

团体标准

T/CI XXX-2022

高抗性淀粉马铃薯抗性淀粉含量指标和 检测方法

Resistant Starch Content Index of High-resistant Starch Potato and its
detection method
(征求意见稿)

2022-X-X 发布

2022-X-X 实施

中国国际科技促进会 发布

目 次

前 言.....	3
高抗性淀粉马铃薯抗性淀粉含量指标和检测方法.....	4
1 范围.....	4
2 规范性引用文件.....	4
3 术语及定义.....	4
4 测定方法.....	4
4.1 原理.....	5
4.2 试剂和材料.....	5
4.3 材料.....	6
4.4 仪器和设备.....	6
4.5 分析步骤.....	7

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》要求进行编写。在内容上力求与相关现有标准相协调，充分参考 GB/T1354-2018、NY122、AACC32-40、NY/T2638-2014 等相关内容。参照相关法律、法规和规定，在编制过程中着重考虑了科学性、适用性和可操作性。

某些内容可能涉及专利，本标准的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由浙江大学提出，中国国际科技促进会归口。

本标准起草单位：浙江大学、浙江绿巨人生物技术有限公司、海南浙江大学研究院、浙江大学山东（临沂）现代农业研究院、浙江大学中南研究院、浙江省农业科学院、浙江省中药研究所、浙江绿巨人生物技术有限公司、杭州赋禾数字科技有限公司、衢州市三易易生态农业科技有限公司。

本标准主要起草人：吴殿星、程林润、舒小丽、王寅、张宁、孟雨莎、张晓艳、郑楠楠、孙健、徐开盛、徐应英、姜章、沈易。

本标准是首次发布。

高抗性淀粉马铃薯抗性淀粉含量指标和检测方法

1 范围

本标准规定了抗性淀粉及高抗性淀粉马铃薯的术语、定义、范围，高抗性淀粉马铃薯中抗性淀粉含量指标的科学确定及马铃薯抗性淀粉含量的测定方法。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件的，仅注日期的版本适用于本文件，凡是不注日期的引用文件，其最亲版本（包括所有修订单）适用于本文件。

GB/T 1.1-2020 《标准化工作导则第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》

LST 3016-2020 马铃薯

NY/T 1066-2006 马铃薯等级规格

NY/T 1605-2008 加工用马铃薯 油炸

GB/T 5497 粮食、油料检验 水分测定法

GB/T 5505-2008 粮油检验 灰分测定法

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 603-2002 化学试剂 试验方法中所用试剂及制品的制备

3 术语及定义

3.1 抗性淀粉 (Resistant starch)

是指在健康人体小肠中不被消化而在大肠中被全部或部分的淀粉。

3.2 高抗性淀粉马铃薯

在正常生长发育过程中积累产生，蒸煮或加工后可食部分的抗性淀粉含量 $\geq 8\%$ 的马铃薯品种（系）。

4 测定方法

4.1 原理

马铃薯体外模拟人体消化,经唾液淀粉酶,胃蛋白酶和胰淀粉酶过夜消化后,非抗性淀粉被水解成葡萄糖,然后利用乙醇终止反应,消化后残渣即为粗抗性淀粉。然后用 KOH 将未被消化的淀粉溶解,再利用淀粉葡萄糖苷酶将抗性淀粉水解成葡萄糖。生成的葡萄糖与葡萄糖氧化酶/过氧化物酶 (GOPOD) 试剂会产生显色反应,形成复合物,在 510nm 处会产生特征吸收峰。测定其在 510nm 处吸光值,利用葡萄糖标准液绘制标准曲线,计算出样品中产生的葡萄糖量,再利用葡萄糖淀粉转化系数将其转化为淀粉含量,即可得出抗性淀粉含量。

4.2 试剂和材料

4.2.1 试剂

除特殊说明外,所用试剂均为分析纯试剂。试验所用水符合 GB/T6682 规定实验用水

4.2.1.1 氯化钾 (KCl)

4.2.1.2 氢氧化钠 (NaOH)

4.2.1.3 氢氧化钾 (KOH)

