

DIN 58931



ICS 11.100.30

Ersatz für
DIN 58931:2010-08

**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 47 Seiten

DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed)

Inhalt

	Seite
Vorwort	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Symbole und Abkürzungen	6
5 Messgröße und Einheit	8
6 Referenzverfahren	8
6.1 Allgemeines	8
6.2 Grundlage der HiCN- und AHD-Methoden	8
6.2.1 Allgemeines	8
6.2.2 HiCN-Methode	8
6.2.3 AHD-Methode	8
6.3 Anforderungen an die Geräte	9
6.3.1 Absorptionsphotometer	9
6.3.2 Geräte zur Herstellung der Messlösung	9
6.3.3 Zentrifuge	9
6.4 Anforderungen an die Konversionslösungen und Lagerung	9
6.4.1 Referenzverfahren HiCN	9
6.4.2 Referenzverfahren AHD	10
6.5 Vorbereitung und Durchführung der Messungen	11
6.5.1 Referenzverfahren HiCN	11
6.5.2 Referenzverfahren AHD	11
6.6 Auswertung der Messungen	12
6.6.1 Referenzverfahren HiCN	12
6.6.2 Referenzverfahren AHD	13
7 Messunsicherheit der Referenzverfahren	14
8 Qualitätskontrolle der Referenzverfahren	15
8.1 Allgemeines	15
8.2 Referenzverfahren HiCN	15
8.2.1 Konversionslösung	15
8.2.2 Kontrolllösung	16
8.3 Referenzverfahren AHD	16
8.3.1 Konversionslösung	16
8.3.2 Kontrolllösungen	16
Anhang A (informativ) Beispiel von Messdaten zur Bestimmung eines Referenzmesswertes für die Hämoglobinkonzentration $\beta(\text{Hb(Fe)})$	17
A.1 Angabe der Messdaten für das gemessene spektrale Absorptionsmaß $a_{i,j}$	17
A.2 Bestimmung der Mittelwerte des richtigen spektralen Absorptionsmaßes $\bar{A}_i$ und Hämoglobinkonzentration $\bar{\beta}_i$	19
Literaturhinweise	23

Bilder

Bild A.1 — Darstellung der Hämoglobinkonzentration $\bar{\beta}_i$ und Messunsicherheiten $u(\bar{\beta}_i)$ als Funktion des Volumenanteils	21
---	----

Tabellen

Tabelle 1 — Zusammenstellung der verwendeten Abkürzungen und mathematischen Symbole .	6
Tabelle A.1 — Messdaten zur Bestimmung von Referenzmesswerten für die Hämoglobinkonzentration für vier verschiedene Verdünnungen	17
Tabelle A.2 — Formelzeichen und Messunsicherheiten der Messgrößen zur Berechnung der Hämoglobinkonzentration im Blut	18
Tabelle A.3 — Mittelwerte und Messunsicherheiten des gemessenen spektralen Absorptionsmaßes $\bar{a}_i$	20
Tabelle A.4 — Mittelwerte und Messunsicherheiten des richtigen spektralen Absorptionsmaßes $\bar{A}_i$ und der Hämoglobinkonzentration $\bar{\beta}_i$	21

Vorwort

Dieses Dokument wurde vom Arbeitsausschuss NA 063-03-06 AA „Hämatologie“ im DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed) 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.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. DIN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

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

Änderungen

Gegenüber DIN 58931:2010-08 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) vollständige Überarbeitung des Inhalts, insbesondere Anpassung der Festlegungen der AHD-Methode an den Stand der Wissenschaft;
- b) redaktionelle Überarbeitung.

Frühere Ausgaben

DIN 58931-1: 1970-11, 1982-10
DIN 58931-2: 1970-11, 1982-10
DIN 58931-3: 1970-11, 1982-10
DIN 58931: 1995-02, 2010-08

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument ist anzuwenden für die Bestimmung der Hämoglobinkonzentration im Blut. Es ist nur anzuwenden für die analytische Phase.

Es 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.

Dieses Dokument ist auch für die Hämoglobinbestimmung in Kontrollmaterialien anzuwenden, wenn sich Lyse und Umwandlungsgeschwindigkeiten der verschiedenen Hb-Varianten ähnlich wie im Frischblut verhalten.

