

オクテニルコハク酸置換でん粉の分析

辻井 淳*，丸山 幸美*，山崎 光廣*，印出 進*

Analysis of Starch Octenylsuccinate Derivatives

Jun TSUJII*, Yukimi MARUYAMA*, Mitsuhiro YAMAZAKI* and Susumu INDE*

*Tokyo Customs Laboratory

2-56, Aomi, Koto-ku, Tokyo 135-8615 Japan

The esterification reaction of starch by acetic acid anhydride or octenyl succinic anhydride (OSA) was examined. The effects of reaction conditions (such as temperature, reaction time, etc.) on the degree of substitution (D.S.) were examined. Detection of OSA in starch derivatives was examined using infrared spectroscopy (IR), gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) and Brabender viscometry. It was found that the GC/MS method could detect OSA having the least degree of substitution among these three methods. The detection limit of OSA in the starch derivative by the GC/MS method was D.S. 0.00002.

1. 緒 言

検出限界を検討したので報告する。

でん粉及び変性でん粉は、食品工業、繊維工業、製紙工業等の分野で広く用いられ、海外からも大量に輸入されている。でん粉及び変性でん粉は、関税率表の分類が異なり、変性を受けていない未処理でん粉は第 11.08 項に分類されるのに対し、変性でん粉は第 35.05 項に分類されている。両者の税率格差が大きいことから、でん粉と変性でん粉との判別は、税関分析において重要な分析項目の一つになっている。

オクテニルコハク酸でん粉（以下、OSA でん粉と略記する）は、エステル化でん粉の一種で、でん粉の水酸基を疎水性のオクテニルコハク酸基で置換し、界面活性作用を持たせたもので、この特性を利用して食品の乳化安定剤、増粘安定剤などに用いられている。

OSA でん粉と同様にエステル化でん粉の一種であるアセチル化でん粉の分析法については、税関分析法 No.403「でん粉誘導体の分析法」に定められているが、OSA でん粉の分析法については、確立されていない。

アセチル化でん粉及び OSA でん粉について、置換度（D.S.）の異なる数種類のでん粉誘導体を合成し、置換度の違いによる挙動の変化を検討した。また、赤外吸収スペクトル（IR）、ガスクロマトグラフィー／質量分析（GC/MS）、ブランダービスコグラフィーにより分析を行い、それぞれの分析法における

2. 実 験

2.1 試薬及び試料

トウモロコシでん粉（和光純薬工業製・試薬特級）
オクテニルコハク酸置換でん粉（輸入サンプル：5種）
グルコース（和光純薬工業製・試薬特級）
無水酢酸（純正化学製・純正一級）
無水オクテニルコハク酸（東京化成製）

2.2 測定条件及び分析装置

- 2.2.1 薄層クロマトグラフィー（TLC）
 - 薄層板：Silica gel 60 F₂₅₄, 5 × 20cm
 - 展開溶媒：ヘキサン：酢酸エチル（2 : 8）
 - 検出：10%硫酸メタノール溶液を噴霧し, 105°で加熱する。
- 2.2.2 赤外吸収スペクトル（IR）
 - 装置：Nicolet Magna IR 560 (NICOLET 社製)
 - 測定条件：KBr 錠剤法
- 2.2.3 核磁気共鳴スペクトル（NMR）
 - 装置：UNITY INOVA 500MHz (VARIAN 社製)
 - 測定核種：¹H
 - 溶媒：重メタノール
- 2.2.4 ガスクロマトグラフィー質量分析（GC/MS）
 - 装置：HP6890/HP5973 (HEWLETT PACKARD 社製)

* 東京税関業務部 〒 135-8615 東京都江東区青海2-56

オクテニルコハク酸置換でん粉の分析

カラム : HP - 5MS (15m × 0.25mm I.D. 膜厚 0.25 μm)
昇温条件 : 100 (3min) (20 /min) 320 (8min)
注入口温度 : 220 ~ 320

2.2.5 ブラベンダービスコグラフィー

装置 : Micro Visco - Amylo - Graph (BRABENDER 社製)
温度条件 : 30 (3 /min) 95 (15min)
(- 3 /min) 50

2.3 実験

2.3.1 グルコースのアセチル化

グルコース 1.8g に無水酢酸 6g と酢酸ナトリウム 4.1g を加え、攪拌しながら 80 度で反応を行う。反応後、メタノールを加えて未反応の無水酢酸を分解した後、水酸化ナトリウムを加えて塩基性にし、塩化メチレンにより反応生成物を抽出する。濃縮後、再結晶化したグルコースのアセチル化物について、TLC, IR 及び NMR で同定を行う。

2.3.2 でん粉誘導体の合成

トウモロコシでん粉を用い、アセチル化でん粉及び OSA でん粉を合成し、反応条件とでん粉誘導体の D.S. の関係について検討する。

2.3.2 (1) アセチル化でん粉

でん粉 15g に水 22.5ml を加え、スラリー状にする。炭酸ナトリウムを加えて pH 8.3 を保持しながら、アセチル化剤として無水酢酸を添加し、攪拌しながら 6 時間反応させる。反応終了後、1N 塩酸で pH 6.8 に調整し、No.2 のろ紙でろ過する。水、メタノールを順次加え、洗浄する。反応生成物を透析膜に移して透析を行い、不純物を除去する。反応生成物は常温で乾燥する。なお、反応時に加えた無水酢酸の量及び反応温度件を、Table 1 (A) に示す。

Table 1 Reaction condition of starch acetyl derivative (A) and Octenylsuccinate derivative (B) in 6 hours

(A)

	Amount of reaction (g)		Temperature
	starch	acetic acid anhydride	
a	15	0.45	room temperature
b	15	2.25	room temperature
c	15	4.5	room temperature

(B)

	Amount of reaction (g)		Temperature
	starch	OSA	
A	15	0.375	room temperature
B	15	0.75	room temperature
C	15	1.5	room temperature
D	15	7.5	room temperature
E	15	15	room temperature
F	15	0.375	50°C
G	15	0.75	50°C
H	15	1.5	50°C
I	15	7.5	50°C
J	15	15	50°C

2.3.2 (2) OSA でん粉

エステル化剤に無水オクテニルコハク酸を用い、上記と同様の操作により合成する。反応時に加えたオクテニルコハク酸の量及び反応温度を、Table 1 (B) に示す。

2.3.3 エステル化でん粉の D.S. 測定

2.3.2 (1) 及び 2.3.2 (2) により合成したアセチル化でん粉、OSA でん粉及び OSA でん粉 (輸入サンプル) について、税関分析法 No.403 の方法により D.S. を求める。なお、OSA でん粉の D.S. は 1 置換体として計算した。

