



## 高铁血红蛋白(MetHb)含量检测试剂盒微量法

中文名称：高铁血红蛋白(MetHb)含量检测试剂盒微量法

英文名称：Methemoglobin (MetHb) Content Assay Kit

产品包装：盒装

产品规格：100T/96S

储存条件：2-8℃

检测方法：微量法

有效期：6个月

### 产品组成：

| 试剂名称 | 规格           | 保存条件   |
|------|--------------|--------|
| 试剂一  | 液体 25 mL×1 瓶 | 2-8℃保存 |
| 试剂二  | 液体 30mL×1 瓶  | 2-8℃保存 |
| 标准品  | 粉剂×1 支       | 2-8℃保存 |

### 溶液的配制：

1. 标准品：临用前加入 1mL 蒸馏水充分溶解，即为 10mg/mL 血红蛋白标准品，2-8℃可保存 4 周。

0.625 mg/mL 标准品配制：取 50 $\mu$ L 10mg/mL 血红蛋白标准品，加入 750 $\mu$ L 蒸馏水，充分混匀，配制成 0.625mg/mL 的血红蛋白标准品使用，现配现用。

### 产品说明：

高铁血红蛋白(Methemoglobin，MetHb)为血红蛋白的氧化物，是血红蛋白分子内的亚铁离子被氧化成三价铁离子形成的。血红蛋白具有携氧能力，氧化后的高铁血红蛋白失去携



氧能力，测定高铁血红蛋白含量可以衡量血液及红细胞代用品携氧能力，其测定方法对临床诊断高铁血红蛋白血症和研制红细胞代用品具有重要意义。

血红蛋白与氧结合形成氧合血红蛋白，脱氧后为脱氧血红蛋白，分别测定氧合血红蛋白、脱氧血红蛋白和高铁血红蛋白在 560nm、576nm、630nm 处的吸光值，利用各组分在特定波长的消光系数，可计算各组分的质量浓度百分比，再测出样本的总血红蛋白含量，即可计算得到样本的高铁血红蛋白含量。

**注意：**实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

**需自备的仪器和用品：**

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、微量玻璃比色皿/96 孔板、可调式移液枪、冰和蒸馏水。

**操作步骤：**

**一、样本处理(可适当调整待测样本量)**

1. 全血/溶血液/血浆/血清：直接测定。血清、血浆若有浑浊请离心后取上清置于冰上待测。

**二、测定步骤**

**A、总血红蛋白含量测定**

1、可见分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 400nm，分光光度计用蒸馏水调零。

2、操作表：

| 试剂名称(μL) | 空白管(A 空白) | 测定管(A 总) | 标准管(A 标准) |
|----------|-----------|----------|-----------|
| 蒸馏水      | 50        | -        | -         |



|     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|
| 样本  | -   | 50  | -   |
| 标准品 | -   | -   | 50  |
| 试剂一 | 200 | 200 | 200 |

充分混匀，常温静置 5min，取反应液于微量玻璃比色皿/96 孔板中，测定 400nm 处吸光值 A，记为 A 空白、A 总、A 标准，计算 $\Delta A_{总} = A_{总} - A_{空白}$ ， $\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{空白}$ 。空白管和标准管只需测 1-2 次。

## B、高铁血红蛋白含量测定

1、可见分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 560 nm、576 nm、630nm，分光光度计蒸馏水调零。

2、操作表：在 1.5mLEP 管中依次加入以下试剂)

| 试剂名称(μL) | 测定管 |
|----------|-----|
| 样本       | 5   |
| 试剂二      | 250 |

充分混匀，常温静置 5min，取 200μL 反应液于微量玻璃比色皿/96 孔板中，分别测定 560、576、630nm 处的吸光度，分别记为 A560、A576、A630。

## 三、高铁血红蛋白(MetHb)含量的计算

1. 总血红蛋白(Hb)含量计算：

$$\text{总血红蛋白含量(mg/mL)} = \Delta A_{总} \div (\Delta A_{标准} \div C_{标准}) \times F = 0.625 \times \Delta A_{总} \div \Delta A_{标准} \times F$$

C 标准：标准品的浓度，0.625 mg/mL；F：稀释倍数。

2. 高铁血红蛋白含量计算

$$[\text{DeoxyHb}] = (1.3687 \times A560 - 0.7451 \times A576 - 0.7091 \times A630) \times 10^{-4} \div 4$$

$$[\text{OxyHb}] = (-0.7292 \times A560 + 1.0098 \times A576 - 0.3722 \times A630) \times 10^{-4} \div 4$$

$$[\text{MetHb}] = (-0.3854 \times A560 + 0.1856 \times A576 + 2.8609 \times A630) \times 10^{-4} \div 4$$

$$\text{MetHb(\%)} = [\text{MetHb}] \div ([\text{MetHb}] + [\text{OxyHb}] + [\text{DeoxyHb}]) \times 100\%$$

$$\text{高铁血红蛋白含量(mg/mL)} = \text{总血红蛋白含量} \times \text{MetHb(\%)}$$

DeoxyHb: 脱氧血红蛋白(Deoxyhemoglobin); OxyHb: 氧合血红蛋白(Oxyhemoglobin);



MetHb(%): 被检测样本中的高铁血红蛋白占比; 100: 百分比单位换算系数。

**注意事项:**

1. 如果 A 总大于 1.0 , 建议将样本用蒸馏水稀释后进行测定, 计算公式中注意同步修改。
2. 如果 A 总小于 0.01 或接近空白管吸光值, 可适当增大样本量, 空白管和标准管也需要进行相应调整。

**实验实例:**

1. 取兔红细胞, 用蒸馏水稀释 50 倍后测定总血红蛋白含量, 不稀释直接测定 A560 、 A576 、 A630 , 用 96 孔板测得计算  $\Delta A_{总} = A_{总} - A_{空白} = 0.899 - 0.053 = 0.846$ ,  $\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{空白} = 0.326 - 0.053 = 0.273$ ; A560=0.573, A576=0.999 , A630=0.069;

**计算:**

(1)总血红蛋白含量(mg/mL) =  $0.625 \times \Delta A_{总} \div \Delta A_{标准} \times F = 96.84 \text{ mg/mL}$

(2)MetHb(%) =  $0.1620 \div (-0.0090 + 0.5653 + 0.1620) \times 100\% = 22.55\%$

(3)高铁血红蛋白含量(mg/mL) = 总血红蛋白含量  $\times$  MetHb(%) = 21.837mg/mL

2. 取兔红细胞, 用蒸馏水稀释 80 倍后测定总血红蛋白含量, 不稀释直接测定 A560、A576、A630, 用 96 孔板测得计算  $\Delta A_{总} = A_{总} - A_{空白} = 0.906 - 0.053 = 0.853$ ,  $\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{空白} = 0.326 - 0.053 = 0.273$ ; A560=0.998, A576=1.760 , A630=0.076;

**计算:**

(1)总血红蛋白含量(mg/mL) =  $0.625 \times \Delta A_{总} \div \Delta A_{标准} \times F = 156.23 \text{ mg/mL}$

(2)MetHb(%) =  $0.1595 \div (0.0007 + 1.0212 + 0.1595) \times 100\% = 13.5\%$

(3)高铁血红蛋白含量(mg/mL) = 总血红蛋白含量  $\times$  MetHb(%) = 21.09 mg/mL