

Megazyme

迅速型レジスタントスターチ (難消化性澱粉)分析法

RESISTANT STARCH

ASSAY PROCEDURE

(Rapid Format)

K-RAPRS 11/19

K-RAPRS

(用手法 100 回分)

AOAC Method 2002.02

AACC Method 32-40

改良法

日本バイオコン株式会社

はじめに - INTRODUCTION -

定義上、レジスタントスターチ(難消化性澱粉;RS)とは、ヒトの小腸内酵素によって分解されない澱粉のことを示します。これらは大腸内で一部または全部が発酵されます。一般にRSは、総食物繊維(TDF)を構成する成分の1つであると考えられています。

酵素的加水分解に耐性を示す澱粉画分が存在することは、1982年 Englyst らにより、澱粉以外の多糖類(NSP)を分析中に発見されました¹。この研究は Berry² に引き継がれ、Englyst ら¹の α -アミラーゼ/プルラナーゼ処理を組み込み、生理学的条件をより忠実に模倣するために煮沸工程を廃したRS測定法が開発されました。

これらの条件下で試料中のレジスタントスターチ含量を測定したところ、はるかに高い値を示しました。この発見は、その後 Englyst らによる現在健康な回腸造瘻術患者の研究によって確認されました³⁻⁶。1990年代初頭までに、RSの生理学的意義は完全に解明されました。欧州の研究プログラム EURESTA では、Champ 法⁷、MuirとO'Dea 法⁸、Faisant らの方法⁹、Goni らの方法¹⁰や Akerberg らの方法¹¹など、いくつかの新しい方法や変法が開発されました。

McCleary らは生体内の状態を多くの点で反映した、生理学的にも有意義かつ確実に信頼性の高いRS測定法を2002年に開発しました^{12, 13}。この方法ではサンプル中の耐性澱粉、可溶性澱粉および総澱粉含量の測定が可能です。さらに本法は試験室間相互評価に成功し、AOAC 法 2002.02 および AACC 法 32-40.01 として採用されました。

統合型総食物繊維分析(INTDF)法(AOAC 法 2009.01; 2011.25)^{14, 15}の開発において、膵臓 α -アミラーゼ/アミログルコシダーゼ(PAA/AMG)の反応条件は、反応時間(すなわち、16時間)を含めてレジスタントスターチ分析法の条件をそのまま採用しました。しかしながら、リン酸架橋澱粉(RS₄)のような「新規な」レジスタントスターチの加水分解に関する最近の研究では、生理学的に有意義なRS値を得るためにはPAA/AMGの反応時間は小腸における食物滞留時間、すなわち4時間(AOAC 法 2009.01の16時間ではない)にするべきであることが判ってきました。

4時間の反応時間でRS値を得るために、PAAとAMG濃度を回腸造瘻術による *in vivo* データに基づく濃度まで増加させました。この新しい方法は、迅速統合型TDF測定法(RINTDF)¹⁷と呼ばれ、AOAC International と ICC (International Association of Cereal Science and Technology)における試験室間相互評価を受け、AOAC 法 2017.16¹⁸と ICC 法 185 として認証されました。

これらの技術的な発展に基づき、オリジナルのレジスタントスターチ測定法にもPAA/AMGの反応時間4時間法を組み込む必要が生じました。その結果完成したのがこのブックレットで紹介させて戴きます「迅速型レジスタントスターチ測定法(RAPRS)」です。

本法の原理： - PRINCIPLE OF THE CURRENT METHOD -

試料に飽和レベルの精製PAAおよびAMGを添加して37°Cで4時間、往復振盪させながら恒温水槽中で反応させます。これにより、耐性のない澱粉(すなわち消化可能な澱粉)は、両酵素の複合作用により可溶化され、D-グルコースに加水分解されます。

(PAA+AMG、pH 6.0、37°C、4時間)

(1) 澱粉 + 水 \longrightarrow D-グルコース + RS

等量のエタノールの添加により反応を停止させ、RSを遠心分離で沈殿として回収します。

(エタノール)

(2) 反応液 $\xrightarrow{\hspace{2cm}}$ D-グルコース(可溶性) + RS(沈殿)

次いで、このRS沈殿をエタノール(50% v/v)中に懸濁させて2度洗浄し、続いて遠心分離します。上清はデカンテーションします。RSを氷水浴中マグネティックスターラーで激しく攪拌しながら1.7M NaOHに溶解させます。この溶液を酢酸緩衝液で中和し、澱粉をAMGでD-グルコースに定量的に加水分解します。

