

アセチル化でん粉の分析

梅田 寛*、水田 完*、原 幸美*、村上 孝之*、山崎 光廣*、印出 進*

Analysis of Starch Acetate

Hiroshi UMEDA*, Yutaka MIZUTA*, Yukimi HARA*, Takayuki MURAKAMI*, Mitsuhiro YAMAZAKI*
and Susumu INDE*

*Tokyo Customs Laboratory

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

Modified starches and non-modified starches are classified differently in the Tariff Schedule. According to domestic classification opinions, starch acetate with a degree of substitution (DS value) of 0.01 or more is treated as starch acetate, so the DS value needs to be measured accurately. This report examined the potentiometric titration method, the enzyme method and ion chromatography to determine the acetic acid generated when starch acetate was hydrolyzed, for obtaining the DS values of starch acetate. With each method, the DS value could be obtained objectively. The titration method showed poor repeatability when the samples were low in DS value, and in the case of a sample having a DS value of 0.003, the relative standard deviation was 6.7%. As hydrolysis conditions in the enzyme method, adding 5 ml of 2N sodium hydroxide solution and heat treatment were found to be adequate. As hydrolysis conditions in ion chromatography, adding 5 ml of 0.5N sodium hydroxide solution and non-heat treatment were found to be adequate. The enzyme method and ion chromatography showed good repeatability, and in the case of a sample having a DS value of 0.003, the relative standard deviations were respectively 1.9% and 4.1%.

1. 緒 言

でん粉は、その物理的、化学的特性により食用から接着剤まで幅広く利用されている。その中に、でん粉の有する機能をさらに向上させるために、加工を施した変性でん粉がある。アセチル化でん粉は、でん粉にアセチル基がエステル結合したエステル化でん粉で、変性でん粉の一種である。未変性のでん粉に比べると、耐老化性や透明性があるため、焼き鳥やみたらしだんごのたれ、冷凍麺の食感改良剤や安定化剤として用いられている。^{1) 2)}

でん粉は、変性の有無によって関税率表の分類が異なり、変性を受けていない未変性でん粉は第 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である。税表分類上は、ア

セチル化でん粉の置換度 (DS 値) が 0.01 以上のものをアセチル化でん粉として扱うため、DS 値の正確な測定が求められる。

現在、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」に定められた滴定法を用いている。しかし、滴定法は前処理及び滴定が煩雑であるため、滴定に高い技術を要する。また、DS 値の測定を中和滴定により行なっているため、アセチル化とオクテニルコハク酸エステル化といったように複数のエステル化による変性が共になされていると、正確なアセチル化の DS 値が得られない。

アセチル化でん粉の DS 値の測定については、関川ら³⁾、中山ら⁴⁾、Ogawa ら⁵⁾ が、赤外分光光度法を用いて測定を行なっているが、これらはエステル結合に起因するカルボニル基の吸収強度を利用しており、アセチル化以外のエステル化が同時になされていると DS 値を求めることができない。Rudolph ら⁶⁾ は核磁気共鳴測定法により DS 値を求めているが、滴定法によ

*東京税関業務部 〒135-8615 東京都江東区青海 2-56

る DS 値を求めた標準品が必要であり、測定値は絶対的なものではない。この事は赤外分光光度法も同様のことがいえる。また、国際標準化機構では、ISO11213⁷⁾ でアセチル化でん粉のアセチル基の定量法として酵素法を定めている。

本報では、はじめに客観的な滴定終点を求めるために、電位差の変化を用いる電位差滴定法を検討した。次に、アセチル基の加水分解によって生じる酢酸と特異的に反応する酵素を利用した酵素法による DS 値の測定を試みた。最後に、イオンクロマトグラフィーにより酢酸イオンの定量を行いアセチル化でん粉の DS 値を求め、これらの方法の比較検討を試みたので報告する。

2. 実 験

2. 1 試料及び試薬

2. 1. 1 試 料

タピオカでん粉：日澱化学提供

アセチル化タピオカでん粉：日澱化学製；DS 値の異なるものの 7 種類（日澱化学による DS 値は以下の通りである。

No.1= 0.0032, No.2= 0.0071, No.3= 0.0109, No.4= 0.0143, No.5= 0.0335, No.6= 0.0692, No.7= 0.0946)

