

游离脂肪酸（free fatty acid, FFA）含量测定试剂盒说明书

测定意义：

FFA 既是脂肪水解的产物，又是脂肪合成的底物。FFA 的浓度与脂类代谢、糖代谢、内分泌功能有关，也可反映食物贮藏中的品质变化。

测定原理：

在弱酸性条件下，FFA 与铜盐反应生成铜皂，在 715nm 处有特征吸收峰，在一定范围内游离脂肪酸含量与显色程度呈线性关系。

自备仪器和用品：

研钵、台式离心机、可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿。

试剂组成和配制：

试剂一：液体×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：液体×1 瓶，4℃ 保存。

试剂三：液体×1 瓶，4℃ 保存。

样品中 FFA 提取：

- 1、血液：将所取血液，室温静置 1 h 后，于 4℃ 离心机 3500 rpm 离心 15min，取上清 0.1mL，加 1.2mL 试剂一，震荡提取 3h，8000rpm，4℃ 离心 10min，取上清液待测。
- 2、组织：组织用蒸馏水冲洗干净后，用吸水纸吸取表面水分，捣碎后称取约 0.1g 转移至离心管，按照组织质量（g）：试剂一体积（mL）为 1：12 的比例加入试剂一，震荡提取 3h，8000rpm，4℃ 离心 10min，取上清液待测。
- 3、细菌、真菌：按照细胞数量（ 10^4 个）：试剂一体积（mL）为 500~1000：1.2 的比例（建议 500 万细胞加入 1.2mL 试剂一）加入试剂一，冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 2 秒，间隔 3 秒，总时间 3min）；震荡提取 3h，然后 8000rpm，4℃，离心 10min，取上清待测。

测定操作：

1. 分光光度计预热 30 min 以上，调节波长到 715 nm。
 2. 对照管：取上清液 1mL，加 0.5mL 试剂二，充分震荡 5min，室温静置 5min，取上层 0.8mL 于 1mL 玻璃比色皿，调零。
 3. 测定管：取上清液 1mL，加 0.5mL 试剂三，充分震荡 5min，室温静置 5min，取上层 0.8mL 于 1mL 玻璃比色皿，测定吸光值，记为 A。
- 记为 A 测定管。

FFA 含量计算：

标准曲线： $y=0.0075x+0.0055$ ， $R^2=0.994$

1. 血液中 FFA 含量计算

$FFA (\mu\text{ mol/L}) = (A-0.0055) \div 0.0075 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} = 1333 \times (A-0.0055)$

2. 组织中 FFA 含量计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

$FFA (\mu\text{ mol/mg prot}) = (A-0.0055) \div 0.0075 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) = 0.133 \times (A-0.0055) \div C_{\text{pr}}$

(2) 按样本质量计算

$FFA (\mu\text{ mol/g}) = (A-0.0055) \div 0.0075 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) = 0.16 \times (A-0.0055) \div W$

3. 按细胞数量计算

$FFA (\mu\text{ mol}/10^4\text{ cell}) = (A-0.0055) \div 0.0075 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量})$
 $= 0.16 \times (A-0.0055) \div \text{细胞数量}$

V 样总: 上清液总体积, 1.2 mL; V 反总: 反应总体积, 1mL; V 样: 加入样本体积, 1mL;
W: 样本鲜重, g; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL