



中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 341—2011

血红蛋白测定参考方法

Reference method for haemoglobinometry in human blood

2011-09-30 发布

2012-04-01 实施

中华人民共和国卫生部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由卫生部临床检验标准专业委员会提出。

本标准主要起草单位：卫生部临床检验中心。

本标准主要起草人：彭明婷、谷小林、李臣宾、施丽飞、陆红、申子瑜。

血红蛋白测定参考方法

1 范围

本标准规定了血红蛋白测定参考方法的技术要求。

本标准适用于建立并运行血红蛋白测定参考方法的实验室。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

血红蛋白 hemoglobin, HGB/Hb

存在于血液中所有的血红蛋白衍生物,包括脱氧血红蛋白、氧合血红蛋白、硫化血红蛋白、碳氧血红蛋白和高铁血红蛋白。

2.2

氰化高铁血红蛋白 haemiglobincyanide, HiCN

血红蛋白(除硫化血红蛋白外)中的亚铁离子被氧化成高铁离子,再与氰离子结合形成的血红蛋白衍生物,即氰化高铁血红蛋白。

2.3

参考方法 reference method

一种可清楚和准确描述的用于特定检测的技术,该技术要有依据,可提供足够准确和精密的实验数据以评价其他实验方法检测结果的有效性。若有决定性方法,参考方法的准确性必须与决定性方法进行比较,并且应标示不准确度和不精密度。

3 总则

为了保证参考方法检测结果的准确性,建立参考方法的实验室应与其他参考实验室进行结果比对。

4 原理

血红蛋白分子中的亚铁离子(Fe^{2+})在溶液中被高铁氰化钾氧化成高铁离子(Fe^{3+})形成高铁血红蛋白(Hi),其后又与氰离子(CN^-)反应生成氰化高铁血红蛋白(HiCN),HiCN在波长540 nm处有最大吸收峰,HiCN吸光度严格遵循朗伯-比尔定律,即HiCN在波长540 nm的吸光度值与HiCN浓度成正比,血红蛋白浓度可由分光光度计所测定的吸光度值计算得出。

5 一般技术要求

5.1 设备

5.1.1 玻璃器具

试验所用的玻璃器具应为A级。

规格要求:正向置换式微量加样器或吸量管 $100\ \mu\text{L}\pm 0.5\ \mu\text{L}$ 、 $0.5\ \text{mL}\pm 0.005\ \text{mL}$,容量瓶 $25\ \text{mL}\pm 0.03\ \text{mL}$ 、 $100\ \text{mL}\pm 0.08\ \text{mL}$ 、 $250\ \text{mL}\pm 0.12\ \text{mL}$ 、 $1\ 000\ \text{mL}\pm 0.3\ \text{mL}$ 。

5.1.2 薄膜过滤器:由低蛋白结合和低释放材料制成,过滤器半径为 $25\ \text{mm}$,薄膜孔径为 $0.20\ \mu\text{m}\sim 0.25\ \mu\text{m}$ 。

5.1.3 分光光度计:所用的分光光度计应经计量部门检定合格,仪器的狭缝宽度 $\leq 2\ \text{nm}$,配对比色杯的内径为 $1.000\ \text{cm}\pm 0.002\ \text{cm}$ 。

5.2 试剂(文-齐氏液, van Kampen and Zijlstra reagent)

5.2.1 文-齐氏液的组成

KCN	0.050 g
$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	0.200 g
KH_2PO_4 (无水)	0.140 g
非离子表面活性剂	$0.5\ \text{mL}\sim 1.0\ \text{mL}$
临床实验室试剂用水, I 级	$1\ 000.0\ \text{mL}$

临床实验室 I 级试剂用水应满足以下指标:细菌数 $<10\ \text{CFU/mL}$; $25\ ^\circ\text{C}$ 条件下电阻抗 $>10\ \text{m}\Omega\cdot\text{cm}$; 硅含量(SiO_2) $<0.05\ \text{mg/L}$ 。

所用化学试剂应为不含结晶水的分析纯。

非离子表面活性剂可使用 Nonidet P-40 或 Triton X-100。

试剂中的氰化钾为剧毒物质,应规定相应的生物安全防护和处理要求。

5.2.2 试剂为清亮的淡黄色溶液,不吸收波长大于 $480\ \text{nm}$ 的光。pH 为 $7.0\sim 7.4$,渗透压为 $6\ \text{mOsm}/(\text{kg}\cdot\text{H}_2\text{O})\sim 7\ \text{mOsm}/(\text{kg}\cdot\text{H}_2\text{O})$ 。试剂应可使血红蛋白在 $5\ \text{min}$ 内完全转化成氰化高铁血红蛋白。

