

抗性淀粉检测试剂盒

微量法 100T

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 α -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	KB059-100T	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，配制使用然后在-20°C稳定 1~3 个月）
试剂二	-20°C	粉剂 5g×1 瓶	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

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



伊势久(江苏连云港)生物科技有限责任公司

江苏省连云港市海州区花果山大道 17 号



服务热线：0518-81263339

官网：<http://www.bio149.com>

试剂三	4°C	液体 500ml×1 瓶	
试剂四	-20°C	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°C 或 <-10°C 下存放超过 12 个月，配制使用后可在 2-5°C 或 <-20°C 可稳定 1~3 个月） 备注：如果该试剂要以冷冻状态储存，则最好将其分为 200 mL 的小份，在使用过程中仅冷冻/解冻一次。 新制备试剂时，其颜色可能为浅黄色或浅粉色。在 4°C 下，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°C	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

使用瓶子 1 中提供的产品（试剂一），这个溶液是有粘性的，因此应使用移液器移取分装。（4°C 下稳定性 > 3 年）稀释后试剂一：取 2 mL 瓶子 1 中溶液用 100mL pH6.0 顺丁烯二酸钠缓冲液稀释至 22mL。（注：以 5 mL 为单位分装后用聚乙烯管冷冻保存，反复冻融不会影响稳定性，稳定性 -20°C > 5 年）

没有提供的试剂（应购买分析纯级）

1. 顺丁烯二酸钠（马来酸钠）缓冲液(100mM, pH6.0)加上 2mM 二水氯化钙和叠氮化钠 (0.02%w/v)：用 1600mL 蒸馏水溶解 23.2g 顺丁烯二酸，用 4M (160g/L) 氢氧化钠调节 pH 至 6.0，加入 0.6g 二水氯化钙和 0.4g 叠氮化钠，混合并溶解，定容至 2L。（4°C 下可保存一年）
2. 醋酸钠缓冲液（1.2M, PH3.8）：将 69.6mL 的冰醋酸（1.05g/mL）加至 800 mL 的蒸馏水中，用 4M 氢氧化钠调节 pH 至 pH3.8，用蒸馏水定容至 1L。（室温下可保存一年）
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 4M 氢氧化钠调节 pH 至 4.5，用蒸馏水定容至 1L。（4°C 保存 2 个月）



4.氢氧化钾溶液（2M）：将 112.2gKOH 加至 900 mL 的去离子水中，搅拌溶解。定容至 1L，密封保存。（室温下可保存 2 年）

5.含水乙醇（或者 IMS）（大约 50%v/v）：将 500mL 乙醇（95%v/v 或者 99%v/v）或者工业甲基化酒精（IMS；变性乙醇；95% v/v 乙醇加上 5%甲醇）至 500mL 的水中，密封保存。（室温下稳定保存>2 年）

设备（推荐）

1. 离心式粉碎机，带有齿轮转子和 1.0mm 筛子，或类似的装置。小型样品可选择旋风磨碎机替代
2. 绞肉机-手动或电动的，装有 4.5mm 筛
3. 台式离心机-能够放入 16×120mm 玻璃试管，速度大约 1500g(3000rpm)
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-能够保持在 50±0.1°C
6. 涡旋混匀器
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 0.1 毫克）
12. 分光光度计-能够设定 510nm（10mm 路径长度）
13. 100μL 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. 培养管-螺旋帽，16×125mm
16. 玻璃试管-16×100mm，14mL 容量
17. 塑料盒，可放置试管架，也可作为冰盒使用
18. 温度计-能够读取 37±0.1°C和 50±0.1°C
19. 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) 水解和溶液化非抗性淀粉

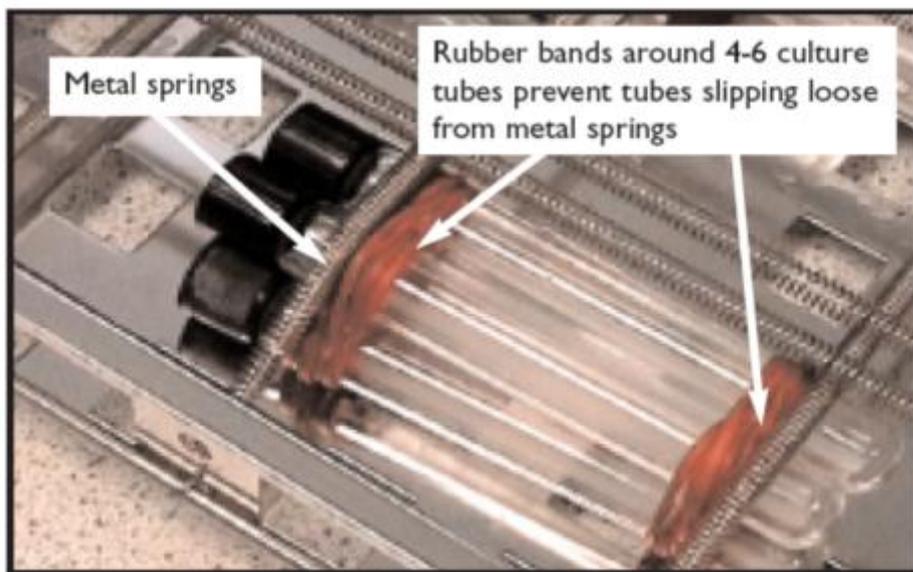
1.准确称取 100mg (± 5 mg) 样品后直接倒入有螺旋帽的试管里，轻柔的拍打试管以保证样品集中在底部。

