



中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 122—1999

全血中血红蛋白的测定

Quantitative determination
of hemoglobin in whole blood

1999-12-09 发布

2000-05-01 实施

中华人民共和国卫生部 发布

前 言

全血中血红蛋白测定是一种临床常用试验,需有相应的标准进行规范,本标准因此而制定。

本标准从 2000 年 5 月 1 日起实施。

本标准由卫生部医政司提出。

本标准由解放军总医院临床检验科负责起草。

本标准主要起草人:丛玉隆、邓新立。

本标准由卫生部委托卫生部临床检验中心负责解释。

中华人民共和国卫生行业标准

全血中血红蛋白的测定

WS/T 122—1999

Quantitative determination
of hemoglobin in whole blood

1 范围

本标准规定了全血中血红蛋白测定的方法、结果的表达及氰化高铁血红蛋白标准物。
本标准适用于临床实验室的常规检验。

2 定义

本标准采用下列定义。

2.1 高铁血红蛋白

铁原子已被氧化成高铁离子的血红蛋白。可用英文缩写 H_i 表示。

2.2 氰化高铁血红蛋白

铁原子被氧化成高铁离子,高铁离子已同氰离子相结合的血红蛋白。可用英文缩写 HiCN 表示。

2.3 总血红蛋白

正常存在人循环血中的所有血红蛋白衍生物,应包括脱氧血红蛋白、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。

3 检测原理

在溶血液中,血红蛋白(硫化血红蛋白除外)中亚铁离子(Fe^{2+})被高铁氰化钾氧化成高铁离子(Fe^{3+}),血红蛋白转化成高铁血红蛋白。高铁血红蛋白同氰化钾中的氰离子反应生成氰化高铁血红蛋白。反应应在 18~25℃ 中进行。加入非离子表面活性剂可加快红细胞的溶解,减少脂蛋白沉淀产生的溶液混浊。在仪器上进行测定。氰化高铁血红蛋白在波长 540 nm 左右有一个较宽的吸收峰,它在 540 nm 处的吸光度同它在溶液中的浓度成正比。标本中血红蛋白的浓度可通过先测得吸光度,然后从标准曲线上按吸光度读取。也可以同时与一标准溶液比色而得出结果。

4 材料与装置

4.1 玻璃器材

要求试验中的玻璃器材准确度为 A 级,清洁度为化学级。微量吸管和沙利氏吸管要求为 20 μL ± 0.1 μL ,吸量管为 0.5 mL ± 0.005 mL,移液管为 5.0 mL ± 0.005 mL 或 10.0 mL ± 0.03 mL。容量瓶 100 mL ± 0.08 mL 或 1 000 mL ± 0.3 mL。

4.2 试剂

4.2.1 试剂组成:

氰化钾(KCN),0.050 g;

高铁氰化钾[$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$],0.200 g;

磷酸二氢钾(KH_2PO_4), 0.140 g;
非离子表面活性剂, 0.5 mL~1.0 mL;
加蒸馏水至 1 000 mL。

4.2.2 非离子表面活性剂可用 Triton X-100(1 mL/L), Saponic 218 等。

4.2.3 试剂应是清亮的淡黄色溶液, 不吸收波长大于 480 nm 的光。试剂的 pH 值在 7.0~7.4 之间。其用冰点法测量的渗量应在 6~7 mmol/L 之间。要求血红蛋白在 5 min 内完全转化成氰化高铁血红蛋白。如果试剂变混浊, 则应弃去。试剂应避光保存在一容量较大且密封的棕色硼硅玻璃瓶中。试剂应保持新鲜, 至少 1 月配制 1 次。试剂不可冰冻, 否则其中的高铁氰化钾会被破坏, 加入乙醇、甲醇、乙二醇或甘油可以防止其分解。

4.2.4 试剂中的氰化钾为剧毒物质, 要注意操作安全。

4.3 仪器

使用双波长的分光光度计测量最准确, 也可使用各种经过校正的光度计和比色计。测量待检标本的血红蛋白浓度, 是先测量其在 540 nm 处的吸光度, 然后再经过换算所得。

仪器必须经过校正。校正的方法是在仪器上测定 HiCN 标准物, 并根据此标准物的光谱特性来对仪器进行调试。校正的主要内容包括:

a) 工作波长: 将标准物放在待测光度计中, 从 500 nm 至 580 nm 测量其吸光度, 如果最大吸光度在 540 nm 处, 则仪器波长准确, 否则应对仪器进行调试。在常规工作中, 如仪器最大吸光度处的波长在 540 nm $\pm$ 5 nm 范围内, 也可用此波长作为工作波长, 仪器的测量结果也是准确的。

b) 校正系数, 即 K 值的测试和计算, 见 10.4.1。

c) 检测结果的线性: 即检查仪器检测 HiCN 的吸光度是否同 HiCN 的浓度成正比。将已知浓度的 HiCN 标准物准确稀释成各种浓度, 分别测定其吸光度。然后以稀释液浓度为横坐标, 其对应的吸光度为纵坐标进行描点, 并通过各点作直线。如测试各点均在直线上, 则证实仪器的线性良好。如有个别点不在直线上, 作直线时应使直线通过尽量多的点, 将不在直线上的点的吸光度与所代表的浓度在直线的吸光度比较, 如两者之差在 5% 以内, 则可认为仪器的检测线性符合要求。

d) 比色杯的厚度及透光性:

