

ヒドロキシプロピルでん粉の分析

丸山 幸美*, 水田 完*, 辻井 淳*, 村上 孝之*, 山崎 光廣*, 印出 進*

Analysis of Hydroxypropyl Starch

Yukimi MARUYAMA*, Yutaka MIZUTA*, Jun TSUJII*,
Takayuki MURAKAMI*, Mitsuhiro YAMAZAKI* and Susumu INDE*

*Tokyo Customs Laboratory
2-56, Aomi, Koto-ku, Tokyo 135-8615 Japan

In the current method of analyzing hydroxypropyl starch (HPS), propylene produced when decomposed by hydriodic acid is measured by gas chromatography. Nevertheless, detection is sometimes impossible because the quantity of produced propylene is too small when analyzing HPS of a low degree of substitution. We therefore tried to determine 2-iodopropyl generated from HPS by means of gas chromatography, applying the method of determining hydroxypropyl starch provided in Japanese Pharmaceutical Excipients(hereinafter to as "GC method"). We also examined the application of the method to HPS of low substitution degrees and HPS in rice flour preparations. On the other hand, for qualitative and quantitative determination, HPS was hydrolyzed in deuterium chloride and protons of methyl groups contained in generated dihydroxypropane were measured by means of ^1H nuclear magnetic resonance spectra (hereinafter referred to as "NMR method"). It was shown that the degree of molar substitution of HPS could be measured by the NMR method as well as the GC method. It was also confirmed that HPS having low degrees of molar substitution and rice flour preparations mixed HPS contained hydroxypropyl groups. In order to identify a change in physical properties of HPS depending on the amount of substituents, measurement was carried out by using a Brabender Viscograph. The result showed that the degree of molar substitution was correlated with the gelatinization temperature.

1. 緒 言

化工でん粉は、食品用、医薬品用、製紙用その他様々な用途に欠かせない素材で、アルファー化でん粉、でん粉誘導体、デキストリンなどの種類がある。

ヒドロキシプロピルでん粉（以下HPS）は、でん粉にヒドロキシプロピル基が結合したエーテル化でん粉で、でん粉誘導体の一つである。保存安定性があり、加工食品の製造に広く使用され、おかき等の米菓に含まれることもある。

米菓の原料等に使用される、米粉とHPSの配合された米粉調製品は、配合されているでん粉の変性の有無や配合割合によって税率が異なるため、分析依頼されることが多い。

現在、HPSの分析は、税関分析法No.403に従い、ヨウ化水素酸による分解反応で生じたプロピレンを、ガスクロマトグラフ

イー（以下GC）で確認している¹⁾。しかし、米粉調製品の場合、HPS含有量によっては、分解反応で生じたプロピレン量がわずかで、分析が困難な場合がある。また、この分析方法は、生じたプロピレンのすべてが溶媒に吸収されない可能性等があり、HPSの置換度の測定は不可能である。

本報では、医薬品添加物規格²⁾のヒドロキシプロピルスターチの定量法を準用し（以下GC法）、低置換度HPS及び米粉調製品中のHPSへの応用について検討した。また、HPSのエーテル結合を重塩酸で加水分解し、生成したジヒドロキシプロパンのメチル基のシグナルを ^1H 核磁気共鳴スペクトル（以下NMR）で測定し、定性及び定量を試みた（以下NMR法）。さらに、HPSの置換基の影響による物性の変化をブラベンダービスコグラフで測定したので報告する。

* 東京税関業務部 〒135-8615 東京都江東区青海2-56

2. 実 験

2. 1 試料及び試薬

2. 1. 1 試 料

タピオカでん粉：島田化学(株)提供、日澱化学(株)提供
ヒドロキシプロピルタピオカでん粉：日澱化学(株)製Msの異なるもの11種類

HPS米粉の調製品、原料HPS及び原料米粉：輸入品 2 検体

2. 1. 2 試 薬

GC法：

ヨウ化水素酸（和光純薬工業(株)製・特級試薬）
アジピン酸（和光純薬工業(株)製・特級試薬）
ヨウ化イソプロピル（和光純薬工業(株)製・特級試薬）
n-オクタン（東京化成工業(株)製）
α-キシレン（和光純薬工業(株)製・特級試薬）

