

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

Vorwort

Dieses Dokument wurde vom Arbeitsausschuss NA 063-03-06 AA „Hämatologie“ des Normenausschusses Medizin (NAMed) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V. erarbeitet und im Einvernehmen mit der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt Braunschweig und Berlin herausgegeben.

Der Arbeitsausschuss setzt sich aus Vertretern der medizinischen Fachgesellschaften DGHO, DGKL, INSTAND und Vertretern der Diagnostikindustrie zusammen.

Änderungen

Gegenüber DIN 58931:1995-02 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) vollständige Überarbeitung des Inhalts, insbesondere Anpassung der Festlegungen an den Stand der Wissenschaft;
- b) Aufnahme der AHD-Methode;
- c) Aufnahme der Rückführung des Absorptionsphotometers und der Messunsicherheitsanalyse;
- d) redaktionelle Überarbeitung;
- e) Ergänzung eines Beispiels zur Auswertung von Messdaten für die Bestimmung von Referenzmesswerten der Hämoglobinkonzentration im Blut.

Frühere Ausgaben

- DIN 58931-1: 1982-10
- DIN 58931-2: 1982-10
- DIN 58931-3: 1982-10
- DIN 58931: 1995-02

Foreword

This standard was elaborated by the Working Committee NA 063-03-06 AA "Haematology" (Haematology of the Normenausschuss Medizin (Medical Standards Committee, NAMed) of the DIN Deutsches Institut für Normung e.V. and was published in agreement with the Physikalisch-Technische Bundesanstalt, Braunschweig and Berlin.

The committee comprises of experts of the professional medical societies DGHO, DGKL, INSTAND, and representatives of the diagnostic industry.

Modifications

Compared to DIN 58931:1995-02, the following changes have been made:

- a) complete revision of the content, in particular adaptation of the specifications to the current state of science;
- b) inclusion of the AHD method;
- c) inclusion of the traceability of the absorption photometer and the uncertainty analysis;
- d) editorial revision;
- e) addition of an example of data analysis for the determination of reference measurement values of the haemoglobin concentration in blood.

1 Anwendungsbereich

Diese Norm gilt für die Bestimmung der Hämoglobinkonzentration im Blut. Sie gilt nur für die analytische Phase.

Sie legt Anforderungen an die Geräte- und Messtechnik sowie an die benötigten Reagenzien bzw. deren Lösungen, die bei der Bestimmung der Hämoglobinkonzentration im Blut eingesetzt werden, fest.

Diese Norm gilt auch für die Hämoglobinbestimmung in Kontrollmaterialien, wenn sich Lyse und Umwandlungsgeschwindigkeiten der verschiedenen Hb-Varianten ähnlich wie im Frischblut verhalten.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden zitierten Dokumente sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. 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).

DIN 58932-1, *Hämatologie — Bestimmung der Blutkörperchenkonzentration im Blut — Teil 1: Blutentnahme, Probenvorbereitung, Einflussgrößen, Störfaktoren*

DIN 58934-1, *Hämatologie — Kontrollmaterialien für das Blutbild — Teil 1: Kontrollblute*

DIN 58960-4, *Photometer für analytische Untersuchungen — Anforderungen an die Beschreibung technischer Daten für den Anwender*

DIN 58963-2, *Küvetten für photometrische Messungen — Präzisions-Rechteckküvetten — Maße, Anforderungen*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

3.1 Hämoglobin

roter Blutfarbstoff, der in den Erythrozyten (roten Blutkörperchen) enthalten ist

ANMERKUNG Nach IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) wird für Hämoglobin in seiner tetrameren Form das Kurzzeichen Hb und für die monomere Form das Kurzzeichen Hb(Fe) verwendet.

1 Scope

This standard applies to the determination of the haemoglobin concentration in blood. It is applicable to the analytical phase only.

In this standard, requirements for the instrumentation and measurement technique are defined. In addition, it specifies requirements for the reagents or their dilutions, which are used for the determination of the haemoglobin concentration in blood.

This standard also applies to the determination of haemoglobin concentration in control materials if the lysis and the conversion rates of the different Hb variants are similar as in fresh blood.

2 Normative references

The below-mentioned documents are required for the application of this document. For dated references, only the referenced issue is valid. For undated references the last issue of the referenced document is valid (including all modifications).

DIN 58932-1, *Haematology — Determination of the concentration of blood corpuscles in blood — Part 1: Blood collection, sample preparation, biological influence factors, interference factors*

DIN 58934-1, *Haematology — Control material for the CBC — Part 1: Control bloods*

DIN 58960-4, *Photometer for analytical tests — Requirements for the description of technical data for the user*

DIN 58963-2, *Optical cells for photometric measurements — Precision rectangular spectrophotometric cells — Dimensions, requirements*

3 Terms and definitions

For the purpose of this document the following apply.

3.1 haemoglobin

red blood pigment contained in the erythrocytes (red blood corpuscles)

NOTE According to IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), the symbol Hb is used for haemoglobin in its tetrameric form and the symbol Hb(Fe) is used for the monomeric form.

3.2

Probe

dem Probanden nach DIN 58932-1 entnommenes, mit Antikoagulans versetztes Blut

ANMERKUNG Als Antikoagulans wird EDTA bevorzugt.

3.3

Konversionslösung

Reaktionsflüssigkeit zur Lyse der Erythrozyten und zur Umwandlung der verschiedenen Hämoglobinvarianten sowie der in den Kontrolllösungen vorhandenen Hämoglobin-analogen Verbindungen in ein stabiles, photometrisch erfassbares Endprodukt

3.3.1

HiCN-Methode

Verwendung einer Konversionslösung zur Umwandlung der verschiedenen Hämoglobinvarianten sowie der in den Kontrolllösungen vorhandenen Hämoglobin-analogen Verbindungen in Cyanmethämoglobin

3.3.2

AHD-Methode

Verwendung einer Konversionslösung zur Umwandlung der verschiedenen Hämoglobinvarianten sowie der in den Kontrolllösungen vorhandenen Hämoglobin-analogen Verbindungen in den Komplex aus alkalischem Hämatin und einem nichtionischen Detergens

3.4

Messlösung

Lösung bestehend aus Probe oder Kontrolllösung und Konversionslösung, die unmittelbar der Messung zugeführt wird

3.5

Kontrolllösung

Lösung mit festgelegten Eigenschaften, die nach Reaktion mit einer Konversionslösung eine Messlösung ergibt, die einen bekannten Wert des spektralen Absorptionsmaßes mit definierter Messunsicherheit liefert

ANMERKUNG Kontrolllösungen dienen der Prüfung von Messverfahren durch Vergleich mit vorgegebenen Werten, einschließlich der Kontrolle von Absorptionsphotometern.

3.6

Kontrollblut

siehe DIN 58934-1

3.2

sample

blood collected from a proband according to DIN 58932-1 and treated with anticoagulant

NOTE EDTA is to be preferred as anticoagulant.

3.3

conversion solution

fluid containing reagents to induce the lysis of the erythrocytes and for the conversion of the different haemoglobin variants as well as the haemoglobin-analogous compounds in control solutions into a stable photometrically identifiable end product

3.3.1

HiCN method

utilisation of a conversion solution for the transformation of the different haemoglobin variants as well as the haemoglobin-analogous compounds contained in the control solutions into cyanmethaemoglobin

3.3.2

AHD method

utilisation of a conversion solution for the transformation of the different haemoglobin variants as well as the haemoglobin-analogous compounds contained in the control solutions into the alkaline haematin complex and a non-ionic detergent

3.4

test sample

sample or control solution with added conversion solution directly used for the measurement

3.5

control solution

solution with defined characteristics which - after reaction with a conversion solution - yields a test sample featuring a known value of the spectral absorbance and a defined measurement uncertainty

NOTE Control solutions are used to test measurement procedures by comparison with specified values including the control of absorption photometers.

3.6

control blood

definition according to DIN 58934-1

4 Abkürzungen und Formelzeichen

4 Abbreviations and symbols

Tabelle 1 — Zusammenstellung der verwendeten Abkürzungen und Formelzeichen
Table 1 — Compilation of abbreviations and symbols used

Abkürzung	Bedeutung	Einheit
Abbreviation	Meaning	Unit
Hb	tetramere Form des Hämoglobins	
	tetrameric form of haemoglobin	
Hb(Fe)	monomere Form des Hämoglobins	
	monomeric form of haemoglobin	
β (Hb(Fe))	Massenkonzentration des Hämoglobins im Blut	g/L
	mass concentration of haemoglobin in blood	
C_0, C_1	Konstanten zur Bestimmung des richtigen Wertes [8] des spektralen (dekadischen) Absorptionsmaßes $A(\lambda)$ der Messlösung aus den Messwerten des spektralen dekadischen Absorptionsmaßes $a(\lambda)$	1
	constants for the determination of the conventional true value [8] of the spectral (decadic) absorbance $A(\lambda)$ of the test sample from the measured values of the spectral decadic absorbance $a(\lambda)$.	
c (Hb(Fe))	Stoffmengenkonzentration des Hämoglobins im Blut	mol/L
	amount-of-substance concentration of haemoglobin in blood	
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (z. B. in K_3 EDTA: Kaliumsalz der Ethylendiamintetraessigsäure)	
	ethylenediamine tetraacetic acid (e.g. in K_3 EDTA: potassium salt of the ethylenediamine tetraacetic acid)	
M (Hb(Fe))	molare Masse des monomeren Hämoglobins Hb(Fe)	g/mol
	Molar mass of the monomeric haemoglobin Hb(Fe)	
HiCN	Cyanmethämoglobin	
	cyanmethaemoglobin	
AHD	alkalisches Hämatin und Detergens, Alkaline Haematin Detergent	
	alkaline haematin and detergent, alkaline haematin detergent	
CAS	Chemical Abstracts Service (Registry Number)	
$a(\lambda)$	Messwert des spektralen (dekadischen) Absorptionsmaßes der Messlösung ANMERKUNG Im Folgenden wird $a(\lambda)$ auch als <i>gemessenes spektrales Absorptionsmaß</i> bezeichnet.	1
	measured value of the spectral (decadic) absorbance of the test sample NOTE In the following, $a(\lambda)$ is also referred to as <i>measured spectral absorbance</i> .	
$A(\lambda)$	richtiger Wert [8] des spektralen (dekadischen) Absorptionsmaßes der Messlösung, berechnet aus dem Messwert $a(\lambda)$ ANMERKUNG Im Folgenden wird $A(\lambda)$ auch als <i>richtiges spektrales Absorptionsmaß</i> bezeichnet.	1
	conventional true value [8] of the spectral (decadic) absorbance of the test sample, calculated from the measured value $a(\lambda)$ NOTE In the following, $A(\lambda)$ is also referred to as <i>conventional true spectral absorbance</i>	

Tabelle 1 (fortgesetzt)

Table 1 (continued)

Abkürzung	Bedeutung	Einheit
Abbreviation	Meaning	Unit
ϕ	Volumenanteil der Probe in der Messlösung	1
	volume fraction of the sample in the test sample	
$\varepsilon(\lambda)$	molarer dekadischer Absorptionskoeffizient	$\frac{\text{L}}{\text{mmol}} \frac{1}{\text{cm}}$
	molar decadic absorption coefficient	
V_B	Volumen der Blutprobe	μL
	volume of the blood sample	
V_K	Volumen der Konversionslösung	μL
	volume of the conversion solution	
d	Schichtdicke der Präzisions-Rechteckküvette	mm
	layer thickness of the precision rectangular spectrophotometric cuvette	
u_{rel}	relative Messunsicherheit	1
	relative measurement uncertainty	

5 Messgröße und Einheit

Messgröße ist entweder die Massenkonzentration $\beta(\text{Hb}(\text{Fe}))$ oder die Stoffmengenkonzentration $c(\text{Hb}(\text{Fe}))$ des Hämoglobins im Blut.