(AMG、pH 4.5、50°C、30分)

(3) 溶解済の沈殿RS $\xrightarrow{\hspace{2cm}}$ D-グルコース

D-グルコースはグルコースオキシダーゼ/パーオキシダーゼ試薬(GOPOD)で測定され、これが試料中のRS含量に相当します。

(グルコースオキシダーゼ)

(4) D-グルコース + O₂ + H₂O $\xrightarrow{\hspace{2cm}}$ D-グルコン酸 + H₂O₂

(5) 2H₂O₂ + p-ヒドロキシ安息香酸 + 4-アミノアンチピリン
(パーオキシダーゼ) $\xrightarrow{\hspace{2cm}}$ キノンイミン色素 + 4H₂O

耐性のない澱粉(可溶性の澱粉)量は、最初の遠心上清と洗浄液を合わせて100mLに定容し、GOPOD試薬でD-グルコース含量を測定します。

特異性、感度、直線性と精度 - SPECIFICITY, SENSITIVITY, LINEARITY AND PRECISION -

この測定法はレジスタントスターチに由来するD-グルコースに対して特異性が高いです。耐性のない澱粉(可溶化澱粉)量もD-グルコースやマルトデキストリンを含め、それがサンプル中に存在すれば定量することができます。

吸光度差の最小値は0.010です。これは試料100mgを10.3mLで抽出した際の有姿100g当たりのレジスタントスターチ濃度0.018gに相当します。検出限界は試料100mgを10.3mLで抽出した際の有姿100g当たりのレジスタントスターチ濃度0.036gで、吸光度差0.02に相当します。グルコースの定量分析は4~100μgのD-グルコース間で直線性を示します。

適用性と正確性 - APPLICABILITY AND ACCURACY -

この方法は、RS含量が2%w/wを超える試料に使用可能です。この場合、±5%の標準誤差が通常達成可能です。RS含量が2%w/w未満の試料では、誤差は大きくなります。

安全性 - SAFETY -

レジスタントスターチ測定に使用される試薬は、有害物質規制の対象となる有害物質で含有していませんが、全ての化学物質に適用される一般的な安全対策は遵守する必要があります。

PAAとAMGは共に一部の人にアレルギー反応を引き起こす可能性があります。分析担当者が粉末PAAかAMGにアレルギーを有している場合、アレルギーを示さない別の担当者が粉末酵素から硫酸アンモニウム懸濁液を調製する必要があります(3ページのCAUTIONを参照)。

キット - KITS -

100 検体のレジスタントスターチ分析用キットを提供しております。キットには以下のものが含まれます。

ボトル1: 精製αアミラーゼ(PAA; 40KU/g)+アミログルコシダーゼ(AMG; 17KU/g)、粉末混合品 3.0g。密封乾燥条件下、-10°C以下で5年以上安定です。

- ボトル2:** アミログルコシダーゼ[14mL、可溶性澱粉に対し 3,300 U/mL(または *p*-ニトロフェニルβ-マルトシド*に対し 200 U/mL)、pH 4.5、40°C]。AMG溶液は検出可能なD-グルコース量を含んでいません。4°Cで3年以上安定です。
- ボトル3:** GOPOD試薬緩衝液。緩衝液(50mL、pH7.4)、*p*-ヒドロキシ安息香酸およびアジ化ナトリウム(0.09%w/v)含有。4°Cで4年以上安定です。
- ボトル4:** GOPOD試薬酵素。グルコースオキシダーゼ+パーオキシダーゼ+4-アミノアンチピリン。凍結乾燥品。-10°C以下で5年以上安定です。
- ボトル5:** D-グルコース標準液(5mL、1.0mg/mL) 0.2%(w/v)安息香酸溶液。密封条件下、室温で5年以上安定です。
- ボトル6:** レジスタントスターチ標準品(約5g)。レジスタントスターチ含有量はラベルに記載。密封条件下、室温で5年以上安定です。

A. 試薬溶液の調製

1. PAA/AMG保存液-PAA(4KU/5mL)+AMG(1.7KU/5mL)

使用直前にPAA/AMG粉末混合品(ボトル1)0.1gをマレイン酸緩衝液[B(a)]5mLに添加し、マグネチックスターラーで5分間攪拌します。氷冷保管し、調製から4時間以内に使用します。

