

水酸化テトラメチルアンモニウム共存下での熱分解ガスクロマトグラフィーによるデンプン誘導体の識別分析および置換度の定量

倉嶋 直樹*, 石田 康行**, 大谷 肇**

Discrimination Analysis and Determination of Degrees of Substitution of Starch Derivatives by Pyrolysis-GC in the Presence of Tetramethylammonium Hydroxide

Naoki KURASHIMA*, Yasuyuki ISHIDA**, Hajime OHTANI**

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance

6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882 Japan

**Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Nagoya University

Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8603, Japan

Pyrolysis gas chromatography (Py-GC) in the presence of tetramethylammonium hydroxide (TMAH) was applied to carry out discrimination analysis and determination of degrees of substitution (D.S.) of starch derivatives rapidly and sensitively. Characteristic products derived from the substituents, namely, methyl acetate from acetylated starch and 1-methoxy-2-propanol and propylene glycol from hydroxypropylated starch, were clearly observed in their pyrograms. This result demonstrated that modified starches can be discriminated from ordinary starch by characteristic products of substituents observed in their pyrograms. Moreover, a good linear relation was observed between the peak area normalized by the sample weight, for methyl acetate from acetylated starch and for propylene glycol from hydroxypropylated starch and the reference D.S. values determined by a conventional method. These results suggest that the D.S. values of substituted starch samples can be determined accurately by using such linear relations as calibration lines.

1. 緒 言

植物の最も重要な貯蔵栄養素であるデンプンは、D-グルコピラノースが α -1,4結合または α -1,6結合した多糖の一種である。デンプン中の1つのD-グルコピラノース単位には、通常3個の水酸基が存在するが、近年、デンプンの糊化温度、粘度および粘着性等の物理的性質を制御したり、耐老化性を向上したりするために、これらの水酸基の一部をエステル化やエーテル化した「デンプン誘導体」が、食品工業、繊維工業や製紙工業等の分野において広く用いられている。こうしたことから、我が国においては、2000年には30万トン以上のデンプン誘導体を海外から輸入している。日本に輸入されるデンプン誘導体の関税は、誘導体化されていない通常のデンプンの関税と大きく異なる。

従って、それらの適正な関税率を決定するために、デンプンとデンプン誘導体を正確に識別することが必要である。さらに、エステル化デンプンの一種であるアセチル化デンプンでは、置換度が0.01以上であればデンプン誘導体として低い関税率が適用されるのに対し、0.01未満の場合、デンプンとみなされ高い関税が課せられるため、単にそれらの識別を行うだけでなく置換度の正確な定量を行うことも必要となる。

一般に、デンプン誘導体の置換基の定性分析および置換度の定量分析は、滴定法、化学分解物の比色分析やガスクロマトグラフィー (GC)、あるいは赤外分光法やNMR等の分光学的手法などにより行われている。例えば、アセチル化デンプンの定性分析は、赤外スペクトル上で 1724 cm^{-1} に観測されるカルボニル伸縮振動の吸収の有無を確認したり、無水メタノール中でアセチル化デンプンとナトリウムメトキシド間のエステル交換反応

* 財務省関税中央分析所 〒277-0882 千葉県柏市柏の葉6-3-5

** 名古屋大学大学院工学研究科化学・生物工学専攻

〒464-8603 愛知県名古屋市千種区不老町

により生成した酢酸メチルをGCで確認する方法¹などにより一般に行われている。また、アセチル化デンプンの置換度の定量分析には、アセチル化デンプンをアルカリでケン化したときに消費されるアルカリの量を酸で逆滴定することにより定量する方法^{2,3}やアセチル化デンプンの塩酸分解および酵素処理などにより生成した還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)の吸光度を測定して定量する方法⁴などが公定法として用いられている。また、上述したGCによる定性分析においてクロマトグラム上に観測される酢酸メチルのピーク強度から、置換度の定量を行った例¹も報告されている。