Einheit der Massenkonzentration ist g/L oder ihre dezimalen Teile. Einheit der Stoffmengenkonzentration ist mol/L oder ihre dezimalen Teile.

ANMERKUNG Die molare Masse $M(\text{Hb}(\text{Fe}))$ des monomeren Hämoglobins $\text{Hb}(\text{Fe})$ im Blut beträgt 16 114,5 g/mol [1]. Es gilt die Umrechnungsgleichung (1).

5 Measurand and unit

The measurand is either the mass concentration $\beta(\text{Hb}(\text{Fe}))$ or the amount-of-substance concentration $c(\text{Hb}(\text{Fe}))$ of the haemoglobin in blood.

The unit of the mass concentration is g/L or its decimal parts. The unit of the amount-of-substance concentration is mol/L or its decimal parts.

NOTE The molar mass $M(\text{Hb}(\text{Fe}))$ of the monomeric haemoglobin $\text{Hb}(\text{Fe})$ in blood amounts to 16 114.5 g/mol [1]. The following conversion equation is applicable:

$$\beta(\text{Hb}(\text{Fe})) = M(\text{Hb}(\text{Fe})) \cdot c(\text{Hb}(\text{Fe})) \quad (1)$$

6 Referenzverfahren

6.1 Grundlage der HiCN- und AHD-Methoden

6.1.1 Allgemeines

Grundlage beider Verfahren ist die reproduzierbare Überführung des Hämoglobins in ein stabiles Derivat definierter chemischer Zusammensetzung.

6 Reference method

6.1 Basic principles of the HiCN and AHD methods

6.1.1 General

The basis of both methods is the reproducible conversion of the haemoglobin into a stable derivative of defined chemical composition.

6.1.2 HiCN-Methode

Ein definiertes Probenvolumen ist mit einem definierten Volumen der Konversionslösung nach 6.3.1 zu versetzen. Dabei wird nach Hämolyse der Erythrozyten die gesamte Hämoglobinmenge, d. h. alle Hämoglobinvarianten und Hämoglobin-analogen Verbindungen mit Ausnahme des Verdoglobins, im Stoffmengenverhältnis 1:1 in Cyanmethämoglobin (HiCN) umgewandelt [2].

6.1.3 AHD-Methode

Ein definiertes Probenvolumen ist mit einem definierten Volumen der Konversionslösung nach 6.3.2 zu versetzen. Dabei wird nach Hämolyse der Erythrozyten und Solubilisierung der Erythrozytenmembranen die gesamte Hämoglobinmenge, d. h. alle Hämoglobinvarianten und Hämoglobin-analogen Verbindungen, im Stoffmengenverhältnis 1:1 in den AHD-Komplex umgewandelt.

6.2 Anforderungen an die Geräte

6.2.1 Absorptionsphotometer

Bei der Durchführung der hier beschriebenen Methoden müssen zur Bestimmung des spektralen Absorptionsmaßes $A(\lambda)$ Absorptionsphotometer verwendet werden, die eine Messung des spektralen Absorptionsmaßes einer Lösung im Wellenlängenbereich von 530 nm bis 590 nm mit einer relativen photometrischen Messunsicherheit bei Verwendung von 10-mm-Präzisions-Rechteckküvetten nach DIN 58963-2 von höchstens $2 u_{\text{rel}}(A(\lambda)) \leq 1,0 \%$ des Messwertes ermöglichen. Die Messunsicherheit der Wellenlänge muss kleiner als $2 u(\lambda) \leq 1 \text{ nm}$ (95 % Vertrauensniveau) und die spektrale Halbwertsbreite kleiner als 1 nm sein. Der Fehlstrahlungsanteil oder Falschlichtanteil darf 0,05 % nicht überschreiten. Die direkte Anzeige der Hb-Konzentration nach Berechnung mithilfe des spektralen Absorptionsmaßes für die HiCN- oder AHD-Methode und des Volumenanteils der Probe in der Messsuspension ist zulässig. Absorptionsphotometer müssen den Anforderungen nach DIN 58960-4 genügen. Durch die Verwendung kalibrierter Filter mit bekanntem spektralem Absorptionsmaß ist die Rückführung des Absorptionsphotometers sicherzustellen, sodass sich aus den Messwerten $a(\lambda)$ des spektralen Absorptionsmaßes der richtige Wert des spektralen Absorptionsmaßes $A(\lambda)$ mit der angegebenen Messunsicherheit berechnen lässt.

6.1.2 HiCN method

A defined sample volume and a defined volume of the conversion solution have to be mixed according to section 6.3.1. Subsequent to the haemolysis of the erythrocytes, the total amount of haemoglobin, i.e. all haemoglobin variants and haemoglobin-analogous compounds, except the verdoglobin, are converted into cyanmethaemoglobin (HiCN) in the amount-of-substance ratio 1:1 [2].

6.1.3 AHD method

A defined sample volume and a defined volume of the conversion solution have to be mixed according to 6.3.2. Subsequent to the haemolysis of the erythrocytes and solubilisation of the erythrocyte membranes, the total amount of haemoglobin, i.e. all haemoglobin variants and haemoglobin-analogous compounds, are converted into the AHD complex in the amount-of-substance ratio 1:1.

6.2 Requirements for the devices

6.2.1 Absorption photometers

In order to carry out the methods described in this document, absorption photometers have to be used for the determination of the spectral absorbance $A(\lambda)$. The instrument shall enable the measurement of the spectral absorbance of a solution in the wavelength range from 530 nm to 590 nm with a relative photometric measurement uncertainty when using 10-mm precision rectangular spectrophotometric cuvettes according to DIN 58963-2 of $2 u_{\text{rel}}(A(\lambda)) \leq 1.0 \%$ of the measured value. The wavelength uncertainty of the absorption photometer shall not exceed $2 u(\lambda) \leq 1 \text{ nm}$ (95 % confidence level), it shall feature a spectral half-width of smaller than 1 nm and a stray light or false light contribution $\leq 0.05 \%$. The direct display of the Hb concentration after calculations based on the spectral absorbance for the HiCN or AHD method and of the volume fraction of the sample in the test sample is admissible. Absorption photometers shall comply with the requirements according to DIN 58960-4. By using calibrated filters with a known spectral absorbance, the traceability of the absorption photometer has to be ensured, so that the conventional true value of the spectral absorbance $A(\lambda)$ can be calculated from the measured values $a(\lambda)$ of the spectral absorbance with the specified measurement uncertainty.

6.2.2 Geräte zur Herstellung der Messlösung

Bei der Herstellung der Messlösung muss sichergestellt werden, dass der Volumenanteil der Probe mit einer Messunsicherheit von $2 u_{\text{rel}}(\phi) \leq 0,6\%$ bestimmt werden kann. Zur Herstellung der Messlösungen können gravimetrische Verfahren oder kalibrierte Volumenmessgeräte, z. B. Pipetten oder Dilutoren, verwendet werden.

6.2.3 Zentrifuge

Bei der zur Durchführung des HiCN-Verfahrens benötigten Zentrifuge muss die relative Zentrifugalbeschleunigung (RZB) so hoch sein, dass ein Zahlenwert des Produktes aus relativer Zentrifugalbeschleunigung und Zentrifugationszeit in Minuten von mindestens 15 000 in einer vertretbaren Zeit (≤ 15 min) erreichbar ist.

Zur Durchführung der AHD-Methode ist eine Zentrifugation nicht erforderlich.

6.3 Anforderungen an die Konversionslösungen und Lagerung

6.3.1 Referenzverfahren HiCN

Zur Herstellung der Konversionslösung müssen Reagenzien und Wasser von hohem Reinheitsgrad (z. B. destilliertes Wasser) verwendet werden. Die Konversionslösung (siehe 3.3.1) muss die folgenden Bestandteile enthalten:

- 0,8 mmol/L bis 2,0 mmol/L Cyanid-Ionen (CN^-) (z. B. 53 mg/L bis 132,5 mg/L KCN [CAS: 151-50-8]);

ANMERKUNG 1 Alkalicyanide wandeln sich bei Zutritt mäßig feuchter, kohlendioxidhaltiger Luft unter Massenzunahme teilweise in Carbonate oder Hydrogencarbonate um. Wesentlich für den Gehalt der Konversionslösung ist nicht die Einwaage, sondern die in der Lösung vorhandene Konzentration an Cyanid-Ionen.

- 0,61 mmol/L bis 1,0 mmol/L Kaliumhexacyanoferrat(III), $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ [CAS: 14459-95-1];
- Puffersubstanzen, wie z. B. Natriumdihydrogenphosphat, NaH_2PO_4 [CAS: 7558-80-7] [2]. Die Konversionslösung muss bei Verwendung dieses Puffers einen pH-Wert von $7,4 \pm 0,3$ aufweisen. Bei der Verwendung anderer Puffersubstanzen ist sicherzustellen, dass der pH-Wert in dem für die entsprechende Substanz geeigneten Bereich liegt.

6.2.2 Devices for the preparation of the test sample

During preparation of the test sample it shall be ensured, that the volume fraction of the sample can be determined with a measurement uncertainty of $2 u_{\text{rel}}(\phi) \leq 0.6\%$. In order to prepare the test samples, gravimetric methods or calibrated volumetric instruments, e.g. pipettes or dilutors, may be used.

6.2.3 Centrifuge

For the centrifuge, which is required when applying the HiCN method, the relative centrifugal acceleration (RCA) shall be sufficiently high that a numerical value of the product of the relative centrifugal acceleration and the centrifugation time in minutes of at least 15 000 is attainable in a reasonable time (≤ 15 min).

