

ハイアミロースコーンスターチ誘導体の分析法についての考察

山盛 愛子*, 片山 貴之*, 赤崎 哲也*, 朝長 洋祐*

A Study of Analytical Methods for High Amylose Corn starch Derivatives

Aiko YAMAMORI*, Takayuki KATAYAMA*, Tetsuya AKASAKI* and Hirosuke TOMONAGA*

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance

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

Since high amylose corn starch (HACS) is different from ordinary corn starch in certain properties, such as its high gelatinization point exceeding 100°C, traditional analytical methods such as viscography cannot be used for it. Recently, reaction pyrolysis gas chromatography/mass spectrometry (Py-GC/MS) in the presence of tetramethylammonium hydroxide (TMAH) and proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR) spectroscopy are used to qualitatively analyze starch derivatives. Under such circumstances, we synthesized three kinds of starch derivatives (acetylated starch, phosphorus monoesterified starch and carboxymethylated starch) and determined each of them by the above two methods. When the reaction Py-GC/MS method was used, methyl acetate and trimethyl phosphate, both of which were derived from substituents, were detected respectively in acetylated HACS and phosphorus monoesterified HACS in the same manner as in the case of starch derivatives made from ordinary corn starch. In the ¹H NMR spectra of acetylated starch and carboxymethylated starch, which were respectively made from HACS and ordinary corn starch, a specific signal for each kind of the derivatives was observed. Thus, the results produced by the two analytical methods showed no remarkable difference between HACS and ordinary corn starch for the same kinds of starch derivatives and raw starch. These results suggest that the reaction Py-GC/MS method and the ¹H NMR method are useful ways to check if HACS is acetylated, phosphorus monoesterified or carboxymethylated and that ordinary corn starch may be used in place of HACS as a standard sample.

1. 緒 言

でん粉及びその誘導体は、さまざまな原料から製造され、食品用、工業用などに幅広く利用されている。とうもろこしから製造されるコーンスターチの原料品種としては、主としてデントコーンが使用されるが、遺伝学を利用した育種改良によって得られたアミロメイズから製造されるハイアミロースコーンスターチ（以下、HACS と略記する。）は、他のでん粉に比べて難消化性でん粉、いわゆるレジスタントスターチ含量が高いなど、通常のでん粉とは異なる性状を持っている^{1), 2)}。

近年、この HACS を原料に湿熱処理を施すことによりさらにレジスタントスターチ含量を高くしたでん粉を利用した製品が製造されている。この湿熱処理でん粉は食物繊維含量が非常に高く、低カロリーであるため各種食品の食物繊維増強剤として使用することが従来のでん粉にはない特徴である。また、無味・無臭の白色微粉末で、加熱したとき非常に糊化しにくく、物性変化が生じない等の理由により食品の加工工程への制約がないので使用し

やすく、さらに、熱と水のみから作られ、化学的処理を行っていないので安全性の観点からも時代のニーズにあった製品である。シリアル食品、機能性食品などに利用されており、今後食品素材としての用途はますます広がるものと期待される²⁾。

関税率表上の分類において、でん粉誘導体であるか否かにより分類は異なり、両者の税率格差は大きいので、これらを判別することは重要である。でん粉誘導体の分析は、税関分析法 No.403 で定められている方法を用いて行っている。しかしながら、HACS は、100°C 以下ではほとんど糊化しないため³⁾、ビスコグラフィーによる分析が困難である。また、その他の定性試験が適用できるかについての知見もない。通常、でん粉誘導体の分析は原料とされるでん粉と比較して行っているが、HACS は試薬販売されていないため、HACS を使用して分析を行うことは困難である。

そこで、本研究では、HACS を原料として、アセチル化でん粉、モノでん粉りん酸エステル、カルボキシメチル化でん粉を合成し、水酸化テトラメチルアンモニウム（以下、TMAH と略記する。）共存下での熱分解ガスクロマトグラフィー⁴⁾及び核磁気共鳴スペクトルの測定⁵⁾を行い、通常のコーンスターチ誘導体と同様に、

* 財務省関税中央分析所 〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-5

これらの分析方法を用いることで誘導体か否かを判別することができるか検討した。さらに、HACS 誘導体と通常のコーンスターチとを比較することにより、HACS が誘導体か否かを判別することができるかを検討したので報告する。

