

DIN 58931**DIN**

ICS 11.100.30

Ersatz für
DIN 58931:1995-02

**Hämatologie –
Bestimmung der Hämoglobinkonzentration im Blut –
Referenzmethode;
Text Deutsch und Englisch**

Haematology –
Determination of haemoglobin concentration in blood –
Reference method;
Text in German and English

Hématologie –
Détermination des concentrations d'hémoglobine dans le sang –
Procédures de référence;
Texte en allemand et anglais

Gesamtumfang 31 Seiten

Normenausschuss Medizin (NAMed) im DIN



Inhalt

Seite

Vorwort 4

1 Anwendungsbereich 5

2 Normative Verweisungen 5

3 Begriffe 5

4 Abkürzungen und Formelzeichen 7

5 Messgröße und Einheit 8

6 Referenzverfahren 8

6.1 Grundlage der HiCN- und AHD-Methoden 8

6.1.1 Allgemeines 8

6.1.2 HiCN-Methode 9

6.1.3 AHD-Methode 9

6.2 Anforderungen an die Geräte 9

6.2.1 Absorptionsphotometer 9

6.2.2 Geräte zur Herstellung der Messlösung 10

6.2.3 Zentrifuge 10

6.3 Anforderungen an die Konversionslösungen und Lagerung 10

6.3.1 Referenzverfahren HiCN 10

6.3.2 Referenzverfahren AHD 11

6.4 Vorbereitung und Durchführung der Messungen 12

6.4.1 Referenzverfahren HiCN 12

6.4.2 Referenzverfahren AHD 13

6.5 Auswertung der Messungen 14

6.5.1 Referenzverfahren HiCN 14

6.5.2 Referenzverfahren AHD 15

7 Messunsicherheit der Referenzverfahren 17

8 Qualitätskontrolle der Referenzverfahren 19

8.1 Allgemeines 19

8.2 Referenzverfahren HiCN 19

8.2.1 Konversionslösung 19

8.2.2 Kontrolllösung 20

8.3 Referenzverfahren AHD 20

8.3.1 Konversionslösung 20

8.3.2 Kontrolllösungen 21

Anhang A (informativ) Bestimmung eines Referenzmesswertes für die Hämoglobinkonzentration $\beta(\text{Hb}(\text{Fe}))$ 22

A.1 Angabe der Messdaten für das gemessene spektrale Absorptionsmaß $a_{i,j}$ 22

Contents

Page

Foreword 4

1 Scope 5

2 Normative references 5

3 Terms and definitions 5

4 Abbreviations and symbols 7

5 Measurand and unit 8

6 Reference method 8

6.1 Basic principles of the HiCN and AHD methods 8

6.1.1 General 8

6.1.2 HiCN method 9

6.1.3 AHD method 9

6.2 Requirements for the devices 9

6.2.1 Absorption photometers 9

6.2.2 Devices for the preparation of the test sample 10

6.2.3 Centrifuge 10

6.3 Requirements for the conversion solutions and storage 10

6.3.1 Reference method HiCN 10

6.3.2 Reference method AHD 11

6.4 Preparation and realisation of measurements 12

6.4.1 Reference method HiCN 12

6.4.2 Reference method AHD 13

6.5 Analysis of the measurements 14

6.5.1 Reference method HiCN 14

6.5.2 Reference method AHD 15

7 Measurement uncertainty of the reference methods 17

8 Quality control of the reference methods 19

8.1 General 19

8.2 Reference method HiCN 19

8.2.1 Conversion solution 19

8.2.2 Control solution 20

8.3 Reference method AHD 20

8.3.1 Conversion solution 20

8.3.2 Control solutions 21

Annex A (informative) Determination of a reference value for the haemoglobin concentration $\beta(\text{Hb}(\text{Fe}))$ 22