一方、エーテル化デンプンの一種であるヒドロキシプロピル化デンプンの定性分析には、試料をヨウ化水素酸で分解することにより生成した置換基由来のヨウ化プロピルをGCで確認する方法⁵が一般に用いられる。また、置換度の定量分析には、試料の濃硫酸分解により生成した置換基由来のプロピレンアルデヒドをニンヒドリンで発色させ、その吸光度から定量する方法⁶が公定法として用いられている。その他にも塩酸中に溶解したり、酵素分解したりした試料を¹H-NMRにより測定し、ヒドロキシプロピル基中のメチルプロトンのシグナル強度から定量する方法^{7,8}が報告されている。しかしながら、いずれの方法も長時間を要する煩雑な前処理が必要であるという問題点がある。さらに、誘導体の種類ごとに一般に異なる分析法を適用する必要がある、試料によっては種々の分析手法を複合して用いる必要がある。したがって、デンプン誘導体の識別や置換基の定量を行う迅速・簡便かつ汎用性の高い実用分析法を開発することが望まれている。

こうした中で最近、有機アルカリの一種である水酸化テトラメチルアンモニウム(TMAH)共存下での熱分解ガスクロマトグラフィー(Py-GC)により、デンプンと分子構造が類似しているセルロースの水酸基の一部を有機酸でエステル化したセルロースエステルを分析した例⁹が報告されている。ここでは試料をTMAH共存下で熱分解することにより生じる、置換基を構成する有機酸成分のメチルエステルを手がかりとして、種々のセルロースエステルの識別を容易に行い得ることが報告されている。そこで本研究では、TMAH共存下でのPy-GCをいくつかのデンプン誘導体の分析に応用し、デンプンとデンプン誘導体の識別分析及び誘導体の置換度の定量分析を簡便かつ迅速に行う方法を確立することを目的とした。

2. 実験

2.1 試料

Table 1に本研究で使用したタピオカデンプンと2種類のタピオカデンプンの誘導体([A]と[B])の、分子構造および置換度(D.S.)をまとめて示す。ここで、D.S.は、D-グルコピラノース1単位あたりの置換基の平均数をいう。試料[A]は、従来のアルカリケン化法により決定したD.S.が0.010から0.076までのアセチル化デンプンである。一方、試料[B]は、比色法により決定したD.S.が0.023から0.114までのヒドロキシプロピル化デ

Table 1 Modified starches used in this study

[A] Acetylated starch

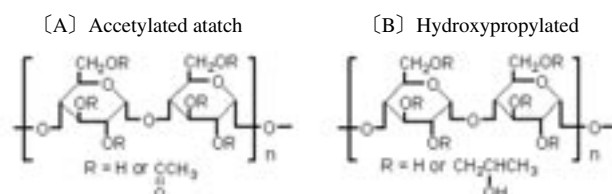
sample	A-1	A-2	A-3	A-4	A-5
D.S. ^a	0.010	0.012	0.018	0.065	0.076

^a D.S. were determined by alkali saponification method.

[B] Hydroxypropylated starch

sample	B-1	B-2	B-3
D.S. ^b	0.023	0.052	0.114

^b D.S.* were determined by the colorimetric method.



* : D.S. means the average number of substitutions in a D-glucopyranosyl unit.

ンプンである。これらの試料は、日本コーンスターチ(株)より提供されたものである。

2.2 反応Py-GC測定

反応Py-GC測定には、検出器に水素炎イオン化検出器(FID)を備えたガスクロマトグラフ(ヒューレットパッカード社製HP4890)に縦型の加熱炉型熱分解装置(ヤナコGP1018)を直結したシステムを使用した。まず、約200 μg の試料を白金製の試料カップに採取する。次に、水酸化テトラメチルアンモニウム(TMAH) 25%水溶液(多摩化学)を3 μl 添加した後、この試料カップをあらかじめ400 $^{\circ}\text{C}$ に保った熱分解装置へ落下導入し、Heキャリアーガス流中で瞬間的な反応熱分解を行う。分解生成物は、Heのキャリアーガス流(50ml/min)と共にスプリッターに移送され、キャピラリー分離カラムに対する適正流量(1ml/min)が分離カラム(Quadrex BTR-CW, 30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 1.0 μm)に導入される。分離カラムにより分離された各成分は、FIDにより検出されパイログラムが測定される。