2. 1. 2 試 薬

水酸化ナトリウム（和光純薬製）

0.2 N 塩酸（和光純薬製）

2 N 硫酸（和光純薬製）

酢酸測定用酵素キット（F-キット：ロシュ・ダイアグノスティックス製）

酢酸（和光純薬製）

2. 2 装置及び分析条件

(1) 電位差滴定装置

装置：AT-420 に電動ビュレット APB-410 及び多検体チェンジャ CHA-500 を付属させたもの（京都電子製）

ガラス電極：H-152（京都電子製）

セラミックス比較電極：R-116（京都電子製）

(2) 紫外可視分光光度計

装置：UA-160A（島津製作所製）

(3) イオンクロマトグラフ

装置：MIC-33（Metrohm 製）

陰イオン分離カラム：Shodex IC SI-90 4E（内径 4.0mm × 長さ 250mm）

移動相：1.8 mM Na₂CO₃/1.7mM NaHCO₃

流量：1.2 ml/min

カラム温度：35℃

検出器：電気伝導度計

注入量：20 μl

2. 3 実験方法

2. 3. 1 水分測定

試料約 1 g を精秤し、105℃で 4 時間、常圧乾燥させた

2. 3. 2 電位差滴定法

滴定操作までの前処理を税関分析法 No.403 の方法により行

い、滴定の終点を電位差滴定装置を用いて求めた。

2. 3. 3 酵素法

サンプル約 0.3–2.0g を 100ml すり付き三角フラスコに精秤し、水 50ml を加えよく攪拌した後、2 N 水酸化ナトリウム溶液 5 ml を加えた。還流冷却管をつけて、沸騰湯浴中で 30 分間加熱し、アセチル基を加水分解した。放冷後、2N 硫酸で pH を 6–7 に中和した後、適当な濃度になるように希釈し、これを試料液とした。酢酸定量用 F-キットを用いて反応させ、吸光度から酢酸を定量し、DS 値を求めた。

2. 3. 4 イオンクロマトグラフィー

サンプル約 0.2–1.0g を 100 ml すり付き三角フラスコに精秤し、水 50ml を加え、よく攪拌した後、0.5 N 水酸化ナトリウム溶液 5 ml を加えた。室温にて 30 分間振とうさせた後、適当な濃度になるように希釈して遠心分離操作を行い、0.45 μm のフィルターを通したものを試料液とした。イオンクロマトグラフを用いて酢酸イオンを定量し、DS 値を求めた。

3. 結果及び考察

3. 1 電位差滴定法

DS 値の異なる 7 種類のアセチル化でん粉 No. 1–7 について、電位差滴定法により得られた DS 値の平均値と相対標準偏差（n=5）を Table 1 に示す。繰り返し精度の良さを示す相対標準偏差は、DS 値が低くなるほど大きくなる傾向があった。これは、滴定量のばらつきがほぼ一定で、DS 値が低くなるほどブランク試料との滴定量の差が小さくなり、相対的なばらつきが大きくなるためである。

Table 1 DS values determined by potentiometric titration method.

Sample No.	Potentiometric method	
	DS	R.S.D. /%
1	0.00253	6.69
2	0.00732	5.02
3	0.0120	8.18
4	0.0159	6.78
5	0.0347	1.78
6	0.0689	0.668
7	0.0940	0.702

(n=5)

R.S.D. = Relative Standard Deviation

3. 2 酵素法

3. 2. 1 加水分解条件の検討

加水分解条件について、加える水酸化ナトリウム溶液の濃度と加熱の有無について検討を行なった。0.5g のアセチル化でん粉 No. 7 について、濃度の異なる水酸化ナトリウム溶液 5 ml をそれぞれ加え、沸騰湯浴中で 30 分間加水分解した場合の DS 値の変化を Fig. 1 に示す。水酸化ナトリウム溶液の濃度が 0.1–2N の範囲では、DS 値に大きな変化は見られなかった。DS 値が 0.09 程度では 0.1N でも加水分解できるが、DS 値が大きい試料