A.1 List of data for the measured spectral absorbance $a_{i,j}$ 22

A.2	Bestimmung der Mittelwerte des richtigen spektralen Absorptionsmaßes \bar{A}_i und Hämoglobinkonzentration $\bar{\beta}_i$	25
	Literaturhinweise	31

A.2	Determination of the mean values of the correct spectral absorbance \bar{A}_i and of the haemoglobin concentration $\bar{\beta}_i$	25
	Bibliography	31

Sonneneinstrahlung, Konzentrationsänderungen aufgrund von Verdunstung sowie mikrobieller Kontamination aufbewahrt wurde. Die Messlösung muss vor der spektrometrischen Messung (nach Ablauf der Reaktionszeit) zentrifugiert werden, um Schwebstoffe zu entfernen. Der Zahlenwert des Produktes aus relativer Zentrifugalbeschleunigung und Zentrifugationszeit, in Minuten, muss nach 6.2.3 mindestens 15 000 betragen.

ANMERKUNG 2 Bestandteile aus der Blutprobe (Erythrozytenstromata, Leukozyten, Thrombozyten, Chylomikronen und Proteinausflockungen) können wegen der zusätzlichen Extinktion aufgrund von Streulicht systematische Messabweichungen verursachen, insbesondere dann, wenn pathologisch erhöhte Werte ihrer Konzentrationen vorliegen. Der Einfluss von Erythrozytenstromata, Leukozyten und Thrombozyten spielt bei Anwendung des Referenzverfahrens wegen der Zentrifugation keine Rolle. Beim Vorliegen von Chylomikronen und Paraproteinen oder anderen pathologischen Proteinen in hoher Konzentration (z. B. Kryoglobulinen) sind auch beim Referenzverfahren erhebliche Messabweichungen von der richtigen Hämoglobin-Konzentration zu erwarten.

8.2.2 Kontrolllösung

Die Kontrolllösung muss ein international anerkanntes Referenzmaterial mit definierter Zusammensetzung und Reinheit sein (z. B. „Kontrollblut“) [4], [5]. Die Qualitätskontrolle ist mit mindestens zwei Referenzlösungen unterschiedlicher Konzentration durchzuführen.

8.3 Referenzverfahren AHD

8.3.1 Konversionslösung

Das spektrale (dekadische) Absorptionsmaß der fertigen Konversionslösung darf im zur Messung verwendeten Bereich, gemessen gegen Wasser mit hohem Reinheitsgrad, einen Wert von 0,002 nicht überschreiten.

Die Konversionslösung muss die Probe in einer Verdünnung bis zu einem Verhältnis von 1:11 vollständig hämolysieren und solubilisieren können, wobei keine Fällung der Proteine auftreten darf. Wenn das Blut mit der Konversionslösung im Verhältnis 1:151 verdünnt wird, müssen nach Ablauf der Reaktionszeit mindestens 99 % des in der Blutprobe vorliegenden Hämoglobins in den AHD-Komplex überführt [6] sein. Es ist sicherzustellen, dass eine Reaktionszeit von mindestens fünf Minuten eingehalten wird.

been avoided. The test sample shall be centrifuged prior to the spectrometric measurement (after the expiry of the reaction time), in order to eliminate levitating particles. The numerical value of the product of the relative centrifugal acceleration and the centrifugation time in minutes shall, according to 6.2.3, amount to at least 15 000.

NOTE 2 Constituents from the blood sample (erythrocyte stromata, leukocytes, thrombocytes, chylomicrones and protein coagulations) can cause systematic measurement deviations due to additional extinction by light scattering. In particular, this effect can occur especially if pathologically increased values of their concentrations occur. The influence of erythrocyte stromata, leukocytes and thrombocytes are - when applying the reference method - irrelevant due to the centrifugation. However, if chylomicrons and paraproteins or other pathological proteins occur in high concentrations (e.g. cryoglobulins), considerable measurement deviations from the conventional true haemoglobin concentration are to be expected also for the reference method.