NMR法：

重水，99.9%（和光純薬工業(株)製・NMR用）
20%重塩酸，99.5%（和光純薬工業(株)製・NMR用）
3-（Trimethylsilyl）-1-propane sulfonic acid, sodium salt
（以下TSPSA）97%（Aldrich製）

2. 2 装置及び分析条件

2. 2. 1 GC法

(1) ガスクロマトグラフ

装置：HP5890 SERIES II（HEWLETT PACKARD製）
カラム：HP-5 [長さ30m，内径0.32mm，膜厚0.25 μm]
（Agilent Technology製）
検出器：FID
注入口温度：320℃
検出器温度：320℃
オープン温度：40℃（8 min）→50℃/min→320℃（5 min）
(2) 加熱器
装置：リアクティサーモⅢ・スターラー付（Pierce Chemical Company製）
加熱温度：150℃
反応瓶：リアクティブバイアル（GL Science製）
攪拌子：マグネティックスターラー攪拌子（GL Science製）

2. 2. 2 NMR法

装置：MERCURY-300（VARIAN製）
観測核：¹H 1次元
待ち時間：30sec
積算回数：1024回

2. 2. 3 ブラベンダービスコグラフィー

装置：ビスコグラフ PT-100（ブラベンダー製）
測定方式：ピン型
測定温度条件：15℃→1.5℃/min→95℃（10min）→
-1.5℃/min→50℃（30min）

2. 3 実験方法

2. 3. 1 水分測定

試料約1gを精秤し，105℃で4時間，常圧乾燥した。

2. 3. 2 GC法

ヒドロキシプロピルスターチ（医薬品添加物規格）の定量法を準用した。ただし，内標準溶液，標準溶液及び反応操作手順は，次のとおりとした。

(1) 内標準原液の作成

n-オクタンを5%（w/v）溶液になるようにメスフラスコに取り，重量測定後，α-キシレンに溶かし，これを内標準原液とした。

(2) 試料用内標準溶液の作成

内標準原液をα-キシレンで10倍に希釈し，0.5%（w/v）溶液を調製し，これを試料用内標準溶液とした。

(3) 標準ヨウ化イソプロピル原液の作成

ヨウ化イソプロピル約0.1mlをメスピペットで50ml容メスフラスコに加え，加えたヨウ化イソプロピルの重量を測定後，α-キシレンを加え，定容した。これを標準ヨウ化イソプロピル原液とした。

(4) 検量線用標準溶液の作成

標準ヨウ化イソプロピル原液1.0，5.0及び10.0mlを20ml容メスフラスコ3本にホールピペットでそれぞれ正確に量り取った。さらに，内標準原液をそれぞれホールピペットで正確に2.0ml加えた後（final 0.5%（w/v）），α-キシレンを加え，定容した。これを検量線用標準溶液とした。なお，ヒドロキシプロパンの量が多いものを測定する際には，測定するヒドロキシプロパン量に応じた濃度の検量線用標準溶液を調製した。

(5) 反応操作手順

リアクティブバイアルに試料約60mgを正確に量り取り，アジピン酸80mg，攪拌子，試料用内標準溶液1.0ml，ヨウ化水素酸2.0mlを加え，密栓し，更にテープでシールした。バイアルを30秒間振り混ぜた後，60分間スターラーで攪拌しながら，150℃で反応させた。加熱後，流水で室温程度に冷却し，上層をGCバイアルに移し，GCで測定した。

検量線作成用には，リアクティブバイアルに検量線用標準溶液各10ml及び，アジピン酸80mg，攪拌子，ヨウ化水素酸2.0mlをそれぞれ加え，密栓し，後の操作は試料と同様の操作を行った。

(6) ヒドロキシプロピル基含有量の算出方法

試料中のヒドロキシプロピル基の含有量は，以下の式を用いて算出した。

$$HP = WR_{IIP/ISTD} \times W_{ISTD}/W_S / (100 - Mo_S) \times 100 \times 59/169 \times 100$$