2.3.4 加水分解に用いる水酸化ナトリウム濃度の検討

アセチル化でん粉の D.S. を求める場合、加水分解を行う水酸化ナトリウム濃度については、税関分析法に規定されているが、OSA でん粉の場合には、水酸化ナトリウム濃度が規定されていない。そこで、0.3N, 0.45N, 0.6N, 0.75N 及び 1N の 5 種類の水酸化ナトリウムを調製し、加水分解を行う水酸化ナトリウムの濃度について検討を行った。

OSA でん粉 (輸入サンプル) 5g を 50ml の水に分散し、フェノールフタレイン指示薬を数滴加え、分散液が微紅色を呈するまで 0.1N 水酸化ナトリウムを加える。それぞれの濃度の水酸化ナトリウムを 25ml ずつ添加し、30 分間室温で振とうを行う。振とう後、無色になるまで 0.2N 塩酸で滴定を行う。未処理でん粉についても、同様の操作を行い、プランク試験値を求め、D.S. を算出する。

2.3.5 でん粉誘導体の分析

2.3.5 (1) IR

合成したアセチル化でん粉、OSA でん粉及び未処理でん粉について、2.2.2 の条件で測定する。

2.3.5 (2) GC/MS

OSA でん粉 3g を 200ml 三角フラスコにとり、水 50ml を加えて分散させる。1N 水酸化ナトリウムを 5ml 加え、30 分間室温で振とうを行う。振とう後、ろ紙 (5C) を用いてろ過する。ろ液にフェノールフタレイン指示薬を数滴加え、1N 塩酸で中和し、さらに過剰の塩酸 1ml 加えて酸性にする。この溶液をジエチルエーテルで抽出した後、溶媒を除去する。これをクロロホルムに溶かし、GC/MS で分析する。

2.3.5 (3) ブラベンダービスコグラフィー

合成したアセチル化でん粉、OSA でん粉をそれぞれ 10g 秤量して 100ml の水に分散し、ブラベンダービスコグラフにより測定する。

3.結果

3.1 グルコースのアセチル化の確認

3.1.1 TLC

グルコースのアセチル化反応前と反応後のクロマトグラムを Fig.1 に示す。反応前のグルコースのスポットは、原点に留まっているのに対し、反応後のスポットは、Rf 値が 0.8 付近に見られた。これは、グルコースの親水性の水酸基が疎水性のアセチル基に置換されたためと考えられる。

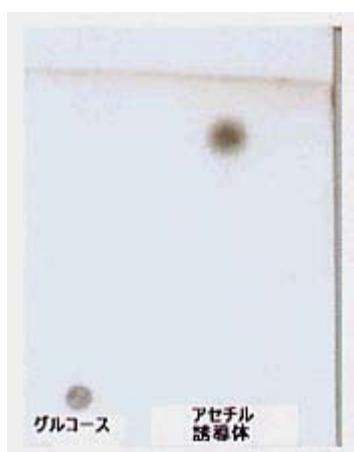


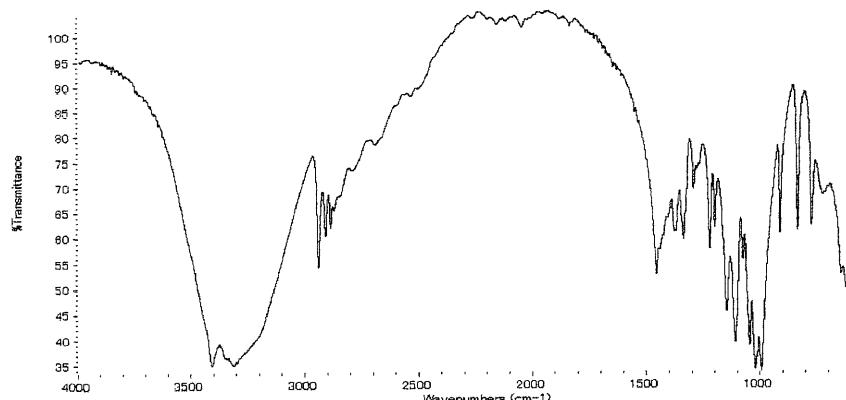
Fig. 1 TLC of glucose and glucose acetyl derivative.

3. 1. 2 IR

グルコース及びグルコースアセチル化誘導体の赤外吸収スペクトルを Fig.2に示す。反応前のグルコースは ,水酸基の 3300cm^{-1} 付近の吸収がみられるのに対し ,反応後は 1740cm^{-1} にエステル基の吸収がみられることから ,エステル化反応がおこっていることが推定できる。

3. 1. 3 NMR

グルコース及びグルコースアセチル化誘導体の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを Fig.3に示す。グルコースのスペクトルでは ,水酸基が結合した炭素のプロトンのシグナル群が $3.6 \sim 3.8\text{ppm}$ に存在するが ,誘導体のスペクトルでは ,これらのシグナル群が低磁場側にシフトし , $3 \sim 4\text{ppm}$ のシグナル群が消失している。また ,アセチル基のメチルプロトンが 2ppm 付近に出現することから ,グルコースの水酸基は ,すべてアセチル基に置換されたものと考えられる。



(A)

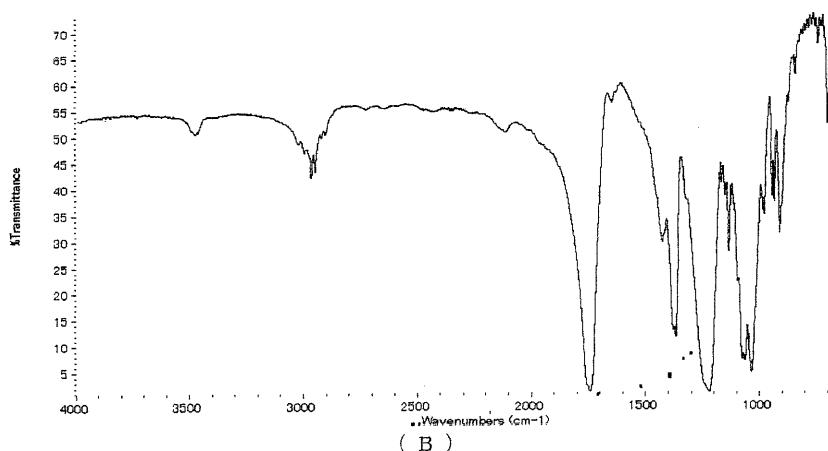


Fig. 2 IR spectrum of glucose (A) and glucose acetyl derivative (B).