3. 結果及び考察

3.1 アセチル化デンプン

Fig. 1に、デンプン(a)及びD.S.の異なる3種類のアセチル化デンプン[(b) A-1, (c) A-3, (d) A-5]を400 $^{\circ}\text{C}$ において反応Py-GC測定して得られたパイログラムを示す。(b)から(d)に示したアセチル化デンプンのパイログラム上には、保持時間8分付近にデンプンのパイログラム(a)には観測されない酢酸メチルの特徴的なピークがはっきり観測されている。ここで酢酸メチルは、側鎖中のエステル結合がTMAH的作用により選択的に加水分解されると同時にメチル化され生成した、置換基由来の熱分解生成物であると考えられ、このピークの出現を手がかりにしてデンプンとアセチル化デンプンの識別を簡便に行うことが可能となる。さらに、(b)から(d)のパイログラムを相互に比較すると、

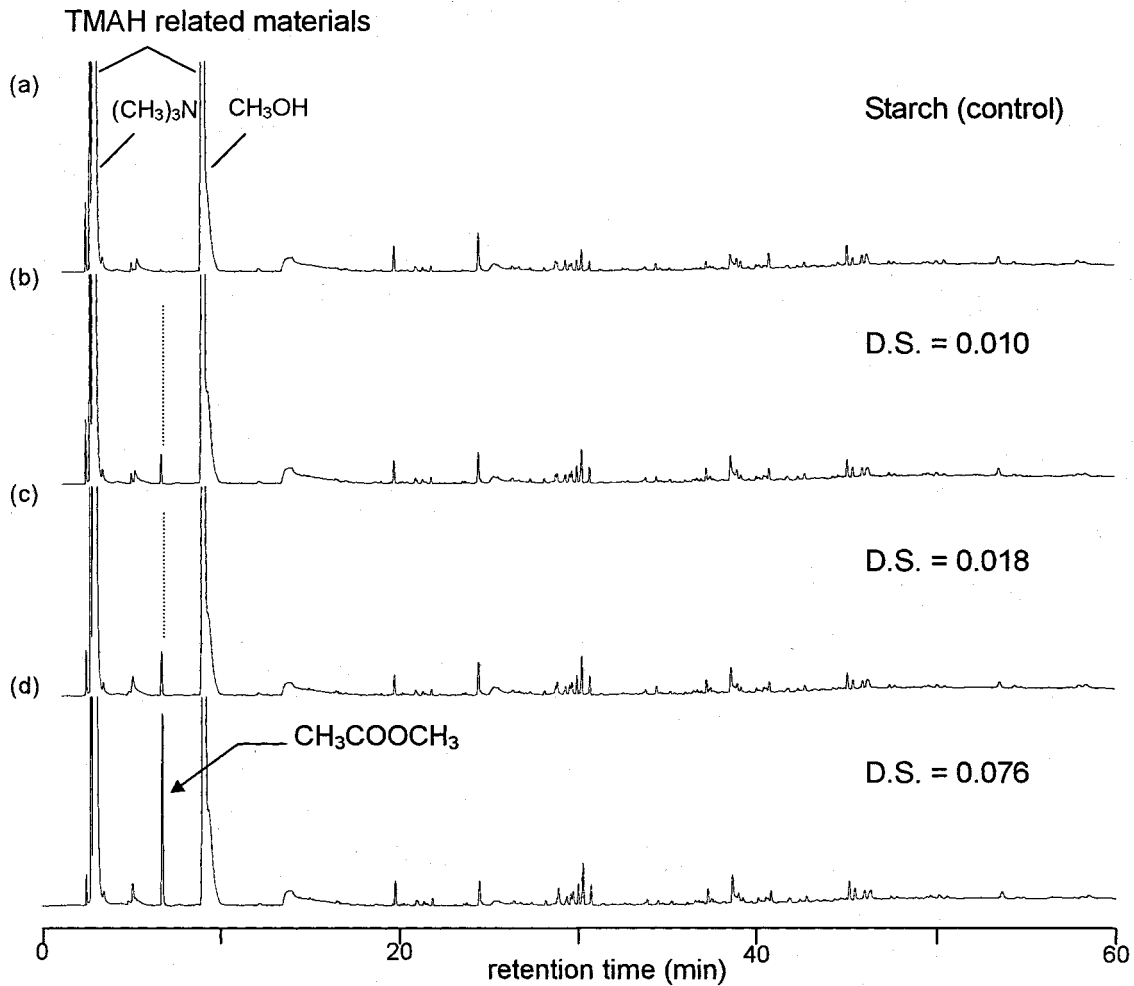


Fig. 1 Pyrograms of starch and acetylated starch in the presence of TMAH; (a) starch, (b) A-1, (c) A-3, (d) A-5.

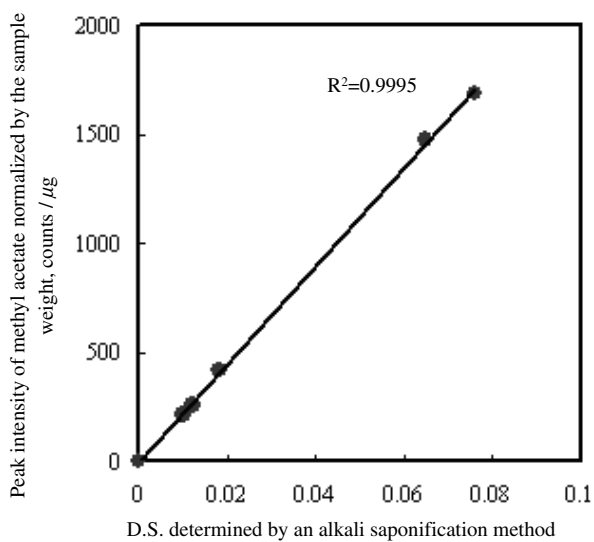


