

## 抗性淀粉检测试剂盒-分光法 50T

### 前言

抗性淀粉（RS）是指在人小肠内不能被酶解的淀粉，在大肠部分或完全发酵。RS 是总膳食纤维的组分之一。

抗性淀粉的测定方法：样品使用 $\alpha$ -胰淀粉酶和淀粉葡萄糖苷酶（AMG）37°C振荡水浴孵育 16 小时，在这期间，通过两种酶的联合作用，非抗性淀粉被溶解，水解成 D-葡萄糖，孵育结束后，加入等体积的乙醇或工业甲基化酒精（IMS,变性乙醇）终止反应。离心上述溶液，收集上清勿弃，底部残留絮状团即为样品中的 RS，用含水的 IMS 或乙醇（50%v/v）洗涤絮状团，洗涤后离心，再重复一次洗涤离心，收集离心后获得的上清，与之前收集的上清混合。小心倒出试管残留的液体，将絮状团置于冰水浴中，加入 2M KOH 溶解，溶解的同时用磁力搅拌机剧烈搅拌。用醋酸盐缓冲液将这个溶液调至中性，用 AMG 将淀粉定量水解成葡萄糖。D-葡萄糖用葡萄糖氧化酶/过氧化物酶试剂（GOPOD）测定，这也是对样品中 RS 含量的测定。非抗性淀粉（可溶性淀粉）的测定可通过集中的上清液并定容至 100ml，再用 GOPOD 测定 D-葡萄糖完成。

### 应用性和精确性

这个方法需要样品中 RS 含量多于 2% w/w, 如 RS 含量多于 2% w/w, 常规标准误差为 $\pm 5\%$ , 少于 2% w/w RS 的误差更高。

### 试剂盒组成与配制

试剂名称	储存条件	KB058-50T	注意事项
试剂一	-20°C	粉剂 5ml×1 瓶	用之前可分为适当大小的等分试样，并在使用期间储存在-10°C以下的聚丙烯管中，如有可能，在使用过程中保持冷却。（未配制时在-20°C稳定 2 年以上，配制使用后在-20°C稳定 1~3 个月）
试剂二	-20°C	粉剂 g×5g	用 100ml 顺丁烯二酸钠缓冲液(100mM, pH6.0)悬浮 1g 试剂二中的产品，搅拌 5 分钟。加入 1.0ml 稀释后试剂一（过程见：溶液/悬浮液的制备），混匀，>1500g 离心 10 分钟，慢慢倒出上清液，这就是制备的试剂二。（试剂二制备后应当天使用）注：可根据实验过程中的使用量适量配制
试剂三	4°C	粉剂 g×1 瓶	用之前加 450ml 蒸馏水溶解混匀，后用 2M 氢氧化钾调节至 pH7.4，最后用蒸馏水定容至 500ml，即为试剂三。

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



试剂四	-20℃	粉剂 mg×1 瓶	用 20ml 试剂三缓冲液溶解试剂四中的内容物,并将其定量转移到含有剩余试剂三缓冲液的瓶子中。用铝箔盖住这个瓶子,以保护密封的试剂不受光照,此试剂为 GOPOD 试剂。(未配制时在 2-5℃或<-10℃下存放超过 12 个月,配制使用后在 2-5℃或<-20℃可稳定 1~3 个月) 备注:如果该试剂要以冷冻状态储存,则最好将其分装为小份,在使用过程中仅冷冻/解冻一次。 新制备试剂,其颜色为浅黄色或浅粉色。在 2-3 个月后,若该溶液将呈现出更强烈的粉红色应立即对照蒸馏水读数,吸光度应小于 0.05,若大于此数值,则表示该溶液不可再使用。
标准品	4℃	液体 5ml×1 瓶	D-葡萄糖标准溶液 (5 ml, 1.0 mg/ml)