2. 実 験

2. 1 試料及び試薬

2. 1. 1 試料

コーンスターチ：和光純薬工業製

HACS：J-オイルミルズ製

アセチル化でん粉、モノでん粉りん酸エステル、カルボキシメチル化でん粉：コーンスターチ、HACS より合成

2. 1. 2 試薬

無水酢酸、第一リン酸ナトリウム ($2\text{H}_2\text{O}$)、第二リン酸ナトリウム ($12\text{H}_2\text{O}$)、モノクロロ酢酸、水酸化ナトリウム

：和光純薬工業製

TMAH：東京化成工業製

2. 2 分析装置及び分析条件

熱分解ガスクロマトグラフィー質量分析計 (Py-GC/MS)

GC/MS：HP6890/5973 (HEWLETT PACKARD 製)

熱分解装置：PY-2010D (FRONTIER LAB 製)

分離カラム：Ultra Alloy⁺-1 (30m×0.25mm×0.25 μm)

分解温度：400℃

オープン温度：50℃(1or3min)→(10℃/min)→320℃(10min)

アセチル化でん粉：3min

モノでん粉りん酸エステル、カルボキシメチル化でん粉：1min

サンプル調製：サンプル約 200 μg+TMAH 25%
水溶液 3 μl

核磁気共鳴スペクトル (NMR)：JNM-ECA300 (日本電子製)

観測核：¹H

溶媒：重ジメチルスルホキシド、重水

アセチル化でん粉：重ジメチルスルホキシド

モノでん粉りん酸エステル、カルボキシメチル化でん粉：重水

測定温度：115℃ (重ジメチルスルホキシド)、
100℃ (重水)

2. 3 でん粉誘導体の合成

2. 3. 1 アセチル化でん粉の合成及び精製

500 ml のビーカーにでん粉 70 g を採取し、蒸留水 200 ml を加えてスラリーを調製した後、30℃の恒温槽中で 1 時間攪拌した。その後ビーカーを取り出し、スラリーに pH 電極を入れ、スターラーで攪拌しながら 0.45~1 N 水酸化ナトリウム溶液で pH 8.3 に保持して、アセチル化剤として無水酢酸 3.00 ml を徐々に添加して 30 分間反応を行った。反応中はスラリーの pH が低下していくので、pH 8.3 に保持し、反応を進行させた。反応終了後、スラリ

ーを希硫酸で pH 5.8 に調整し、多量の蒸留水で数回洗浄した後、風乾した。精製は、セルロース透析チューブ (ユニオンカーバイド社製、公称孔径サイズ：24 Å) に入れ、脱イオン交換水で 3 日間透析を行い、遊離の塩類を除去し、風乾した⁶⁾。

2. 3. 2 モノでん粉りん酸エステルの合成

第一リン酸ナトリウム ($2\text{H}_2\text{O}$) 32.22 g、第二リン酸ナトリウム ($12\text{H}_2\text{O}$) 56 g を水 60 ml に溶解、pH 6.4 に調整し、でん粉 50 g を分散させた。約 30 分間攪拌し、プフナー漏斗を用い、吸引ろ別し、60℃以下で乾燥、水分 10%以下にした。細かく砕いて、ロータリーエバポレーターを利用し、油浴上で 160℃、50~100 mmHg の減圧下で、2 時間、回転、反応を続けた。50%メタノールを用いて、未反応のリン酸塩を洗浄し、メタノールで水置換を行い、風乾した⁷⁾。

2. 3. 3 カルボキシメチル化でん粉の合成

三角フラスコにメタノール 100 ml を入れ、モノクロロ酢酸 15 g を溶解した。水 18 ml に水酸化ナトリウム 18 g を溶解し、攪拌しながら 30℃で徐々に添加した。50 g のでん粉を分散し、45℃、48 時間還流加熱した。室温に冷却し、氷酢酸で pH 6.5~7.0 に中和、吸引ろ別した。ろ過物を 60%メタノールで洗浄を繰り返し、メタノールで置換、乾燥した⁷⁾。