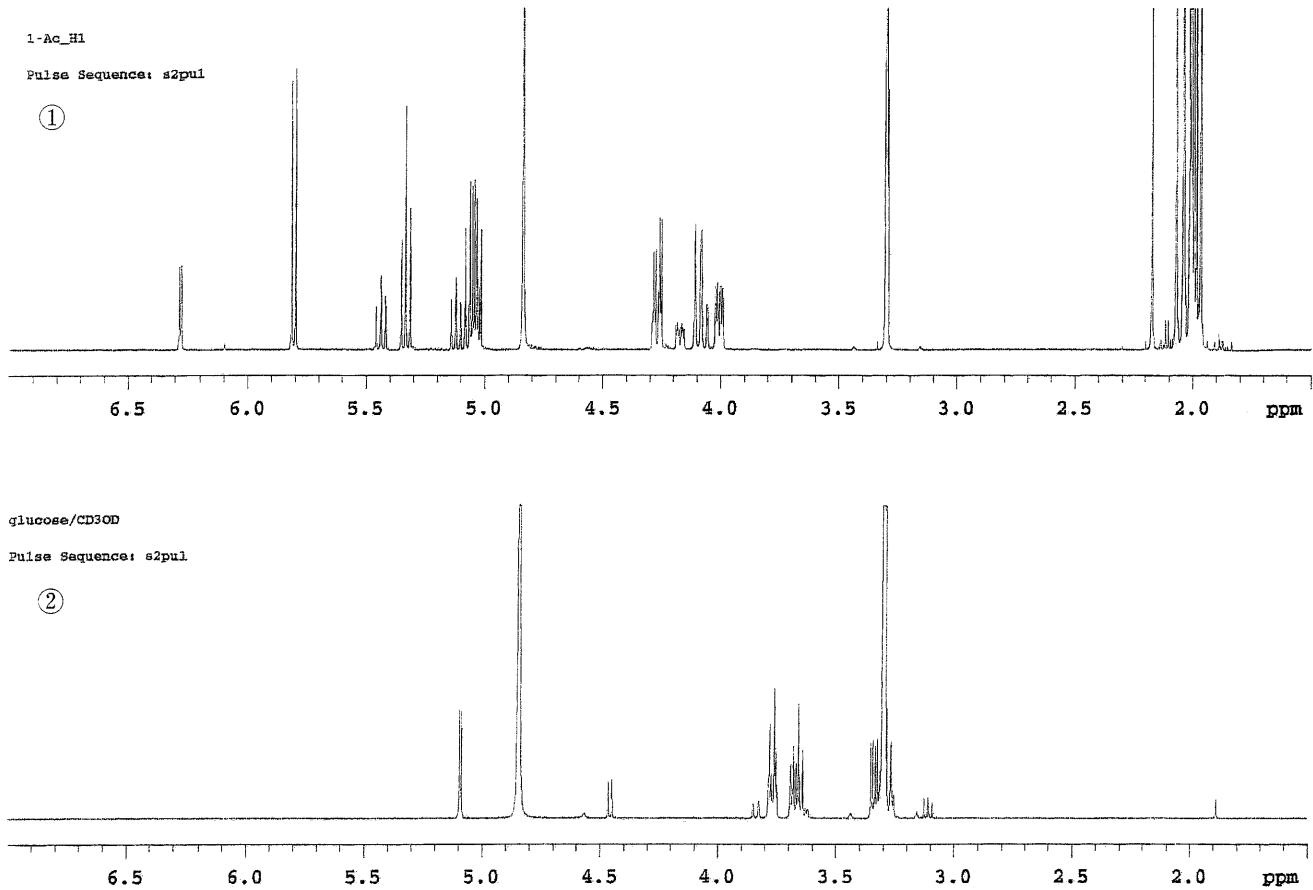


Fig. 3 ^1H -NMR spectrum of glucose and glucose acetyl derivative.
glucose acetylate glucose

TLC, IR 及び NMR の結果から、グルコースの水酸基は全てアセチル基に置換されていることがわかった。アセチル化置換反応とオクテニルコハク酸置換反応は、いずれも糖質の水酸基のエステル化反応であり、OSA でん粉の水酸基においても同様の反応がおこっているものと推定される。

3.2 OSA でん粉のD.S.

3.2.1 置換度に対する反応条件の影響

反応条件の異なるでん粉誘導体のD.S.をTable.2に示す。アセチル化でん粉については、無水酢酸の量が多くなるにつれて、D.S.が大きくなるということが確認できた (Table 2, a~c)。

オクテニルコハク酸の D.S.についても同様の結果が得られた (Table 2, A~E)。

反応温度の違い (Table 2, A~E 及び F~J) については、同一濃度では、室温で反応したものに比べ、50°で反応したものの方がD.S.は高い傾向にあった。

50°で反応したものについて、反応時のオクテニルコハク酸濃度と D.S.との関係をグラフで示すと (Fig.4), 対数曲線の挙動を示した。

3.2.2 OSA でん粉のD.S.に対する加水分解条件の影響 OSA でん粉 (輸入サンプル) についての水酸化ナトリウム濃度と D.S.との関係をそれぞれ Fig.5に示す。

Table 2 D.S. of starch acetyl derivative (A) and Octenylsuccinate derivative (B).

	Amount of acetic acid anhydride(g)	D.S.
a	0.45	0.0011
b	2.25	0.0093
c	4.5	0.0172

6 hours and room temperature		6 hours and 50 °C			
	Amount of OSA (g)	D.S.	Amount of OSA (g)	D.S.	
A	0.375	0.0078	F	0.375	0.004
B	0.75	0.0058	G	0.75	0.0144
C	1.5	0.0124	H	1.5	0.0248
D	7.5	0.0158	I	7.5	0.0569
E	15	0.0261	J	15	0.0618

サンプルA (Fig. 5A) については、水酸化ナトリウムの濃度が増加するにしたがって D.S.が高くなるが、水酸化ナトリウムの濃度が一定の量を超えると D.S.はほぼ平衡に達した。

サンプルB (Fig. 5B) については、0.6Nまでは水酸化ナトリウム濃度の増加とともに D.S.も増加していくが、0.75Nで D.S.が急激に減少した。サンプルC,D 及びEについてもサンプルBと

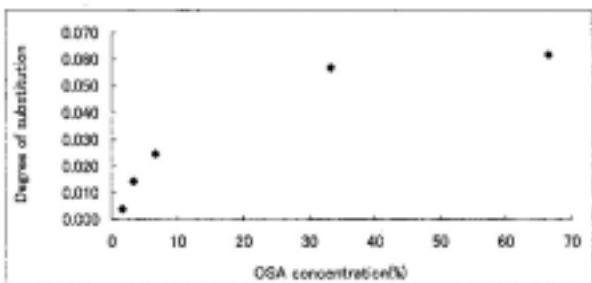


Fig. 4 Effect of degree of substitution on OSA concentration.