2 Normative Verweisungen

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

DIN 58932-1, *Hämatologie — Bestimmung der Blutkörperchenkonzentration im Blut — Teil 1: Blutentnahme, Probenvorbereitung, Einflussgrößen, Störfaktoren; Text Deutsch und Englisch*

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.

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

— DIN-TERMinologieportal: verfügbar unter <https://www.din.de/go/din-term>

— DKE-IEV: verfügbar unter <http://www.dke.de/DKE-IEV>

3.1

Hämoglobin

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

Anmerkung 1 zum Begriff: 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.

3.2

Probe

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

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

3.4

HiCN-Methode

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

3.5

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

3.6

Messlösung

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

3.7

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 1 zum Begriff: Kontrolllösungen dienen der Prüfung von Messverfahren durch Vergleich mit vorgegebenen Werten, einschließlich der Kontrolle von Absorptionsphotometern.

3.8

Kontrollblut

Suspensionen von Partikeln, vorzugsweise menschlicher Herkunft

[QUELLE: DIN 58934-1:1997-12, 3.1]

4 Symbole und Abkürzungen

Tabelle 1 — Zusammenstellung der verwendeten Abkürzungen und mathematischen Symbole

Symbol oder Abkürzung	Bedeutung	Einheit
$a(\lambda)$	Messwert des spektralen (dekadischen) Absorptionsmaßes der Messlösung ANMERKUNG Im Folgenden wird $a(\lambda)$ auch als <i>gemessenes spektrales Absorptionsmaß</i> bezeichnet.	1
δa	Auflösung des Absorptionsphotometers für das spektrale Absorptionsmaß aufgrund der Digitalisierung; Digitalisierungsfehler	1
$A(\lambda)$	Richtiger Wert [1] 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
$a_{i,j}$	Gemessenes spektrales Absorptionsmaß einer bestimmten Wiederholmessung j der jeweiligen Verdünnung i	1
$\Delta a_{\text{Küvette}}$	Unterschied des spektralen Absorptionsmaßes zwischen zwei Küvetten bei Verwendung von Küvettenpaaren mit je einer Küvette für den Messstrahlengang und den Referenzstrahlengang	1
$\bar{A}$	Mittelwert des richtigen spektralen Absorptionsmaßes	1
$\bar{a}_i$	Mittelwert des gemessenen spektralen Absorptionsmaßes der jeweiligen Verdünnung	1
$\bar{A}_i$	Mittelwert des richtigen spektralen Absorptionsmaßes der jeweiligen Verdünnung	1

Tabelle 1 (fortgesetzt)

Symbol oder Abkürzung	Bedeutung	Einheit
AHD	Alkalisches Hämatin und Detergens, Alkaline Haematin Detergent	—
$\beta(\text{Hb}(\text{Fe}))$	Massenkonzentration des Hämoglobins im Blut	g/l
$\bar{\beta}_i$	Mittelwert der Hämoglobinkonzentration der jeweiligen Verdünnung	g/l
c	Stoffmengenkonzentration	mol/l
$c(\text{Hb}(\text{Fe}))$	Stoffmengenkonzentration des Hämoglobins im Blut	mol/l
C_0	Konstanten zur Bestimmung des richtigen Wertes [1] des spektralen (dekadischen) Absorptionsmaßes $A(\lambda)$ der Messlösung aus den Messwerten des spektralen dekadischen Absorptionsmaßes $a(\lambda)$	1
C_1		1
CAS	Chemical Abstracts Service (Registry Number)	—
d	Schichtdicke der Präzisions-Rechteckküvette	mm
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (z. B. in K_3EDTA : Kaliumsalz der Ethylendiamintetraessigsäure)	—
Hb	Tetramere Form des Hämoglobins	—
$\text{Hb}(\text{Fe})$	Monomere Form des Hämoglobins	—
HiCN	Cyanmethämoglobin	—
i	Index der Verdünnung oder Messsuspension	1
j	Index der Wiederholungsmessungen der Verdünnung i	1
k	Erweiterungsfaktor zur Bestimmung der erweiterten Messunsicherheit entsprechend den effektiven Freiheitsgraden	1
m_B	Masse der Blutprobe	g
m_K	Masse der Konversionslösung	g
δm	Auflösung der Waage	g
M	Molare Masse	g/mol
$M(\text{Hb}(\text{Fe}))$	Molare Masse des monomeren Hämoglobins $\text{Hb}(\text{Fe})$	g/mol
n	Anzahl von Wiederholungsmessungen für eine bestimmte Verdünnung, Stichprobenumfang	1
$s(a_{i,j})$	Standardabweichung des gemessenen spektralen Absorptionsmaßes	1
u	Standardmessunsicherheit	Einheit der jeweiligen Messgröße
u_{rel}	Relative Messunsicherheit	1
V_B	Volumen der Blutprobe	μl
V_K	Volumen der Konversionslösung	μl
$\varepsilon(\lambda)$	Molarer dekadischer Absorptionskoeffizient	$\frac{1}{\text{mmol} \cdot \text{cm}}$
ρ	Dichte	$\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$
ρ_B	Dichte der Blutprobe	$\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$
ρ_K	Dichte der Konversionslösung	$\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$

