

# 高铁血红蛋白 (MetHb) 测试盒

(货号: BC142 100 管/96 样)

## 一、试剂组成及配制: (试剂盒有效期 6 个月)

试剂组成	成分	50T/48 样	100T/96 样	保存
试剂一	血红蛋白测定浓缩液	1mL×2 支	1mL×4 支	4°C
	临用前将浓缩液用双蒸水 1 : 99 稀释, 即 100 倍稀释配成 <b>血红蛋白测定应用液</b> , 现用现配。配好的试剂 2~8°C 避光保存, 可存放 1 个月。			
试剂二	高铁血红蛋白测定浓缩液	30mL×1 瓶	60mL×1 瓶	4°C
	用时按浓缩液 : 双蒸水 = 1 : 9 稀释, 即 10 倍稀释配成 <b>高铁血红蛋白测定应用液</b> , 配好后可存放 6 个月。			
试剂三	还原血红蛋白曲线粉剂	1 支	1 支	4°C 避光
	还原血红蛋白曲线粉剂稀释液	1mL×1 支	1mL×1 支	4°C
	临用前每支粉剂加入 1 支稀释液配成 <b>试剂三应用液</b> , 现用现配, 注意避光。			
试剂四	高铁血红蛋白曲线粉剂	1 支	1 支	4°C 避光
	高铁血红蛋白曲线稀释液	1mL×1 支	1mL×1 支	4°C
	临用前每支粉剂加入 1 支稀释液配成 <b>试剂四应用液</b> , 现用现配, 注意避光。			

## 二、检测意义:

体内一氧化氮弥散入血后, 很快与氧合血红蛋白结合形成高铁血红蛋白 (methemoglobin, MetHb), NO 与 MetHb 变化相关, 故全血 MetHb 检测近年来受到临床的广泛重视。同时血液中高铁血红蛋白含量的测定对接触芳香族氨基、硝基化合物所引起的中毒性疾病的诊断与治疗, 有重要的意义。

## 三、测定原理:

高铁血红蛋白在 630nm 波长处有一特征吸收峰, 而高铁血红蛋白 (MetHb) 和还原血红蛋白 (Hb) 在 602nm 波长处光密度值相等, 利用此关系可以通过相应的公式算出高铁血红蛋白含量。

## 四、所需仪器及试剂:

可见光分光光度计及 1cm 光径比色皿, 蒸馏水, 试管或离心管, 涡旋混匀器。

## 五、操作步骤：

- 1、**制备抗凝全血：**取全血立即加入到肝素抗凝管内，加盖封口，轻轻颠倒混匀。
- 2、**血红蛋白含量的测定：**取 0.01mL 全血与 2.5mL 的 100 倍稀释的试剂一应用液（血红蛋白测定应用液），混匀，静置 5 分钟后，1cm 光径，双蒸水调零，540nm 处测定各管吸光度值。
- 3、**高铁血红蛋白测定：**取 0.05mL 全血，加入 2.5mL 的试剂二稀释应用液（即高铁血红蛋白测定应用液），混匀，静置 5 分钟后，1cm 光径，双蒸水调零，测定 630nm 处及 602nm 处吸光度值。如果没有双波长的分光光度计则可以先测定各管 630nm 处吸光度值，然后再测各管 602 nm 处吸光度值。但一定要注意各管的编号不要弄错。

## 六、计算公式：

### ①、血红蛋白含量的计算：

$$\text{血红蛋白含量 (g/L)} = A_{540\text{nm}} \times 367.7$$

### ②、高铁血红蛋白百分比计算：

$$\text{MetHb\%} = \frac{A_{630\text{nm}} - r \times A_{602\text{nm}}}{A_{602\text{nm}} \times (R-r)} \times 100\%$$

### ③、高铁血红蛋白含量的计算：

$$\text{高铁血红蛋白含量 (g/L)} = \text{MetHb\%} \times \text{血红蛋白含量 (g/L)}$$

【注 1】  $A_{630}$  即在 630nm 波长时样本的吸光度值； $A_{602}$  即在 602nm 波长时样本的吸光度值

【注 2】 R 与 r 均为常数，**R=1.81**；**r=0.14**。（本研究所测定常数）

即计算公式可以简化为：

### ①、高铁血红蛋白百分比：

$$\text{MetHb\%} = \frac{A_{630\text{nm}} - 0.14 \times A_{602\text{nm}}}{A_{602\text{nm}} \times 1.67} \times 100\%$$

### ②、高铁血红蛋白含量的计算：

$$\text{高铁血红蛋白含量 (g/L)} = \text{MetHb\%} \times \text{血红蛋白含量 (g/L)}$$

## 七、计算举例：

- ①、取吸烟人全血，立即加入到肝素抗凝管内，加盖封口，轻轻颠倒混匀。
- ②、取该全血 0.01mL 与 2.5mL 的 100 倍稀释的试剂一应用液（血红蛋白测定应用液），混匀，静置 5 分钟后，540nm 处，1cm 光径，双蒸水调零，测定吸光度值为 0.373，则通过公式可计算出血红蛋白含量：

### 血红蛋白含量计算：

$$\text{血红蛋白含量 (g/L)} = 0.373 \times 367.7 = 137.15\text{g/L}$$

- ③、再取该全血 0.05mL，加入 2.5mL 的试剂二稀释应用液（即高铁血红蛋白测定应用液），混匀，静置 5 分钟后，1cm 光径，双蒸水调零，测得 602nm 处的吸光度值为 0.226，测定管 630nm 处的吸光度值为 0.066，通过公式可计算出**高铁血红蛋白百分比**：

