

游离脂肪酸（FFA）含量检测试剂盒说明书

可见分光光度法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC0590

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，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	自备试剂	-
试剂二 A	液体 16 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二 B	粉剂×1 瓶	2-8°C保存
试剂三	粉剂×2 瓶	2-8°C保存
标准品	粉剂×1 支	常温保存

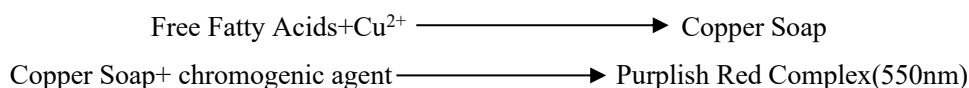
溶液的配制：

- 1、试剂一：实验前，取一个玻璃瓶，按照正庚烷：无水甲醇：氯仿=24:1:25 的比例配制（自备），盖紧后混匀，大概需要 50mL，2-8°C保存。使用后及时封口；
- 2、试剂二：将试剂二 B 倒入试剂二 A 中 40°C加热溶解 20min，此溶液为饱和溶液，若还有粉剂未溶解，取上清使用即可，2-8°C可以保存 3 个月；
- 3、试剂三：临用前取一瓶加入 32 mL 无水乙醇充分溶解，未用完的试剂 2-8°C可以保存 2 周；
- 4、标准品：临用前把试剂转移到 10 mL 玻璃瓶中，加入 7.8 mL 氯仿充分溶解，即为 5μmol/mL 的棕榈酸标准溶液，未用完的试剂 2-8°C封口膜封口，可以保存 4 周。

产品说明：

FFA既是脂肪水解的产物，又是脂肪合成的底物。血清中FFA的浓度与脂类代谢、糖代谢、内分泌功能有关。

FFA与铜离子结合形成脂肪酸铜盐，并溶于氯仿；利用铜试剂法测定铜离子含量，即可推算出游离脂肪酸含量。



技术指标：

线性范围：0.025-0.8 μmol/mL

检出限：0.012 μmol/mL

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、台式离心机、可调式移液枪、1mL 玻璃比色皿、漩涡混匀器、研钵/匀浆器、一个 50mL 玻璃瓶、一个 10 mL 玻璃瓶、正庚烷、无水甲醇、氯仿（三氯甲烷）、冰、无水乙醇和蒸馏水。

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、血清中 FFA 测定：将所取血液，室温静置 1 h 后，4 °C，3500 rpm 离心 15min，取上层血清置于冰上保存，待测。

2、组织中 FFA 含量测定：组织用生理盐水冲洗干净后，用吸水纸吸取表面水分，按照组织质量 (g)：提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液），进行冰浴匀浆。8000rpm，4 °C 离心 10min，取上清液，待测。

二、测定步骤

1. 分光光度计预热 30 min 以上，调节波长到 550 nm，无水乙醇调零。

2. 试剂二在 37 °C 水浴中预热 20min 以上。

3. 标准品的稀释：将标准品用氯仿稀释成 0.8、0.6、0.4、0.2、0.1、0.05、0.025 μmol/mL。

4. 标准品稀释表

序号	稀释前浓度 (μmol/mL)	标准液体积 (μL)	氯仿体积 (μL)	稀释后浓度 (μmol/mL)
1	5	200	800	1
2	1	160	40	0.8
3	1	120	80	0.6
4	1	160	240	0.4
5	0.4	200	200	0.2
6	0.2	200	200	0.1
7	0.1	200	200	0.05

备注：实验中每个标准管需 50 μL 标准溶液。

5. 按下表在 1.5mL 离心管中加入相应试剂

	对照管	测定管	空白管	标准管
蒸馏水 (μL)	50	-	-	-
样本 (μL)	-	50	-	-
氯仿 (μL)	-	-	50	-
标准品 (μL)	-	-	-	50
试剂一 (μL)	500	500	500	500
试剂二 (μL)	200	200	200	200
充分振荡15min后，3000rpm，离心10min				
上层溶液 (μL)	200	200	200	200
试剂三 (μL)	800	800	800	800
充分振荡5min后，静置15min，于550 nm下测吸光值，分别记为A对照管、A测定管、A空白管、A标准管。 $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ ， $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ （对照管、空白管和标准曲线只需做1-2次）。				