CAUTION

分析担当者がPAA/AMG粉末にアレルギーがある場合は、アレルギーを示さない別の担当者が次の手順で粉末酵素から硫酸懸濁液を調製して下さい。

13mL容ポリプロピレン試験管[C(p)]に冷蒸留水7mLを入れ、ドラフト内でスターラーで攪拌しておきます。そこにPAA/AMG粉末(ボトル1)1.0gを徐々に加え、酵素が完全に溶解するまで(約5分間)攪拌します。次に顆粒状硫酸アンモニウム3.5gを加え、攪拌して溶解します。溶解後、硫酸アンモニウム溶液(50g/100mL)で10mLに定容します。4°Cで3ヶ月間安定です。

- 2a. (AMG)一付属のボトル2(アミログルコシダーゼ)をそのまま使用して下さい。4°Cで3年以上安定です。
- 2b. (希釈AMG)一ボトル2の内容物1mLを100mM酢酸緩衝液(pH 4.5)[B(c)]30mLに添加します。十分に混合し、13mL容ポリプロピレン試験管[C(p)]に約10mLずつ分注し、-10°C以下で保存します(AMG約100 U/mL)。
3. ボトル3(GOPOD試薬緩衝液)の内容物を蒸留水で1Lに希釈します。これが溶液3です。

NOTE:

- 緩衝液濃度が高いため、保存中に塩の結晶が生じることがあります。この緩衝液を蒸留水で1Lに希釈する際には、結晶を完全に溶解して下さい。
- この緩衝液には、0.09%(w/v)のアジ化ナトリウムが含まれています。これは有毒化学物質ですので、留意してお取り扱い下さい。

4. ボトル4の内容物を20mLの溶液3に溶解し、これを残りの溶液3のボトルに全量に移します。このボトルをアルミニウム箔で覆い、試薬を遮光保管します。これがグルコース測定試薬(GOPOD試薬)です。2~5°Cで約3ヶ月、-10°C以下で12ヶ月以上安定です。凍結保存する場合は、1回の分析で使い切れる適量ずつ小分けにして保存して下さい。決して凍結/融解を繰り返さない下さい。

新しく調製した試薬は淡く黄色～ピンク色を呈しています。着色は4℃で2～3ヶ月保存している間にピンク色がさらに強くなります。この試薬の吸光度は、蒸留水に対し 0.05 未満でなければなりません。それを上回る場合は新しい試薬をご用意下さい。

5.6. 付属のボトル5、6をそのまま使用して下さい。密封条件下、室温で5年以上安定です

B. 試薬(提供外の試薬)

- a) マレイン酸ナトリウム緩衝液 (50mM、pH6.0)、2mM 塩化カルシウム含有
マレイン酸 11.6g を蒸留水 1600mL に溶解し、4M(160g/L) 水酸化ナトリウムで pH 6.0 に調整します。塩化カルシウム二水和物 (CaCl₂·2H₂O) 0.6g を加えて溶解後、2L に定容します。4℃で12ヶ月間安定です。
- b) 酢酸ナトリウム緩衝液 (1.0M、pH3.8) + 5mM 塩化カルシウム含有
蒸留水 800mL に氷酢酸(1.05g/mL) 57.0mL を加え、塩化カルシウム2水和物 0.74g を加え溶解させます。4M 水酸化ナトリウムを用いて pH3.8 に調整後、蒸留水で 1L に定容しメジウム瓶で保管します。室温で12ヶ月間安定です。
- c) 酢酸ナトリウム緩衝液、(100mM、pH4.5)
蒸留水 800mL に氷酢酸(1.05g/mL) 5.7mL を加え、1M 水酸化ナトリウムで pH 4.5 に調整します。蒸留水で 1L に定容後、メジウム瓶に保存します。4℃で約1年間安定です。
- d) 水酸化ナトリウム溶液 (1.7M)
ドラフト内で蒸留水 800mL を攪拌し、水酸化ナトリウム 68g を注意しながら(必要なら防護メガネ等を着用)徐々に添加して溶解します。
1L に定容後、メジウム瓶に保存します。室温で4年以上安定です。
- e) 水和エタノール(50%v/v)
エタノール(95%v/v) 500mL を蒸留水 500mL に加えます。1Lメジウム瓶に保存します。室温で4年以上安定です。

