

## 抗性淀粉（Resistant starch, RS）试剂盒说明书

### 微量法 100 管/96 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

#### 测定意义：

抗性淀粉又称抗酶解淀粉或抗消化淀粉，是指在胃和小肠中不能被淀粉有关酶降解为葡萄糖，利于降低血糖指数，且在肠胃道和结肠中通过菌群发酵产生短链脂肪酸，利于肠蠕动、防止便秘和结肠癌病变的一类功能淀粉。

#### 测定原理：

使用  $\alpha$ -淀粉酶和淀粉葡萄糖苷酶将样品中的非抗性淀粉水解为葡萄糖除去后，利用氢氧化钾溶液溶解抗性淀粉，再用  $\alpha$ -淀粉酶和淀粉葡萄糖苷酶将抗性淀粉水解为葡萄糖，最后用 GOD-POD 试剂测定葡萄糖量，计算抗性淀粉含量。

#### 需自备的仪器和用品：

酶标仪、台式离心机、可调式移液器、微量天平、摇床或震荡仪、96 孔板、研钵、无水乙醇、冰和蒸馏水。

#### 试剂的组成和配制：

试剂一：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：粉剂×1 管，4℃ 避光保存；

试剂三：液体 2mL×1 管，4℃ 避光保存。

试剂四：液体 20mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂五：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂六：液体 12mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

试剂七：液体 12mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

葡萄糖标准液：液体 1mL×1 瓶，4℃ 保存。

混合液配制：临用前，按试剂一：试剂二：试剂三=1mL：10mg：10 $\mu$ L 的比例配制混合液，用多少配多少，当天使用完。

#### 样本的前处理：

样本烘干，然后充分粉碎，过 100 目筛。称取约 10mg 样品于 EP 管中，加入 0.5mL 混合液，充分混匀，37℃ 震荡反应 16h。

反应结束后，加入 0.5mL 乙醇，充分震荡混匀，然后 3000g 离心 10min，小心去除上清留沉淀。

沉淀中再加入 1mL50%乙醇，充分震荡混匀，然后 3000g 离心 10min，小心去除上清留沉淀。重复此步骤一次。

沉淀中加入 100 $\mu$ L 蒸馏水，轻轻震荡使沉淀重新分散。然后冰浴中再加入 100 $\mu$ L 试剂四，混匀后冰浴中震荡 20min。

加入 0.8mL 试剂五，混匀后加入 10 $\mu$ L 试剂三，再次混匀，37℃ 反应 30min，期间震荡数次。然后 3000g 离心 10min，取上清待测。

#### 测定步骤：

1、酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 505nm；

2、工作液的配制：使用前将试剂六和试剂七 1:1 等体积混合，用多少配多少。

3、在 96 孔板中加入如下试剂

试剂 (μL)	空白管	标准管	测定管
样本上清			10
葡萄糖标准液		10	
蒸馏水	10		
工作液	190	190	190

混匀，置 37℃ 保温 15min 后，于 505nm 波长处读取吸光度，记作 A 空白、A 标准和 A 测定。空白管和标准管只要做一管。

**抗性淀粉含量计算：**

$$\text{抗性淀粉含量 (mg/g)} = (C \text{ 标准} \times V1) \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div (W \times V1 \div V2) \times 162 \div 180 \\ = 0.1818 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div W$$

C 标准：标准管浓度，0.2mg/mL； V1：加入样本体积，0.01mL； V2：总体积，1.01mL； W：样本鲜重，g； 162÷180，游离葡萄糖到淀粉的转换系数。

**注意事项**

1. 加入试剂四震荡时不要使用涡旋振荡器，过于激烈的震荡可能导致淀粉乳化影响操作。
2. 如果预测样本中抗性淀粉含量超过 10%，或者测定管吸光度超过 1，需使用蒸馏水稀释样本上清 5-10 倍后测定。
3. 加入试剂四后如果无法冰浴震荡，可以冰浴后进行震荡，并在过程中取出冰浴数次。