三、FFA 含量计算

1、根据标准管的浓度 (x, μmol/mL) 和吸光度 $\Delta A_{\text{标准}}$ (y, $\Delta A_{\text{标准}}$)，建立标准曲线。根据标准曲线，将 $\Delta A_{\text{测定}}$ (y, $\Delta A_{\text{测定}}$) 带入公式计算样本浓度 (x, μmol/mL)。

2、血清中FFA含量计算:

$$\text{FFA } (\mu\text{mol/L}) = 1000x$$

3、组织中FFA含量计算:

(1) 按样本蛋白浓度计算

$$\text{FFA含量 } (\mu\text{mol/mg prot}) = x \times V_{\text{样总}} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样总}}) = x \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本质量计算

$$\text{FFA } (\mu\text{mol/g 质量}) = x \times V_{\text{样总}} \div W$$

V样总: 上清液总体积, 1 mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 1000: 单位换算系数, 1L=1000mL。

注意事项:

1. 试剂三配制应尽量晚配, 可在操作到加入试剂二时, 再配制试剂三。
2. 必须保证每管的震荡频率及时间一致。
3. 尽量在 30min 内完成测量, 并且测完后要密封好再丢弃。
4. 因所用试剂多数为有机溶剂, 同一支吸头多次吸取会造成体积不准确, 建议更换吸头。

实验实例:

- 1、取小鼠血清进行样本处理, 按照测定步骤操作, 测得 A 对照管=0.091、A 测定管=0.527、 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管=0.527-0.091=0.436, 带入标准曲线 $y = 1.3429x + 0.1189$, 计算 $x = 0.236$, 按血清含量计算:
FFA 含量 ($\mu\text{mol/L}$) = $1000x = 1000 \times 0.236 = 236 \mu\text{mol/L}$ 。

相关发表文献:

- [1] Shanming Ruan,Zhiqian Zhang, Xinxin Tian,et al. Compound Fuling Granule Suppresses Ovarian Cancer Development and Progression by disrupting mitochondrial function, galactose and fatty acid metabolism. Journal of Cancer. September 2018;(IF3.182)
- [2] Tunyu Jian,Yuexian Wu,Xiaoqin Ding,et al. A novel sesquiterpene glycoside from Loquat leaf alleviates oleic acid-induced steatosis and oxidative stress in HepG2 cells. Biomedicine & Pharmacotherapy. January 2018;(IF3.743)
- [3] Rui Wang,Junhua Yuan,Caishun Zhang,et al. Neuropeptide Y-Positive Neurons in the Dorsomedial Hypothalamus Are Involved in the Anorexic Effect of Angptl9. Frontiers in Immunology. December 2018;(IF3.72)
- [4] Yao L, Chen S, Li W. Fatostatin inhibits the development of endometrial carcinoma in endometrial carcinoma cells and a xenograft model by targeting lipid metabolism[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2020: 108327.

参考文献:

- [1] Laurell S, Tibbling G. Colorimetric micro-determination of free fatty acids in plasma[J]. Clinica chimica acta, 1967, 16(1): 57-62.
- [2] Itaya K. A more sensitive and stable colorimetric determination of free fatty acids in blood[J]. Journal of lipid Research, 1977, 18(5): 663-665.
- [3] Duncombe W G. The colorimetric micro-determination of non-esterified fatty acids in plasma[J]. Clinica chimica acta, 1964, 9: 122-125.

相关系列产品：

BC2340/BC2345 脂肪酶（LPS）活性检测试剂盒

BC1080/BC1085 乙醇脱氢酶（ADH）活性检测试剂盒