HP ：試料中のヒドロキシプロピル基含有量（%（w/w））

WR_{IIP/ISTD} ：ヨウ化イソプロピルの内標準に対する重量比

W_{ISTD} ：内標準重量(mg)

W_S ：試料重量（mg）

Mo_S ：試料の水分割合（%）

59 ：ヒドロキシプロピル基の分子量

169 ：ヨウ化イソプロピルの分子量

(7) HPSのモル置換度算出方法

アセチル化でん粉の場合，アセチル基の置換の度合はDs

(Degree of substitution) として表わし、無水グルコース残基 1 分子あたりのアセチル基の平均置換分子数を意味する。HPS の場合、ヒドロキシプロピル基がグルコース残基だけでなく、既にグルコース残基に結合しているヒドロキシプロピル基にさらに結合している場合があるため、Ds の代わりに Ms (Molar substitution; モル置換度) として表わした^{3), 4)}。Ms は、無水グルコース残基 1 分子あたりに存在するヒドロキシプロピル基の平均分子数を意味する。

$$Ms = HP / (100 - HP) \times 162 / 59$$

HP : ヒドロキシプロピル基 (% (w/w))

Ms : モル置換度

59 : ヒドロキシプロピル基の分子量

162 : 無水グルコース残基の分子量

2. 3. 3 NMR法

国際標準化機構 (ISO) で検討されている定量法⁵⁾ を準用した。ただし、内標準溶液及び反応操作手順は、次のとおりとした。

(1) 内標準溶液の作成

TSPSA 約 6 mg を正確に量り取り、重水約 0.7 ml を加え、重水の重量も精秤した。これを内標準溶液とした。

(2) 反応操作手順

NMR 用試料管に試料約 12 mg を正確に量り取り、マイクロピペットで重水 0.7 ml 及び 2N 重塩酸 0.1 ml を加え、密栓した。混合後、熱湯浴中で溶液が透明になるまで加熱した (約 5-10 分間)。放冷後、内標準溶液 0.05 ml をマイクロピペットで NMR 用試料管に加え、加えた内標準溶液の重量を正確に量った。密栓後、混合して NMR で測定した。加えた 2N 重塩酸は、試薬 20% 重塩酸を重水で希釈して調製したものを用いた。

(3) ヒドロキシプロピル基含有量の算出方法

試料中のヒドロキシプロピル基の含有量は、以下の式を用いて算出した。

$$HP = 3A_S / A_{ISTD} \times W_{TSPSA/D_2O} \times W_{ISTD} / W_S / (100 - Mo_S) \times 100 \times 59 / 218 \times 100$$

HP : 試料中のヒドロキシプロピル基含有量 (% (w/w))

A_S : 試料のメチルプロトンの積分値

A_{ISTD} : 内標準のメチルプロトンの積分値

W_{TSPSA/D₂O} : 内標準溶液濃度 (mg/mg)

W_{ISTD} : 加えた内標準溶液重量 (mg)

W_S : 試料重量 (mg)

Mo_S : 試料の水分割合 (%)