For the implementation of the AHD method centrifugation is not required.

6.3 Requirements for the conversion solutions and storage

6.3.1 Reference method HiCN

For the preparation of the conversion solution, reagents and water having a high purity grade (e.g. distilled water) shall be used. The conversion solution (see 3.3.1) shall contain the following constituents:

- 0.8 mmol/L – 2.0 mmol/L cyanide ions (CN^-) (e.g. 53 mg/L – 132.5 mg/L KCN [CAS: 151-50-8]),

NOTE 1 Alkali cyanides partially convert into carbonate or hydrogencarbonate when exposed to moderately humid, carbon-dioxide-enriched air under mass augmentation. It should be noted, that the cyanide ion concentration in the solution is essential rather than the net weight of the cyanide.

- 0.61 mmol/L – 1,0 mmol/L potassium hexacyanoferrate(III), $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ [CAS: 14459-95-1],
- Buffering agents, e.g. monosodium phosphate, NaH_2PO_4 [CAS: 7558-80-7] [2]. When using this buffer, the conversion solution shall have a pH value of 7.4 ± 0.3 . If other buffer agents are applied, it shall be assured, that the pH value is in the range adequate for the corresponding buffer agent.

ANMERKUNG 2 Bei zu niedrigem pH-Wert entweicht Blausäure (HCN), sodass sich die Cyanid-Ionen-Konzentration vermindern kann. Ein zu hoher pH-Wert führt zu längeren Umwandlungszeiten und zu Trübungen.

ANMERKUNG 3 Enthält die Konversionslösung als Puffersubstanz Natriumbicarbonat, NaHCO_3 [CAS: 144-55-8] (Drabkin-Lösung), ist ein pH-Wert von 8,5 bis 9,0 einzuhalten. Eine Messung bei pH 7,4 ergibt eine fehlerhafte erhöhte Konzentration.

Die Konversionslösung kann weitere Substanzen, wie z. B. Neutralsalze, zur Erhöhung der Osmolarität, Detergentien zur Reaktionsbeschleunigung sowie bakterizid und fungizid wirkende Substanzen enthalten. Diese Bestandteile dürfen das Messergebnis nicht beeinflussen.

Die Konversionslösung ist verschlossen, vor Licht geschützt, bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank aufzubewahren. Sie darf nicht eingefroren werden.

Die Konversionslösung muss den gestellten Anforderungen auch dann genügen, wenn sie nach dem vorschriftsmäßigen Ansatz zwei Monate bei einer Temperatur $T \leq 25^\circ\text{C}$ in mindestens halbgefüllten, verschlossenen und mit Lichtschutz versehenen Flaschen (z. B. braunen Glasflaschen) gelagert wurde.

6.3.2 Referenzverfahren AHD

Zur Herstellung der Konversionslösung müssen Reagenzien und Wasser von hohem Reinheitsgrad (z. B. demineralisiertes Wasser) verwendet werden. Die Konversionslösung (siehe 3.3.2) muss die folgenden Bestandteile enthalten:

- 1,0 % bis 5,0 % Triton X-100 [CAS: 9002-93-1];
- 0,02 mol/L bis 0,2 mol/L · NaOH [CAS: 1310-73-2]. Die Konversionslösung muss einen pH-Wert von 12,3 bis 13 aufweisen.

ANMERKUNG Bei der Herstellung der Lösung von Triton X-100 in Wasser ist darauf zu achten, dass das Triton unter ständigem Rühren des Wassers stetig zugegeben wird.

Der Zusatz weiterer Substanzen, wie z. B. Neutralsalze, zur Erhöhung der Osmolarität, Detergentien zur Reaktionsbeschleunigung sowie bakterizid und fungizid wirkende Substanzen zur Konversionslösung ist nicht erforderlich.

NOTE 2 If the pH value is too low, hydrogen cyanide (HCN) is escaping and the cyanide ion concentration might diminish. If the pH value is too high, the conversion time will increase and turbidity can occur.

NOTE 3 If the conversion solution contains sodium bicarbonate NaHCO_3 [CAS: 144-55-8] (Drabkin's solution), a pH value between 8.5 and 9 is required. A measurement at pH 7.4 results in an erroneous high concentration.

The conversion solution can contain other substances such as neutral salts in order to increase osmolarity, detergents to accelerate the reaction as well as bactericide and fungicide substances. These constituents shall not influence the results of the measurement.

The conversion solution is to be stored sealed, protected from light, at room temperature or in the refrigerator. It shall not be frozen.

The conversion solution shall also comply with the requirements if it has been stored – after having been prepared as prescribed – for two months at a temperature of $T \leq 25^\circ\text{C}$ in at least half-filled, closed and light protecting bottles (e.g. brown glass bottles).

6.3.2 Reference method AHD

For the preparation of the conversion solution, reagents and water having a high purity grade (e.g. demineralised water) shall be used. The conversion solution (see 3.3.2) shall contain the following constituents:

- 1.0 % – 5.0 % Triton X-100 [CAS: 9002-93-1],
- 0.02 mol/L – 0.2 mol/L · NaOH [CAS: 1310-73-2]. The conversion solution shall have a pH value of between 12.3 and 13.

NOTE When solving Triton X-100 in water, make sure that the Triton is added continuously while stirring the water.

Addition of other substances, e.g. neutral salts to increase osmolarity, detergents for the acceleration of the reaction as well as bactericide and fungicide substances to the conversion solution is not required.

Die Konversionslösung ist bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank aufzubewahren. Sie darf mehrmals eingefroren werden, da sich ihre spektralen Eigenschaften und Reaktivität dadurch nicht ändern.

Die Konversionslösung muss den gestellten Anforderungen auch dann genügen, wenn sie nach dem vorschriftsmäßigen Ansatz sechs Monate bei einer Temperatur $T \leq 30 \text{ °C}$ in verschlossenen Flaschen gelagert wurde.

6.4 Vorbereitung und Durchführung der Messungen

6.4.1 Referenzverfahren HiCN

Die Temperatur der Probe und die der Konversionslösung müssen vor dem Vermischen an die Raumtemperatur zwischen 18 °C und 24 °C angeglichen werden.

Die Probe ist im Verhältnis 1:50 bis 1:500 mit der Konversionslösung zu verdünnen, d. h., der Volumenanteil der Probe in der Messlösung beträgt $0,02 \geq \phi \geq 0,002$. Bei Proben mit niedriger Hämoglobinkonzentration sind große Volumenanteile zu bevorzugen (z. B. 1:100), um im Bereich kleiner Messunsicherheit des Absorptionsphotometers zu messen. Bei großem Volumenanteil der Probe in der Messlösung ist sicherzustellen, dass die Umwandlungsreaktion in der geforderten Zeit stattfindet und keine Trübung der Lösung durch Proteine und Lipoproteine auftritt.

ANMERKUNG 1 Die geringsten Messunsicherheiten für das spektrale Absorptionsmaß werden für Werte erreicht, die zwischen 1 und 0,5 liegen ($1 \geq a \geq 0,5$).

Nach Ansetzen der Verdünnung muss abgewartet werden, bis die Erythrozyten durch die Konversionslösung vollständig hämolysiert und die Hämoglobinvarianten und Hämoglobin-analogen Verbindungen mindestens zu 99 % in HiCN umgewandelt worden sind. Die zum Ablauf dieser Vorgänge notwendige Reaktionszeit muss für die verwendete Konversionslösung bekannt sein. Sie beträgt in der Regel 15 min, kann aber bei Anwesenheit von Carboxyhämoglobin in der Probe bis zu 90 min betragen [3]. Die Umwandlung von $\geq 99 \%$ sollte durch eine Endpunktbestimmung dokumentiert werden. Die erzeugte Messlösung muss jeweils unmittelbar vor der spektrometrischen Absorptionsmessung unter Einhaltung der in 6.2.3 angegebenen Anforderung zentrifugiert werden.

The conversion solution is to be stored at room temperature or in the refrigerator. It can be frozen several times, as this does not change its spectral characteristics and reactivity.

The conversion solution shall also comply with the requirements if it has been stored – after having been prepared as described – for six months at a temperature of $T \leq 30 \text{ °C}$ in closed bottles.

6.4 Preparation and realisation of measurements

6.4.1 Reference method HiCN

The temperatures of the sample and of the conversion solution shall be adapted to the room temperature between 18 °C and 24 °C prior to mixing.

The sample shall be diluted at a ratio of 1:50 to 1:500 with the conversion solution, i.e. the volume fraction of the sample in the test sample amounts to $0.02 \geq \phi \geq 0.002$. For samples with a low haemoglobin concentration, large volume fractions are to be given priority (e.g. 1:100), in order to measure in the range of a small measurement uncertainty of the absorption photometer. For large volume fractions of the sample in the test sample it shall be ensured, that the conversion reaction takes place in the time required and no turbidity of the solution appears caused by proteins and lipoproteins.

NOTE 1 The lowest measurement uncertainties for the spectral absorbance are generally achieved for values between 1 and 0.5 ($1 \geq a \geq 0.5$).

After the preparation of the test sample, one has to wait until the erythrocytes have been completely haemolysed by the conversion solution and at least 99 % of the haemoglobin variants and of the haemoglobin-analogous compounds have been converted into HiCN. The reaction time required for these processes shall be known for the conversion solution utilised. Usually the reaction time is 15 minutes. However, it can increase up to 90 minutes if carboxyhaemoglobin is present in the sample [3]. The conversion of $\geq 99 \%$ should be documented by means of end-point determination. The test sample prepared shall be centrifuged directly before the spectrometric absorbance measurement taking into account the requirement in 6.2.3.

ANMERKUNG 2 Untersuchungen zur Reaktionsgeschwindigkeit bei der Konversion von Carboxyhämoglobin in HiCN sind bisher nur an bovinem Blut durchgeführt worden [3]. Weiterhin ist zu beachten, dass die Zeit bis zum Erreichen der Umwandlung von 99 % von der Hämoglobinkonzentration abhängt.

Bei Verwendung von Kontrolllösungen oder Kontrollbluten ist zu beachten, dass längere Reaktionszeiten auftreten können. Gegebenenfalls muss die Reaktionskinetik überprüft werden.

Die Bestimmung des richtigen spektralen Absorptionsmaßes $A(\lambda)$ der Messlösung erfolgt als Differenzmessung mit einem Absorptionsphotometer nach 6.2.1 bei einer Wellenlänge von 540 nm und einer Temperatur zwischen 18 °C und 24 °C gegen die Konversionslösung. Es sind Präzisions-Rechteckküvetten nach DIN 58963-2 zu verwenden. Eine Schichtdicke von 10 mm und die Verwendung von Quarzküvetten sind zu bevorzugen. Für die Messunsicherheit der Bestimmung der Schichtdicke d muss $2 u_{\text{rel}}(d) \leq 0,2 \%$ gelten.