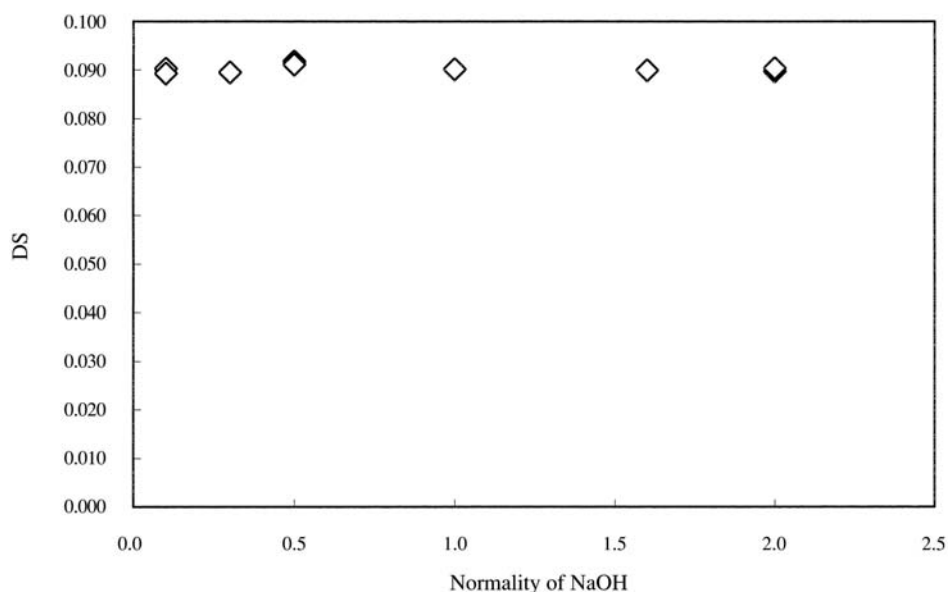


Fig. 1 Variations in normality of NaOH with DS value by the enzyme method.

の場合には 0.1N では不十分であることが想定され、また、水酸化ナトリウム溶液の濃度が低い場合には、加えた時点では糊化せず、加熱すると一部のみが糊化してしまう試料もあったため、2N が好ましいと判断した。

アセチル化でん粉 No. 2, 7 について、2 N 水酸化ナトリウム溶液 5 ml を加えた後、還流冷却管をつけて、沸騰湯浴中で 30 分間加熱した場合と、室温で 30 分間振とうさせた場合の DS 値を Table 2 に示す。アセチル化でん粉 No. 7 では加熱、非加熱の試料で DS 値はほぼ同様となったものの、アセチル化でん粉 No. 2 では加熱の有無で値が異なっている。これは、No. 2 は DS 値が小さく、サンプル採取量を約 2 g としたため、振とうしただけでは、糊化したでん粉の粘性が高く、三角フラスコからメスフラスコに全量を移すことができなかったことが原因であると考えられる。Table 2 中で No. 2 の非加熱試料は、糊化現象により三角フラスコに移すことができないものがあり、3 試料中 1 つしか測定できなかった。一方、加熱した場合には、加熱により粘性が低下するブレイクダウン現象のため、全量をフラスコに移すことができた。No. 7 は採取量が約 0.25 g であり、加熱、非加熱試料とも糊化したでん粉の粘性が低いため、いずれも良好な結果が得られたと考えられる。以上のことから、サンプル採取量が少ない場合には、振とうするだけでも定量可能であるが、

サンプル採取量が多い場合には、加熱しないと良好な結果が得られないことが分かったため、本実験では加熱処理することとした。

3. 2. 2 酢酸添加回収実験

アセチル化でん粉に対して加水分解操作を行った時の F-キットの酢酸定量値に対する影響を確認するために、水酸化ナトリウム溶液 5 ml を加え、加熱処理した未変性でん粉及びアセチル化でん粉に標準酢酸溶液を加え測定を行なう添加回収実験を行った。その結果を Table 3 に示す。回収率はほぼ 100% と良好な値を示した。このことより、でん粉が測定値に与える影響はないと判断できる。