C. 機器(推奨)

- a) 粉碎ミル— 12 枚歯のロータと 0.5mm の篩を備えた遠心分離式、または類似の装置
サンプルが少量の場合は、装置が空冷もしくは別の冷却装置でサンプルの過熱防止が可能ならサイクロンミルを用いることができます
- b) ミートミンサー— 手動または電気式、4.5mm のスクリーンを装備しているもの
- c) 卓上型遠心分離機— 101×16.5mm のポリプロピレン試験管に対応で約 3,250ref (約 4000rpm) が得られるもの。例 Sigma Laboratory 遠心機 4-15 #10730
- d) マイクロ遠心分離機— 13,000rpm 対応のもの
- e) 使い捨て 2.0mL 容ポリプロピレン製マイクロ遠心チューブ— (例 Sarstedt #72.691)
- f) ボルテックスミキサー
- g) マグネチックスターラー
- h) マグネチックスターラーバー— PTFE製 6×12mm。一部に隆起があるものが望ましい
- i) 往復振盪型恒温水槽— (Grant OLS200 または同等品)。
振盪数: 100 回/分(往復回数)、振幅: 35mm、37℃で反応。
- j) 振盪恒温槽用のポリプロピレン試験管ホルダー— 振盪恒温槽で振盪方向に 13mL 容ポリプロピレン試験管を保持するクランプ付試験管ホルダー(図1)
- k) 分光光度計— 510nm の測定が可能で、光路長 10mm のフローセルが取り付けられてい

ることが望ましい

- l) 分析用天秤—0.1mg の精度を有するもの
- m) 凍結乾燥機—Virtis 社 Genesis®25XL または同等品
- n) ピペッター—100μL または 1mL を分注可能なディスプレイチップ対応のもの。
Gilson Pipetman®等
- o) ポジティブディスプレイ方式分注機—例 Brand HandyStep®S、Eppendorf Multipette®
 - 25mL Brand PD-Tip®, Combitip® (0.5-2.5mL 分注用)
 - 5mL Brand PD-Tip®, Combitip® (酵素液 0.1mL 分注用)
- p) ポリプロピレン試験管—13mL 容、101×φ 16.5mm
(Sarstedt #60.541.685) または同等品
- q) ガラス試験管—16×100mm、14mL 容
- r) プラスチック製容器—試験管立てを入れ、氷水浴として使えるサイズのプラスチック製タッパー等(図2参照)
- s) 温度計— $37 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 、 $50 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ が測定可能なもの
- t) メスフラスコ—100mL 容量



図1. 振盪恒温槽中で試験管ホルダーにポリプロピレン試験管を装着した状態

D. サンプルの準備

食べる状態、例えばベーキングミックスを調製して焼き、パスタを茹でるなどの処理済みのサンプルを採取して準備します。脂質が 10% を超える場合、AOAC 985.29 法に準じて脱脂します。

水分の多いサンプル(25%以上)は、凍結乾燥するのが望ましいです。粉碎ミル[C(a)]で約 50g を粉碎して、0.5mm の篩を通します。広口のプラスチック瓶に移し、蓋をして反転させて良く振り混ぜます。乾燥剤を入れて保管して下さい。

水分のあるサンプル(例えば、茹でたパスタ)を肉ミンサーでを粉碎して、均質なペーストを得ます。平均的な部分を分析用サンプルとして抜き取り、秤量します。これとは別に、サンプルの含水率を測定し、水分量を算出しておきます。

E. 分析手順

(a) 可溶性の澱粉の加水分解

- i. ポリプロピレン試験管 $[C(p)]$ にサンプル $100 \pm 5\text{mg}$ を精秤し、試験管の底を軽く叩いてサンプルを試験管の底に落とします。