6.4.2 Referenzverfahren AHD

Die Temperatur der Probe und die der Konversionslösung müssen vor dem Vermischen an die Raumtemperatur zwischen 18 °C und 24 °C angeglichen werden.

Die Probe ist im Verhältnis 1:50 bis 1:500 mit der Konversionslösung zu verdünnen, d. h., der Volumenanteil der Probe in der Messlösung beträgt $0,02 \geq \phi \geq 0,002$. Bei Proben mit niedriger Hämoglobin-Konzentration sind große Volumenanteile zu bevorzugen (z. B. 1:100), um im Bereich kleiner Messunsicherheit des Absorptionsphotometers zu messen. Bei großem Volumenanteil der Probe in der Messlösung ist sicherzustellen, dass die Verschiebung des pH-Wertes so gering ist, dass keine signifikante Verlängerung der Reaktionszeit eintritt.

ANMERKUNG Die geringsten Messunsicherheiten für das spektrale Absorptionsmaß werden für Werte erreicht, die zwischen 1 und 0,5 liegen ($1 \geq a \geq 0,5$).

Nach Ansetzen der Verdünnung muss abgewartet werden, bis die Erythrozyten und Leukozyten durch die Konversionslösung vollständig hämolysiert, die Erythrozytenstromata und Lipide solubilisiert und die Hämoglobinvarianten und Hämoglobin-analogen Verbindungen mindestens zu 99 % in den AHD-Komplex umgewandelt worden sind. Die zum Ablauf dieser Vorgänge notwendige Reaktionszeit muss für die verwendete Konversionslösung bekannt sein. Sie beträgt in der Regel etwa 5 min [11]. Die vollständige Umwandlung sollte durch eine Endpunktbestimmung dokumentiert werden.

NOTE 2 Up to now, measurements on the reaction kinetics of carboxyhaemoglobin in HiCN were carried out using bovine blood samples [3]. In addition, it should be considered that the time to reach a conversion of 99 % depends on the haemoglobin concentration.

When using control solutions or control bloods, it shall be considered that longer reaction times can occur. When indicated, the reaction kinetics shall be verified.

The conventional true spectral absorbance $A(\lambda)$ of the test sample is determined with an absorption photometer according to 6.2.1 at a wavelength of 540 nm and a temperature between 18 °C and 24 °C in a difference measurement against the conversion solution. Precision rectangular spectrophotometric cuvettes according to DIN 58963-2 have to be used. Preferably, the layer thickness should be 10 mm and spectrophotometric cuvettes made from quartz should be used. For the layer thickness or absorption length d the measurement uncertainty shall be $2 u_{\text{rel}}(d) \leq 0.2 \%$.

6.4.2 Reference method AHD

The temperatures of the sample and of the conversion solution shall be adapted to the room temperature between 18 °C and 24 °C prior to mixing.

The sample shall be diluted at a ratio of 1:50 to 1:500 with the conversion solution, i.e. the volume fraction of the sample in the test sample amounts to $0.02 \geq \phi \geq 0.002$. For samples with a low haemoglobin concentration, large volume fractions are to be given priority (e.g. 1:100), in order to measure in the range of a small measurement uncertainty of the absorption photometer. For large volume fractions of the sample in the test sample it shall be ensured, that the shift of the pH value is so small, that the reaction time is not changed significantly.

NOTE The lowest measurement uncertainties for the spectral absorbance are generally achieved for values between 1 and 0.5 ($1 \geq a \geq 0.5$).

After the preparation of the test sample, one has to wait until the erythrocytes and leukocytes have been completely haemolysed by the conversion solution, the erythrocyte stromata and lipids have been solubilised and at least 99 % of the haemoglobin variants and of the haemoglobin-analogous compounds have been converted into the AHD complex. The reaction time required for these processes shall be known for the conversion solution utilised. Usually the reaction time is 5 minutes [11]. The complete conversion should be documented by means of end-point determination.

Die Bestimmung des richtigen spektralen Absorptionsmaßes $A(\lambda)$ der Messlösung erfolgt als Differenzmessung mit einem Absorptionsphotometer nach 6.2.1 bei einer Wellenlänge von 574 nm und bei einer Temperatur zwischen 18 °C und 24 °C gegen die Konversionslösung. Es sind Präzisions-Rechteckküvetten nach DIN 58963-2 zu verwenden. Eine Schichtdicke von 10 mm und die Verwendung von Quarzküvetten sind zu bevorzugen. Für die Messunsicherheit der Bestimmung der Schichtdicke d muss $2 u_{rel}(d) \leq 0,2 \%$ gelten.

The conventional true spectral absorbance $A(\lambda)$ of the test sample is determined with an absorption photometer according to 6.2.1 at a wavelength of 574 nm and a temperature between 18 °C and 24 °C in a difference measurement against the conversion solution. Precision rectangular spectrophotometric cuvettes according to DIN 58963-2 have to be used. Preferably, the layer thickness should be 10 mm and spectrophotometric cuvettes made from quartz should be used. For the layer thickness or absorption length d the measurement uncertainty shall be $2 u_{rel}(d) \leq 0.2 \%$.

6.5 Auswertung der Messungen

6.5 Analysis of the measurements

6.5.1 Referenzverfahren HiCN

6.5.1 Reference method HiCN

Die Massenkonzentration $\beta(\text{Hb}(\text{Fe}))$ des monomeren Hämoglobins im Blut wird nach folgender Gleichung (2) berechnet:

The mass concentration $\beta(\text{Hb}(\text{Fe}))$ of the monomeric haemoglobin in blood is calculated according to the following equation:

$$\beta(\text{Hb}(\text{Fe})) = \frac{A(\lambda)_{\text{HiCN}} \cdot M(\text{Hb}(\text{Fe}))}{d \cdot \varepsilon(\lambda) \cdot \phi} \quad (2)$$

Dabei ist

The quantities in equation 2 are defined as follows:

- $A(\lambda)_{\text{HiCN}}$ das richtige spektrale Absorptionsmaß der Messlösung;
- d die Schichtdicke der Präzisions-Rechteckküvette;
- ϕ der Volumenanteil der Probe in der Messlösung;
- $\varepsilon(\lambda)_{\text{HiCN}}$ der molare dekadische Absorptionskoeffizient des HiCN.

- $A(\lambda)_{\text{HiCN}}$ conventional true value of the spectral absorbance of the test sample;
- d layer thickness of the rectangular spectrophotometric cuvette;
- ϕ volume fraction of the sample in the test sample;
- $\varepsilon(\lambda)_{\text{HiCN}}$ molar decadic absorption coefficient of the HiCN.

Wie in 6.2.1, 6.2.2 und 6.4.1 angegeben, müssen für die erweiterten Messunsicherheiten die Anforderungen

As specified in 6.2.1, 6.2.2 and 6.4.1, the following requirements for the expanded measurement uncertainties

$$2 u_{rel}(A(\lambda)_{\text{HiCN}}) \leq 1,0 \%,$$

$$2 u_{rel}(A(\lambda)_{\text{HiCN}}) \leq 1.0 \%,$$

$$2 u_{rel} \phi \leq 0,6 \%,$$

$$2 u_{rel} \phi \leq 0.6 \%,$$

$$2 u_{rel}(d) \leq 0,2 \%$$

$$2 u_{rel}(d) \leq 0.2 \%$$

gelten.

shall be valid.

Der richtige Wert $A(\lambda)_{\text{HiCN}}$ des spektralen Absorptionsmaßes ergibt sich aus dem gemessenen spektralen Absorptionsmaß $a(\lambda)_{\text{HiCN}}$ mithilfe der Gleichung (3):

The conventional true value $A(\lambda)_{\text{HiCN}}$ of the spectral absorbance is derived from the measured spectral absorbance $a(\lambda)_{\text{HiCN}}$ by means of the equation:

$$A(\lambda)_{\text{HiCN}} = (C_0 + C_1 \cdot a(\lambda)_{\text{HiCN}}) \quad (3)$$

Die Konstanten C_0 und C_1 werden durch die Rückführung des Spektralphotometers bei der entsprechenden Messwellenlänge bestimmt. Die Rückführung erfolgt durch die Messung der Extinktion von Filtern, deren spektrale Absorptionsmaße bekannt und auf ein (nationales) Normal zurückgeführt sind. Die Konstanten C_0 und C_1 werden durch den Vergleich der mit dem für die Hb-Konzentrationsbestimmung verwendeten Spektralphotometer gemessenen Werte und den bekannten Werten von mindestens drei Absorptionsfiltern durch eine lineare Regression nach Gleichung (3) berechnet.

Der Volumenanteil ϕ ergibt sich aus dem Volumen der Blutprobe V_B und dem Volumen der Konversionslösung V_K entsprechend

$$\phi = \frac{V_B}{V_B + V_K} \quad (4)$$

Die Massenkonzentration $\beta(\text{Hb(Fe)})$ in g/L wird berechnet, indem man in Gleichung (2) die Schichtdicke d , in cm, den molaren dekadischen Absorptionskoeffizienten $\varepsilon(540)_{\text{HiCN}} = 11,0 \text{ L}/(\text{mmol} \cdot \text{cm})$ und das Molekulargewicht $M(\text{Hb(Fe)}) = 16\,114,5 \text{ g/mol}$ einsetzt [1].

Soll die Stoffmengenkonzentration $c(\text{Hb(Fe)})$ in mmol/L angegeben werden, so ist anstelle Gleichung (2) die Gleichung (5)

$$c(\text{Hb(Fe)}) = \frac{A(540\text{nm})_{\text{HiCN}}}{d \cdot \varepsilon(540\text{nm})_{\text{HiCN}} \cdot \phi} \quad (5)$$

zu verwenden.

6.5.2 Referenzverfahren AHD

Die Massenkonzentration $\beta(\text{Hb(Fe)})$ des monomeren Hämoglobins im Blut wird nach folgender Gleichung (6) berechnet:

$$\beta(\text{Hb(Fe)}) = \frac{A(\lambda)_{\text{AHD}} \cdot M(\text{Hb(Fe)})}{d \cdot \varepsilon(\lambda)_{\text{AHD}} \cdot \phi} \quad (6)$$

The constants C_0 and C_1 are determined by back tracing of the spectral photometer at the respective wavelength used for measurement. To this end the extinction of absorption filters, whose spectral absorbance is known and which has been traced back to a (national) standard, has to be measured. The constants C_0 and C_1 are calculated by comparing the values measured by means of the spectrophotometer used for the determination of the Hb concentration with the known values of at least three absorption filters by a linear regression according to equation (3).