### 高铁血红蛋白百分比计算：

$$\text{MetHb}\% = \frac{A_{630\text{nm}} - r \times A_{602\text{nm}}}{A_{602\text{nm}} \times (R - r)} \times 100\%$$

$$= \frac{0.066 - 0.14 \times 0.226}{0.226 \times 1.67} \times 100\% = 9.10\%$$

**高铁血红蛋白含量的计算：**

$$\begin{aligned} \text{高铁血红蛋白含量 (g/L)} &= \text{MetHb}\% \times \text{血红蛋白含量 (g/L)} \\ &= 0.091 \times 137.15 \\ &= 12.486\text{g/L} \end{aligned}$$

**八、注意事项：**

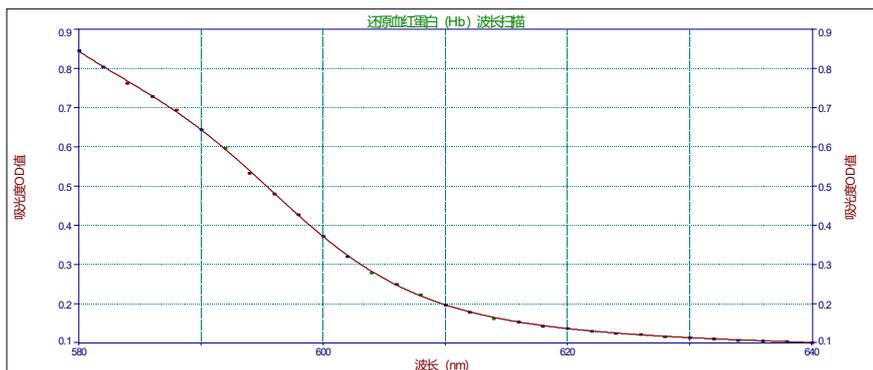
- ①、取血后应在 1 小时内完成实验，否则影响测定结果，因为红细胞中的还原酶可使高铁血红蛋白逐渐还原，使结果降低。但可放 -20℃ 以下冷冻保存，如果血样较多，可将全血分成几小管，每次测试可取其一小管，余下各管仍保存 -20℃ 以下以备重复测试，其结果不受影响。
- ②、本实验可用双波长分光光度计测定，可同时测定 602nm 处及 630nm 处吸光度值，进行计算。也可用单波长分光光度计测定，可以先测定各管 630nm 处吸光度值，然后再测各管 602 nm 处吸光度值。但一定要注意各管的编号不要弄错。
- ③、如果您实验室分光光度计没有双波长扫描功能，可以不做标准曲线，直接用本所实验室 R 与 r 均为常数，**R=1.81；r=0.14**。
- ④、所用器皿要干净。

**九、特征波峰的扫描：**

○ 还原血红蛋白波长扫描曲线：

加入物	还原血红蛋白管
全血 (mL)	0.02
试剂二应用液 (mL)	2.50
试剂三应用液 (mL)	0.05

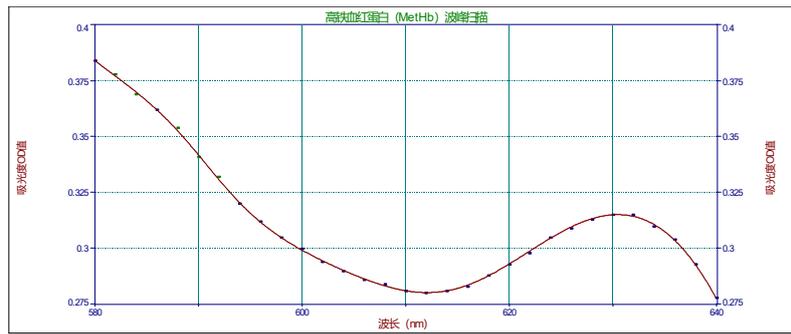
混匀，静置 5 分钟后，1cm 光径，双蒸水调零，进行波长扫描



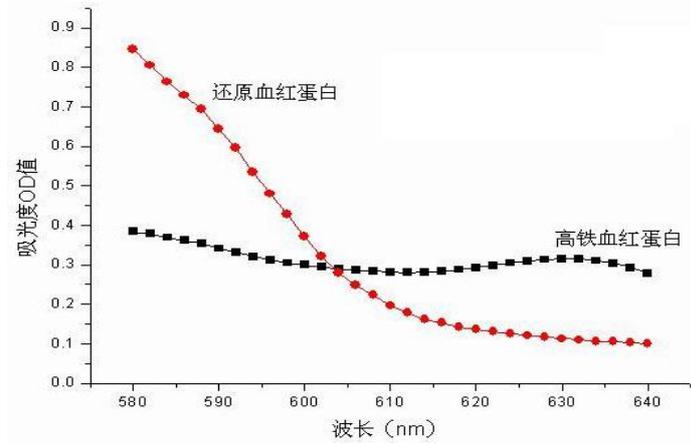
○ 高铁血红蛋白波长扫描曲线操作：

加入物	高铁血红蛋白管
全血 (mL)	0.02
试剂二应用液 (mL)	2.50
试剂四应用液 (mL)	0.05

混匀，静置 5 分钟后，1cm 光径，双蒸水调零，进行波长扫描



○ 曲线拼合:



高铁血红蛋白 (MetHb) 和还原血红蛋白 (Hb) 波长扫描曲线相交于 602nm 处,即高铁血红蛋白 (MetHb) 和还原血红蛋白 (Hb) 在 602nm 波长处光密度值相等