同じパターンを示した。また、1N 水酸化ナトリウムを加えると、サンプルA～Eはいずれも糊化した。

これらについては、原料のでん粉の種類により糊化するアルカリの濃度が異なり、ある限界量を超えるとでん粉が糊化し¹⁾、正確なD.S.の測定ができなくなるためと考えられる。今後OSAでん粉のD.S.の分析については、種類の異なるでん粉について加水分解する水酸化ナトリウムの濃度を検討する必要がある。

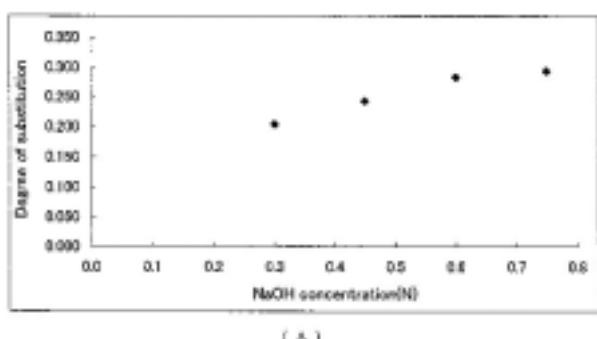


Fig. 5 Effect of degree of substitution on NaOH.

3.3 でん粉誘導体の検出限界

3.3.1 IR

Fig.6及び7に未処理でん粉、アセチル化でん粉及びOSAでん粉のIRスペクトルを示す。アセチル化でん粉及びOSAでん粉のIRスペクトルは、いずれもエステル基(1740cm^{-1})の吸収がみられる。

アセチル化でん粉及びOSAでん粉の検出限界は、D.S.が0.01程度であった。

3.3.2 GC/MS

GC/MSにより、OSAでん粉の加水分解抽出物であるオクテニルコハク酸を検出した。

OSAでん粉の加水分解抽出物のトータルイオンクロマトグラム及びマススペクトルをFig.8に示す。トータルイオンクロマトグラムには、及びの2本のピーク現れ、それぞれのピークのマススペクトルは、いずれもオクテニルコハク酸のスペクトルを示した。なお、のピークのリテンションタイムは、標準の無水オクテニルコハク酸と一致した。

ガスクロマトグラフの注入口温度を変えて注入した場合のトータルイオンクロマトグラムをFig.9に示す。注入口温度が高くなるほど、のピークに対するのピークの相対比が大きくなつた。

OSAでん粉の加水分解抽出物について、GC/MS注入前にIR測定を行ったところ、Fig.10に示すように、オクテニルコハク酸の吸収を示し、酸無水物の吸収は見られなかった。

これらのことから、2本のピークは、それぞれ無水オクテニルコハク酸(のピーク)とオクテニルコハク酸(のピーク)と考えられる(Fig.11)。これは、OSAでん粉の加水分解によってオクテニルコハク酸を生じ、ガスクロマトグラフの注入口で加熱され、一部が酸無水物になったものと推測される。

D.S.が0.01のOSAでん粉及びそれを未処理でん粉で希釈したものについて、GC/MSで分析した結果をFig.12に示す。(C)のクロマトグラムについて、無水オクテニルコハク酸(のピーク)が検出されたことから、GC/MSの検出限界は、0.00002と考えられる。

3.3.3 プラベンドーピスコグラフィー

アセチル化でん粉及びOSAでん粉の粘度曲線をFig.13及び14に示す。

Fig.13に示すように、アセチル化でん粉については、未処理でん粉の粘度曲線と比較して、ほとんど変化が見られなかった。しかし、D.S.が増加するにつれて、最大粘度が減少する傾向にあった。

Fig.14に示すように、OSAでん粉については、D.S.が増加するにつれて糊化温度(立ち上がり温度)が低下する傾向にあったが、再現性に問題があり、データに信頼性がなかった。D.S.が0.06のOSAでん粉の粘度曲線は、未処理でん粉及びD.S.が0.06よりも低いOSAでん粉の粘度曲線と異なる傾向を示した。

この原因は、D.S.が0.06ものは、温度上昇につれて測定容器からサンプルの吹きこぼれが生じたこと、粘度計のフィーラーに試料が付着糊化したことなどによるものと考えられる。