1) 比色杯的厚度可用标准测量工具进行测量, 其结果应精确到 0.001 cm。

2) 透光性测定方法如下: 溶解 0.2 mg 伊文兰于 100 mL 蒸馏水中, 放入所有待测比色杯内, 用一比色杯作标准, 将仪器读数准确调到 50% 透光度, 将其他比色杯逐一与标准杯比较, 读数时应反复交替测定标准杯与待测杯的透光度, 尽量减少仪器漂移的影响, 比色杯的透光度应在 50% $\pm$ 0.5% 以内方为合格, 标记比色杯的透光面, 以便在以后应用中使同一侧面面向光源。

5 标本的采集和保存

5.1 血液标本的采集

应使用静脉血, 但也可使用外周血。如果用外周血, 则要采用正确的标本采集方法。静脉血用乙二胺四乙酸二钠(Na_2EDTA)抗凝, 其比例是 1.5 mg~1.8 mg Na_2EDTA 抗凝 1 mL 血液, 并要立即混匀。测定应在标本采集后立即进行, 也可在一天内测定完毕。在室温(18~25℃)条件下保存标本 1 周, 其中的血红蛋白值变化不大。标本同检测试剂混合后, 产生的 HiCN 溶液更为稳定。如果保存时间超过 6 h, 则应将 HiCN 溶液放在避光密封的容器中, 置于 4~10℃ 条件下。其测量结果可在 6 年内无改变。

5.2 干扰物质

脂血症或标本中存在的大量脂蛋白产生混浊, 白细胞增多及球蛋白增多可造成干扰。煤气中毒或大量吸烟引起血液内碳氧血红蛋白(HbCO)增多, 也可引起测量值增高。

6 标本的稀释

按 1:251 比例稀释血液标本。如果采集的血液用于仪器的标定,则其稀释操作按 6.11 进行。常规检测标本的稀释按 6.1~6.10 进行。

- 6.1 缓慢匀速吸取 20 μL 血液到微量吸管中(不可超过刻度 5 mm)。
- 6.2 用一干纱布将微量吸管的外面擦干净,但不可带出微量吸管中的血液。
- 6.3 调整管中的血液到微量吸管的刻度。
- 6.4 再用干纱布将微量吸管的外面擦干净。
- 6.5 将微量吸管中的血液柱轻微地回吸,血液柱的最下端离微量吸管的最下端约 10 mm。
- 6.6 将微量吸管插入一个盛有 5.0 mL 试剂的试管中,微量吸管插入液面约 2.5 cm。
- 6.7 慢慢地从微量吸管中排出血液标本(血液应扩散到试管的底部)。
- 6.8 从试管的上部吸取较为清亮的试剂清洗微量吸管 8~10 次。微量吸管中所有接触过血液的部分都应清洗。
- 6.9 将试管盖上,颠倒混匀 5~6 次。
- 6.10 稀释过的血红蛋白溶液在室温下放置 5 min,以保证颜色反应完全。
- 6.11 大体积的稀释液的制备,在计算稀释倍数之后,可以用 0.4 mL 或 0.5 mL 的吸量管和 100 mL 的容量瓶进行操作。

7 标本的测定

以试剂作空白,在仪器上进行测定,根据仪器对应的曲线读取吸光度。

8 血红蛋白浓度的测定

- 8.1 根据式(1)计算血红蛋白浓度。

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

式中: c ——血红蛋白浓度, g/L;

A_{HiCN}^{540} ——待测血红蛋白溶液在波长为 540 nm 时的吸光度;

16 114.5——血红蛋白单体的分子量;

F ——血液的稀释倍数;

11.0——HiCN 在波长为 540 nm 时的摩尔吸光度;

1——光径, cm;

1 000——将毫克转换成克所乘的倍数。

如果稀释倍数是 1:251, 光径为 1.000 cm, 则 c 等于 367.7 乘以 A_{HiCN}^{540} 所得的值。

- 8.2 如果光度计上的刻度转换成血红蛋白浓度, 那么也可在仪器测量的范围内直接读取血红蛋白浓度。

- 8.3 比色计在同样条件下测定已知浓度的血红蛋白标准液和待检的血红蛋白溶液, 可根据式(2)计算出待测血红蛋白溶液的浓度:

$$c_u = \frac{A_u^{540} \times c_r}{A_r^{540}} \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中: c_u ——待检溶液的血红蛋白浓度, g/L;