Tabelle 1 (fortgesetzt)

Symbol oder Abkürzung	Bedeutung	Einheit
ϕ	Volumenanteil der Probe in der Messlösung	1
ϕ_i	Volumenanteil der Probe in der Messsuspension i	1

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 [2].

Es gilt die Umrechnungsgleichung (1):

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

6 Referenzverfahren

6.1 Allgemeines

Das Referenzverfahren wird zur Bestimmung von Hämoglobin in humanem Blut verwendet. Um die Probenstabilität während der Anwendung des Referenzverfahrens sicherzustellen, ist es notwendig, die Blutprobe mit einem Antikoagulanzenreagenz zu versetzen. Als Antikoagulanzenreagenz sollte EDTA verwendet werden.

ANMERKUNG Alle für die Anwendung dieses Dokuments nötigen mathematischen Symbole sowie die verwendeten Abkürzungen befinden sich in Tabelle 1.

6.2 Grundlage der HiCN- und AHD-Methoden

6.2.1 Allgemeines

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

6.2.2 HiCN-Methode

Ein definiertes Probenvolumen muss mit einem definierten Volumen der Konversionslösung nach 6.4.1 versetzt werden. 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] [3] [4] [5].

6.2.3 AHD-Methode

Ein definiertes Probenvolumen muss mit einem definierten Volumen der Konversionslösung nach 6.4.2 versetzt werden. 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 [5] [6] [7].

6.3 Anforderungen an die Geräte

6.3.1 Absorptionsphotometer

Zur Durchführung der hier beschriebenen Methoden muss zur Bestimmung des spektralen Absorptionsmaßes $A(\lambda)$ ein Absorptionsphotometer verwendet werden. Dieses Instrument muss die Messung des spektralen Absorptionsmaßes einer Lösung im Wellenlängenbereich von 530 nm bis 590 nm mit einer erweiterten photometrischen Messunsicherheit bei Verwendung von 10-mm-Präzisions-Rechteckküvetten nach DIN 58963-2 von höchstens $2u_{\text{rel}}(A(\lambda)) \leq 1,0\%$ des Messwertes ermöglichen. Die Messunsicherheit der Wellenlänge darf nicht größer sein als $2u(\lambda) \leq 1\text{ nm}$ (95,45 % Vertrauensniveau) und die spektrale Halbwertsbreite muss 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 entsprechen. 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.

6.3.2 Geräte zur Herstellung der Messlösung

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

6.3.3 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 ($\leq 15\text{ min}$) erreichbar ist.

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

6.4 Anforderungen an die Konversionslösungen und Lagerung

6.4.1 Referenzverfahren HiCN

Zur Herstellung der Konversionslösung müssen Reagenzien und Wasser von hohem Reinheitsgrad (z. B. pro analysi) verwendet werden. Die Konversionslösung (siehe 3.3) muss die folgenden Bestandteile enthalten:

- a) 1,0 ml/l nichtionisches Detergens;
- b) $(1,0 \pm 0,03)\text{ mmol/l}$ Cyanid-Ionen (CN^-) ($65,1\text{ mg/l KCN}$ [CAS: 151-50-8], $M = 65,12\text{ g/mol}$);

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.