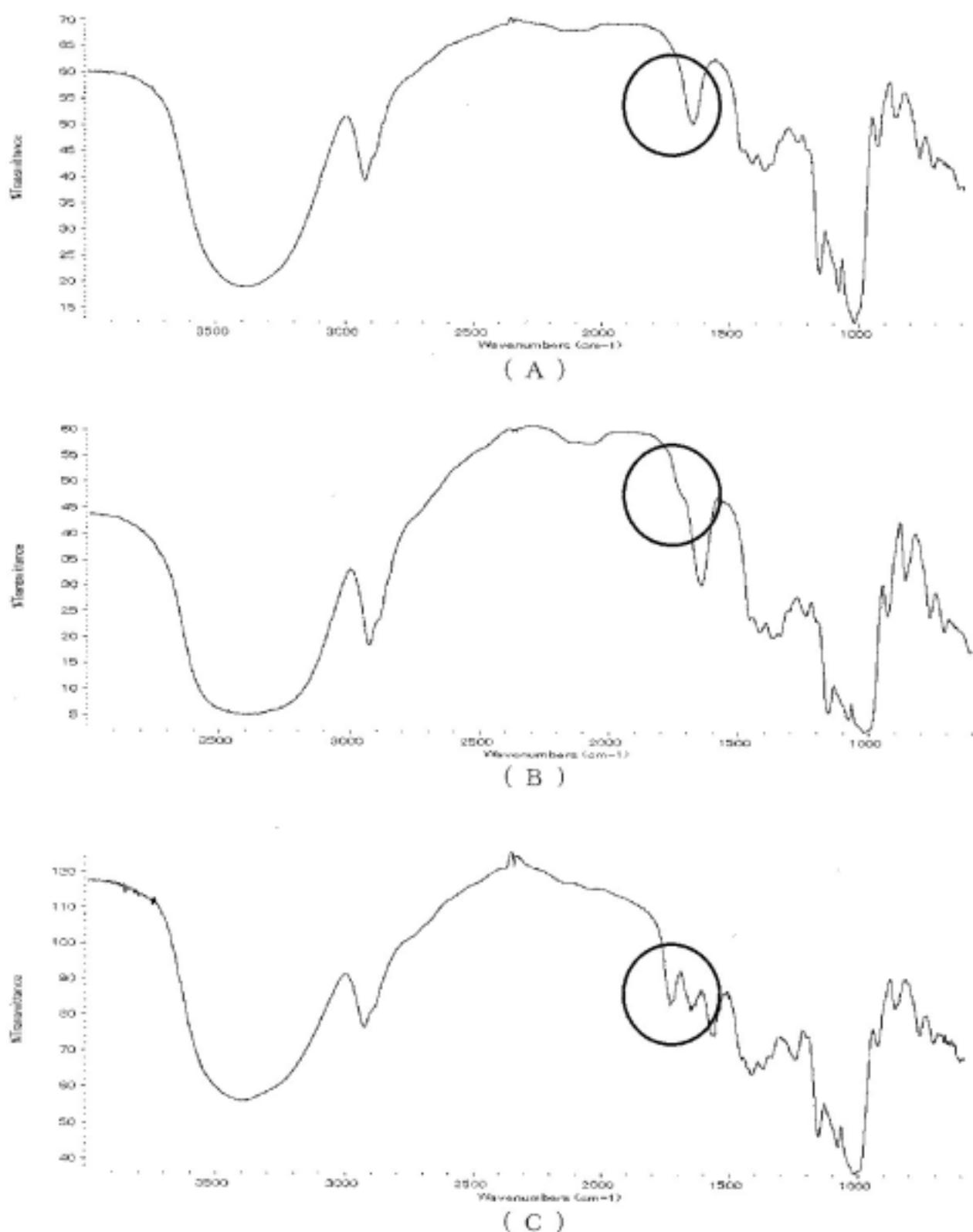


Fig. 6 IR spectrum of raw starch (A) and starch acetyl derivative.

(B) : 0.007 (C) : 0.017 degree of substitution.

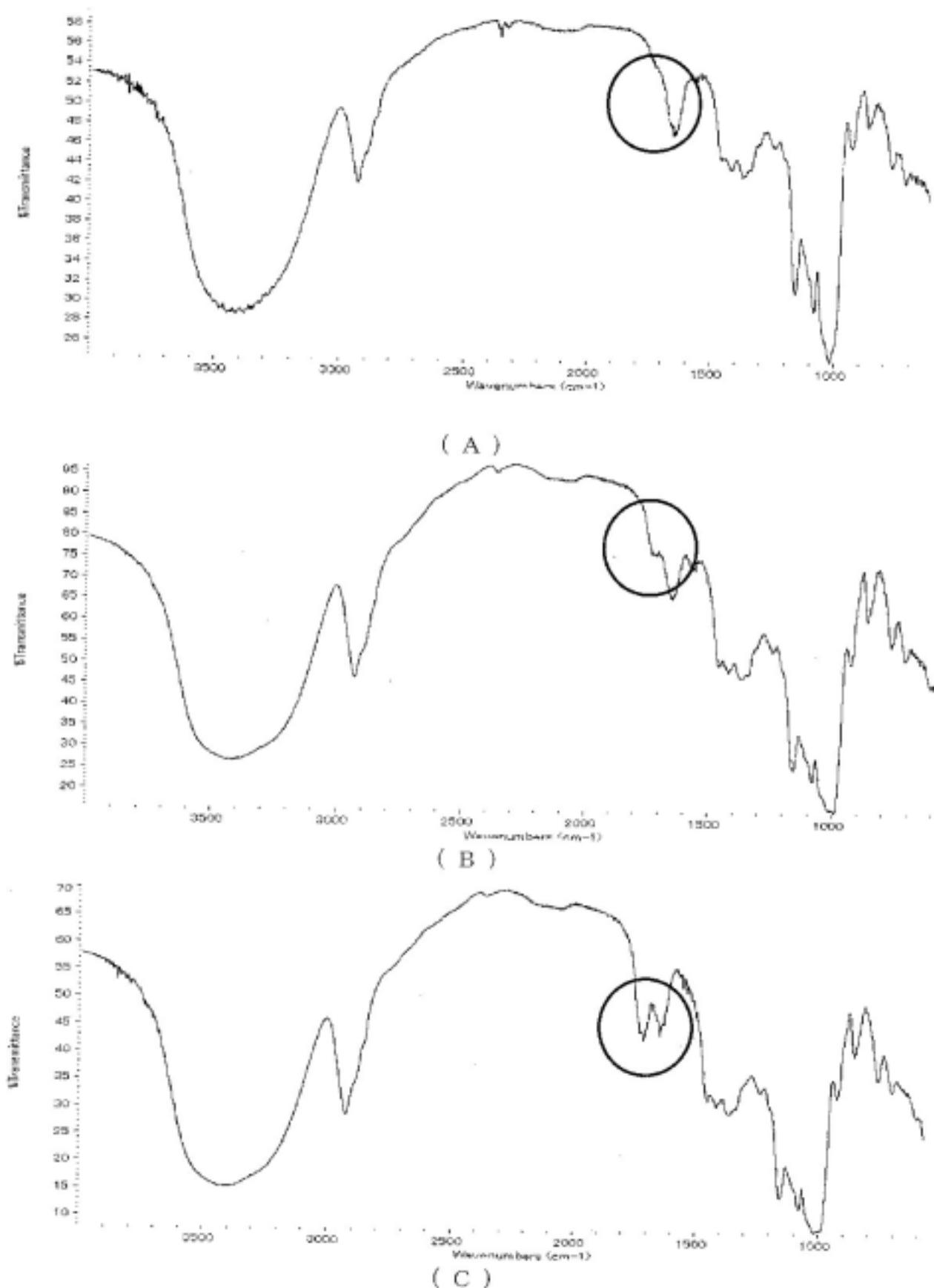


Fig. 7 IR spectrum of starch Octenylsuccinate derivative.

(A) : 0.006 (B) : 0.012 (C) : 0.026 degree of substitution.