3. 2. 3 検量線

酢酸標準溶液を用いて作成した検量線を Fig. 2 に示す。F-キットでは試料溶液量を 0.1–2 ml の範囲で設定でき、Fig. 2 は溶液量を 2 ml とした時のものである。48mg/l では濃度が濃すぎて直線関係から外れてしまったが、0.24~36mg/l の間で良好な直線性 ($r^2 = 0.999$) を得ることができた。

3. 2. 4 アセチル化でん粉の測定

DS 値の異なる 7 種類のアセチル化でん粉 No. 1–7 について、酵素法により得られた DS 値の平均値及び相対標準偏差 ($n=5$) を Table 4 に示す。酵素法でも、DS 値を求めることができ、相

Table 2 Effects of heat and non-heat treatment on the DS values determined by the enzyme method.

Sample No.	non-heat		heat	
	DS	R.S.D. /%	DS	R.S.D. /%
2	0.0036	—	0.0062	(2.3)
7	0.0642	(5.2)	0.0637	(6.2)

(n=3)

Table 3 Recovery test of samples by the enzyme method.

Sample No.	Recovery / % R.S.D. / %	
Tapioka Starch	100.6	0.7
Starch Acetate No.3	101.8	0.6
Starch Acetate No.7	99.3	0.4

(n=3)

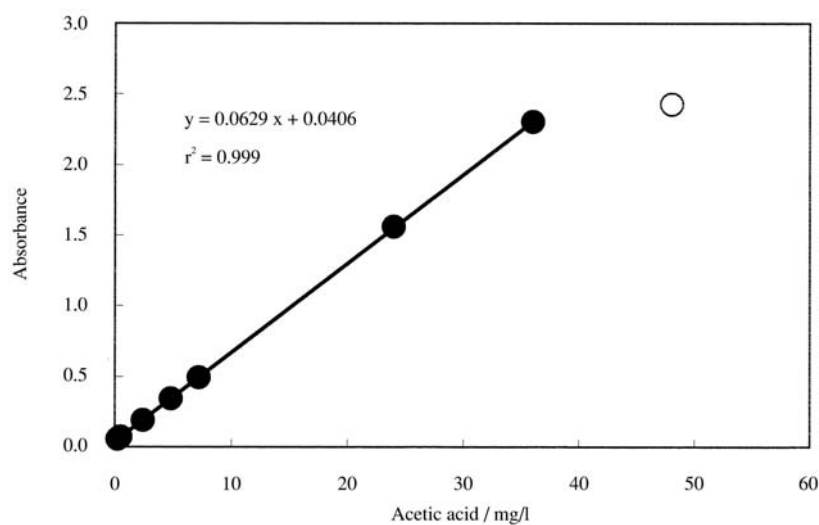


Fig. 2 Calibration curve obtained from absorbance by the enzyme method for acetic acid.

対標準偏差は 0.8–4 %程度と良い繰り返し精度が得られた。

3. 3 イオンクロマトグラフィー

3. 3. 1 検量線

アセチル化でん粉を加水分解して得られた試料溶液のイオンクロマトグラムを、Fig. 3 に示す。3 分過ぎのピークが酢酸イオンのピークである。このピーク面積を用いて、酢酸標準溶液から作成した検量線を Fig. 4 に示す。2.4–120mg/ l の間で良好な直線性 ($r^2 = 0.9992$) を得ることができた。

3. 3. 2 加水分解条件の検討

イオンクロマトグラフィーでは、測定前に試料液を $0.45 \mu\text{m}$ のフィルターでろ過するため、糊化した試料は適さない。0.6g のアセチル化でん粉 No. 3 について、加える水酸化ナトリウム溶液 5 ml の濃度を変え、室温で 30 分間振とうして、加水分解した場合の DS 値の変化を Fig. 5 に示す。0.2N 以上ではほぼ同様の

Table 4 DS values by the enzyme method.