- c) $(0,60 \pm 0,01)\text{ mmol/l}$ Kaliumhexacyanoferrat(III), $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ [CAS: 14459-95-1], $M = 329,26\text{ g/mol}$;
- d) $(2,5 \pm 0,05)\text{ mmol/l}$ Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [CAS: 7558-80-7], $M = 156,02\text{ g/mol}$ [2]. Die Konversionslösung muss einen pH-Wert von $7,2 \pm 0,1$ aufweisen. Zur Einstellung des pH-Werts werden Phosphorsäure, H_3PO_4 ($c = 1,0\text{ mol/l}$) und Natronlauge, NaOH ($c = 2\text{ mol/l}$) verwendet.

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.

Für die Handhabung von Reagenzien, von denen einige hochgiftig, ätzend oder umweltgefährlich sind, muss der Benutzer alle geltenden gesetzlichen Sicherheits- und Entsorgungsvorschriften kennen und Zugang zu diesen haben. Der Anwender muss dokumentieren/zeigen, dass er Zugang zu allen anwendbaren gesetzlichen Bestimmungen hat und wie diese gesetzlichen Bestimmungen erfüllt werden.

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

Die Konversionslösung muss verschlossen, vor Licht geschützt, bei einer Temperatur zwischen 2 °C bis 24 °C aufbewahrt werden. Sie darf nicht eingefroren werden.

Die Konversionslösung kann nach vorschriftsmäßigen Ansatz zwei Monate bei einer Temperatur zwischen 2 °C bis 24 °C in mindestens halbgefüllten, verschlossenen und mit Lichtschutz versehenen Flaschen (z. B. braunen Glasflaschen) gelagert werden.

6.4.2 Referenzverfahren AHD

Zur Herstellung der Konversionslösung müssen Reagenzien und Wasser von hohem Reinheitsgrad (z. B. pro analysi) verwendet werden. Die Konversionslösung (siehe 3.3) muss die folgenden Bestandteile enthalten:

- a) geeignetes nichtionisches Detergens (z. B. 2,5 % $\pm$ 0,2 % Octylphenoxypolyethoxyethanol [CAS: 9002-93-1] (z. B. Triton X-100));

ANMERKUNG Die Verwendung von Triton X-100 ist seit 04.01.2021 in der Europäischen Union regulatorisch eingeschränkt (Anhang XIV der REACH-Verordnung).

- b) $(0,1 \pm 0,01)$ mol/l NaOH [CAS: 1310-73-2].

Herstellung der Konversionslösung:

- 1) 26 g Triton X unter Erwärmen bei $38\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ in etwa 150 ml bis 200 ml Wasser auflösen, abkühlen und in einen 1 000 ml Messkolben überführen;
- 2) etwa 600 ml Wasser langsam zugeben (Schaumbildung);
- 3) (100 ± 1) ml $(1 \pm 0,1)$ mol/l NaOH langsam zugeben;
- 4) auf $(1\,000 \pm 10)$ ml mit Wasser auffüllen.

Für die Handhabung von Reagenzien, von denen einige ätzend oder umweltgefährlich sind, muss der Benutzer alle geltenden gesetzlichen Sicherheits- und Entsorgungsvorschriften kennen und Zugang zu diesen haben. Der Anwender muss dokumentieren/zeigen, dass er Zugang zu allen anwendbaren gesetzlichen Bestimmungen hat und wie diese gesetzlichen Bestimmungen erfüllt werden.

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

Die Konversionslösung muss bei einer Temperatur zwischen 2 °C bis 24 °C aufbewahrt werden.

Die Konversionslösung kann nach vorschriftsmäßigen Ansatz sechs Monate bei einer Temperatur zwischen 2 °C bis 24 °C in verschlossenen Flaschen gelagert werden.

6.5 Vorbereitung und Durchführung der Messungen

6.5.1 Referenzverfahren HiCN

Die Temperatur der Probe und die der Konversionslösung müssen vor dem Vermischen an die Raumtemperatur zwischen 20 °C und 24 °C angeglichen werden.

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

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 durch die Konversionslösung vollständig hämolysiert und die Hämoglobinvarianten und Hämoglobin-analogen Verbindungen mindestens zu 99 % in HiCN umgewandelt worden sind. Die Reaktionszeit beträgt 90 min und kann bis höchstens 24 h verlängert werden [3] [5] [8]. Die erzeugte Messlösung muss jeweils unmittelbar vor der spektrometrischen Absorptionsmessung unter Einhaltung der in 6.3.3 angegebenen Anforderung zentrifugiert werden.