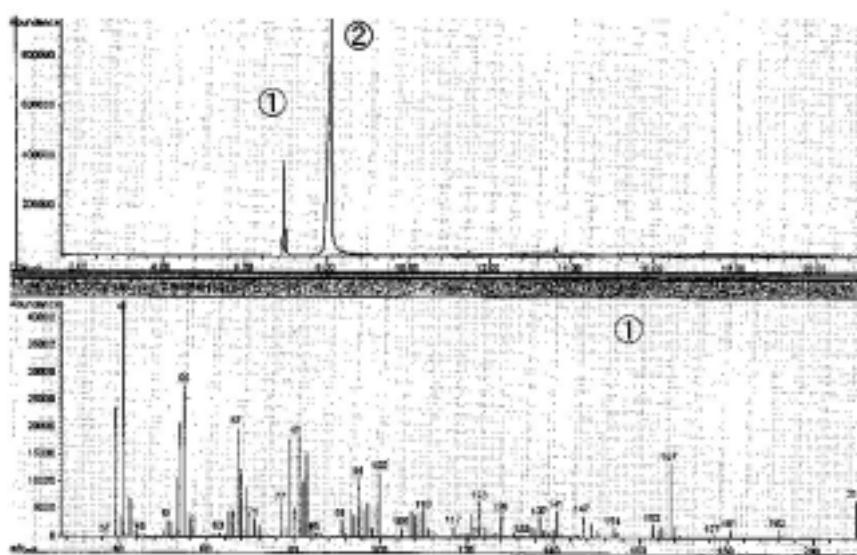


Fig. 8 GC/MS of OSA about 0.01 degree of substitution.

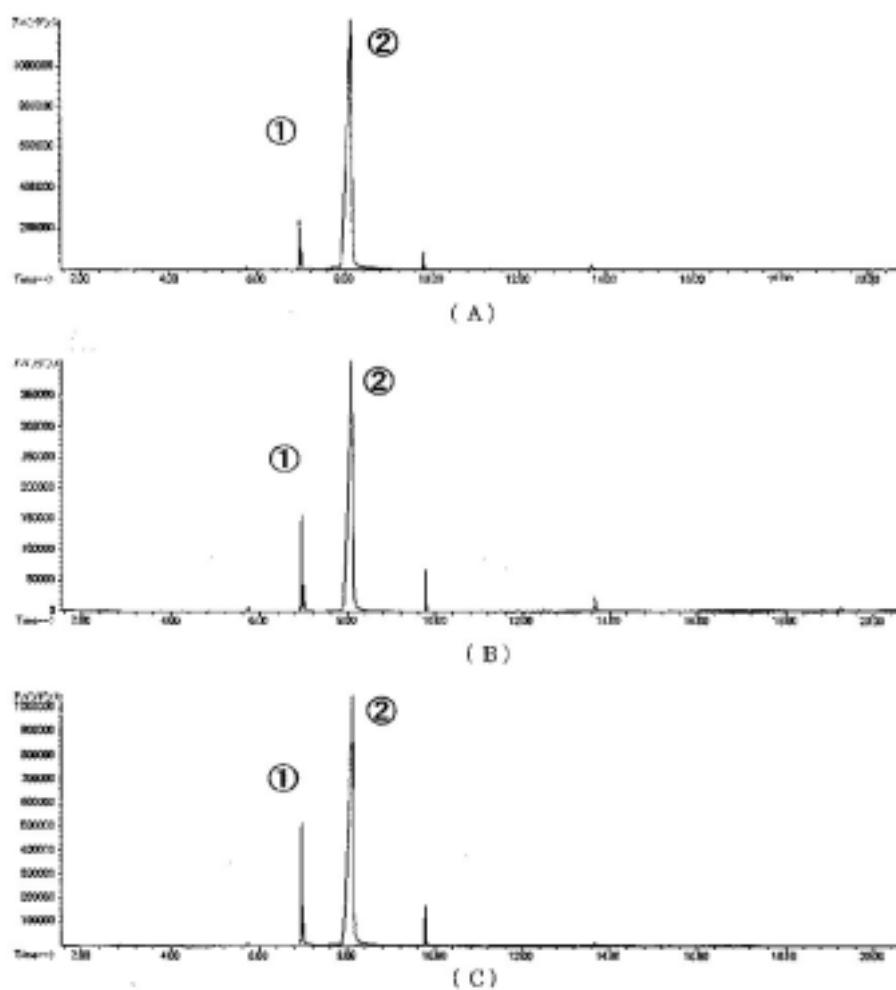


Fig. 9 Relationship of degree of substitution and Injection temperature of GC/MS.

Injection temperature : (A), 220 ; (B), 270 ; (C), 320 .

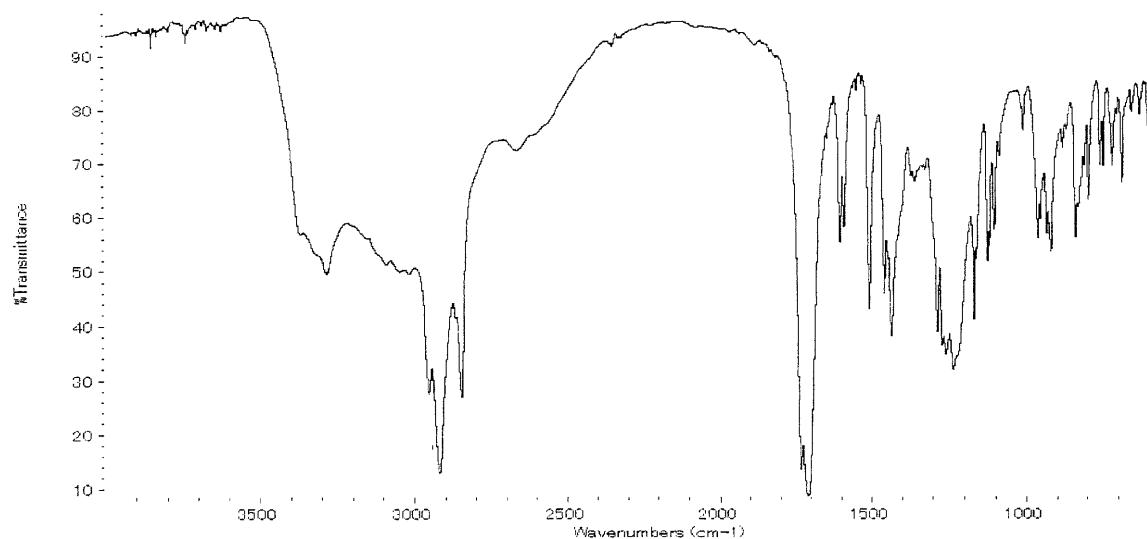
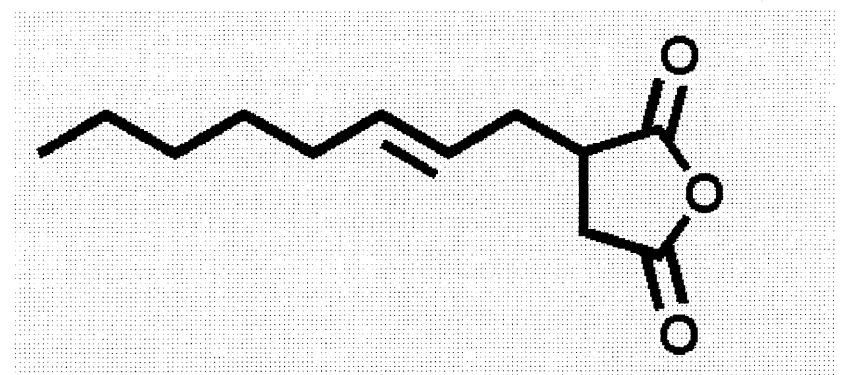
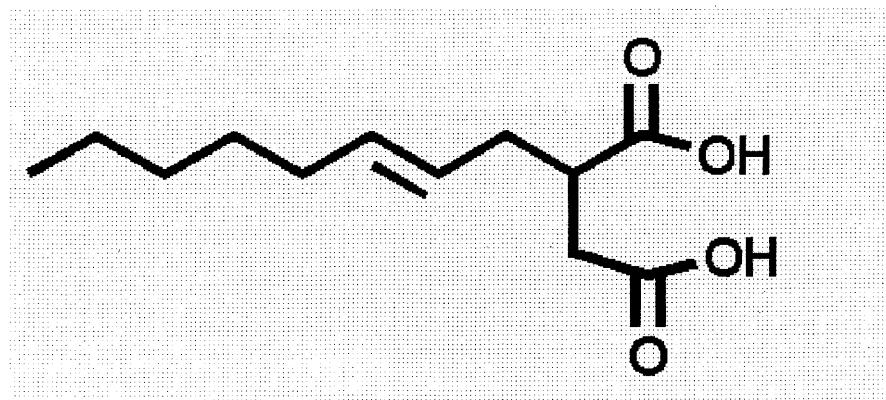