### 溶液/悬浮液的制备

试剂一的稀释:使用移液枪吸取 2 ml 试剂一溶液用顺丁烯二酸钠缓冲液 (100mM pH6.0) 稀释至 22ml。

**注意:**以 5 ml 为单位分装后-20℃保存,反复冻融不会影响其稳定性。

### 溶液配制

1. 顺丁烯二酸钠 (马来酸钠) 缓冲液(100mM, pH6.0)含 2mM 二水合 CaCl<sub>2</sub> 和 0.02%叠氮化钠 (防腐剂,若没有该试剂可不添加):用 1600ml 蒸馏水溶解 23.2g 顺丁烯二酸钠,接着用 NaOH 调节 pH 至 6.0,加入 0.6g 二水合 CaCl<sub>2</sub> 和 0.4g 叠氮化钠,混合并溶解,定容至 2L。
2. 醋酸钠缓冲液 (1.2M, PH3.8):将 69.6ml 的冰醋酸加至 800 ml 的蒸馏水中,用 NaOH 调节 pH 至 pH3.8,用蒸馏水定容至 1L。
3. 醋酸钠缓冲液 (100mM, PH4.5):将 5.8ml 的冰醋酸加至 900 ml 的蒸馏水中,用 NaOH 调节 pH 至 4.5,用蒸馏水定容至 1L。
4. 氢氧化钾溶液 (2M):将 112.2g KOH 加至 900 ml 的去离子水中,搅拌溶解。定容至 1L,密封保存。
5. 50%乙醇:将 500ml 乙醇 (95%v/v 或者 99%v/v 加入 500ml 的水中,密封保存。



## 仪器设备

1. 离心式粉碎机，带有齿轮转子和 1.0mm 筛子，或类似的装置；小型样品可选择磨碎机替代。
2. 绞肉机-手动或电动的，装有 4.5mm 筛
3. 台式离心机
4. 振荡水浴器，可设定为每分钟 100 次直线运动（振荡速度为每分钟 200 里程），振荡距离 35mm,37°C
5. 水浴锅
6. 涡旋仪
7. 磁力搅拌器
8. 磁力搅拌棒-5×15mm
9. pH 计
10. 计时器
11. 分析天平（精确到 0.1mg）
12. 分光光度计-能够设定 510nm（10mm 路径长度）
13. 100 $\mu$ L 移液器及一次性枪头
14. 连续分配器配有 50ml 管嘴，能够移取 2.0ml，3.0ml 和 4.0ml
15. 温度计-能够读取 37+0.1°C和 50+0.1°C
16. 容量瓶-100ml，200ml，500ml，1L，2L

## 样品制备

用磨碎机研磨大约 50g 谷物样品或冻干植物或食品，使样品粉末可过 1.0mm 筛，转移所有的材料至广口瓶，颠倒振荡混匀。工业淀粉一般不用研磨，用绞肉机粉碎鲜样（如罐装的豆子，香蕉，土豆），过 4.5mm 筛，测定干样中的含水量，根据 AOAC 法 925.10，冻干后烘炉干燥测定鲜样中的含水量。



## 分析方法

### (a) 制备空白试剂

准备空白试剂：混匀 0.1ml 的醋酸钠缓冲液（100mM，pH4.5）和 3.0ml 的试剂四溶液。

制备 D-葡萄糖标准品（一式四份）：混匀 0.1ml D-葡萄糖（1mg/ml）和 3.0ml 的 GOPOD 试剂。

### (b) 水解和溶液化非抗性淀粉

1. 准确称取 100mg 样品后直接倒入 15ml 离心管中，样品应尽量集中在底部，向每个离心管中加入 4.0 ml 试剂二；

**注意：对于湿样，样品大概为 0.5g（准确称重），这些材料的含水量通常为 60-80%**

2. 盖紧离心管管盖，进行涡旋混匀，之后放入振荡水浴器中 37°C 孵育 16h；

3. 把离心管从水浴锅中拿出，用纸巾擦掉多余的水，打开开盖子放置在涡旋仪上轻轻涡旋同时加入 4.0ml 无水乙醇混匀；

4. 1500xg 离心 10min，小心倒出上清并**保留（后续实验及计算需要）**，向沉淀中加入 2ml 50%乙醇，用涡旋仪涡旋混匀，再加入 6ml 50%乙醇，涡旋混匀；