8.2.2 Control solution

The control solution shall be an internationally recognized reference material with a defined composition and purity (e.g. “control blood“) [4], [5]. The quality control shall be carried out with at least two reference solutions of different concentration.

8.3 Reference method AHD

8.3.1 Conversion solution

The spectral (decadic) absorbance of the finally prepared conversion solution shall not exceed a value of 0.002 within the range used for the measurement, measured against water having a high purity grade.

The conversion solution shall be able to completely haemolyse and solubilise the sample in a dilution of up to a ratio of 1:11, whereby no precipitation of the proteins may occur. If the blood is diluted with the conversion solution at the ratio 1:151, at least 99 % of the haemoglobin in the blood sample shall have been converted into the AHD complex after the reaction time has expired [6]. It shall be ensured that a reaction time of at least five minutes is maintained.

Die Reaktionszeit wird durch die Konzentration der oben beschriebenen Stoffe in der Reaktionslösung und durch die Temperatur bestimmt. Die Reaktionszeit einer Konversionslösung mit der oben beschriebenen Zusammensetzung muss für die verwendete Verdünnung bekannt sein.

Wird eine Probe mit der Konversionslösung im Verhältnis von 1:151 verdünnt, so darf das nach Ablauf der Reaktionszeit bei 574 nm gemessene spektrale Absorptionsmaß während 24 h keine größere Abweichung als 1 % aufweisen, wenn die angesetzte Probe bei einer Temperatur von 18 °C bis 24 °C unter Vermeidung direkter Sonneneinstrahlung und Konzentrationsänderungen aufgrund von Verdunstung aufbewahrt wurde.

ANMERKUNG Die systematischen Messabweichungen durch Bestandteile aus der Blutprobe (Erythrozytenstromata, Leukozyten, Thrombozyten, Triglyceride und Proteinausflockungen) sind auch dann, wenn pathologisch erhöhte Werte ihrer Konzentrationen vorliegen, vernachlässigbar gering (Änderung des spektralen Absorptionsmaß $\leq 0,003$).

8.3.2 Kontrolllösungen

Die Kontrolllösungen, die bei der Durchführung der AHD-Methode zu verwenden sind, enthalten unterschiedliche Konzentrationen an Häminchlorid (Chlorhämin, [CAS: 16009-13-5]).

ANMERKUNG 1 Durch Oxidation des Fe^{2+} der Häm-Gruppe (chromophore Gruppe des Hämoglobins) zu Fe^{3+} und nachfolgendem Zusatz von Cl^- -Ionen bildet sich schwerlösliches Häminchlorid. Es ist eine tiefrote, sehr stabile kristalline Verbindung mit einem Molekulargewicht von 651,96 g/mol [7].

Die Kontrolllösungen sind durch Einwiegen einer bestimmten Menge an Häminchlorid und Auflösen derselben in AHD-Konversionslösung nach 6.3.2 herzustellen. Die Qualitätskontrolle ist mit mindestens zwei Lösungen mit unterschiedlicher Konzentration durchzuführen.

ANMERKUNG 2 Empfohlen werden Kontrolllösungen, deren Konzentrationen an Häminchlorid so eingestellt sind, dass eine Verdünnung im Verhältnis 1:151 Werte des dekadischen Absorptionsmaßes ergeben, die den Hb-Konzentrationen von 30 g/L, 60 g/L, 90 g/L, 120 g/L, 150 g/L oder 180 g/L im Blut entsprechen.

Die Kontrolllösungen auf der Basis von Häminchlorid dürfen ohne Änderung ihrer spektralen Eigenschaften bei Zimmertemperatur oder im Kühlschrank aufbewahrt sowie auch mehrmals eingefroren werden.

The reaction time is determined by the concentration of the above-described substances in the reaction solution and by the temperature. The reaction time of a conversion solution having the above-described composition shall be known for the prepared dilution.