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

Die Bestimmung des richtigen spektralen Absorptionsmaßes $A(\lambda)$ der Messlösung muss als Differenzmessung mit einem Absorptionsphotometer nach 6.3.1 bei einer Wellenlänge von 540 nm und einer Temperatur zwischen 20 °C und 24 °C gegen die Konversionslösung erfolgen. Es müssen Präzisions-Rechteckküvetten nach DIN 58963-2 verwendet werden. Die Schichtdicke sollte 10 mm betragen und Quarzküvetten sollten verwendet werden. Für die Messunsicherheit der Bestimmung der Schichtdicke d muss $2u_{\text{rel}}(d) \leq 0,2 \%$ gelten.

6.5.2 Referenzverfahren AHD

Die Temperatur der Probe und die der Konversionslösung müssen vor dem Vermischen an die Raumtemperatur zwischen 20 °C und 24 °C angeglichen werden.

Die Probe muss im Verhältnis 1 : 50 bis 1 : 500 mit der Konversionslösung verdünnt werden, d. h., der Volumenanteil der Probe in der Messlösung beträgt $0,02 \geq \phi \geq 0,002$. Bei Proben mit niedriger Hämoglobinkonzentration müssen große Volumenanteile zu bevorzugt werden (z. B. 1 : 100), um im Bereich kleiner Messunsicherheit des Absorptionsphotometers zu messen. Bei großem Volumenanteil der Probe in der Messlösung muss sichergestellt werden, 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 [9]. Die vollständige Umwandlung sollte durch eine Endpunktbestimmung dokumentiert werden.

Die Bestimmung des richtigen spektralen Absorptionsmaßes $A(\lambda)$ der Messlösung muss als Differenzmessung mit einem Absorptionsphotometer nach 6.3.1 bei einer Wellenlänge von 574 nm und bei einer Temperatur zwischen 20 °C und 24 °C gegen die Konversionslösung erfolgen. Es sind Präzisions-Rechteckküvetten nach

DIN 58963-2 zu verwenden. Die Schichtdicke sollte 10 mm betragen und Quarzküvetten sollten verwendet werden. Für die Messunsicherheit der Bestimmung der Schichtdicke d muss $2u_{\text{rel}}(d) \leq 0,2 \%$ gelten.

6.6 Auswertung der Messungen

6.6.1 Referenzverfahren HiCN

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

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

Dabei ist

$A(\lambda)_{\text{HiCN}}$ 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.

Wie in 6.3.1, 6.3.2 und 6.5.1 angegeben, müssen für die erweiterten Messunsicherheiten die Anforderungen

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

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

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

gelten.

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):

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

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.

ANMERKUNG 1 Eine detaillierte Analyse zur Bestimmung von $A(\lambda)_{\text{HiCN}}$ ist in [10] beschrieben.

Der Volumenanteil ϕ ergibt sich aus dem Volumen der Blutprobe V_B und dem Volumen der Konversionslösung V_K entsprechend Gleichung (4):

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

Die Massenkonzentration $\beta(\text{Hb}(\text{Fe}))$ 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 $M(\text{Hb}(\text{Fe})) = 16\,114,5 \text{ g/mol}$ einsetzt [2].

ANMERKUNG 2 Ein Beispiel von Messdaten zur Bestimmung eines Referenzmesswertes für die Hämoglobinkonzentration $\beta(\text{Hb}(\text{Fe}))$ ist in Anhang A beschrieben.

Ist die Stoffmengenkonzentration $c(\text{Hb(Fe)})$ in mmol/l anzugeben, so muss anstelle von Gleichung (2) die Gleichung (5)

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

verwendet werden.

6.6.2 Referenzverfahren AHD

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

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

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;

$\varepsilon(\lambda)_{\text{AHD}}$ der molare dekadische Absorptionskoeffizient des AHD.

Wie in 6.3.1, 6.3.2 und 6.5.2 angegeben, müssen für die erweiterten Messunsicherheiten die Anforderungen

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

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

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

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):

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

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.