NOTE: 缶詰の豆や食品等、水分の多いサンプルの場合は、約 0.5g を精秤します。
これらのサンプルでは、水分は通常 $60 \sim 80\%$ です。

- ii. 25mL チップを装着したポジティブディスプレイメント方式分注機 $[C(o)]$ を用いてマレイン酸緩衝液 (pH 6.0) $[B(a)]$ 3.5mL を加え、試験管に蓋をして内容物をボルテックスミキサーで5秒間混合します。試験管を 37°C の恒温水槽に置き、5分間予熱します。
- iii. 試験管の蓋を外し、各試験管にPAA/AMG溶液 $[A(1)]$ 0.5mL を加え、試験管をしっかりと蓋をして 37°C に設定した振盪恒温水槽 $[C(i)]$ 中に振盪方向に取り付けます (図1)。
註> 酵素製剤 $[A(1)]$ の硫安懸濁液を使用する場合は、 $[E(a)ii]$ のマレイン酸緩衝液 $[B(a)]$ を 3.8mL とし、酵素懸濁液 0.2mL を加えます。
- iv. 試験管を 37°C で連続振盪 (100 ストローク (往復) / 分) しながら正確に4時間反応させます。
- v. 水槽から試験管を1本ずつ取り出し、ペーパータオルで表面の余分な水をふき取ります。試験管の蓋を取り外し、 25mL チップを装着したポジティブディスプレイメント方式ピペット $[C(o)]$ で $95\% \text{v/v}$ エタノールを 4.0mL 加え、ボルテックスミキサーで激しく攪拌します。
- vi. 全ての試験管にエタノールを添加し終わったら蓋を外して試験管を卓上型遠心機 $[C(c)]$ にて $4,000\text{rpm}$ (約 $3,250\text{rcf}$) で10分間遠心分離します。
- vii. 遠心が止まったらすぐ、慎重にデカンテーションし (沈殿層が乱れない様に留意)、上清を回収します。上清は「消化可能な澱粉」の分析のため取っておきます。
- viii. 沈殿に $50\% \text{v/v}$ エタノール 2mL $[B(e)]$ を加え、ボルテックスミキサーで激しく攪拌して再懸濁させます。さらに $50\% \text{v/v}$ エタノール 6mL を加え、試験管を転倒させて十分に攪拌します。
試験管を軽く叩き、蓋に付いた液を落としてから蓋を取り、 $4,000\text{rpm}$ で10分間、再び遠心分離します。
- ix. 上清をデカンテーションし、ステップ (viii) の遠心洗浄工程をもう一度繰り返します。
2回の上清を回収し、ステップ (vii) の上清と合わせて消化可能な澱粉を測定に供します。
- x. 上清を慎重にデカンテーションし、吸水紙の上に試験管を逆さにし上清を極力除去します。沈殿を落としてしまわないように留意して下さい。
註> この時点で分析を中断し、翌日に繰り越すことができます。

(b) レジスタントスターチの測定

- i. 各試験管にスターラーバー ($6 \times 12\text{mm}$) $[C(h)]$ を入れ、氷冷した 1.7M NaOH $[B(d)]$ 2mL を添加し、マグネティックスターラー $[C(g)]$ を用い氷水浴中で約20分間攪拌して沈殿を再懸濁しRSを溶解します (図2)。

NOTE:

1. ボルテックスミキサーでの混合は、澱粉が乳化する原因となるので使用しないで下さい。
2. NaOH溶液を添加する際に試験管内容物が激しく攪拌されていることを確認して下さい。
これにより澱粉が固まって溶けづらくなることを防ぎます。