If a sample is diluted with the conversion solution at a ratio of 1:151, the spectral absorbance measured at 574 nm after the reaction time has expired shall not show any deviation larger than 1 % within a period of 24 hours provided the test sample has been stored at a temperature between 18 °C and 24 °C, direct solar radiation and changes of the concentration due to evaporation have been avoided.

NOTE Systematic measurement deviations due to constituents from the blood sample (erythrocyte stromata, leukocytes, thrombocytes, triglycerides and protein coagulations) are negligible, even if pathologically increased values of their concentrations are present (change in spectral absorbance ≤ 0.003).

8.3.2 Control solutions

The control solutions to be used when applying the AHD method contain different concentrations of haemin chloride (chlorohaemin, [CAS: 16009-13-5]).

NOTE 1 Due to the oxidation of the Fe^{2+} of the haem group (chromophoric group of the haemoglobin) into Fe^{3+} and the subsequent addition of Cl^- ions, poorly soluble haemin chloride is generated. It is a bright red, very stable, crystalline compound with a molecular weight of 651.96 g/mol [7].

The control solutions shall be prepared by weighing in a certain amount of haemin chloride and dissolving it in AHD conversion solution according to section 6.3.2. Quality control has to be carried out with at least two solutions of different concentration.

NOTE 2 It is recommended to use control solutions whose concentrations of haemin chloride are adjusted in such a way that a dilution at the ratio of 1:151 results in values of the decadic absorbance which correspond to the Hb concentrations of 30 g/L, 60 g/L, 90 g/L, 120 g/L, 150 g/L or 180 g/L in blood.

The control solutions based on haemin chloride may be stored at room temperature or in the refrigerator and may also be frozen several times without any change of their spectral characteristics.

Literaturhinweise

Bibliography

- [1] Braunitzer, G. (1964): The molecular weight of haemoglobin; *Bibl. Haematol.* 18, 59–60
- [2] Van Kampen, E. J., Zijlstra, W. G. (1965): Determination of hemoglobin and its derivatives; *Adv Clin Chem* 8: 141–187
- [3] Rodkey, F. L. (1967): Kinetic Aspects of Cyanmethemoglobin Formation from Carboxyhemoglobin; *Clin Chem* 13: 2–5
- [4] International Committee for the Standardization in Haematology: Expert Panel on Haemoglobinometry, Recommendations for reference method for haemoglobinometry in human blood (ICSH standard 1986) and specifications for international haemoglobinocyanide reference preparation (3rd edition); *Clin lab Haemat* 9 (1987) 73–79
- [5] CLSI H15-A3 Reference and Selected Procedures for the Quantitative Determination of Hemoglobin in Blood; Approved Standard-Third Edition
- [6] Zander, R., Lang, W., Wolf, H. U. (1989): The determination of haemoglobin as cyanhaemoglobin or as alkaline haematin D-575. Comparison of method-related errors; *J Clin Chem Clin Biochem* 27: 185-189
- [7] Wolf, H. U., Link, H., Lang, W. (1992): Preparation, purification and characterization of chlorohaemin; *Biol Chem Hoppe-Seyler* 373(6): 305–313
- [8] Internationales Wörterbuch der Metrologie (VIM), 2. Auflage 1994, Beuth Verlag Berlin, Wien, Zürich
- [9] Guide to the expression of uncertainty in measurement, corrected and reprinted 1995, International Organisation for Standardization (Geneva, Switzerland) ISBN 92-67-10188-9
- [10] Elster, C. (2000): Evaluation of measurement uncertainty in the presence of combined random and analogue-to-digital conversion errors; *Meas. Sci. Technol.* 11: 1359–1363
- [11] Heuck, C. C., Reinauer, H., Wood, W. G. (2008): The alkaline haematin detergent (AHD575) method for the determination of haemoglobin in blood — a candidate reference measurement procedure; *Clin Lab* 54, 255–272