Sample No.	DS	R.S.D. /%
1	0.00281	1.90
2	0.00671	2.14
3	0.0101	4.65
4	0.0125	1.87
5	0.0318	3.41
6	0.0647	1.98
7	0.0894	0.813

(n=5)

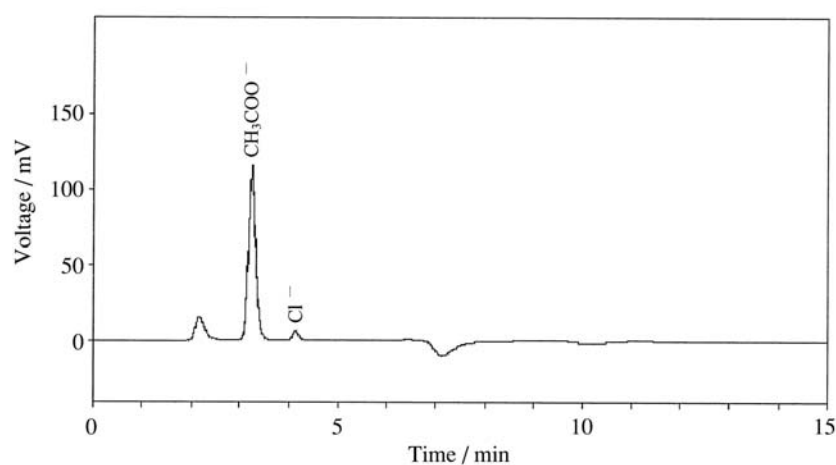


Fig. 3 Ion chromatogram of starch acetate after hydrolytic pretreatment.

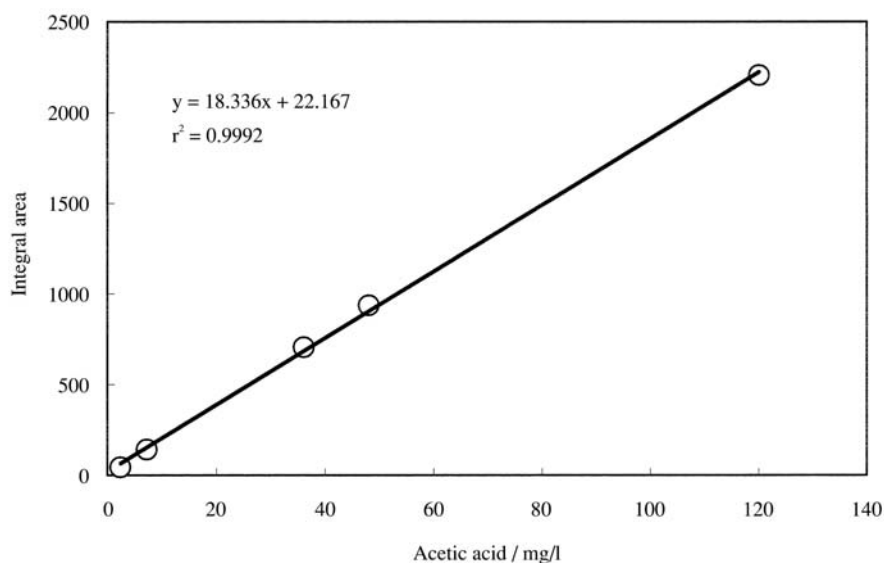


Fig. 4 Calibration curve obtained from integral area by ion chromatography for acetic acid.

値を示すが、1.0N ではでん粉が糊化してしまうため測定不可能であった。加える水酸化ナトリウム溶液の濃度は、でん粉懸濁液に 5 ml の水酸化ナトリウム溶液を加えた際に、糊化しない範囲で濃い濃度である 0.5N とした。また、加熱すると糊化してしまうため、加熱処理は行なわなかった。

3. 3. 3 アセチル化でん粉の測定

DS 値の異なる 7 種類のアセチル化でん粉 No. 1-7 について、イオンクロマトグラフィーにより得られた DS 値の平均値及び相対標準偏差 (n=5) を Table 5 に示す。イオンクロマトグラフィーでも、DS 値を求めることができ、相対標準偏差は 0.3-