Fig. 2 Relationship between peak intensity of methyl acetate and D.S. determined by an alkali saponification method

酢酸メチルのピーク強度は、D.S.の値が大きくなるにつれて増加していることがわかる。そこで次に、酢酸メチルのピーク強

度を基に、各アセチル化デンプン試料のD.S.を定量することを試みた。

Fig.2に、D.S.の異なるアセチル化デンプン試料について得られた、アルカリケン化法により求めた置換度とパイログラム上に観測される単位試料量あたりの酢酸メチルのピーク強度との関係を示す。この図に示すように、両者の関係は相関係数で0.9995と非常に良い直線性を示しており、また、A-5試料の5回繰り返し測定によるピーク強度の再現性は、C.V.値で約2%と良好であったことから、この検量線を用いることにより置換度が未知のアセチル化デンプンの置換度を迅速、簡便かつ高精度に定量することが可能となる。

3. 2 ヒドロキシプロピル化デンプン

Fig.3に、デンプン(a)及びヒドロキシプロピル化デンプン[(b) B-1, (c) B-2, (d) B-3]を400℃において反応Py-GC測定して得られたパイログラムを示す。ヒドロキシプロピル化デンプンのパイログラム上には、前節で示したアセチル化デンプンの場合と同様に、デンプンのパイログラム(a)上には観測されない、ヒドロキシプロピル基に由来する1-メトキシ-2-プロパノール（ピーク

