

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	
$\beta(\text{Hb(Fe)})$	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 $a(\lambda)$.	
$c(\text{Hb(Fe)})$	Stoffmengenkonzentration des Hämoglobins im Blut	mol/L
	amount-of-substance concentration of haemoglobin in blood	
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (z. B. in K_3EDTA : Kaliumsalz der Ethylendiamintetraessigsäure)	
	ethylenediamine tetraacetic acid (e.g. in K_3EDTA : potassium salt of the ethylenediamine tetraacetic acid)	
$M(\text{Hb(Fe)})$	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 $\beta(\text{Hb(Fe)})$ oder die Stoffmengenkonzentration $c(\text{Hb(Fe)})$ 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 $M(\text{Hb(Fe)})$ des monomeren Hämoglobins Hb(Fe) im Blut beträgt 16 114,5 g/mol [1]. Es gilt die Umrechnungsgleichung (1).

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

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.

5 Measurand and unit

The measurand is either the mass concentration $\beta(\text{Hb(Fe)})$ or the amount-of-substance concentration $c(\text{Hb(Fe)})$ 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 $M(\text{Hb(Fe)})$ of the monomeric haemoglobin Hb(Fe) in blood amounts to 16 114.5 g/mol [1]. The following conversion equation is applicable:

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 Erythrozyten-membranen 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-Rechteck-küvetten 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. Absorptions-photometer 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.