4.2.1.4 马来酸钠

4.2.1.5 二水合氯化钙 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

4.2.1.6 磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)

4.2.1.7 盐酸 (HCl)

4.2.1.8 冰醋酸 (乙酸) (HAc)

4.2.1.9 无水乙醇

4.2.1.10 胃蛋白酶 (1:3000)

4.2.1.11 α -胰淀粉酶(A3176, sigma)

4.2.1.12 淀粉葡萄糖苷酶 (AMG) (A10115, sigma)

4.2.1.13 葡萄糖测试试剂盒

4.2.2 试剂配制

4.2.2.1 马来酸钠缓冲液 (0.1 M, pH6.0): 准确称取 23.2 g 马来酸,加 1600 mL 水溶解后,用 4 M (160 g/L) NaOH 溶液定容至 pH 6.0。再加入 0.6 g 氯化钙

(CaCl₂·2H₂O) 溶解后定容至 2 L。该溶液在 4°C 下可稳定 12 个月。

4.2.2.2 醋酸钠缓冲液 (1.2 M, pH3.8) : 将 69.6 mL 冰醋酸加入至 800 mL 水中, 用 4 M NaOH 调 pH 至 3.8, 定容至 1 L。该试剂在室温下可稳定 12 个月。

4.2.2.3 醋酸钠缓冲液 (0.1 M, pH4.5) : 将 5.8 mL 冰醋酸加入至 800 mL 水中, 用 4 M NaOH 调 pH 至 4.5, 定容至 1 L。该试剂在 4°C 可稳定 2 个月。

4.2.2.4 KOH 溶液 (4M) : 准确称取 44.8 g KOH 至 150mL 水中, 搅拌溶解后定容至 200mL。试剂在室温下可稳定 12 个月。

4.2.2.5 HCl 溶液 (0.1 M) : 量取 8.4 mL 浓盐酸, 加适量水并稀释至 1000 mL。

4.2.2.6 KCl-HCl 溶液 (0.1 M, pH1.5) : 称取 7.35 g KCl, 溶于适量水中, 然后用 HCl 溶液调 pH 至 1.5。

4.2.2.7 无水乙醇, 50% : 稀释 500 mL 无水乙醇至 1 L。80% : 稀释 800 mL 无水乙醇至 1 L。溶液室温下可稳定 12 个月。

4.2.2.8 3300 U/mL AMG : 用 pH 4.5 NaAc 缓冲液 (4.2.2.3) 配制, 4°C 下可稳定 5 年。

4.2.2.9 300 U/mL AMG : 用 0.1 M 马来酸钠缓冲液 (pH6.0)(4.2.2.1)将 2 mL 3300 U AMG (4.2.2.8) 稀释至 22 mL, 然后分装在小离心管中, -20°C 保存备用, 试剂 -20°C 下可稳定 5 年。

4.2.2.10 α -胰淀粉酶 (10 mg/mL) +AMG (3 U/mL) : 称取 1 g 胰腺 α -淀粉酶, 用 100 mL 马来酸钠缓冲液 (4.2.2.1) 悬浮, 振荡 5 min。加入 1 mL AMG (300 U/mL)(4.2.2.9), 充分混合。1500 g 离心 10 min, 取上清液。现用现配。

