

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℃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）的测定可通过集上的上清液并定容至 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℃	粉剂 mg×1 瓶	使用前甩几下使试剂落入底部，再加 10ml 的醋酸钠缓冲液（100mM pH4.5）涡旋溶解，可分为适当大小的等分试样，并在在使用期间储存在-10℃以下的聚丙烯管中，避免反复冻融，如有可能，在使用过程中保持冷却。（未配制时在-20℃稳定 2 年以上，配制使用后在-20℃稳定 1~3 个月）
试剂二	-20℃	粉剂 g×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	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。
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°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

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°C 保存，反复冻融会影响其稳定性。

溶液配制

1. 顺丁烯二酸缓冲液(100mM, pH6.0)含 2mM 二水合 CaCl_2 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，接着用 NaOH 调节 pH 至 6.0，加入 0.6g 二水合 CaCl_2 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。

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>

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. 酶标仪-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. 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) 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。

(b) 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）；取上清液，即为抗性淀粉上清液；

4. 吸取抗性淀粉上清液 0.05mL 至 5mL EP 管中，一式两份，分别加入 1.5mL 的试剂四溶液，50°C 孵育 20min；

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。



(c) 计算可溶性的非抗性淀粉含量

1. 将**流程(a)**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，混匀作为非抗性淀粉待测液；
2. 使用移液枪吸取 0.05mL 非抗性淀粉待测液转移到 5mL EP 管中（一式两份）并加入 5μL **稀释试剂一**混合均匀，50℃孵育 20min，之后加入 1.5 mL 试剂四溶液混合均匀，50℃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。

(d) 制备空白溶液和标准品溶液

1. 准备空白溶液：将 0.05mL 的醋酸钠缓冲液（100mM，pH4.5）和 1.5mL 的试剂四溶液混匀；
3. 制备标准品溶液（一式四份）：将 0.05mL 标准品和 1.5mL 的试剂四溶液混匀；
3. 统一放入 50℃孵育 20min，记录在 510nm 下的吸光度值。

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**：

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

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

总淀粉含量=抗性淀粉含量+非抗性淀粉含量

上述式中：

ΔE =相对于空白试剂的吸光度值；

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



$162/180$ =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 μg 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 μg 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 μg 到 mg 的换算；

W =分析样本的干重% =质量 $\times$ （ 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）。