59 : ヒドロキシプロピル基の分子量

218 : TSPSA の分子量

(4) HPS のモル置換度算出方法

HPS の Ms 算出方法は、GC 法で用いた算出式を使用した。

2. 3. 4 ブラベンダービスコグラフィー

未変性のタピオカでん粉及びそのでん粉を原料として合成したモル置換度の異なる数種類の HPS について、ブラベンダービスコグラフによりアミログラムを測定した。

3. 結果及び考察

3. 1 GC法

3. 1. 1 ガスクロマトグラム

未変性でん粉及び Ms 0.022 の HPS についてヨウ化水素酸を反応させ、GC で測定したときのガスクロマトグラムを Fig. 1 に示す。

未変性でん粉について、内標準の n-オクタンを加えずに反応させたところ、ヨウ化イソプロピル及び n-オクタンのピークの位置に何も検出されなかった。

HPS のクロマトグラムについては、ヨウ化イソプロピルのピークが検出され、内標準物質の n-オクタンのピークとの分離は良好であった。

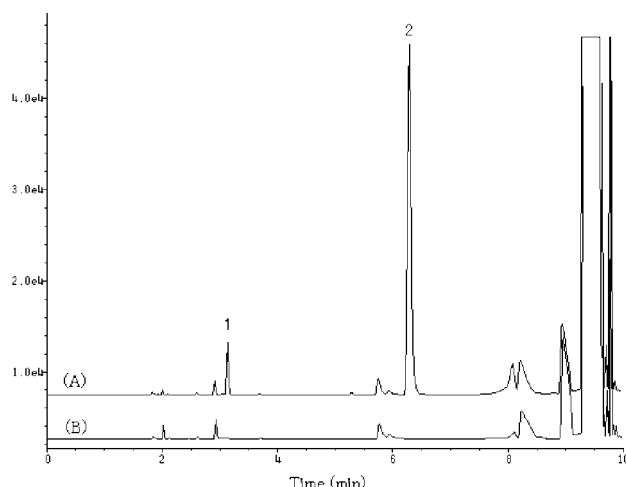


Fig. 1 Gas Chromatograms of Products

3. 1. 2 検量線

n-オクタンを内標準とした、ヨウ化イソプロピルの検量線を Fig. 2 に示す。実際に分析依頼される試料は、Ms 0.005-0.03 の範囲のものが多く、その範囲を含む検量線は、原点付近を通り、相関係数 0.999 の良好な直線性を示した。

また、Ms 0.004-0.1 に相当する濃度領域でも検量線を作成したところ、相対重量比 0.2-5.1 の範囲で原点付近を通り、相関係数 0.999 の良好な直線性を示した。

3. 1. 3 Ms 測定と繰返し精度

Ms 0.022 の HPS を反応させ、算出したヒドロキシプロピル基量及び Ms の値を Table 1 に示す。測定を 6 回行った結果、Ms の

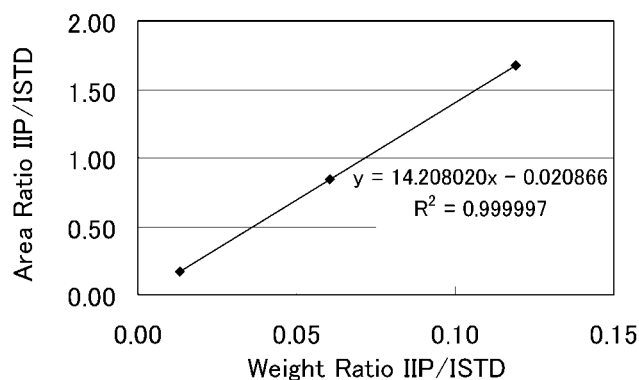


Fig. 2 Calibration Curve of 2-Iodopropane

平均値は0.021であり、変動係数は2.33%と良好な繰返し精度を示した。

3. 1. 4 輸入試料の測定

輸入品の米粉調製品 (A, B) 2 検体及びそれぞれの原料 HPS (A, B) について GC で測定した結果、いずれの試料からもヨウ化イソプロピルを検出でき、米粉調製品中の HPS の置換の確認が可能であった。

原料 HPS (A, B) の Ms は、それぞれ 0.016 及び 0.070 であった。

3. 2 NMR 法

3. 2. 1 NMR スペクトル

未変性でん粉及び HPS (Ms 0.022) を各々重塩酸で加水分解し、基準物質及び内標準物質として TSPSA を加えて測定したものの ^1H NMR スペクトルを Fig. 3 に示す。

HPS のスペクトルにおいて、重塩酸による加水分解によって生成したジヒドロキシプロパンのメチルプロトンのシグナルが、ダブレットとして 1.2 ppm 付近に検出された。

一方、未変性でん粉の ^1H NMR スペクトルでは、1.2 ppm 付近に何のシグナルも検出されなかった。

3. 2. 2 Ms 測定と繰返し精度

Ms 0.022 の HPS を測定し、算出したヒドロキシプロピル基量及び Ms の値を Table 2 に示す。測定を 5 回行った結果、Ms の平均値は 0.020 であり、変動係数は 3.90% と良好な繰返し精度を示した。