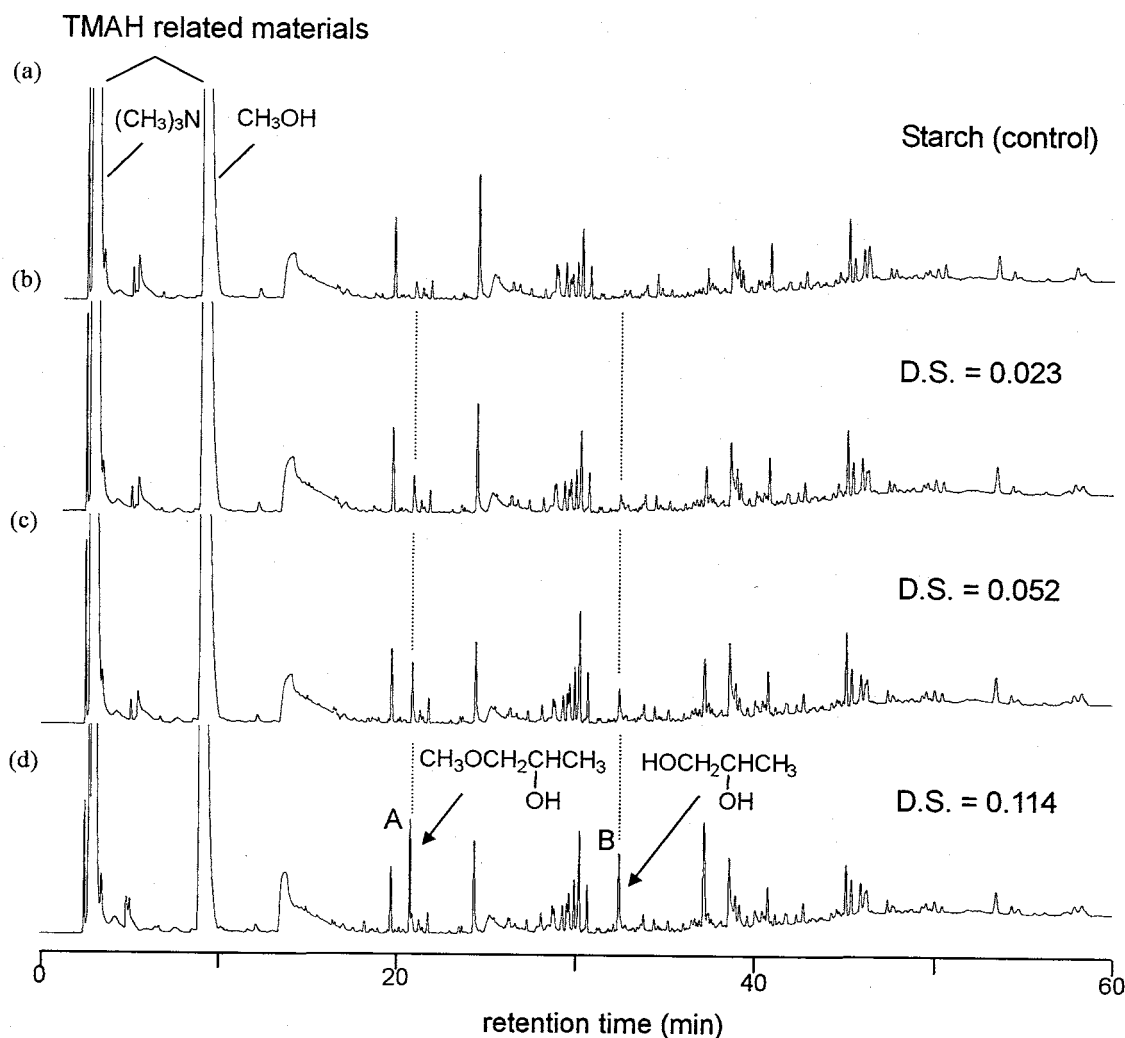


Fig. 3 Pyrograms of starch and hydroxypropylated starch in the presence of TMAH; (a) starch; (b) B-1; (c) B-2; (d) B-3.

A)とプロピレングリコール (ピークB)のピークが特徴的に観測されている。ここで、置換基由来の熱分解生成物として置換基のエーテル結合部分がメチル誘導体化された1-メトキシ-2-プロパノールだけでなく、当該部がメチル化されていないプロピレングリコールもかなりの強度で検出されている理由として、以下のことが考えられる。ヒドロキシプロピル化デンプンでは、置換基がエステル結合で結合しているアセチル化デンプンとは異なり、置換基がエーテル結合を介してD-グルコピラノース単位と結合している。そのため、TMAHによる置換基成分の加水分解的な反応熱分解は、アセチル化デンプンほどには進行せず、結果的に熱エネルギーによるエーテル結合の単純解裂が競合して起こり、これによってプロピレングリコールが生成しやすくなる。さらに、TMAHによるエーテル結合の加水分解が起きたとしても、ほぼ同時に進行するメチル誘導体化が不十分なため、1-メトキシ-2-プロパノールとプロピレングリコールの両者が置換基由来の成分として生成したと考えられる。それらのピークのうち、保持時間20.5分付近に現れる1-メトキシ-2-プロパノール

