

# 血中碳氧血红蛋白的分光光度测定方法

WS/T 42-1996

---

## 1 主题内容与适用范围

本标准规定了血中的碳氧血红蛋白的分光光度测定方法。

本法最低检测浓度为 2%HbCO。

本标准适用于正常人和接触一氧化碳工人血中 HbCO 浓度的测定。

## 2 原理

血液中含有四种血红蛋白成分，即还原血红蛋白(Hb)、氧合血红蛋白(HbO<sub>2</sub>)、碳氧血红蛋白(HbCO)及微量的变性血红蛋白(MetHb)，用连二亚硫酸钠将 HbO<sub>2</sub> 和 MetHb 还原成 Hb，则血液中只存在 HbCO(I) 和 Hb(II) 两种成分。I 的最大吸收波长在 420 nm，II 的最大吸收波长在 430 nm。测出被检血样在两个波长的吸光度，再利用 I 与 II 在两个波长下的摩尔吸光系数计算 HbCO 的百分浓度。

## 3 仪器

3.1 分光光度计，10 mm 比色杯。

3.2 液体快速混合器。

3.3 采血吸管。

3.4 小玻璃管，25 mm×4 mm，带帽。

3.5 试管，10 mL，具磨口塞，实际能盛 15 mL 至满。

## 4 试剂

本标准所用试剂除另有说明者外，均为分析纯试剂。

4.1 实验用水：去离子水或经全玻璃蒸馏器重蒸的水。

4.2 硫酸， $\rho_{20}=1.84$  g/mL。

4.3 甲酸，85%(m/m)。

4.4 连二亚硫酸钠(Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)。

4.5 氮气，高纯。

4.6 氧气，高纯。

4.7 一氧化碳纯气，钢瓶装或自制。制备方法：在装有滴液漏斗和气体导出管的烧瓶中加入甲酸(4.3)，自滴液漏斗滴加浓硫酸，产生的一氧化碳通过内装氢氧化钠水溶液(4.8)的洗气瓶及缓冲瓶后通入样品液中。操作应在良好的通风橱内进行。

4.8 氢氧化钠溶液，20 g/L。

4.9 血液稀释液，0.02 mol/L 三羟甲基氨基甲烷(Tris)溶液。

4.10 肝素溶液，5 g/L。

## 5 采样、运输和保存

取末梢血约 10  $\mu$ L，直接注入到小玻璃瓶中(事先加入 5 g/L 肝素溶液 40  $\mu$ L)，立即加帽，旋转混匀以防凝血。于保温瓶上加冰运送，置冰箱冰盒内(-8 $^{\circ}$ C)保存。一周内分析完毕。

## 6 分析步骤

### 6.1 摩尔吸光系数的测定

摩尔吸光系数不易测定。但在本法计算中，可用同一浓度的血样制得 Hb 及 HbCO，测其在 420 nm，430 nm 下的吸光值来代替，作为常数。测定方法如下：

取不吸烟健康人血(肝素抗凝)用水稀释 5 倍。取 0.3 mL 加 Tris 稀释液(4.9)至 90 mL 通氧气 30 min。从中取 4 份，每份 15 mL 于具塞试管中。其中两份通氮气 10 min 以除去过剩的氧，得到 HbO<sub>2</sub> 液。另两份通纯一氧化碳气 10 min，得到 HbCO 液。立即将 HbO<sub>2</sub>、HbCO 制备液分别转入内盛 60 mg 连二亚硫酸钠的具塞试管中，混匀，放置 10 min 测量。读取 430 nm 和 420 nm 的吸光度值，代替摩尔吸光系数(以下简称吸光常数)。

### 6.2 样品处理和测定

将冷藏的血样于室温放置，用液体混合器混匀。迅速取 10  $\mu$ L(二个平行样)，加入内盛 15 mL Tris 溶液(4.9)的具塞试管中(若采样后随即分析，可直接取血 10  $\mu$ L 放入内盛 15 mL Tris 溶液的试管中)，加入 60 mg 连二亚硫酸钠，轻轻混匀放置 10 min，用 10 mm 比色杯以试剂空白为参比，测其在 420 nm 和 430 nm 处的吸光度值。