ANMERKUNG Eine detaillierte Analyse zur Bestimmung von $A(\lambda)_{\text{HiCN}}$ ist in [10] beschrieben.

Der Volumenanteil ϕ ergibt sich aus dem Volumen der Blutprobe V_B und dem Volumen der Konversionslösung V_K entsprechend Gleichung (8):

$$\phi = \frac{V_B}{V_B + V_K} \quad (8)$$

Die Massenkonzentration $\beta(\text{Hb(Fe)})$, in g/l, wird berechnet, indem man in Gleichung (6) die Schichtdicke d , in cm, den molaren dekadischen Absorptionskoeffizienten $\varepsilon(574)_{\text{AHD}} = (6,945 \pm 0,019) \text{ l}/(\text{mmol} \cdot \text{cm})$ [6] und das Molekulargewicht $M(\text{Hb(Fe)}) = 16\,114,5 \text{ g/mol}$ einsetzt [2].

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

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

zu verwenden.

7 Messunsicherheit der Referenzverfahren

Systematische Messabweichungen können unter anderem verursacht werden durch:

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

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

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 ($2u_{\text{rel}}(\beta(\text{Hb(Fe)})) < 1,5 \%$).

Aus der (quadratischen) Fortpflanzung ergibt sich aus den Messunsicherheiten in 6.6.1 und 6.6.2 die Gesamtmessunsicherheit des Mittelwertes der Massenkonzentration $\bar{\beta}_i$ für eine bestimmte Verdünnung i nach Gleichung (10):

$$\begin{aligned} 2u_{\text{rel}}(\bar{\beta}_i) &= \sqrt{(2u_{\text{rel}}(\bar{A}_i))^2 + (2u_{\text{rel}}(\phi_i))^2 + (2u_{\text{rel}}(d))^2} \\ &= \sqrt{(0,01)^2 + (0,006)^2 + (0,002)^2} \approx 1,2 \% \end{aligned} \quad (10)$$

Die Messunsicherheit des Mittelwertes des richtigen spektralen Absorptionsmaßes $\bar{A}_i$ folgt dabei aus Gleichung (11):

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

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 [11] [12]; dargestellt in Gleichung (12):

$$\begin{aligned} 2u_{\text{rel}}(\bar{a}_i) &= \frac{2}{\bar{a}_i} \cdot \sqrt{\left(\frac{s(a_{i,j})}{n}\right)^2 + (\Delta a_{\text{Küvette}})^2 + \left(\frac{\delta a^2}{12}\right)} \\ &= \frac{2}{\bar{a}_i} \cdot \sqrt{\frac{1}{n \cdot (n-1)} \cdot \sum_{j=1}^n (a_{i,j} - \bar{a}_i)^2 + (\Delta a_{\text{Küvette}})^2 + \left(\frac{\delta a^2}{12}\right)} \end{aligned} \quad (12)$$

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 $\Delta a_{\text{Küvette}}$ 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 auf ein Vertrauensniveau von 95,45 % für eine Größe mit einer Normalverteilung.

ANMERKUNG Bei Abweichungen von der Normalverteilung, etwa infolge einer geringen Zahl der effektiven Freiheitsgrade, kann sich bei $k = 2$ ein verändertes Vertrauensniveau ergeben. Weitere Erläuterungen finden sich in ISO/IEC Guide 98-3:2008 [11].

8 Qualitätskontrolle der Referenzverfahren

8.1 Allgemeines

Das für die Qualitätskontrolle der Referenzverfahren zu verwendende Absorptionsphotometer ist auf Präzision und Genauigkeit 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 diesem Dokument beschriebenen Referenzmethoden ($2u_{\text{rel}}(\bar{A}(\lambda)) \leq 0,5 \%$) 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 hämolyisieren 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 90 min eingehalten wird.

Die Reaktionszeit wird durch die Konzentration der in 6.4.1 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 bis zu 90 min dauern kann [3] [5], daher müssen mindestens 90 min abgewartet werden.

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 20 °C bis 24 °C und unter Vermeidung direkter 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 und um das richtige spektrale Absorptionsmaß zu erhalten. Der Zahlenwert des Produktes aus relativer Zentrifugalbeschleunigung und Zentrifugationszeit, in Minuten, muss nach 6.3.3 mindestens 15 000 betragen.

ANMERKUNG 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.