5.2.3 试剂应保存于较大且密封的棕色硼硅酸盐玻璃瓶内,室温避光保存,不能冷冻。如有浑浊物生成,应重新配制。至少每月重新配制一次。

5.3 血标本的采集

5.3.1 用真空采血系统采集新鲜静脉血。采血时要避免皮肤消毒物质的污染。标本中不得有肉眼可见的小凝块或溶血。

5.3.2 采集标本时使用 EDTA 为抗凝剂,要求加入血液后抗凝剂的终浓度为 $3.7\ \mu\text{mol/mL}\sim 5.4\ \mu\text{mol/mL}$,可以使用以下几种抗凝剂:

- EDTA· K_2 (相对分子质量 368.4),浓度为 $1.4\ \text{mg/mL}\sim 2.0\ \text{mg/mL}$;
- EDTA· $\text{K}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (相对分子质量 404.5),浓度为 $1.5\ \text{mg/mL}\sim 2.2\ \text{mg/mL}$;
- EDTA· $\text{K}_3\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (相对分子质量 442.5),浓度为 $1.6\ \text{mg/mL}\sim 2.4\ \text{mg/mL}$;
- EDTA· $\text{Na}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (相对分子质量 372.23),浓度为 $1.4\ \text{mg/mL}\sim 2.0\ \text{mg/mL}$ 。

5.3.3 血液加入抗凝管后,管内剩余空间至少占试管体积的 20% ,以利于血标本的混匀。

5.3.4 标本采集后应在当天完成测定。

6 测定步骤

6.1 标本稀释

6.1.1 取文-齐氏液加至容量为 $25\ \text{mL}$ 的 A 级容量瓶中,将试剂液面调至刻度线。

6.1.2 用正向置换移液器吸取 $100\ \mu\text{L}$ 混匀全血,使用蘸有盐水的纱布小心快速地擦掉毛细管外壁残

留的血液(该过程应避免因虹吸作用带走毛细管内的血液),将毛细管中的血液加至装有试剂的容量瓶中,吹吸至少5次,以保证血液全部从毛细管中洗出。同一份标本分次稀释后,检测结果的变异系数应 $<0.5\%$ 。

6.1.3 盖上容量瓶盖子,充分颠倒混匀,直至红细胞完全溶解。

6.1.4 避光放置5 min以上,以保证血红蛋白完全转化成氰化高铁血红蛋白。

6.1.5 用滤器过滤稀释后的标本。

6.1.5.1 使用注射器和特定的滤器(5.1.2)过滤。

6.1.5.2 滤液至少放置1 min,以使气泡溢出。

6.2 血红蛋白浓度检测

6.2.1 使用分光光度计测定HiCN溶液的吸光度值。

6.2.2 以试剂作空白,分别在504 nm、540 nm和750 nm波长条件下,读取HiCN溶液的吸光度值。

6.2.3 HiCN溶液纯度与浊度的要求

$$\text{纯度检查 } 1.59 \leq \frac{A_{\text{HiCN}}^{540}}{A_{\text{HiCN}}^{504}} \leq 1.63$$

$$\text{浊度检查 } A_{\text{HiCN}}^{750} \leq 0.003$$

6.3 血红蛋白浓度计算

6.3.1 血红蛋白浓度计算公式见式(1):

$$c = \frac{A_{\text{HiCN}}^{540} \times 16\,114.5 \times F}{11.0 \times d \times 1\,000} \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

c ——血红蛋白浓度,单位为克每升(g/L);

A_{HiCN}^{540} ——HiCN溶液在540 nm时的吸光度;

16 114.5 ——血红蛋白单体的相对分子质量(4个单体组成的血红蛋白的相对分子质量为64 458);

F ——血液的稀释倍数;

11.0 ——HiCN溶液在540 nm时的1/4毫摩尔消光系数;

d ——光径,为1.000 cm;

1 000 ——将毫克转换为克的倍数。

6.3.2 当稀释倍数为1:251,光径为1.000 cm时,式(1)可表达为

$$c = A_{\text{HiCN}}^{540} \times 367.7 \quad \dots\dots\dots (2)$$

7 血红蛋白结果的表达方式

血红蛋白浓度以g/L形式表示。

参 考 文 献

- [1] ICSH: Recommendations for haemoglobinometry in human blood. Br J Haematol. 1967;13: 71-5
- [2] ICSH: Recommendations for reference method for haemoglobinometry in human blood (ICSH standard EP 6/2:1977) and specifications for international haemoglobinocyanide reference preparation (ICSH standard EP 6/3:1977). J Clin Pathol. 1978 Feb;31(2):139-43
- [3] ICSH: 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 Haematol. 1987;9(1):73-9
- [4] ICSH: Recommendations for reference method for haemoglobinometry in human blood (ICSH standard 1995) and specifications for international haemoglobinocyanide standard (4th edition). J Clin Pathol. 1996 Apr;49(4):271-4
- [5] NCCLS: H15-A3 Reference and Selected Procedures for the Quantitative Determination of Hemoglobin in Blood. Approved Standard. 3rd ed. Wayne, Pa. :NCCLS;2000
-