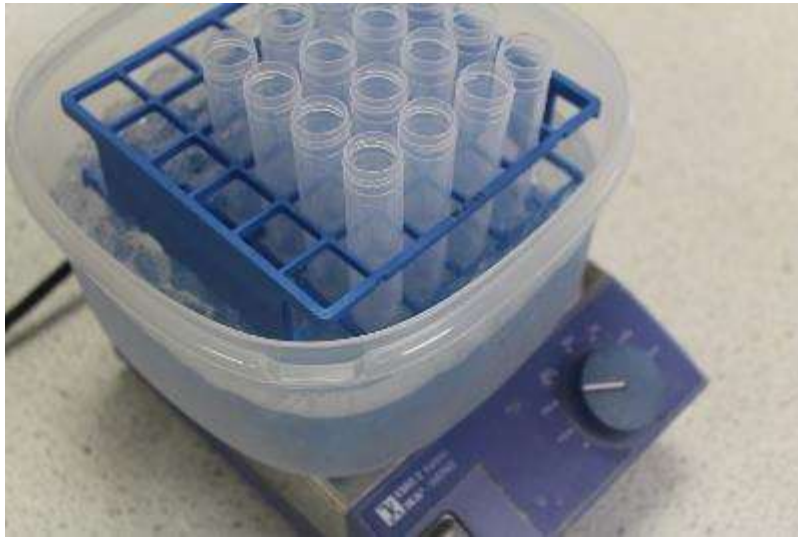


図2.
1.7M NaOHによるレジスタ
ントスターチ可溶化処理時
のマグネティックスターラー
と氷冷水浴の状況

- ii. マグネチックスターラー上で攪拌しながら、各試験管に 1.0M 酢酸緩衝液 (pH3.8) [B(b)] 8mL を加えます。ただちにAMG溶液 (3,300 U/mL) [A(2a)] 0.1mL を添加し、良く混合した後、試験管を50°Cの恒温槽に入れます。
- iii. ボルテックスミキサー [C(t)] で時折り混合しながら50°Cで30分間反応させます。
- iv. **RS含量が10%以上の試料の場合**； 洗瓶を用い、試験管の内容物を 100mL 容メスフラスコ [C(t)] に全量移します。磁石を用いスターラーバーを試験管内に留めたまま、洗瓶で試験管に残る反応液を洗い出します。蒸留水で 100mL に定容し、良く混合した後、溶液の一部を 13,000rpm で5分間、マイクロ遠心機で遠心分離 [C(d)] します。
- v. **RS含量が10%以下の試料の場合**； 反応液の一部 (約 2mL) を 13,000rpm で5分間、マイクロ遠心機で遠心分離 [C(d)] します (希釈はしません)。乾燥したサンプルの場合、試験管内反応液の最終液量は通常約 10.3mL です。但し水分を含むサンプルの場合、メスフラスコに移し定容するもしくは容量補正など、適切な補正手段が必要です。
- vi. ステップ iv または v で得られた上清サンプル 0.1mL を2連でガラス試験管 (16×100mm) に移し、GOPOD試薬 [A(4)] 3.0mL を加え、50°Cで20分間反応させます。
- vii. 反応液を試薬ブランクに対して 510nm の吸光度を測定します。
- viii. レジスタントスターチ含量を算出します (セクションFへ)。

試薬ブランク： 100mM 酢酸緩衝液 (pH 4.5) 0.1mL + GOPOD試薬 3.0mL
 グルコース標準液 (4連)： D-グルコース (1mg/mL) 0.1mL + GOPOD試薬 3.0mL
 サンプルの分析と一緒に、50°Cで20分間反応させます。

(c) 消化性 (可溶性) 澱粉の測定

- i. 最初の反応の遠心分離で得られた上清液 [E(a)vii] と、その後2回の50%エタノール洗浄上清 [E(a)ix] と合わせて 100mL 容メスフラスコ [C(t)] に移し、蒸留水で定容し、良く攪拌します。
- ii. 希釈液 0.1mL をガラス試験管 [C(q)] に2連で分取し、希釈AMG [A(2b)] 0.1mL を加え、50°Cで30分間反応させます。次にGOPOD試薬 (溶液4、[A(4)]) 3.0mL を添加し、50°Cで20分間反応させます。

iii. 試薬ブランクに対し、510nm での吸光度を測定します。

試薬ブランク : 100mM 酢酸緩衝液(pH 4.5) 0.2mL+GOPOD試薬 3.0mL
グルコース標準液 (4連) : D-グルコース(1mg/mL) 0.1mL+100mM 酢酸緩衝液
(pH 4.5) 0.1mL+GOPOD試薬 3.0mL

サンプルの分析と一緒に、50°Cで20分間反応させます。

iv. 消化性の澱粉含量を算出します(セクションFへ)。

F. 計算 - CALCULATIONS -

サンプル中のレジスタントスターチ、消化性(可溶性)澱粉、総澱粉量(有姿%)の計算方法は以下の通り:

レジスタントスターチ (g/100g)

$$\begin{aligned} &= \Delta A \times F \times \frac{EV}{0.1} \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180} \\ &= \Delta A \times F \times \frac{EV}{W} \times 0.90 \end{aligned}$$

* 水分の多いサンプルでは適宜補正して下さい

消化性澱粉 (g/100g)

$$\begin{aligned} &= \Delta A \times F \times \frac{EV}{0.1} \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180} \\ &= \Delta A \times F \times \frac{EV}{W} \times 0.90 \end{aligned}$$

総澱粉量(g/100g) = レジスタントスターチ + 消化性澱粉

ここで:

- ΔA = 試薬ブランクに対する反応液の吸光度
 F = $\frac{100(\text{グルコース } \mu\text{g})}{\text{吸光度}(\text{グルコース } 100\mu\text{g})}$ (吸光度を μg に換算するファクター)
 EV = サンプル抽出容量 (10.3mL か 100mL)
または $[E(b)v]$ で適宜希釈した際はその容量
 0.1 = 分析に用いたサンプル液量
 1000 = $\mu\text{g} \rightarrow \text{mg}$ 換算
 W = サンプルの重量(mg)
 $100/W$ = 重量 100mg 当たりへの換算
 $162/180$ = グルコースのアンヒドログルコース(澱粉内の構造様式)換算

NOTE: 上記は、メガザイムウェブサイト(www.megazyme.com)の各製品ページからダウンロード可能な Megazyme *Mega-Calc*TMを使用することで簡単に計算できます。