The volume fraction ϕ results from the volume of the blood sample V_B and the volume of the conversion solution V_K according to

The mass concentration $\beta(\text{Hb(Fe)})$ in g/L is calculated by entering, into equation (2), the layer thickness d in cm, the molar decadic absorption coefficient $\varepsilon(540)_{\text{HiCN}} = 11.0 \text{ L}/(\text{mmol cm})$ and the molecular weight $M(\text{Hb(Fe)}) = 16\,114.5 \text{ g/mol}$ [1].

If the amount- of-substance concentration $c(\text{Hb(Fe)})$ in mmol/L has to be declared, the following equation

shall be used instead of equation (2).

6.5.2 Reference method AHD

The mass concentration $\beta(\text{Hb(Fe)})$ of the monomeric haemoglobin in blood is calculated according to the following equation:

Dabei ist

- $A(\lambda)_{\text{AHD}}$ das richtige spektrale Absorptionsmaß der Messlösung;
- d die Schichtdicke der Präzisions-Rechteckküvette;
- ϕ der Volumenanteil der Probe in der Messlösung;
- $a(\lambda)_{\text{AHD}}$ der molare dekadische Absorptionskoeffizient des AHD.

Wie in 6.2.1, 6.2.2 und 6.4.2 angegeben, müssen für die erweiterten Messunsicherheiten die Anforderungen

- $2 u_{\text{rel}} (A(\lambda)_{\text{AHD}}) \leq 1,0 \%$,
- $2 u_{\text{rel}} \phi \leq 0,6 \%$,
- $2 u_{\text{rel}} (d) \leq 0,2 \%$

gelten.

Der richtige Wert $A(\lambda)_{\text{AHD}}$ des spektralen Absorptionsmaßes ergibt sich aus dem gemessenen spektralen Absorptionsmaß $a(\lambda)_{\text{AHD}}$ mithilfe der Gleichung (7):

$$A(\lambda)_{\text{AHD}} = (C_0 + C_1 \cdot a(\lambda)_{\text{AHD}}) \tag{7}$$

Die Konstanten C_0 und C_1 werden durch die Rückführung des Spektralphotometers bei der entsprechenden Messwellenlänge bestimmt. Die Rückführung erfolgt durch die Messung der Extinktion von Filtern, deren spektrale Absorptionsmaße bekannt und auf ein (nationales) Normal zurückgeführt sind. Die Konstanten C_0 und C_1 werden durch den Vergleich der mit dem für die Hb-Konzentrationsbestimmung verwendeten Spektralphotometer gemessenen Werte und den bekannten Werten von mindestens drei Absorptionsfiltern durch eine lineare Regression nach Gleichung (7) berechnet.

Der Volumenanteil ϕ ergibt sich aus dem Volumen der Blutprobe V_B und dem Volumen der Konversionslösung V_K entsprechend

$$\phi = \frac{V_B}{V_B + V_K} \tag{8}$$

The quantities in equation 6 are defined as follows:

- $A(\lambda)_{\text{AHD}}$ conventional true value of the spectral absorbance of the test sample;
- d layer thickness of the rectangular spectrophotometric cuvette;
- ϕ volume fraction of the sample in the test sample;
- $a(\lambda)_{\text{AHD}}$ molar decadic absorption coefficient of the AHD complex.

As specified in 6.2.1, 6.2.2 and 6.4.2 the following requirements for the expanded measurement uncertainties

- $2 u_{\text{rel}} (A(\lambda)_{\text{AHD}}) \leq 1.0 \%$
- $2 u_{\text{rel}} (\phi) \leq 0.6 \%$
- $2 u_{\text{rel}} (d) \leq 0.2 \%$

shall be valid.

The conventional true value $A(\lambda)_{\text{AHD}}$ of the spectral absorbance is derived from the measured spectral absorbance $a(\lambda)_{\text{AHD}}$ by means of the following equation:

The constants C_0 and C_1 are determined by back tracing of the spectral photometer at the respective wavelength used for measurement. To this end the extinction of absorption filters, whose spectral absorbance is known and which has been traced back to a (national) standard, has to be measured. The constants C_0 and C_1 are calculated by comparing the values measured by means of the spectrophotometer used for the determination of the Hb concentration with the known values of at least three absorption filters by a linear regression according to equation (7).

The volume fraction ϕ results from the volume of the blood sample V_B and the volume of the conversion solution V_K according to

Die Massenkonzentration $\beta(\text{Hb}(\text{Fe}))$, in g/L, wird berechnet, indem man in Gleichung (6) die Schichtdicke d , in cm, den molaren dekadischen Absorptionskoeffizienten

$\varepsilon(574)_{\text{AHD}} = (6,945 \pm 0,019) \text{ L}/(\text{mmol cm})$ [7] und das Molekulargewicht $M(\text{Hb}(\text{Fe})) = 16\,114,5 \text{ g/mol}$ einsetzt [1].

Soll die Stoffmengenkonzentration $c(\text{Hb}(\text{Fe}))$ in mmol/L angegeben werden, so ist anstelle Gleichung (6) die Gleichung (9)

$$c(\text{Hb}(\text{Fe})) = \frac{A(574 \text{ nm})_{\text{AHD}}}{d \cdot \varepsilon(574 \text{ nm})_{\text{AHD}} \cdot \phi} \quad (9)$$

zu verwenden.

7 Messunsicherheit der Referenzverfahren

Systematische Messabweichungen können unter anderem verursacht werden durch:

- fehlerhaft kalibrierte Volumenmessgeräte;
- fehlerhafte und unsaubere Küvetten;
- Dejustage des Strahlenganges durch die Küvette (Abweichungen von der Symmetrieachse der Küvette, nicht senkrechter Lichteinfall);
- Temperatur außerhalb des vorgegebenen Bereichs;
- nicht abgeschlossene Umsetzung des Hämoglobins zum Endprodukt (Cyanhämoglobin bzw. AHD-Komplex);
- Existenz von Partikeln oder Trübungen in der Messlösung.

ANMERKUNG 1 Beim HiCN-Verfahren wird die Reaktionskinetik beeinflusst durch die NaCl-Konzentration. Die Reaktionskinetik bei der AHD-Methode ist dagegen von der Triton-X-100-Konzentration nahezu unabhängig [11].

The mass concentration $\beta(\text{Hb}(\text{Fe}))$ in g/L is calculated by entering, into equation (6), the layer thickness d in cm, the molar decadic absorption coefficient

$\varepsilon(574)_{\text{AHD}} = (6.945 \pm 0.019) \text{ L}/(\text{mmol cm})$ [7] and the molecular weight $M(\text{Hb}(\text{Fe})) = 16\,114.5 \text{ g/mol}$ [1].

If the amount-of-substance concentration $c(\text{Hb}(\text{Fe}))$ in mmol/L has to be declared, the following equation

shall be used instead of equation (6).

7 Measurement uncertainty of the reference methods

Systematic measurement deviations can be caused, among other things by

- falsely calibrated volume measuring instruments;
- faulty and unclean spectrophotometric cuvettes;
- misaligned ray path through the spectrophotometric cuvette (with respect to the symmetry axis of the cuvette, non-perpendicular incidence of light);
- temperature outside the specified range;
- uncompleted conversion of haemoglobin into the end product (cyanhaemoglobin or AHD complex);
- existence of particles or turbidity in the test sample.

NOTE 1 The conversion kinetics of the HiCN method depends on the concentration of NaCl, while the conversion kinetics of the AHD method is almost independent on the Triton X-100 concentration [11].

Systematische Messabweichungen müssen quantifiziert und — wenn erforderlich — korrigiert werden.

Systematic measurement deviations shall be quantified and — if necessary — corrected.

Die Messunsicherheit der Hämoglobinkonzentration ergibt sich aus der Wurzel der Summe der Quadrate der für die genannten Einflüsse verbleibenden, quantitativ abzuschätzenden zufälligen Komponenten. Die relative Gesamtmessunsicherheit der Hämoglobin-Konzentration muss geringer als 1,5 % sein ($2 u_{rel}(\beta(\text{Hb}(\text{Fe}))) < 1,5 \%$).

The measurement uncertainty of the haemoglobin concentration follows from the square root of the sum of the squares of the estimated uncertainties of the above-mentioned influences. The total relative measurement uncertainty of the haemoglobin concentration shall be lower than 1.5 % ($2 u_{rel}(\beta(\text{Hb}(\text{Fe}))) \leq 1.5 \%$).

ANMERKUNG 2 Aus der (quadratischen) Fortpflanzung ergibt sich aus den Messunsicherheiten in 6.5.1 und 6.5.2 die Gesamtmessunsicherheit des Mittelwertes der Massenkonzentration $\bar{\beta}$ für eine bestimmte Verdünnung i zu:

NOTE 2 From the (quadratic) error or uncertainty propagation, the total measurement uncertainty $\bar{\beta}$ is obtained from the measurement uncertainties specified in 6.5.1 and 6.5.2 for a specific dilution according to

$$2 \cdot u_{rel}(\bar{\beta}_i) = \sqrt{(2 \cdot u_{rel}(\bar{A}_i))^2 + (2 \cdot u_{rel}(\phi_i))^2 + (2 \cdot u_{rel}(d))^2} \tag{10}$$

$$= \sqrt{(0,01)^2 + (0,006)^2 + (0,002)^2} \approx 1,2\%$$

Die Messunsicherheit des Mittelwertes des richtigen spektralen Absorptionsmaßes \bar{A}_i folgt dabei aus

The measurement uncertainty of the mean value of the conventional true value of the spectral absorbance \bar{A}_i follows from

$$2 \cdot u_{rel}(\bar{A}_i) = \frac{1}{A} \cdot \sqrt{(2 \cdot u(C_0))^2 + (C_1 \cdot \bar{a}_i)^2 \cdot \left[(2 \cdot u_{rel}(C_1))^2 + (2 \cdot u_{rel}(\bar{a}_i))^2 \right]} \tag{11}$$

Die Messunsicherheit des Mittelwertes des gemessenen spektralen Absorptionsmaßes \bar{a}_i setzt sich zusammen aus der Standardabweichung $s(a_{i,j})$, dem Absorptionsunterschied der Küvetten und dem Beitrag aufgrund der Digitalisierung der Messwerte [9], [10]:

The measurement uncertainty of the mean value of the measured spectral absorbance \bar{a}_i is composed of the standard deviation $s(a_{i,j})$, the absorption difference of the spectrophotometric cuvettes and the contribution due to the digitisation of the measured values [9], [10]:

$$2 \cdot u_{rel}(\bar{a}_i) = \frac{2}{\bar{a}_i} \cdot \sqrt{\frac{(s(a_{i,j}))^2}{n} + (\Delta a_{Küvette})^2 + \left(\frac{\delta a^2}{12}\right)} \tag{12}$$

$$= \frac{2}{\bar{a}_i} \cdot \sqrt{\frac{1}{n \cdot (n-1)} \cdot \sum_{j=1}^k (a_{i,j} - \bar{a}_i)^2 + (\Delta a_{Küvette})^2 + \left(\frac{\delta a^2}{12}\right)}$$