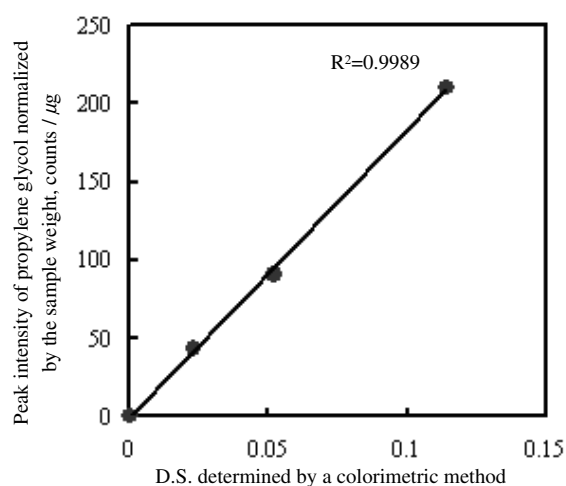


Fig. 4 Relationship between peak intensity of propylene glycol and D.S. determined by a colorimetric method

ル（ピークA）は、デンプンのパイログラム(a)との比較からわかるように、微量ではあるが、デンプン主鎖由来の熱分解生成物が、ほぼ同じ保持時間に溶出するため、ヒドロキシプロピル化デンプンの一義的な識別に用いることはできなかった。これに対し、保持時間32.0分付近に出現するプロピレングリコール（ピークB）はデンプン由来の生成物による妨害をほとんど見ないことから、このピークの出現を手がかりとしてヒドロキシプロピル化デンプンとデンプンとの識別が可能となるほか、そのピーク強度を基にして置換度の定量も行い得ることが予想される。

Fig.4に、ヒドロキシプロピル化デンプンの各試料について、比色分析法により求めた置換度とパイログラム上に観測される単位試料量あたりのプロピレングリコールのピーク強度との関係を示す。この図のように、両者の関係は相関係数で0.9989と良い直線性を示しており、また、B-3試料の5回繰り返し測定に

よるピーク強度の再現性は、C.V.値で約3%と良好であった。したがって、この検量線を用いることにより置換度が未知のヒドロキシプロピル化デンプンの置換度を迅速、簡便かつ高精度に定量することが可能となる。

4. 要 約

水酸化テトラメチルアンモニウム共存下でのPy-GCにより、従来法では煩雑な実験操作が不可欠であった、デンプン誘導体の定性分析や置換度の定量を、迅速かつ簡便に行うことができた。この手法は本研究で検討したアセチル化デンプン及びヒドロキシプロピル化デンプンだけでなく、様々なデンプン誘導体の識別分析及び置換度の定量分析に適用できると考えられる。

文 献

- 1) M. Wandel, H. Tengler, Gummi Abset Kunststoffe, **19**, 141 (1966)
- 2) R. L. Whistler, A. Jeans, *Ind. Eng. Chem.*, **15**, 317 (1943)
- 3) R. J. Smith, Starch; *Chemistry and Technology*, Academic Press, Vol. 2, 621 (1967)
- 4) ISO 11213:1995
- 5) K. L. Hodges, W. E. Kester, D. L. Widderrich, J.A. Grover, *Anal. Chem.*, **51**, 2172 (1979)
- 6) D. P. Johnson, *Anal. Chem.*, **41**, 859 (1969)
- 7) H. Stahl, R. P. McNaught, *Cereal Chem.*, **47**, 345 (1970)
- 8) A. Xut, P.A. Seib, *J. Cereal Sci.*, **25**, 17 (1997)
- 9) C. Scharzinger, I. Tanczos, H. Schmidt, *J. Anal. App. Pyrolysis*, **58-59**, 513 (2001)