4 %程度と良好な繰り返し精度が得られた。

3. 4 各方法の比較

各方法を比較したところ、測定した DS 値の平均値に大きな差がみられないが、測定値の繰り返し精度については、酵素法及びイオンクロマトグラフィーが優れている。電位差滴定法は、DS 値が低くなるにつれて、繰り返し精度が悪くなるのに対し、酵素法及びイオンクロマトグラフィーは、DS 値が 0.003 程度と低くても、それぞれ 1.9 %, 4.1%と良好な繰り返し精度を示した。また、酵素法及びイオンクロマトグラフィーは、酢酸のみを選択的に定量できることが特長である。

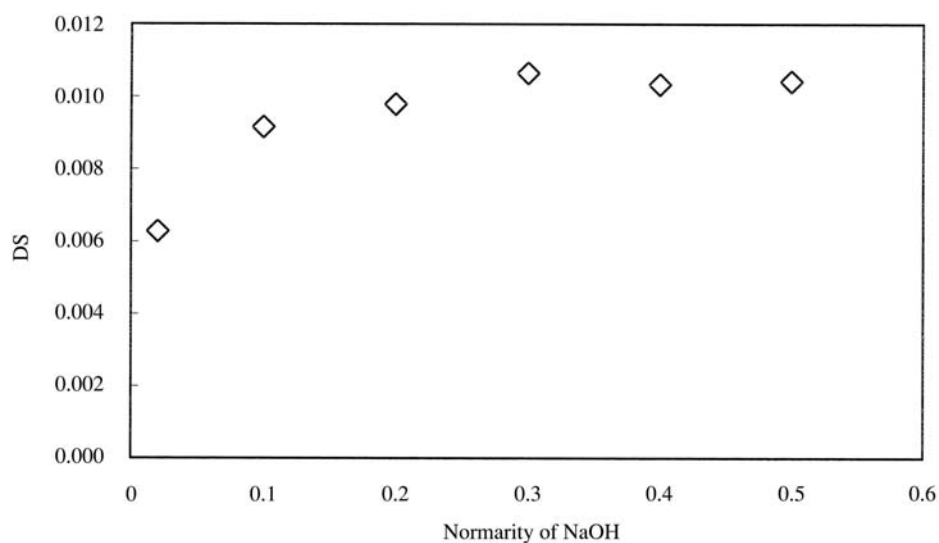


Fig. 5 Variations in normality of NaOH with DS value by ion chromatography

Table 5 DS values by ion chromatography.

Sample No.	DS	R.S.D. /%
1	0.002944	4.083
2	0.007135	1.222
3	0.01072	0.3041
4	0.01419	0.3388
5	0.03279	0.4438
6	0.06745	0.3340
7	0.09268	0.5377

(n=5) .

4. 要 約

アセチル化でん粉の DS 値を正確に求めることを目的とし、アセチル化でん粉を加水分解することによって生じた酢酸量を、滴定による電位差変化を利用する電位差滴定法、酢酸と特異的に反応する酵素を利用する酵素法、酢酸イオンを捉えるイオンクロマトグラフィーにより定量し、アセチル化でん粉の DS 値を求めた。いずれの方法でも客観的に DS 値を求めることができた。特に、酵素法とイオンクロマトグラフィーは、DS 値が低いものでも精度よく、選択的に測定できた。

(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くだ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。

文 献

- 1) 二國二郎監修，中村道徳，鈴木繁男編集：“澱粉科学ハンドブック”，(1980)，(朝倉書店)。
- 2) 高橋禮治：“でん粉製品の知識”，P.111 (2000)，(幸書房)。
- 3) 関川義明，嶋田勝：関税中央分析所報，22，55 (1981)。
- 4) 中山清貴，松本吉三郎：関税中央分析所報，42，49 (2002)。
- 5) Kazuo Ogawa, Ikuo Hirai, Choichiro Shimasaki, Toshiaki Yoshimura, Shin Ono, Seichi Rengakuji, Yuuko Nakamura and Isao Yamazaki, Bull. Chem. Soc. Jpn., 72, 2785 (1999) .
- 6) S. E. Rudolph and R. C. Glowwaky, J. Polym. Sci. ,16, 2129 (1978) .
- 7) ISO 11213 (1995)