Dabei bedeutet n die Anzahl der Wiederholungsmessungen für eine bestimmte Verdünnung i . Die Differenz des spektralen Absorptionsmaßes bei Verwendung von zwei Küvetten mit Konversionslösung ist mit $\Delta a_{Küvette}$ bezeichnet. Die Größe δa gibt die Auflösung des Absorptionsphotometers für das spektrale Absorptionsmaß aufgrund der Digitalisierung an. Die erweiterte Messunsicherheit mit dem Erweiterungsfaktor $k = 2$ bezieht sich

n being the number of repeat measurements for a specific dilution i . The difference of the spectral absorbance when using two spectrophotometric cuvettes with conversion solution is referred to as $\Delta a_{Küvette}$. The quantity δa indicates the resolution of the absorption photometer for the spectral absorbance due to the digitisation. The expanded measurement uncertainty with the expansion factor $k = 2$ refers to a "level of confidence" of 95.45 % for

auf ein Vertrauensniveau von 95,45 % für eine Größe mit einer Normalverteilung. Der Erweiterungsfaktor k muss gegebenenfalls angepasst werden, um dasselbe Vertrauensniveau bei einer geringeren Stichprobenanzahl zu erhalten [9].

8 Qualitätskontrolle der Referenzverfahren

8.1 Allgemeines

Die für die Qualitätskontrolle der Referenzverfahren zu verwendenden Absorptionsphotometer sind auf Präzision und Richtigkeit der gemessenen spektralen Absorptionsmaße mit geeigneten Filtern oder mit Kontrolllösungen zu prüfen, deren spektrales Absorptionsmaß mit einer Messunsicherheit bestimmt worden ist, die höchstens ein Drittel der Messunsicherheit der in dieser Norm beschriebenen Referenzmethoden ($2 u_{\text{rel}}(\bar{A}(\lambda)) \leq 0,5 \%$) betragen darf.

8.2 Referenzverfahren HiCN

8.2.1 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 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 HiCN überführt sein. Es ist sicherzustellen, dass eine Reaktionszeit von mindestens 60 min eingehalten wird.

ANMERKUNG 1 Die Reaktionszeit wird durch die Konzentration der in 6.3.1 beschriebenen Stoffe in der Konversionslösung sowie durch den pH-Wert und die Temperatur beeinflusst. Zu beachten ist außerdem, dass die vollständige Umwandlung des Carboxyhämoglobins in das Reaktionsprodukt HiCN bei den angegebenen Verdünnungen etwa 60 min bis 90 min dauert [3].

Das nach Ablauf der Reaktionszeit bei 540 nm gemessene spektrale Absorptionsmaß darf während eines Zeitraumes von 24 h keine größere Abweichung als $\pm 1 \%$ aufweisen, wenn die angesetzte Messlösung bei einer Temperatur von 18 °C bis 24 °C unter Vermeidung direkter

a quantity with a normal distribution. If necessary, the expansion factor k shall be adapted in order to achieve the same level of confidence with a lower number of random samples [9].

8 Quality control of the reference methods

8.1 General

The absorption photometers to be used for the quality control of the reference methods shall be checked for precision and accuracy of the measured spectral absorbance with appropriate filters or with control solutions whose spectral absorbance has been determined with a measurement uncertainty amounting to at most a third of the measurement uncertainty of the reference methods described in this standard, i.e. ($2 u_{\text{rel}}(\bar{A}(\lambda)) \leq 0.5 \%$).

8.2 Reference method HiCN

8.2.1 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 degree of purity.

The conversion solution shall be able to completely haemolyse the sample with 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 a ratio of 1:151, at least 99 % of the haemoglobin in the blood sample shall have been converted into HiCN after the reaction time has expired. It shall be ensured that a reaction time of at least 60 minutes is maintained.

NOTE 1 The reaction time is influenced by the concentration of the substances described in 6.3.1 and contained in the conversion solution as well as by the pH value and the temperature. Furthermore, it should be taken into account that the complete conversion of the carboxyhaemoglobin into the reaction product HiCN will take about 60 to 90 minutes for the dilutions specified [3].

The spectral absorbance measured at 540 nm after the reaction time has expired shall not show any deviation larger than $\pm 1 \%$ 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, changes of concentration due to evaporation, and microbial contamination have

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.

Anhang A
(informativ)

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

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

In dem folgenden Beispiel wird der Referenzmesswert für die Hämoglobinkonzentration $\beta(\text{Hb}(\text{Fe}))$ durch die Messung von vier verschiedenen Verdünnungen i mit jeweils 5 Wiederholungsmessungen j bestimmt. In Tabelle A.1 sind die Volumenanteile ϕ_i und dessen Messunsicherheiten $u(\phi_i)$ sowie die gemessenen Werte des spektralen Absorptionsmaßes $a_{i,j}$ der Mittelwert des spektralen Absorptionsmaßes \bar{a}_i und die Standardabweichung $s(a_{i,j})$ angegeben. Die Präparation der Verdünnungen erfolgte gravimetrisch durch Einwaage der Konversionslösung und des Blutes. Der Volumenanteil ϕ ist gegeben durch:

$$\phi = \frac{V_{\text{Blut}}}{V_{\text{Blut}} + V_{\text{KL}}} = \frac{\left(\frac{m_{\text{Blut}}}{\rho_{\text{Blut}}} \right)}{\left(\frac{m_{\text{Blut}}}{\rho_{\text{Blut}}} \right) + \left(\frac{m_{\text{KL}}}{\rho_{\text{KL}}} \right)} \quad (\text{A.1})$$

Dabei ist

- V das Volumen;
- m die Masse;
- ρ die Dichte der Blutprobe und der Konversionslösung (Index KL).

Annex A
(informative)

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

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

In the following example, the reference value for the haemoglobin concentration $\beta(\text{Hb}(\text{Fe}))$ is determined by measuring four different dilutions i with 5 repeat measurements j each. In Table A.1, the volume fractions ϕ_i and their measurement uncertainties $u(\phi_i)$ as well as the measured values of the spectral absorbance $a_{i,j}$, the mean value of the spectral absorbance \bar{a}_i and the standard deviation $s(a_{i,j})$ are given. The dilutions were prepared gravimetrically by weighing the conversion solution and the blood. The volume fraction ϕ is given by

Tabelle A.1 — Messdaten zur Bestimmung von Referenzmesswerten für die Hämoglobinkonzentration für vier verschiedene Verdünnungen

Table A.1 — Measured data (four different dilutions) for the determination of reference measurement values for the haemoglobin concentration

Verdünnung	Wiederholungsmessung	Volumenanteil	Messunsicherheit des Volumenanteils	Gemessenes spektrales Absorptionsmaß	Mittelwert des gemessenen spektralen Absorptionsmaßes	Standardabweichung des gemessenen spektralen Absorptionsmaßes
Dilution	Repeat measurement	Volume fraction	Measurement uncertainty of the volume fraction	Measured spectral absorbance	Mean value of the measured spectral absorbance	Standard deviation of the measured spectral absorbance
i	j	ϕ_i	$u(\phi_i)$	$a_{i,j}$	\bar{a}_i	$s(a_{i,j})$
1	1	$7,403 \cdot 10^{-3}$	$0,005 \cdot 10^{-3}$	0,765 9	0,765 9	$8,4 \cdot 10^{-5}$
	2			0,765 9		
	3			0,766 0		
	4			0,765 8		
	5			0,765 8		
2	1	$5,792 \cdot 10^{-3}$	$0,005 \cdot 10^{-3}$	0,596 9	0,596 9	$4,5 \cdot 10^{-5}$
	2			0,597 0		
	3			0,596 9		
	4			0,596 9		
	5			0,596 9		
3	1	$4,140 \cdot 10^{-3}$	$0,005 \cdot 10^{-3}$	0,427 8	0,427 8	$8,4 \cdot 10^{-5}$
	2			0,427 7		
	3			0,427 7		
	4			0,427 8		
	5			0,427 9		
4	1	$2,397 \cdot 10^{-3}$	$0,004 \cdot 10^{-3}$	0,249 5	0,249 4	$4,5 \cdot 10^{-5}$
	2			0,249 4		
	3			0,249 4		
	4			0,249 4		

Tabelle A.2 — Formelzeichen und Messunsicherheiten der Messgrößen zur Berechnung der Hämoglobinkonzentration im Blut

Table A.2 — Formula symbols and measurement uncertainties of the measurands required for the determination of the haemoglobin concentration in blood

Messgröße	Formelzeichen	Typische Werte	Messunsicherheit	Einheit	Relative Messunsicherheit
Measurand	Formula symbol	Typical values	Measurement uncertainty	Unit	Relative measurement uncertainty
Masse der Blutprobe	m_{Blut}	0,2	$u(m_{Blut}) = 1 \cdot 10^{-4}$	g	$u_{rel}(m_{Blut}) = 5 \cdot 10^{-4}$
Mass of the blood sample					
Masse der Konversionslösung	m_{KL}	20	$u(m_{KL}) = 1 \cdot 10^{-4}$	g	$u_{rel}(m_{KL}) = 5 \cdot 10^{-6}$
Mass of the conversion solution					
Dichte	ρ	1	$u(\rho) = 5 \cdot 10^{-5}$	g cm ⁻³	$u_{rel}(\rho) = 5 \cdot 10^{-5}$
Density					
Volumenanteil der Blutprobe in der Messlösung	ϕ	$2 \cdot 10^{-3} \leq \phi \leq 2 \cdot 10^{-2}$ $10^{-6} \leq u(\phi) \leq 10^{-5}$		1	$u_{rel}(\phi) = 5 \cdot 10^{-4}$
Volume fraction of the blood sample in the test sample					

Die zur Berechnung der Volumina und des Volumenanteils erforderlichen Dichten wurden mithilfe eines Biegeschwinger-Dichtemessinstrumentes bestimmt, das eine relative Messunsicherheit kleiner als 10⁻⁴ (Tabelle A.2) aufweist.

Aus den Angaben für typische Werte der Einwaage und der Dichte von Konversionslösung und Blut und deren Abweichungen (Tabelle A.2) folgen die relativen Messunsicherheiten der Volumina:

The densities required for the calculation of the volumes and the volume fraction were determined by the mechanical oscillator technique with an uncertainty less than 10⁻⁴ (Table A.2).

