Waagenablesung I_i entspricht der Masse m des gefüllten Wägegefäßes und einer unabhängigen Messabweichung ε_i die eine zufälligen Messabweichung darstellt (siehe E.6.3).

E.5.2 Volumenbestimmung

Unter idealen Laborbedingungen (konstante Temperatur, Luftfeuchte und Luftdruck) kann davon ausgegangen werden, dass die Verdunstungsrate der Prüfflüssigkeit konstant ist und m_i in einem linearen Verhältnis zur Zeit t steht (weitere Informationen über die Verdunstungsrate von Wasser finden Sie in [20]). Um Verdunstungseffekte zu kompensieren, müssen die in E.5.1 aufgezeichneten Wägewerte vor und nach der Abgabe der Prüfflüssigkeit wie folgt verarbeitet werden:

- a) Es wird eine lineare Regression für beide Datensätze durchgeführt (vor und nach der Abgabe der Prüfflüssigkeit).

Unmittelbar nach der Abgabe der Prüfflüssigkeit kommt es zu einer plötzlichen Massenzunahme, wie aus den Wägewerten in Bild E.1 hervorgeht. Dieser abrupte Anstieg pendelt sich nach kurzer Zeit wieder ein, so dass die Waage nur noch die Verdunstung der Flüssigkeit misst. Daher muss nach der Abgabe der Flüssigkeit eine

Beruhigungszeit festgelegt werden, während der die Waagenablesungen nicht in die Berechnung der linearen Regression nach der Abgabe einbezogen werden (siehe Bild E.1).

- b) Die Differenz zwischen diesen beiden linearen Regressionswerten ($m_{\text{after}} - m_{\text{before}}$) zum Zeitpunkt der Abgabe der Prüflässigkeit (t_{del}) wird berechnet. Diese Differenz entspricht der Masse m der abgegebenen Prüflässigkeit nach Gleichung (E.1):

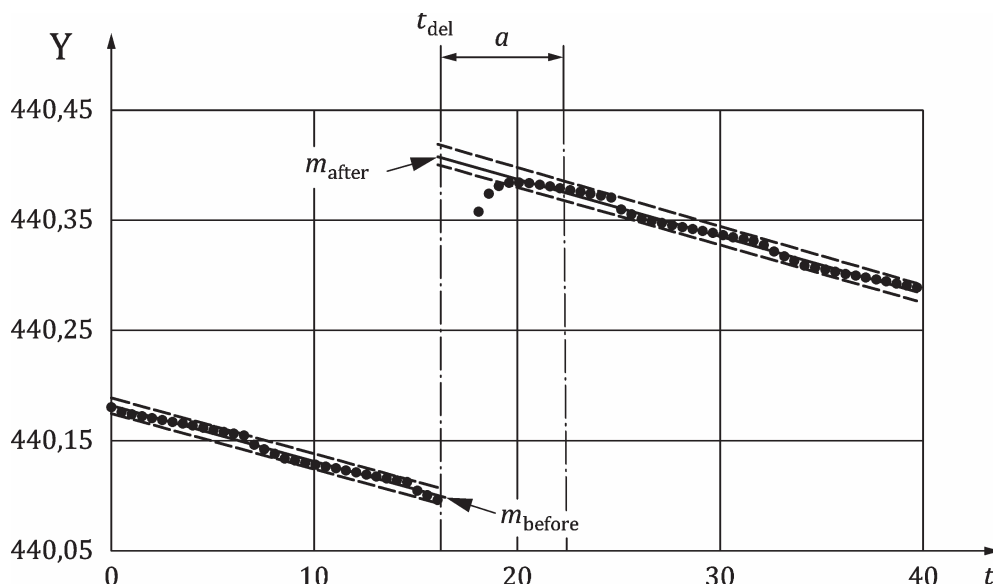
$$m = m_{\text{after}} - m_{\text{before}} \quad (\text{E.1})$$

Dabei ist

m die Masse der abgegebenen Prüflässigkeit;

m_{after} die durch lineare Regression der aufgezeichneten Wägewerte nach der Abgabe zum Zeitpunkt der Abgabe (t_{del}) berechnete Masse;

m_{before} die durch lineare Regression der aufgezeichneten Wägewerte vor der Abgabe zum Zeitpunkt der Abgabe (t_{del}) berechnete Masse.



Legende

t Dauer in s

Y Masse in mg

• Waagenablesungen

— lineare Regression

--- Prognoseintervall

a Beruhigungszeit der Waage (die während dieser Zeit aufgezeichnete Masse wird nicht in die Berechnungen einbezogen)

Bild E.1 — Diagramm einer typischen Messung — lineare Regressionen der erfassten Masse vor und nach der Abgabe der Prüflässigkeit in Abhängigkeit von der Zeit