4.2.2.11 胃蛋白酶 (10%) : 称取 10.0 g 胃蛋白酶溶于 KCL-HCL 溶液, 并定容至 100 mL。

4.3 材料

符合 LS/T3106-2020 标准三级及以上马铃薯块茎鲜样或干样。

4.4 仪器和设备

4.4.1 旋风式磨粉机

4.4.2 冷冻干燥机

4.4.3 分析天平（精度 0.1 mg）

4.4.4 pH 计

4.4.5 电饭煲

4.4.6 手持式匀浆机

4.4.7 水浴摇床

4.4.8 翻转摇床

4.4.9 具盖螺纹圆底离心管（15 mL，16×25mm）

4.4.10 离心机

4.4.11 酶标仪（可用 96 孔酶标板，510 nm）

4.4.12 容量瓶（100 mL, 1000 mL, 500 mL, 250 mL）

4.4.13 移液器（1mL, 10 μ l, 200 μ l）

4.4.14 磁力搅拌器

4.4.15 全自动水份测定仪

4.5 分析步骤

4.5.1 试样准备

A. 干样或干制品

1. 用旋风磨磨碎，过 150 μ m 筛子，混匀后保存于自封袋中密封备用。
2. 利用全自动水份测定仪或根据 GB/T5497 测定试样中水份。

B. 鲜样

1. 鲜薯洗净去皮，吸干表面水份切小块备用。或者马铃薯切薄片，冷冻干燥（至少 48 h）或普通烘箱烘干；
2. 冷冻干燥样品用旋风磨磨碎，过 150 μ m 筛子，混匀后保存于自封袋中密封备用。

3. 鲜样根据 GB/T5497 测定试样中水份

4.5.2 测定

4.5.2.1 水解非抗性淀粉

(1) 准确称取样品 100 ± 5 mg 干样至 15 mL 带盖螺旋圆底离心管中，轻轻敲打试管以使样品位于底部；

(2) 加入 500 μL 蒸馏水于各试管中，等电饭煲中的水沸腾后放入，蒸煮 20 min，然后保温 10 min；

(3) 取出试管，等试管冷却至室温时，加入 2 mL KCl-HCl 溶液 (4.2.2.6)，利用手持式匀浆机（最小档，40 s）将样品捣碎；

(4) 加入 100 μL 胃蛋白酶 (4.2.2.11)，置于旋转摇床 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 1 h；

(5) 加入 4 mL 马来酸钠缓冲液混匀，然后加入 4 mL α -胰淀粉酶 (4.2.2.10)，混匀；

(6) 旋紧试管盖，置于旋转摇床 (20 转/min)，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化过夜 (16 h)；

(7) 取出试管，4000 rpm (1500 g) 离心 10 min；

(8) 小心去除上清液，然后加入 2 mL 50%乙醇，旋涡振荡，将沉淀充分重悬，然后再加入 6 mL 50%乙醇，混匀，4000 rpm 离心 10 min；

(9) 小心去除上清并重复重悬离心两次；

(10) 小心去除上清液，倒置试管去除多余水分，并用滤纸将试管壁上多余水分小心吸去；

4.5.2.2 抗性淀粉测定

(1) 在每个试管中加入 1 mL 水，将沉淀充分重悬，然后再加入 1 mL 4 M KOH 溶液 (4.2.2.4)，轻轻混匀后，置冰水浴中振荡 20 min；

(2) 每个试管中加入 8 mL 1.2 M 醋酸钠缓冲液 (4.2.2.2)，混匀后，立即加入 0.1 mL 3300 U 的 AMG (4.2.2.8)，混匀后置水浴摇床，50 $^{\circ}\text{C}$ 30 min，期间取出两次混匀；

(3) 取出试管，擦干试管表面水份，4000 rpm 离心 10 min；

(4) 吸取 10 μL 上清液至 96 孔板中，加入 190 μL GOPOD 试剂 (试剂盒)；

(5) 葡萄糖标准曲线制备：吸取 0, 1, 3, 5, 7, 9, 10 μL 1 mg/mL 葡萄糖标准试剂至 96 孔板中，不足 10 μL 的分别用 0.1M 醋酸钠溶液 (4.2.2.3) 补足至 10 μL ，加入 190 μL GOPOD 试剂；

(6) 50 $^{\circ}\text{C}$ 温育 20 min 后，冷却，利用酶标仪测定 510 nm 处吸光值；

4.5.2.3 结果计算

根据葡萄糖标准样品绘制标准曲线，根据标准曲线方程计算试样中的葡萄糖溶液，然后根据下列公式计算 RS 含量：

$$RS, \text{ g/100g 样品} = C \times 10.3 \times \frac{162}{180} \times \frac{100}{W}$$

式中：

C — 根据标准曲线得出的葡萄糖浓度 (mg/mL)

10.3 — 试样体积 (mL)

162/180 — 葡萄糖淀粉转化系数

4.5.3 精度

两次独立测定结果标准误差不大于平均值的 10%。