Using the listed typical values of the weight of the sample and the density of the conversion solution and blood including their measurement uncertainties (Table A.2), the relative measurement uncertainties of the volumes are obtained according to

$$u_{rel}(V_{Blut}) = \sqrt{(u_{rel}(m_{Blut}))^2 + (u_{rel}(\rho_{Blut}))^2} = \sqrt{(5 \cdot 10^{-4})^2 + (5 \cdot 10^{-5})^2} \approx 5 \cdot 10^{-4} \quad (A.2)$$

$$u_{rel}(V_{KL}) = \sqrt{(u_{rel}(m_{KL}))^2 + (u_{rel}(\rho_{KL}))^2} = \sqrt{(5 \cdot 10^{-6})^2 + (5 \cdot 10^{-5})^2} \approx 5 \cdot 10^{-5} \quad (A.3)$$

$$u_{rel}(V_{Blut} + V_{KL}) = \frac{1}{V_{Blut} + V_{KL}} \cdot \sqrt{(u(V_{Blut}))^2 + (u(V_{KL}))^2} \quad (A.4)$$

$$= \frac{1}{20,2} \cdot \sqrt{(10^{-4})^2 + (10^{-3})^2} \approx 5 \cdot 10^{-5}$$

Die Betrachtung zeigt, dass die relative Messunsicherheit des Volumenanteils der Blutprobe in der Messlösung

It follows from this comparison that the relative measurement uncertainty of the volume fraction of the blood sample in the test sample

$$u_{rel}(\phi) = \sqrt{(u_{rel}(V_{Blut}))^2 + (u_{rel}(V_{Blut} + V_{KL}))^2} = \sqrt{(5 \cdot 10^{-4})^2 + (5 \cdot 10^{-5})^2} \approx 5 \cdot 10^{-4} \quad (\text{A.5})$$

näherungsweise der relativen Messunsicherheit der Massenbestimmung m_{Blut} entspricht, da alle übrigen Messunsicherheiten wesentlich geringere Beiträge aufweisen. Das bedeutet, die in Tabelle A.2 angegebenen Messunsicherheiten werden im Wesentlichen bestimmt durch die Messunsicherheit bei der Einwaage des Blutes von typisch 200 mg. Aufgrund der Messunsicherheit durch die Auflösung der Waage von $\delta m = 0,1$ mg folgt bei einer Gesamtmenge von 20,2 g (Konversionslösung und Blut) mit einem Volumenanteil $\phi \approx 10^{-2}$ eine Messunsicherheit von

corresponds approximately to the relative measurement uncertainty of the mass m_{Blut} , as all remaining measurement uncertainties have substantially lower contributions. This means that the measurement uncertainties specified in Table A.2 are essentially determined by the measurement uncertainty when weighting in typically 200 mg of blood. Considering the measurement uncertainty due to the resolution of the analytical balance of $\delta m = 0.1$ mg, a total volume of 20.2 g (conversion solution and blood) and a volume fraction of $\phi \approx 10^{-2}$ the uncertainty of the volume fraction is given by

$$u(\phi) = \phi \cdot u_{rel}(\phi) = 10^{-2} \cdot 5 \cdot 10^{-4} = 5 \cdot 10^{-6} \quad (\text{A.6})$$

Das spektrale Absorptionsmaß wurde bei 540 nm mit einem Zweistrahlphotometer als Differenz zwischen einer Küvette mit der Messlösung im Messstrahlengang und einer Küvette mit Konversionslösung im Referenzstrahlengang ermittelt. Die jeweiligen Küvettenpaare wurden durch Vorexperimente ausgewählt, um sicherzustellen, dass der Unterschied des spektralen Absorptionsmaßes zwischen beiden Küvetten $\Delta a_{Küvette}$ bei Verwendung von Konversionslösung kleiner als 10^{-4} ist. Damit repräsentieren die Messdaten für das gemessene spektrale Absorptionsmaß in Tabelle A.1 die vom HiCN verursachte Absorption.

The spectral absorbance was determined at 540 nm by means of a double-beam photometer. The difference was measured between a spectrophotometric cuvette with the test sample placed in one of the beam paths and a spectrophotometric cuvette with conversion solution in the second (reference) path. The respective pairs of spectrophotometric cuvettes were chosen by selection experiments to make sure that the difference of the spectral absorbance $\Delta a_{Küvette}$ between both spectrophotometric cuvettes, when using a conversion solution, is smaller than 10^{-4} . Thus, the measured data for the measured spectral absorbance in Table A.1 represent the absorption caused by the HiCN.

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

Aus den Messwerten in Tabelle A.1 werden die Mittelwerte für das spektrale Absorptionsmaß \bar{a}_i und die Messunsicherheiten $u(\bar{a}_i)$ berechnet. Bei der Berechnung der erweiterten Messunsicherheit ergeben drei Beiträge entsprechend

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

From the measured values in Table A.1, the mean values for the spectral absorbance \bar{a}_i and the measurement uncertainties $u(\bar{a}_i)$ are calculated. For the calculation of the expanded measurement uncertainty, three contributions are considered according to

$$k \cdot u(\bar{a}_i) = k \cdot \sqrt{\frac{(s(a_{i,j}))^2}{n} + (\Delta a_{Küvette})^2 + \left(\frac{\delta a^2}{12}\right)} \quad (\text{A.7})$$

Dabei ist

- $s(a_{i,j})$ die Standardabweichung des gemessenen spektralen Absorptionsmaßes;
- $\dots \Delta a_{Küvette}$ der Unterschied des spektralen Absorptionsmaßes zwischen zwei Küvetten bei Verwendung von Küvettenpaaren mit je einer Küvette für den Messstrahlengang und den Referenzstrahlengang;
- δa der Digitalisierungsfehler [9], [10];
- n die Anzahl der Wiederholungsmessungen;
- k der Erweiterungsfaktor zur Angabe der erweiterten Messunsicherheit.

with

- $s(a_{i,j})$ standard deviation of the measured spectral absorbance,
- $\dots \Delta a_{Küvette}$ difference of the spectral absorbance between two spectrophotometric cuvettes when using cuvette pairs with one cuvette placed in the measurement light beam and the other in the reference path,
- δa digitisation error [9], [10],
- n number of repetition measurements,
- k expansion factor for the specification of the expanded measurement uncertainty.

Zur Abschätzung des Erweiterungsfaktors wird für alle drei Beiträge eine Normalverteilung angenommen. Damit gilt $k = 2$ für ein Vertrauensniveau von 95,45 %. In dem hier beschriebenen Beispiel sind die Beiträge der Standardabweichung $s(a_{i,j})$ (Tabelle A.1) und des Digitalisierungsfehlers $\delta a = 0,000 1$ gegenüber dem Unterschied des spektralen Absorptionsmaßes $\Delta a_{Küvette} = 0,000 1$ bei Verwendung von Küvettenpaaren mit je einer Küvette für den Messstrahlengang und den Referenzstrahlengang zu vernachlässigen. Für die Messunsicherheit des Mittelwertes gilt daher $u(\bar{a}_i) \approx \Delta a_{Küvette} = 0,000 1$, wie in Tabelle A.3 angegeben. Die Anzahl der Wiederholungsmessungen in dem Beispiel beträgt $n = 5$.

To estimate the expansion factor, a normal distribution is assumed for all three contributions. Thus, $k = 2$ applies to a confidence level of 95.45 %. In the example described, the contributions of the standard deviation $s(a_{i,j})$ (Table A.1) and of the digitisation error $\delta a = 0.0001$ are negligible compared to the difference of the spectral absorbance $\Delta a_{Küvette} = 0.0001$ when using pairs of selected spectrophotometric cuvette placed in the measurement and reference path, respectively. For the measurement uncertainty of the mean value, $u(\bar{a}_i) \approx \Delta a_{Küvette} = 0.000 1$ therefore applies, as specified in Table A.3. The number of repetition measurements in the example amounts to $n = 5$.

Tabelle A.3 — Mittelwerte und Messunsicherheiten des gemessenen spektralen Absorptionsmaßes \bar{a}_i
Table A.3 — Mean values and measurement uncertainties of the measured spectral absorbance \bar{a}_i

Verdünnung	Volumenanteil	Messunsicherheit des Volumenanteils		Mittelwert des gemessenen spektralen Absorptionsmaßes	Messunsicherheit des Mittelwertes	
Dilution	Volume fraction	Measurement uncertainty of the volume fraction		Mean value of the measured spectral absorbance	Measurement uncertainty of the mean value	
i	ϕ_i	$u(\phi_i)$	$2 \cdot u_{rel}(\phi_i)$	\bar{a}_i	$u(\bar{a}_i)$	$2 \cdot u_{rel}(\bar{a}_i)$
1	$7,403 \cdot 10^{-3}$	$0,005 \cdot 10^{-3}$	0,14 %	0,765 9	0,000 1	0,03 %
2	$5,792 \cdot 10^{-3}$	$0,005 \cdot 10^{-3}$	0,18 %	0,596 9	0,000 1	0,03 %
3	$4,140 \cdot 10^{-3}$	$0,005 \cdot 10^{-3}$	0,25 %	0,427 8	0,000 1	0,05 %
4	$2,397 \cdot 10^{-3}$	$0,004 \cdot 10^{-3}$	0,35 %	0,249 4	0,000 1	0,08 %

Aus den Messwerten \bar{a}_i wird das richtige spektrale Absorptionsmaß \bar{A}_i und die Hämoglobinkonzentration mithilfe der in 6.5.1 angegebenen Gleichungen (2) und (3)

From the measured values \bar{a}_i , the conventional true value of the spectral absorbance \bar{A}_i and the haemoglobin concentration are calculated by means of the equations (2) and (3) specified in section 6.5.1

$$\bar{A}_i(\lambda)_{\text{HICN}} = (C_0 + C_1 \cdot \bar{a}_i(\lambda)_{\text{HICN}}) \quad (\text{A.8})$$

und

and

$$\bar{\beta}_i = \frac{\bar{A}_i \cdot M(\text{Hb}(\text{Fe}))}{d \cdot \varepsilon(\lambda)_{\text{HICN}} \cdot \phi_i} \quad (\text{A.9})$$

berechnet. Die Konstanten C_0 und C_1 wurden mithilfe von Absorptionsfiltern, deren spektrales Absorptionsmaß auf nationale oder internationale Standards zurückgeführt sind, für das verwendete Absorptionsphotometer zu $C_0 = -0,000\ 93 \pm 0,005$ und $C_1 = 1,001\ 93 \pm 0,003$ bestimmt. Die Schichtdicke der Küvette beträgt 10 mm, für das Molekulargewicht und den molaren dekadischen Absorptionskoeffizienten wurden die Werte $M(\text{Hb}(\text{Fe})) = 16\ 114,5\ \text{g/mol}$ [1] und $\varepsilon(540)_{\text{HICN}} = 11,0\ \text{L}/(\text{mmol} \cdot \text{cm})$ verwendet. Die berechneten Mittelwerte des richtigen spektralen Absorptionsmaßes für die vier Verdünnungen sind in Tabelle A.4 aufgeführt.