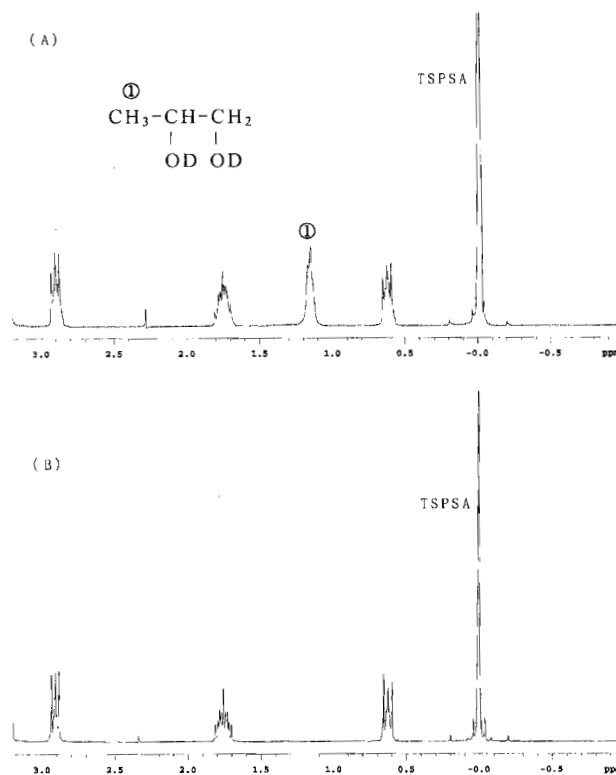
3. 2. 3 輸入試料の測定

米粉調製品 (A, B) 2 検体、それぞれの原料 HPS (A, B) 及び原料米粉 (A, B) を重塩酸で反応させ、NMR で測定した。このうち、検体 A についての米粉調製品、原料 HPS 及び原料米粉の ^1H NMR スペクトルを Fig. 4 に示す。

原料 HPS だけでなく、米粉調製品についても、微量ながらもはっきりとしたメチルプロトンのシグナルがみられ、米粉調製品でも HPS の置換の確認が可能だった。しかし、米粉の成分の一つと思われるシグナルが、メチルプロトンのシグナルに重なって検出された。また、NMR 用試料管内の試料溶液が均一で

Table 1 Hydroxypropyl Content and Molar Substitution in HPS by GC

HPS	Hydroxypropyl Group (%(w/w))	Molar Substitution
No.1	0.722	0.0200
No.2	0.718	0.0199
No.3	0.745	0.0206
No.4	0.749	0.0207
No.5	0.769	0.0213
No.6	0.739	0.0204
Mean		0.0205
Standard Deviation		0.0005
Coefficient of Variation(%)		2.3311

Fig. 3 ^1H NMR Spectra of Products

ないため、正確な積分値が得られないことがわかった。これらのことは、検体 B についても同様の挙動を示した。

原料 HPS の Ms は、検体 A の値が 0.016 となり、GC 法での値とほぼ一致したが、検体 B の値は 0.084 となり、GC 法での値より高い値になった。

3. 3 ブラベンダービスコグラフィー

未変性でん粉及び Ms 0.09, 0.14 及び 0.17 の HPS をそれぞれ 6 % (乾燥状態) 懸濁液に調製し、ブラベンダービスコグラフで測定したアミログラムを Fig. 5 に示す。HPS の Ms の値が高く

Table 2 Hydroxypropyl content and Molar substitution in HPS by NMR

HPS	Hydroxypropyl Group (%(w/w))	Molar Substitution
No.1	0.751	0.0208
No.2	0.711	0.0197
No.3	0.712	0.0197
No.4	0.785	0.0217
No.5	0.720	0.0199
Mean		0.0203
Standard Deviation		0.0008
Coefficient of Variation(%)		3.904

なるに従い、糊化開始温度（立ち上がり温度）が低下し、最大粘度が高くなった。

また、未変性でん粉及びMsの異なるHPS7種類について、Msを変化させたときの糊化開始温度の変化をFig.6に示す。HPSのMsと糊化開始温度の関係には相関性があることがわかった。試料懸濁液濃度を15%に上げ、反応感度をあげて測定すると、さらに直線性が良好になった。なお、糊化開始温度は、アミロ20BU時の温度を測定した。BUとは、Brabender Unitを意味する。