A_u^{540} ——待检溶液在光波长为 540 nm 时的吸光度;

c_r ——标准溶液的血红蛋白浓度, g/L;

A_r^{540} ——标准溶液在光波长为 540 nm 时的吸光度。

8.4 从所制备的标准曲线上读取,见 11.4。

9 结果

血红蛋白浓度以 g/L 形式表达。

10 标准曲线的制备

标准曲线通过用试剂稀释一个或多个二级 HiCN 标准物来制备。常规检测血红蛋白,先将 0.02 mL 血用 5 mL 试剂稀释,然后测定此溶液在波长为 540 nm 时的吸光度,并与用同样方法处理的血红蛋白标准物所测得的吸光度进行比较,从而得出待检血红蛋白浓度。

10.1 HiCN 标准物的血红蛋白值

标准物的血红蛋白的标值乘以稀释倍数,即为所对应的全血的血红蛋白浓度。

10.2 标准曲线

稀释为四种浓度(200 g/L, 100 g/L, 50 g/L, 25 g/L)的血红蛋白标准物溶液,然后分别测定其在 540 nm 处的吸光度。

10.3 标准曲线的绘制

以血红蛋白浓度(g/L)为横坐标,其对应的吸光度为纵坐标,在坐标纸上描点。然后过原点处,尽量靠近所描点画一直线,即为标准曲线。

10.4 将从测定仪器读取的吸光度换算成血红蛋白浓度和 K 值的定义。

10.4.1 10.3 所制定的标准曲线的斜率即为 K 值,见式(3)。

$$K = \frac{A^{540}}{c} \dots\dots\dots(3)$$

式中: A^{540} ——标准 HiCN 溶液在波长为 540 nm 时的吸光度;

c ——血红蛋白浓度, g/L。

K 值可用于鉴定仪器给出的标准曲线是否有效,也应用于将所测得的吸光度换算成血红蛋白浓度。

10.4.2 标准曲线制定过程中,要用四种浓度的血红蛋白标准物。测定这四种溶液的吸光度,用吸光度除以血红蛋白浓度,得出 K 值,将四个 K 值取平均值,此平均值同仪器给定的 K 值之差不应大于 0.000 03,如超过 0.000 03,则仪器的标准曲线要重新设定。

11 氰化高铁血红蛋白标准物

11.1 成分

氰化高铁血红蛋白标准物应是氰化高铁血红蛋白的水溶液,其浓度应在 0.55 g/L 至 0.85 g/L 之间,溶液无沉渣。如用献血者血红蛋白制作标准物,献血源的血应无乙肝病毒表面抗原,抗 HIV 抗体、抗 HCV 抗体阴性。溶液应无菌。其中氰化高铁血红蛋白含量的定值的误差应在 1% 的范围之内。

11.2 光学测量特性

11.2.1 标准物 HiCN 含量的定值应在波长 540 nm 时测定吸光度,然后根据式(4)进行计算:

$$c = \frac{A_{\text{HiCN}}^{540} \times 16\,114.5}{11.0 \times 1.000 \times 1\,000} \dots\dots\dots(4)$$

式中: c ——HiCN 浓度, g/L;

A_{HiCN}^{540} ——HiCN 标准物在波长为 540 nm 时的吸光度;

16 114.5——血红蛋白单体的相对分子量;

11.0——HiCN 在波长为 540 nm 时的四分之一吸光系数;

1.000——光径, cm;

1 000——换算系数。

光径应精确到小数点后 3 位小数。仪器必须校正好,且在仪器的测量范围内,不吸收散射光。比色杯透过光的面应为平面,且其两内侧面的距离为 1.000 cm(允许 0.5%的误差)。测量温度应是 20℃~25℃。

11.2.2 标准物的定值由多个参考实验室测定。

11.3 纯度要求

11.3.1 将波长为 450 nm 到 750 nm 的吸收光谱同氰化高铁血红蛋白国际标准物的吸收光谱进行比较,观察其纯度。

11.3.2 分别测量标准物在波长为 540 nm 和 504 nm 的吸光度,前者与后者的比值应在 1.59 和 1.63 之间。

11.3.3 在波长大于 710 nm 的红外区测定其吸光度,以检查其混浊度。其在波长为 750 nm 时的吸光度应小于或等于 0.002/cm 光径。

11.3.4 将标准物接种到需氧和厌氧的培养基上,然后分别在 22℃和 37℃中培养。培养结果应为无菌。

11.4 标签

标签上必须有生产者的姓名、批号、HiCN 浓度、血红蛋白浓度、有效期,而且标明符合安全规定和表明其稳定性的数据。生产者应持续监测标准物的稳定性,一旦发现问题,应立即通知使用者。

11.5 包装

标准物应保存于棕色容器内。

11.6 保存温度

标准物应放于 4~8℃下保存。