Using absorption filters whose spectral absorbance is traced back to an national standard, the constant quantities C were determined for the absorption photometer employed to be $C_0 = -0.000\ 93 \pm 0.005$ and $C_1 = 1.001\ 93 \pm 0.003$. The layer thickness of the spectrophotometric cuvette is 10 mm. For the molecular weight and the molar decadic absorption coefficient the values $M(\text{Hb}(\text{Fe})) = 16\ 114.5\ \text{g/mol}$ [1] and $\varepsilon(540)_{\text{HICN}} = 11.0\ \text{L}/(\text{mmol cm})$ were used. The calculated mean values of the conventional true spectral absorbance for the four dilutions are given in Table A.4.

Die entsprechenden Messunsicherheiten ergeben sich aus den folgenden Gleichungen (A.10) und (A.11) (siehe [9]):

The corresponding measurement uncertainties result from the following equations(A.10) and (A.11) (see [9])

$$u(\bar{A}_i) = \sqrt{(u(C_0))^2 + (C_1 \cdot \bar{a}_i)^2 \cdot \left[(u_{rel}(C_1))^2 + (u_{rel}(\bar{a}_i))^2 \right]}$$

$$u(\bar{A}_i) = \sqrt{(u(C_0))^2 + (\bar{a}_i)^2 \cdot (u(C_1))^2 + (C_1)^2 \cdot (u(\bar{a}_i))^2}$$

(A.10)

und

and

$$u(\bar{\beta}_i) = \bar{\beta}_i \sqrt{(u_{rel}(\bar{A}_i))^2 + (u_{rel}(\phi_i))^2 + (u_{rel}(d))^2}$$

(A.11)

unter Verwendung der Messunsicherheiten in Tabelle A.2 für den Volumenanteil ϕ_i und den Mittelwert \bar{a}_i und der Messunsicherheit $u(d) = 10 \mu\text{m}$ ($2 \cdot u_{rel}(d) = 0,2 \%$ für die Dicke der Küvette. Die Hämoglobinkonzentration ist in Bild A.1 als Funktion des Volumenanteils ϕ_i dargestellt. In der Graphik sind außerdem die Messunsicherheiten $u(\bar{\beta}_i)$ und $u(\phi_i)$ angegeben, wobei die Messunsicherheiten des Volumenanteils geringer als die Größe der Punkte sind. Die durchgezogene Gerade kennzeichnet den Mittelwert der vier Messserien, die gestrichelten Geraden geben die einfache Messunsicherheit des Mittelwertes an. Sowohl aus der Tabelle als auch aus der graphischen Darstellung ist ersichtlich, dass mit geringerem Volumenanteil der Probe in der Messlösung die Messunsicherheiten ansteigen. Dabei wird der größte Anteil an der Messunsicherheit durch die Absorptionmessung verursacht.

by using the measurement uncertainties specified in Table A.2 for the volume fraction ϕ_i and the mean value \bar{a}_i and the measurement uncertainty $u(d) = 10 \mu\text{m}$ ($2 \cdot u_{rel}(d) = 0.2 \%$ for the layer thickness of the spectrophotometric cuvette. The haemoglobin concentration is represented in Figure A.1 as a function of the volume fraction ϕ_i . In addition, the measurement uncertainties $u(\bar{\beta}_i)$ and $u(\phi_i)$ are plotted in the graphic. It should be noted, that the measurement uncertainties of the volume fraction are smaller than the size of the dots. The straight line indicates the mean value derived from the four measurement series, the dashed lines illustrate the (non-expanded) uncertainty of the mean value. It follows from the table and the graphical presentation that the measurement uncertainties increase with decreasing volume fraction of the sample in the test solution. The largest contingent of the measurement uncertainty is caused by absorption measurement.

Tabelle A.4 — Mittelwerte und Messunsicherheiten des richtigen spektralen Absorptionsmaßes \bar{A}_i und der Hämoglobinkonzentration $\bar{\beta}_i$

Table A.4 — Mean values and measurement uncertainties of the conventional true spectral absorbance \bar{A}_i and of the haemoglobin concentration $\bar{\beta}_i$

Verdünnung	Mittelwert des richtigen spektralen Absorptionsmaßes	Messunsicherheit des Mittelwertes des richtigen spektralen Absorptionsmaßes		Mittelwert der Hämoglobinkonzentration	Messunsicherheit des Mittelwertes der Hämoglobinkonzentration	
Dilution	Mean value of the correct spectral absorbance	Measurement uncertainty of the mean value of the correct spectral absorbance		Mean value of the haemoglobin concentration	Measurement uncertainty of the mean value of the haemoglobin concentration	
i	\bar{A}_i	$u(\bar{A}_i)$	$2 \cdot u_{rel}(\bar{A}_i)$	$\bar{\beta}_i$ g/L	$u(\bar{\beta}_i)$ g/L	$2 \cdot u_{rel}(\bar{\beta}_i)$
1	0,766 4	0,005 5	1,4 %	151,7	1,1	1,5 %
2	0,597 1	0,005 3	1,8 %	151,0	1,4	1,8 %
3	0,427 7	0,005 2	2,4 %	151,3	1,8	2,4 %
4	0,249 0	0,005 1	4,1 %	152,2	3,1	4,1 %

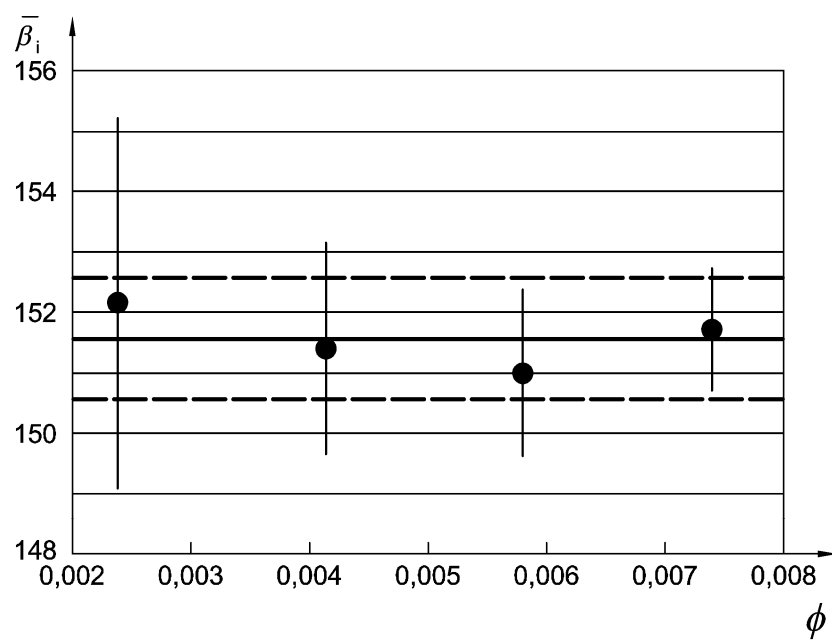


Bild A.1 — Darstellung der Hämoglobinkonzentration $\bar{\beta}_i$ und Messunsicherheiten $u(\bar{\beta}_i)$ als Funktion des Volumenanteils

Figure A.1 — Presentation of the haemoglobin concentration $\bar{\beta}_i$ and of the measurement uncertainties $u(\bar{\beta}_i)$ as a function of the volume fraction

Wegen der konstanten Beiträge zur Messunsicherheit bei der Bestimmung des richtigen spektralen Absorptionsmaßes $u(C_0) = 0,005$ und $u(C_1) = 0,003$, wirken sich diese Messunsicherheiten mit geringerem spektralen Absorptionsmaß immer stärker aus. Für jede einzelne Messlösung sind die mit Gleichung (A.7) berechneten Messunsicherheiten eingezeichnet.

Due to the constant contributions to the measurement uncertainty when determining the conventional true value for the spectral absorbance $u(C_0) = 0,005$ and $u(C_1) = 0,003$, these contributions to the measurement uncertainties increase with a lower spectral absorbance. For each individual test sample, the measurement uncertainties calculated with equation (A.7) are plotted.

Den Referenzmesswert für die Hämoglobinkonzentration erhält man als Mittelwert

The reference measurement value for the haemoglobin concentration is obtained as mean value

$$\beta(\text{Hb(Fe)}) = \frac{1}{4} \cdot \sum_{i=1}^4 \bar{\beta}_i \tag{A.12}$$

der vier Verdünnungen mit der Messunsicherheit

of the four dilutions with the measurement uncertainty

$$u\{\beta(\text{Hb(Fe)})\} = \sqrt{\frac{1}{4} \cdot \frac{1}{(4-1)} \cdot \sum_{i=1}^4 (\bar{\beta}_i + \beta(\text{Hb(Fe)}))^2 + \frac{1}{16} \cdot \sum_{i=1}^4 (u(\bar{\beta}_i))^2} \tag{A.13}$$

Die erweiterte relative Messunsicherheit $2 \cdot u_{rel}$ beträgt 1,4 % und ist kleiner als die in der vorliegenden Norm geforderte Gesamtmessunsicherheit von 1,5 %. Die erste Summe unter der Wurzel repräsentiert die Standardabweichung des Mittelwerts $\beta(\text{Hb(Fe)})$, die bei der hier vorgestellten Messung nur einen geringen Anteil zur Messunsicherheit liefert.

The expanded relative measurement uncertainty $2 \cdot u_{rel}$ amounts to 1.4 % and is smaller than the total measurement uncertainty of 1.5 % required by the present standard. The first sum in the square root represents the standard deviation of the mean value $\beta(\text{Hb(Fe)})$ which, in the case of the measurement presented here, provides only a small contribution to the measurement uncertainty.

Als Endergebnis erhält man den Referenzmesswert

The final result, i.e. the reference measurement value for the haemoglobin concentration is given by

$$\beta(\text{Hb(Fe)}) \pm 2 \cdot u(\beta(\text{Hb(Fe)})) = (151,5 \pm 2,1 \text{ g/L})$$

für die Hämoglobinkonzentration, der als durchgezogene Gerade in Bild A.1 eingezeichnet ist. Die (einfachen) Messunsicherheiten des Referenzwertes sind in Bild A.1 gestrichelt dargestellt.

and plotted as straight line in Figure A.1. The (non-expanded) measurement uncertainties of the reference measurement value are presented in the figure by means of dashed lines.

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