表1. AOAC 法 2002.02 と迅速レジスタントスターチ測定法によるRS値比較

試料	RS含量(有姿 w/w%当たり)2連平均値	
	AOAC 法 2002.02	迅速RS測定法
Brennans 全粒粉パン	0.9	0.8
UB 長粒精米	0.5	0.5
UB 早炊き米	2.4	2.4
Heinz® ベイクドビーンズ(FD品)	3.6	3.8
小麦澱粉(Sigma S512L)	0.4	0.5
コーンフレーク (20-12-10)	2.2	2.1
ライマメ(缶詰)	3.1	3.3
ヒヨコマメ(缶詰)	5.0	5.1
エンドウ豆(缶詰)	8.2	7.7
Ryvita® ダークライ麦クラッカー	1.7	1.9
インゲン豆(缶詰)(20-7-11)	4.3	4.3
インゲン豆 (2015)	3.5	4.0
UB 調理済み白米	3.2	3.2
トウモロコシ澱粉 60401	0.9	1.8
半熟グリーンバナナ	13.8	11.0
天然ジャガイモ澱粉 (Sigma)	60.9	63.9
高アミロース・トウモロコシ澱粉	37.9	48.5
Hylon VII® (60901) (高アミロース澱粉)	41.5	52.3
Novelose 240® (96LF10063) (高アミロース)	40.4	44.6
ジャガイモ・アミロース (Sigma A9262)	35.6	35.3
Actistar® (難消化性澱粉)	46.3	49.3

表2. 迅速レジスタントスターチ分析法のレジスタントスターチ定量の再現性

試料	レジスタントスターチ %(w/w) ^a 平均 ^b ±2SD/(%RSD _r) ^c				日平均±2SD、 (%RSD _r)
	1日目	2日目	3日目	4日目	
トウモロコシ澱粉 60401	1.7±0.2	1.8±0.2	1.8±0.1	1.8±0.1	1.8±0.2
	5.07	5.09	1.52	3.23	4.33
Hylon VII®	48±0.2	48.7±0.4	49.2±0.2	48.6±0.5	48.6±0.9
	0.25	0.45	0.25	0.48	0.92
エンドウ豆(缶詰)	8±0.3	8±1.1	8.5±0.4	8±0.6	8.1±0.6
	1.79	6.74	2.48	3.50	3.94
UB 早炊き米	2.6±0.2	2.3±0.1	2.5±0	2.4±0.2	2.5±0.3
	3.12	1.91	0.89	3.95	5.31
天然ジャガイモ澱粉 (Sigma S4251)	68.1±0.3	66.2±9.2	68.5±4.2	66±0.2	65.9±5.6
	0.23	6.96	3.03	0.13	4.23
グリーンバナナ	45.6±2.3	46.2±2.1	48.7±2.1	47.1±3.7	46.9±3.2
	2.48	2.32	2.18	3.95	3.44
Actistar® (難消化性澱粉)	48±0.5	50.4±0.4	50.5±0.3	48.8±0.2	49.4±2.2
	0.57	0.38	0.28	0.23	2.26

a) 結果は全て乾燥重量当たりの総澱粉量として表示、b) 各日、各試料を2回分析、c) CV、変動係数

迅速レジスタントスターチ分析法の再現性相対標準偏差(%RSD_r)を、7つの粉碎サンプルを用いて評価した。各サンプルについて個別の4日間に各日2回の抽出を行ない当日分析を実施した。比検試料のレジスタントスターチ含量は、1.8~63.9%(w/w)の範囲であった。この試料群の再現性相対標準偏差(%RSD_r)に基づく再現性は非常に高く、10~100%(w/w)のレジスタントスターチ含有試料で7.24%以下であり、0.2~10%(w/w)を含有試料では5.31%であった。このレベルの再現性と正確さは、迅速レジスタントスターチ分析法が信頼性が高く再現性があり、豆類、穀類、果物および野菜を含む様々な食品中のレジスタントスターチ分析に適していることを示している。

