

高铁血红蛋白（MetHb）含量检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号：AC17800

规格：50T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 50mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 60mL×1 瓶	2-8°C保存
标准品	粉剂×1 支	2-8°C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°C可保存4周。
2. 0.625 mg/mL标准品配制：取50 μ L 10mg/mL血红蛋白标准品，加入750 μ 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、低温离心机、1mL玻璃比色皿、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，具体比例可以参考文献）

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、可见分光光度计预热30min以上，调节波长至400nm，用蒸馏水调零。
- 2、操作表：（在1.5mLEP管中依次加入以下试剂）

试剂名称 (μL)	空白管 (A空白)	测定管 (A总)	标准管 (A标准)
蒸馏水	200	-	-
样本	-	200	-
标准品	-	-	200
试剂一	800	800	800

充分混匀，常温静置5min，取反应液于1mL玻璃比色皿中，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、可见分光光度计预热30min以上，调节波长至560 nm、576 nm、630nm，用蒸馏水调零。

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	20
试剂二	1000

充分混匀，常温静置5min，取反应液于1mL玻璃比色皿中，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 (MetHb) 含量计算

$$[\text{DeoxyHb}] = (1.3687 \times A_{560} - 0.7451 \times A_{576} - 0.7091 \times A_{630}) \times 10^{-4} \div 4$$

$$[\text{OxyHb}] = (-0.7292 \times A_{560} + 1.0098 \times A_{576} - 0.3722 \times A_{630}) \times 10^{-4} \div 4$$

$$[\text{MetHb}] = (-0.3854 \times A_{560} + 0.1856 \times A_{576} + 2.8609 \times A_{630}) \times 10^{-4} \div 4$$

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

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

F：稀释倍数；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。

注意事项：

- 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。
- 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：

- 将兔红细胞，用蒸馏水稀释 100 倍后测定总血红蛋白含量，不稀释直接测定 A560、A576、A630，用 1mL 玻璃比色皿测得并计算 $\Delta A_{总} = A_{总} - A_{空白} = 0.537 - 0.007 = 0.530$ ， $\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{空白} = 0.369 - 0.007 = 0.362$ ； $A_{560} = 0.741$ ， $A_{576} = 1.218$ ， $A_{630} = 0.104$ ；计算：

$$(1) \text{总血红蛋白含量 (mg/mL)} = 0.625 \times \Delta A_{总} \div \Delta A_{标准} \times F = 91.51 \text{ mg/mL}$$

$$(2) \text{MetHb} (\%) = 0.2380 \div (0.2380 + 0.6509 + 0.0329) \times 100\% = 25.82\%$$

$$(3) \text{高铁血红蛋白含量 (mg/mL)} = \text{总血红蛋白含量} \times \text{MetHb} (\%) = 23.627 \text{ mg/mL}$$

2. 将兔全血，用蒸馏水稀释 160 倍后测定总血红蛋白含量，不稀释直接测定 A560、A576、A630，用 1mL 玻璃比色皿测得计算 $\Delta A_{\text{总}} = A_{\text{总}} - A_{\text{空白}} = 0.570 - 0.007 = 0.563$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}} = 0.369 - 0.007 = 0.362$ ； $A_{560} = 1.111$ ， $A_{576} = 1.650$ ， $A_{630} = 0.072$ ，计算：

$$(1) \text{总血红蛋白含量 (mg/mL)} = 0.625 \times \Delta A_{\text{总}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times F = 155.525 \text{ mg/mL}$$

$$(2) \text{MetHb} (\%) = 0.084 \div (0.2402 + 0.8292 + 0.0840) \times 100\% = 7.283\%$$

$$(3) \text{高铁血红蛋白含量 (mg/mL)} = \text{总血红蛋白含量} \times \text{MetHb} (\%) = 11.33 \text{ mg/mL}$$

3. 将小鼠全血，用蒸馏水稀释 160 倍后测定总血红蛋白含量，不稀释直接测定 A560、A576、A630，用 1mL 玻璃比色皿测得并计算 $\Delta A_{\text{总}} = A_{\text{总}} - A_{\text{空白}} = 0.787 - 0.007 = 0.780$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}} = 0.369 - 0.007 = 0.362$ ； $A_{560} = 1.518$ ， $A_{576} = 1.821$ ， $A_{630} = 0.373$ ，计算：

$$(1) \text{总血红蛋白含量 (mg/mL)} = 0.625 \times \Delta A_{\text{总}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times F = 215.47 \text{ mg/mL}$$

$$(2) \text{MetHb} (\%) = 0.8201 \div (0.4564 + 0.5931 + 0.8201) \times 100\% = 43.86\%$$

$$(3) \text{高铁血红蛋白含量 (mg/mL)} = \text{总血红蛋白含量} \times \text{MetHb} (\%) = 95.51 \text{ mg/mL}$$

相关系列产品：

AC10349/AC10350 血清铁浓度检测试剂盒

AC17860/AC17861 亚铁离子含量检测试剂盒

AC17960/AC17961 血红蛋白 (Hb) 含量检测试剂盒

AC17943/AC17945 游离血红蛋白 (FHb) 含量检测试剂盒

AC17942/AC17801 糖化血红蛋白 (GHb) 含量检测试剂盒