## 7 计算

按下式计算血中 HbCO 的浓度。

式中：X——血中碳氧血红蛋白的浓度，%；

$A_{420}$ ——血样在 420 nm 的吸光度读数；

$A_{430}$ ——血样在 430 nm 的吸光度读数；

$K_1$ ——HbCO 在 420 nm 的吸光常数(6.1)；

$K_2$ ——HbCO 在 430 nm 的吸光常数(6.1);

$K_3$ ——Hb 在 420 nm 的吸光常数(6.1);

$K_4$ ——Hb 在 430 nm 的吸光常数(6.1)。

## 8 说明

8.1 本法检测限(0.02 吸光度对应的浓度)为 2%HbCO。测定范围: 2%~70.5%HbCO。精密度: 批间变异系数为 1.9%~5.6%(HbCO 浓度为 9.9%、36.6%、56.8%,  $n=6$ )。准确度: 中毒病人血样加已知 HbCO 浓度血测定回收率, 平均为 95.8%(三个浓度,  $n=8$ )。

8.2 本法测定所依据的 Hb 与 HbCO 含量比例与血红蛋白含量高低无关, 因此取血量不需要很准确。吸光度常数测定后只要仪器波长稳定, 可较长时间使用。

8.3 空气中有大量氧气, 所以血样及制成的待测液接触空气越少越好。实验证明含 HbCO20% 及近饱和 HbCO 的待测液, 其容器上端空气分别为 5~6 mL 及 20 mL 时, 较装满或近满者, 测定结果 HbCO 平均下降 4.5%及 10.2%( $n=6$ )。

8.4 非高纯级的钢瓶氧气和氮气含有微量的一氧化碳。制备 HbO<sub>2</sub>时应通过加热至 80~100 °C 的 1 cm×10 cm 霍加拉特管除去之。

8.5 连二亚硫酸钠遇水易分解。应避光密封保存, 临用现称。如试剂放置过久可按附录 A(补充件)方法标定。

## 附 录 A

### 连二亚硫酸钠含量测定方法

(补充件)

#### A1 试剂

A1.1 碘, 0.1 mol/L 标准溶液。

A1.2 酚酞, 10 g/L 乙醇溶液。

A1.3 甲醛, 250 g/L 碱性甲醛溶液, 用 NaOH 将甲醛溶液的 pH 调至 8~9。

A1.4 冰乙酸, 5%(V/V)溶液。

A1.5 可溶性淀粉, 10 g/L 溶液。

#### A2 测定

用预先盛有 15 mL 碱性甲醛溶液(A1.3)的 30 mL 高型称量瓶, 称取约 1 g 样品(称重至 0.002 g)。待样品充分溶解后移于 250 mL 容量瓶中, 加水稀释至刻度, 混匀, 吸出 25 mL

置于锥形瓶中，加水稀释至刻度，混匀，吸出 25 mL 置于锥形瓶中。加 5 mL 乙酸溶液(A1.4)，2 mL 淀粉溶液(A1.5)，用 0.1 mol/L 碘溶液(A1.1)滴定至蓝色为终点。

### A3 计算

连二亚硫酸钠的百分含量按式(A1)计算：

$$\dots\dots\dots(A1)$$

式中：c——碘溶液的浓度，mol/L；

V——滴定用去碘溶液之体积，mL；

m——称取试样之质量，g；

0.04352——与 1.00 mL 碘标准溶液相当的以克表示的连二亚硫酸钠的质量。

#### 附加说明：

本标准由卫生部卫生监督司提出。

本标准由中国预防医学科学院劳动卫生与职业病研究所和天津防病中心负责起草。

本标准主要起草人马相民、线引林。

本标准由卫生部委托技术归口单位中国预防医学科学院劳动卫生与职业病研究所负责解释。

中华人民共和国卫生行业标准。

WS/T 42-1996。

血中碳氧血红蛋白的分光光度测定方法。

Blood -Determination of carboxyhemoglobin-Spectrophotometric method.

中华人民共和国卫生部 1996-10-14 批准，1997-05-01 实施。