表3. 迅速レジスタントスターチ分析法の消化可能(可溶性)澱粉定量の再現性

試料	消化可能澱粉、%(w/w) ^a 平均 ^b ±2SD/(%RSD _r) ^c				日平均±2SD、(%RSD _r)
	1日目	2日目	3日目	4日目	
トウモロコシ澱粉 60401	80.3±2	81.1±1	82.6±0.5	82.7±1.6	81.6±2.4
	1.25	0.61	0.31	0.99	1.50
Hylon VII®	32.2±0.6	33±0.6	33.1±0.1	33.5±1.4	32.9±1.2
	0.93	0.98	0.12	2.08	1.79
エンドウ豆(缶詰)	16.6±0.2	16.6±1.1	17.7±0.5	16.9±0.1	16.9±1.1
	0.53	3.19	1.40	0.28	3.11
UB 早炊き米	69.7±1.2	72.7±0	71.6±0.2	72±1.6	71.5±2.5
	0.88	0.00	0.13	1.09	1.77
天然ジャガイモ澱粉 (Sigma S4251)	11.4±0.4	11.2±0.2	11.9±0.4	11.3±0.2	11.5±0.6
	1.79	0.96	1.51	1.10	2.71
グリーンバナナ	17.3±1.5	17.7±0.2	14.8±1.2	16.2±2.7	16.5±2.7
	4.30	0.63	4.18	8.17	9.01
Actistar® (難消化性澱粉)	37.5±1.1	36.7±0.3	36.8±0.9	37.2±0.1	37.1±0.9
	1.53	0.48	1.20	0.13	1.20

a) 結果は全て乾燥重量当たりの総澱粉量として表示、b) 各日、各試料を2回分析、c) CV、変動係数

再現性相対標準偏差(%RSD_r)を、7つの粉碎サンプルを用いて評価した。各サンプルについて個別の4日間に各日2回の抽出を行ない当日分析を実施した。比検試料の消化可能澱粉含量は、11.5~81.6%(w/w)の範囲であった。この試料群の再現性相対標準偏差(%RSD_r)に基づく再現性は非常に高く、9.01%以下であった。

G. 文献 - REFERENCES -

- Englyst, H., Wiggins, H. L. & Cummins, J. H. (1982). *Analyst*, **107**, 307-318.
- Berry, C. S. (1986). *J. Cereal Sci.*, **4**, 301-314.
- Englyst, H. N. & Cummins, J. H. (1985). *Am. J. Clin. Nutr.*, **42**, 778-787.
- Englyst, H. N. & Cummins, J. H. (1986). *Am. J. Clin. Nutr.*, **44**, 42-50.
- Englyst, H. N. & Cummins, J. H. (1987). *Am. J. Clin. Nutr.*, **45**, 423-431.
- Englyst, H. N. Kingman, S. M. & Cummins, J. H. (1992). *European J. Clin. Nutr.*, **46**, (Suppl. 2), S33-S50.
- Champ, M. (1992). *Eur. J. Clin. Nutr.*, **46**, (Suppl. 2), S51-S62.
- Muir, J. G. & O'Dea, K. (1992). *Am. J. Clin. Nutr.*, **56**, 123-127.
- Faisant, N., Planchot, V., Kozlowski, F., M. P. Pacouret, Colonna. P. & M. Champ. M. (1995). *Sciences des Aliments*, **15**, 83-89.
- Goni, I., Garcia-Diz, E., Manas, E. & Saura-Calixto, F. (1996). *Fd. Chem.*, **56**, 445-449.

11. Akerberg, A. K. E., Liljberg, G. M., Granfeldt, Y. E. Drews, A. W. & Bjorck, M. E. (1998). *Am. Soc. Nutr. Sciences*, **128**, 651-660.
12. McCleary, B. V. & Monaghan, D. A. (2002). *J. AOAC Int.*, **85**, 665-675.
13. McCleary, B. V., McNally, M. & Rossiter, P. (2002). *J. AOAC Int.*, **85**, 1103-1111.
14. McCleary, B. V. (2007). *Anal. Bioanal. Chem.*, **389**, 291-308.
15. McCleary, B. V., DeVries, J. W., Rader, J. I., Cohen, G., Prosky, L., Mugford, D. C. & Okuma, K. (2012). *J. AOAC Int.*, **95**, 824-844.
16. Szarka, L. A. & Camilleri, M. (2012). *Seminars in Nuclear Medicine*, **42**, 113-123.
17. McCleary, B. V., Sloane, N. & Draga, A. (2015). *Starch*, **67**, 860-883.
18. McCleary, B. V. (2018). *J. AOAC Int.*, **101**, 196-207.

日本バイオコン株式会社

名古屋本社

〒454-0852 名古屋市中川区昭和橋通三丁目 23 番地1 バイオコンビル
TEL 052-661-8105 (代表) FAX 052-659-0888

TEL 052-659-4898 (試薬担当直通)

E-mail : bj-megazyme@biocon.co.jp

Homepage : <http://www.biocon.co.jp>

この小冊子に記載されている情報は、当社が知る限りにおいて事実かつ正確に記載されていますが、使用条件が当社の管理範囲外であるため、本文中にどのような推奨や示唆があったとしても、如何なる使用も特許を侵害しないということを保証しているものではありません