5. 1500xg 离心 10min，小心倒出上清并**保留（后续实验及计算需要）**，重复上述重悬浮步骤；

6. 1500xg 离心 10min，小心倒出上清并**保留（后续实验及计算需要）**，翻转试管，用纸巾吸除多余的液体。

### (c) 测定抗性淀粉含量

1. 将离心管放入冰上进行冰浴，向每个离心管中加入 2 ml 2M 的 KOH 再使用磁力搅拌棒搅匀，用磁力搅拌棒在冰浴状态下搅拌 20min，使抗性淀粉得到充分溶解；

**注意：**

**(1) 不要使用涡旋仪混匀，会导致淀粉乳化。**

**(2) 确保边加入 KOH 溶液边搅拌，避免形成难溶的淀粉块。**

2. 向每个离心管中加入 8 ml 醋酸钠缓冲液（1.2M，pH3.8），使用磁力搅拌机搅拌，混合均匀后加入 0.1ml 试剂一，混匀，放入水浴锅中 50°C 水浴 30min，期间用涡旋仪混匀 3~5 次；

3. 对于抗性淀粉含量>10%的样品，用水洗瓶定量转移试管里的样品至 100ml 容量瓶并用蒸馏水定容至 100ml，混匀后，1500xg 离心 10min；

对于抗性淀粉含量<10%的样品，直接 1500xg 离心 10min；

4. 吸取**步骤 4** 中的上清液 0.1ml 5ml EP 管中，一式两份，分别加入 3.0ml 的试剂 4，50°C 孵育 20min；

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



5. 测量每一个溶液在 510nm 处相对于空白试剂的吸光度值；

**注意：反应结束后，放冷 5min 内测完结果**

6. 计算抗性淀粉的含量。

**(d) 计算可溶性的非抗性淀粉含量**

1. 将**流程 (b)** 中**步骤 4-6** 的上清收集到容量瓶中，用醋酸钠缓冲液（100mM，pH4.5）定容至 100ml，混匀作为待测液；

2. 使用移液枪吸取 0.1 ml 待测液转移到 5ml EP 管中（一式两份）并加入 10 $\mu$ L **稀释试剂一**混合均匀，50 $^{\circ}$ C 孵育 20min，之后加入 3.0 ml 试剂四混合均匀，50 $^{\circ}$ C 孵育 20min；

3. 计算在 510nm 下相对于空白试剂的吸光度值。

**注意：反应结束后，放冷 5min 内测完结果；**

4. 计算非抗性淀粉的含量。

## 计算

计算样品中抗性淀粉含量、非抗性淀粉含量和总淀粉含量（%，干重），计算公式如下：

样品包含**>10%抗性淀粉**：

$$\text{抗性淀粉含量 (g/100g 样品)} = \Delta E \times F \times \frac{100}{0.1} \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180} = \Delta E \times \frac{F}{W} \times 90$$

样品包含**<10%抗性淀粉**：

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



$$\text{抗性淀粉含量 (g/100g 样品)} = \Delta E \times F \times \frac{10.3}{0.1} \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180} = \Delta E \times \frac{F}{W} \times 9.27$$

$$\text{非抗性淀粉含量 (g/100g 样品)} = \Delta E \times F \times \frac{100}{0.1} \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180} = \Delta E \times \frac{F}{W} \times 90$$

总淀粉含量=抗性淀粉含量+非抗性淀粉含量

上述式中：

$\Delta E$ =相对于空白试剂的吸光度值；

162/180=测定获得的游离 D-葡萄糖转换到淀粉中存在的脱水 D-葡萄糖的因子；

F=吸光度值到 $\mu\text{g}$  的转换因子（试剂四催化 100 $\mu\text{g}$ D-葡萄糖的吸光度值是确定的，F=100（D-葡萄糖的 $\mu\text{g}$  数）/100 $\mu\text{g}$  D-葡萄糖被试剂四催化发生的吸光度值变化）；

100/0.1=体积计算（从 100ml 取 0.1ml）；

1/1000=从 $\mu\text{g}$  到 mg 的换算；

W=分析样本的干重% =质量×（100-含水量）/100；

100/ W=抗性淀粉在样品质量中的百分比；

10.3/0.1=体积校正（从 10.3 ml 取 0.1ml，对于含有<10%抗性淀粉的样品，在孵育溶液时没有进行稀释）。