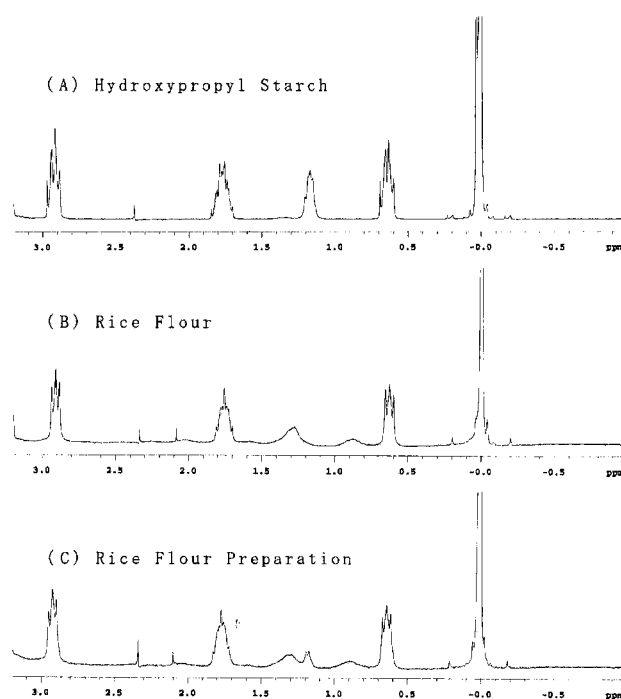


Fig. 4 ^1H NMR Spectra of Products

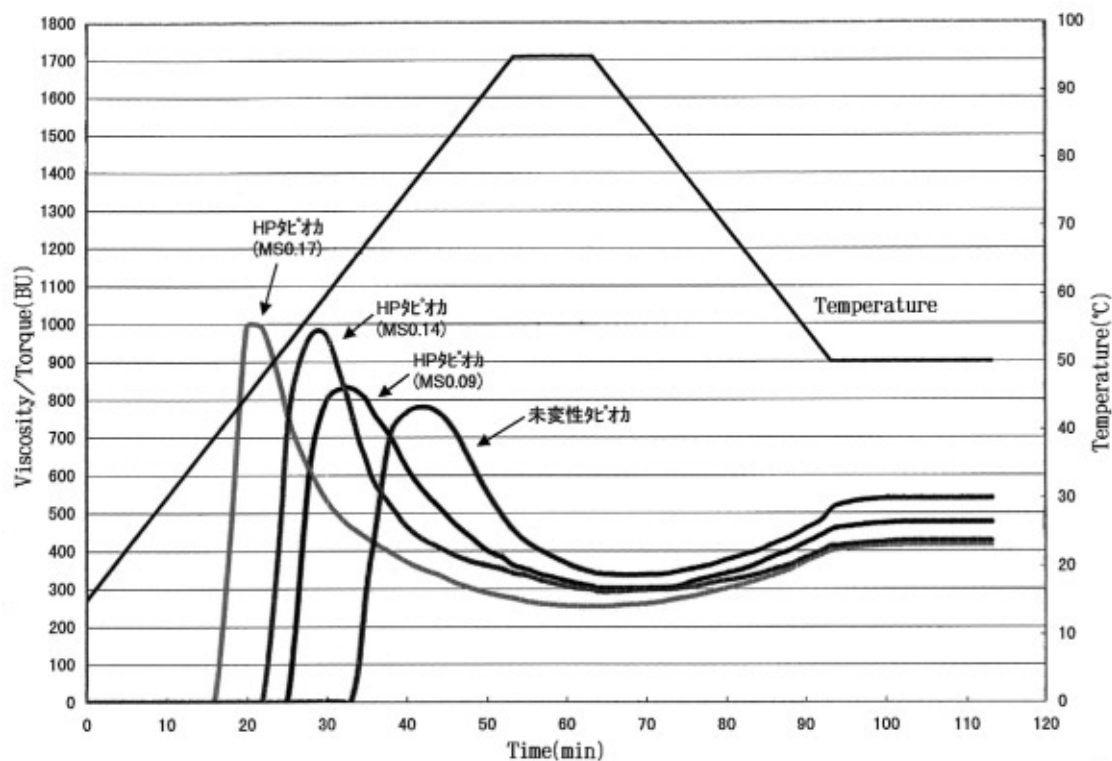


Fig. 5 Amylogram of raw starch and HPS

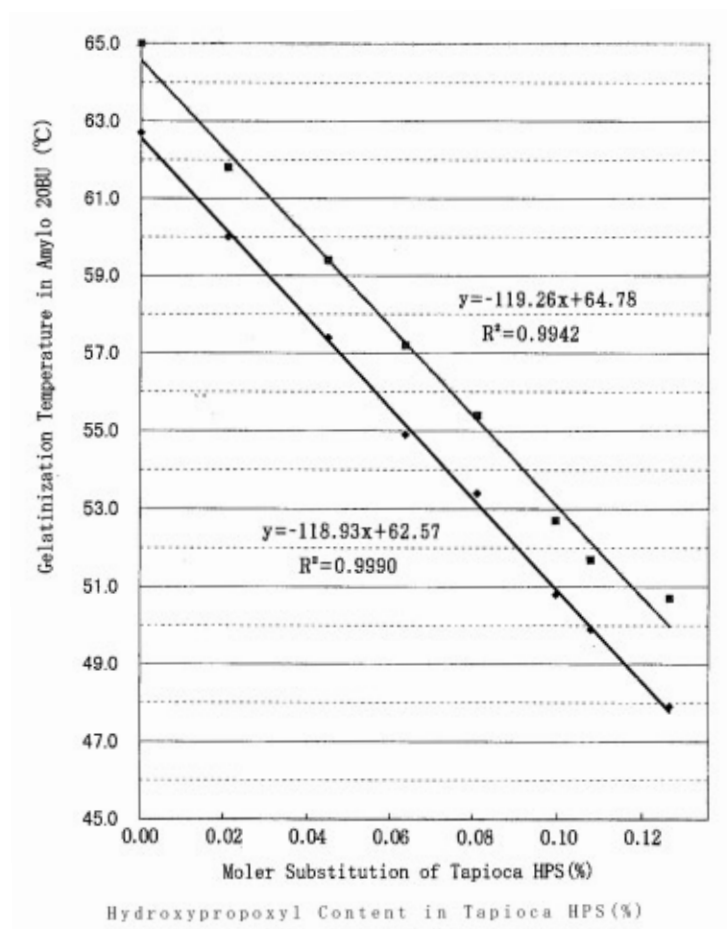


Fig. 6 Effect of Molar Substitution in Tapioca Hydroxypropyl Starch on Gelatinization Temperature

4. 要 約

今回検討した方法では、HPSのモル置換度の測定が可能で、置換度の低いHPSについても、その誘導体化の有無が確認できた。また、HPSを含有する米粉調製品からも、ヨウ化イソプロピルが検出できた。HPSのモル置換度の測定は、Ms0.006付近まで可能であった。

ブラベンダービスコグラフィーにより、HPSのモル置換度が高くなるほど、糊化開始温度が下がり、モル置換度と糊化開始

温度の関係には相関性がみられた。

(謝辞)

本実験にあたり、試料の提供とともに貴重なご助言を下さいました日澱化学株式会社遠藤靖夫氏に厚く感謝申し上げます。

なお、提供された試料に係るブラベンダービスコグラフの測定結果 (Fig.5及びFig.6) も遠藤氏によるものであり、ここに、深く謝意を表する。

文 献

- 1) 川端省三, 井上昭朗: 関税中央分析所報, 22, 55 (1981)
- 2) 医薬品添加物規格, 008205, 503 (1998)
- 3) Roy L. Whistler and E and James N. BeMiller: "Carbohydrate Chemistry for Food Scientists", p.83 (1997), (the American Association of Cereal Chemists, Inc., Minnesota)
- 4) O.B. Wurzburg, M.S.: "Modified Starches: Properties and Uses", p.82, (CRC Press, Inc., Florida)
- 5) Committee Draft, ISO/CD 11543 (1999)