

## 抗性淀粉检测试剂盒（可见分光光度法）

产品货号：BA2163

产品规格：50T

### 产品简介：

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。

### 产品组成：

试剂名称	50T	配制过程	保存条件
试剂一	粉剂mg×1瓶	用前甩几下使试剂落入底部，再加5ml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，并在使用期间储存在-10°C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°C稳定2年以上，配制使用用在-20°C稳定1~3个月）	-20°C
试剂二	粉剂g×1瓶	用100ml顺丁烯二酸钠缓冲液（100mM,pH 6.0）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。	-20°C
试剂三	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pH 7.4，最后用蒸馏水定容至500ml，即为试剂三。	2-8°C
试剂四	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，配制使用用在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。	-20°C
标准品	液体5ml×1瓶	D-葡萄糖标准溶液（5ml，1.0mg/ml）	2-8°C

### 溶液/悬浮液的制备



扫一扫 加微信

**上海尚宝生物科技有限公司**  
 Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

试剂一的稀释：使用移液枪吸取2ml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5ml为单位分装后-20℃保存，反复冻融会影响其稳定性。**

#### 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，若无该试剂可不添加）：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，PH 3.8）：将69.6ml的冰醋酸加至800ml的蒸馏水中，用NaOH调节pH至pH 3.8，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900ml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900ml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。

#### 自备材料：

##### 1. 所需的仪器

- (a) 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。
- (b) 绞肉机-手动或电动的，装有 4.5mm 筛。
- (c) 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℃。
- (d) 台式离心机、水浴锅、涡旋仪、磁力搅拌器、磁力搅拌棒-5×15mm、pH 计、计时器、分析天平（精确到 0.1mg）。
- (e) 分光光度计-能够设定 510nm（10mm 路径长度）
- (f) 100 μL 移液器及一次性枪头
- (g) 连续分配器配有 50ml 管嘴，能够移取 2.0ml，3.0ml 和 4.0ml
- (h) 温度计-能够读取 37±0.1℃和 50±0.1℃
- (i) 容量瓶-100ml，200ml，500ml，1L，2L

##### 2. 样品的制备

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) 制备空白溶液和标准品溶液

1. 准备空白试剂：混匀 0.1ml 的醋酸钠缓冲液（100mM，pH4.5）和 3.0ml 的试剂四溶液混匀。
2. 制备标准品溶液（一式四份）：混匀 0.1ml 标准品和试剂四溶液混匀。
3. 统一放入 50℃ 孵育 20min，记录在 510nm 下的吸光值。

##### (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 4.0ml 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℃ 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。



扫一扫 加微信

**上海尚宝生物科技有限公司**  
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

### (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 2ml 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 8ml 醋酸钠缓冲液（1.2M, pH 3.8），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℃ 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，即为抗性淀粉上清液；
4. 吸取抗性淀粉上清液 0.1ml 到 5ml EP 管中，一式两份，分别加入 3.0ml 的试剂四溶液，50℃ 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。

### (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, pH 4.5）定容至 100ml，混匀作为待测液；
2. 使用移液枪吸取 0.1ml 非抗性淀粉待测液转移到 5ml EP 管中（一式两份）并加入 10 μL 稀释试剂一混合均匀，50℃ 孵育 20min，之后加入 3.0ml 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。

**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：

$\Delta E$  = 相对于空白试剂的吸光度值；

162/180 = 测定获得的游离 D-葡萄糖转换为淀粉中存在的脱水 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 10.3ml 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）。



扫一扫 加微信

**上海尚宝生物科技有限公司**  
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com