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.每个试管中加入 4.0 mL 试剂二。

3.盖紧试管盖子，用涡旋振荡器混匀，卧式放入振荡水浴器，与运动方向平行。

如下图所示：



4.连续振荡，37°C 孵育，精确孵育时间为 16 小时。（备注：200 里程/min）。

5.把试管从水浴锅中拿出，用纸巾擦掉多余的水，拿开盖子，加入 4.0mL 乙醇（99% v/v）或者 IMS（99% v/v），用涡旋器涡旋。

6.1500g 离心，10 分钟（不加盖）。



7.小心倒出上清，加入 2mL 50%乙醇或 50% IMS 重悬浮，用涡旋器涡旋，再加入 6mL 50%IMS，混合，1500g 离心，10 分钟。

8.小心倒出上清，重复上述重悬浮和离心步骤。

9.小心倒出上清，翻转试管，用纸巾吸除多余的液体。

(b) 测定抗性淀粉含量

1.将试管冰浴，再向每个试管中加入磁力搅拌棒和 2 mL 2M 的 KOH，用磁力搅拌机在冰浴/水浴状态下搅拌 20min，以重悬浮絮状物和溶解 RS。

如下图所示：



备注：

(1) 不要使用涡旋器混匀，那将会导致淀粉乳化。

(2) 确保边加入 KOH 溶液边剧烈搅拌试管里的样品，这将会避免形成难溶的淀粉块。

2.向每个试管中加入 8 mL (1.2M pH3.8) 醋酸钠缓冲液，并用磁力搅拌机搅拌，立即加入 0.1mL 试剂一，混匀，并放入 50°C 水浴。

3.孵育 30min,期间用涡旋器间歇混匀。

4.对于 RS 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，当用洗瓶洗涤试管中的溶液时用外磁铁保持试管中的磁力棒，用蒸馏水定容至 100mL，并混匀，以单位体积离心溶液，1500g，10min。



- 5.对于 RS 含量<10%的样品，直接离心 1500g,10min（非稀释），对于这些的样品，试管里的最终体积大约为 10.3mL。（体积可能会变化，如果分析的是湿样，在计算数值时应注意折扣）
- 6.将稀释的（4）或非稀释的（5）上清液以 0.05mL 为单位转移至玻璃试管（16×100mm），一式两份，加入 1.5mLGOPOD 试剂，50℃孵育 20 分钟。
- 7.孵育完成后各取出 200ul 溶液，分别测量每一个溶液的在 510nm 下相对于空白试剂的吸光度值。（备注：反应结束后，放冷 5min 内测完结果）

制备空白试剂

准备空白试剂：通过混匀 0.05mL 的 100mM 的醋酸钠缓冲液（pH4.5）和 1.5mL 的 GOPOD 试剂，孵育完成后各取出 200ul 溶液进行同上检测。

制备 D-葡萄糖标准品（一式四份）通过混合 0.05mLD-葡萄糖（1mg/mL）和 1.5mL 的 GOPOD 试剂，孵育完成后各取出 200ul 溶液进行同上检测。

（c）计算非抗性（可溶性的）淀粉

- 1.收集起始孵育[(a)7]过程中离心获得上清液和两次 50%乙醇洗涤[(a)8 和 9]获得的上清液至容量瓶中，用 100mM 的醋酸钠缓冲液（pH4.5）定容至 100mL，混匀。
- 2.以 0.05 mL 为单位孵育溶液（一式两份）并加入 5μL 稀释试剂一，50℃孵育 20 分钟,加入 1.5 mL GOPOD 试剂，50℃孵育 20 分钟，孵育完成后各取出 200ul 溶液，分别测量每一个溶液的在 510nm 下相对于空白试剂的吸光度值。（备注：反应结束后，放冷 5min 内测完结果）
- 3.计算在 510nm 下相对于空白试剂的吸光度值。
- 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（%，在干重的基础上），计算模板如下：

$$\begin{aligned} \text{抗性淀粉 (g/100g 样品) (样品包含>10\%RS)} &= \Delta E \times F \times 100 / 0.1 \times 1 / 1000 \times 100 / W \times 162 / 180 \\ &= \Delta E \times F / W \times 90 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{抗性淀粉 (g/100g 样品) (样品包含<10\%RS)} &= \Delta E \times F \times 10.3 / 0.1 \times 1 / 1000 \times 100 / W \times 162 / 180 \\ &= \Delta E \times F / W \times 9.27 \end{aligned}$$



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

总淀粉含量=抗性淀粉含量+非抗性淀粉含量

ΔE =相对于空白试剂的吸光度值;

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

F=从吸光度值到微克的转换 (在 GOPOD 反应中 100 μ gD-葡萄糖的吸光度值是确定的, F=100 (D-葡萄糖的 μ g 数) 除以这 100 μ gD-葡萄糖的 GOPOD 吸光度值);

100/0.1=体积校正 (从 100mL 取 0.1mL);

1/1000=从 ug 到 mg 的转换;

W=分析样本的干重 =重量 \times (100-含水量) /100; 100/ W=RS 在样品重量中百分比因子;

10.3/0.1=体积校正 (从 10.3 mL 取 0.1mL), 对于含有 0-10%RS, 当孵育溶液时没有被稀释。