Fig. 10 IR of OSA before injecting GC/MS.



(A)



(B)

Fig. 11 Chemical structure of (A) OSA (anhydrite), (B) OSA.

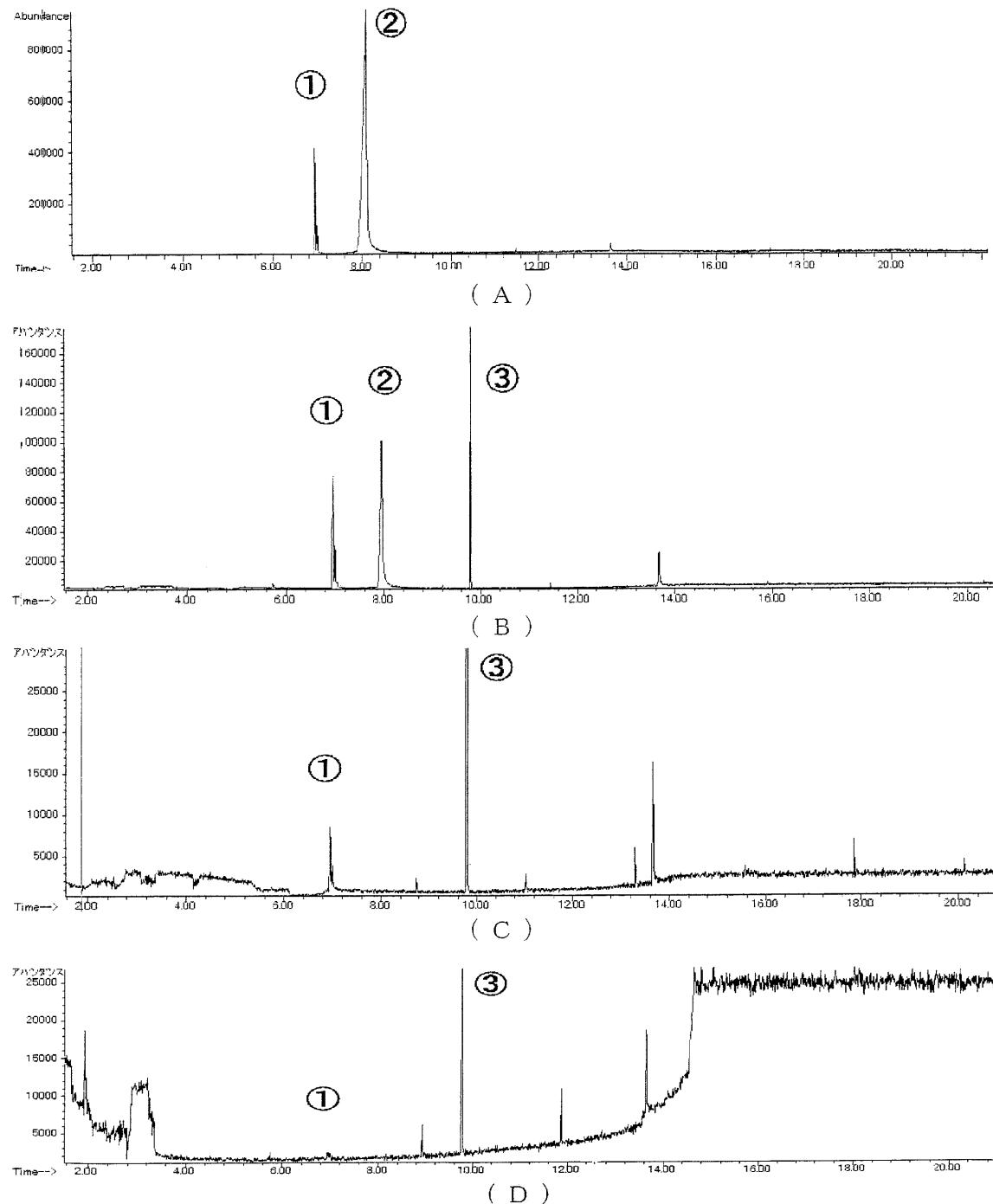


Fig. 12 Gas chromatogram of OSA.
 (A) : 0.012
 (B) : $0.012 \times (1/10)$ (C) : $0.012 \times (1/100)$
 (D) : $0.012 \times (1/500)$ degree of substitution.
 : OSA (anhydrite)
 : OSA
 : phenolphthalein

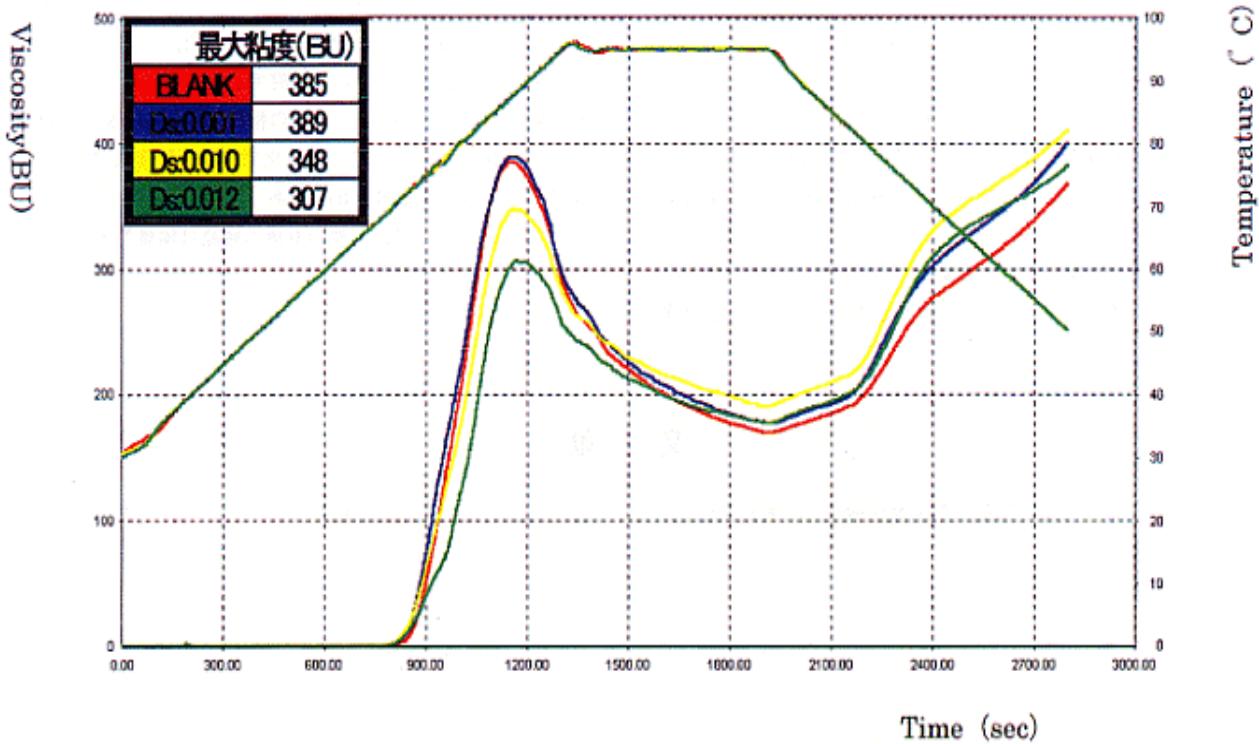


Fig. 13 Brabender viscomogram of starch acetylate derivative.

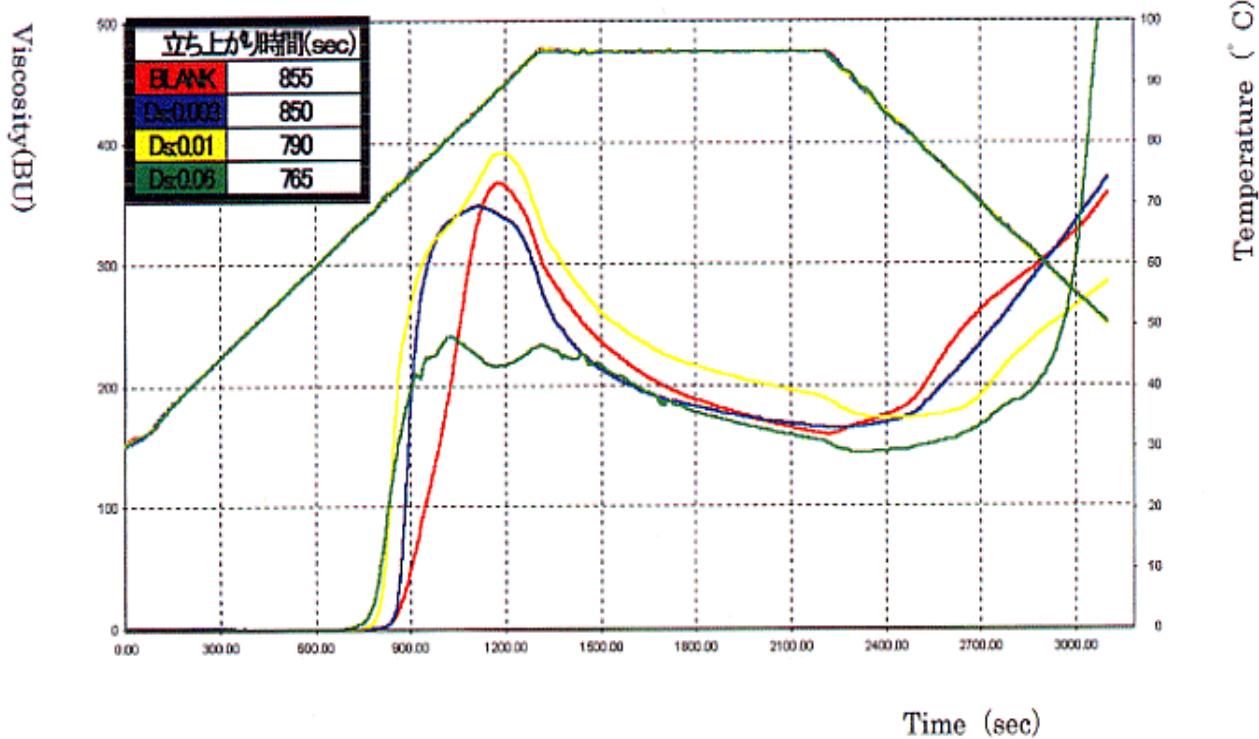


Fig. 14 Brabender viscomogram of starch Octenylsuccinate derivative.

4. 要 約

アセチル化でん粉及びOSAでん粉を合成したところ、エスチル化剤の無水酢酸またはオクテニルコハク酸の濃度が高いほどD.S.が高い傾向にあった。また、反応温度が高いほど、D.S.の高いでん粉誘導体が得られた。

OSAでん粉のD.S.を分析する場合、加水分解に用いる水酸化ナトリウムの濃度が高いほどD.S.の測定値が高くなるが、水酸

化ナトリウムの濃度が高すぎるとでん粉が糊化するため、OSAでん粉については加水分解に用いる水酸化ナトリウムの濃度など、D.S.の測定条件について検討する必要がある。

GC/MSについて、OSAでん粉の検出限界は、D.S.が0.00002であった。IRについて、アセチル化でん粉及びOSAでん粉の検出限界は、いずれもD.S.が0.01であった。ラベンドービスコグラフィーについては、置換の有無の確認は困難であった。

文 献

- 1) 二国二郎監修、中村道徳、鈴木繁男編集：“澱粉科学ハンドブック”，p.38（1979），朝倉書店