2. 4 アセチル基の置換度の測定

税関分析法 No.403 に記載の滴定法により測定した。

2. 5 りんの定量

税関分析法 No.403 に記載のアレン法により定量した。

2. 6 カルボキシメチル基の置換度の測定

合成したカルボキシメチルでん粉 0.7 g を精秤し、2 N 塩酸-70%メタノール溶液 25 ml に分散させ、60 分間振とうした。ガラス漏斗でろ過し、ろ液に硝酸銀溶液で塩素イオンが検出されなくなるまで、70%メタノール溶液で洗浄した。定量的にビーカーに移し、純水 300 ml に分散、沸騰水浴上で糊化、15 分間そのまま加熱を続けた。0.1 N 水酸化ナトリウム標準溶液で、フェノールフタレインを指示薬にして滴定した。別に原料のでん粉についてブランクをとり、次式により算出した⁷⁾。

$-\text{CH}_2\text{COONa} \%$ (dry base)

$= (\text{試料}-\text{ブランク}) \text{ 滴定値 ml} \times \text{NaOH 規定度} \times 0.081$
/ 試料重量 g (dry base) $\times 100$

置換度 $= 162\text{CM} / (8100 - 80\text{CM})$

(CM : カルボキシメチル基 % (dry base))

2. 7 でん粉誘導体の測定

合成した、HACS 誘導体及びコーンスターチ誘導体、未処理 HACS、未処理コーンスターチについて、それぞれ、反応 Py-GC/MS、NMR による測定を行った。なお、反応 Py-GC/MS におけるピークの同定は、各々のピークについてのマススペクトルと標準マススペクトルライブラリとを照合することにより行った。

3. 結果及び考察

3. 1 置換度、含有量の測定

HACS 及び通常のコーンスターチを原料として合成した、アセチル化でん粉及びカルボキシメチル化でん粉の置換度、及びモノでん粉りん酸エステルの結合りん含有量を Table 1 に示す。いずれの誘導体においても、原料でん粉の種類による大きな違いは見られなかった。

Table 1 D.S.* value or phosphorus content of modified starches used in this study

	[A]	[B]	[C]
corn starch	0.02	1.4%	0.2
HACS	0.02	1.3%	0.3

[A] : D.S. value of acetylated starch

[B] : phosphorus content of phosphorus monoesterified starch

[C] : D.S. value of carboxymethylated starch

* : D.S. = Degree of Substitution

3. 2 アセチル化でん粉

反応 Py-GC/MS 測定により得られたパイログラムを Fig.1 に示す。(a)及び(b)の HACS に関してのパイログラムを比較すると、アセチル化でん粉のパイログラム(a)では、保持時間 1.8 分付近に未処理でん粉のパイログラム(b)には観測されない酢酸メチルのピークが観測された。これは、(c)及び(d)のアセチル化コーンスターチと未処理のコーンスターチの場合と同様の結果を示している。この酢酸メチルは、側鎖中のエステル結合が TMAH の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る⁴⁾。また、アセチル化でん粉の(a)と(c)及び未処理でん粉の(b)と(d)のパイログラムをそれぞれ比較すると、アセチル化 HACS 及びアセチル化コーンスターチのいずれの場合においても、酢酸メチルのピークが保持時間 1.8 分付近に特異的に現れ、それ以外に大きな違いは見られない。このことより、(a)と(d)のパイログラムの比較、つまり、アセチル化 HACS と通常のコーンスターチとの比較によっても、酢酸メチルのピークを手がかりとして、HACS についてのアセチル化の有無の判別を行うことが可能であると考えられる。

¹H NMR スペクトルを測定した結果を Fig.2 に示す。(a)及び(b)の HACS に関してのスペクトルを比較すると、アセチル化でん粉のスペクトル(a)では、化学シフト値が 2~2.1 ppm 付近に、未処理でん粉のスペクトル(b)には観測されないシグナルが観測されており、(c)及び(d)のアセチル化コーンスターチと未処理のコーンスターチの場合と同様である。このシグナルは、一般的なアセチル基のメチルプロトンの化学シフト値と一致している⁸⁾。また、アセチル化でん粉の(a)と(c)及び未処理でん粉の(b)と(d)のスペクトルをそれぞれ比較すると、アセチル化でん粉ではどちらも化学シフト値が 2~2.1 ppm 付近にシグナルが現れるなど、いずれも測定結果に大きな違いは見られない。このことより、(a)と(d)のスペクトルの比較、つまりアセチル化 HACS と通常のコーンスターチとの比較によっても、このシグナルを手がかりとして、アセチル化の有無の判別を行うことが可能であると考えられる。

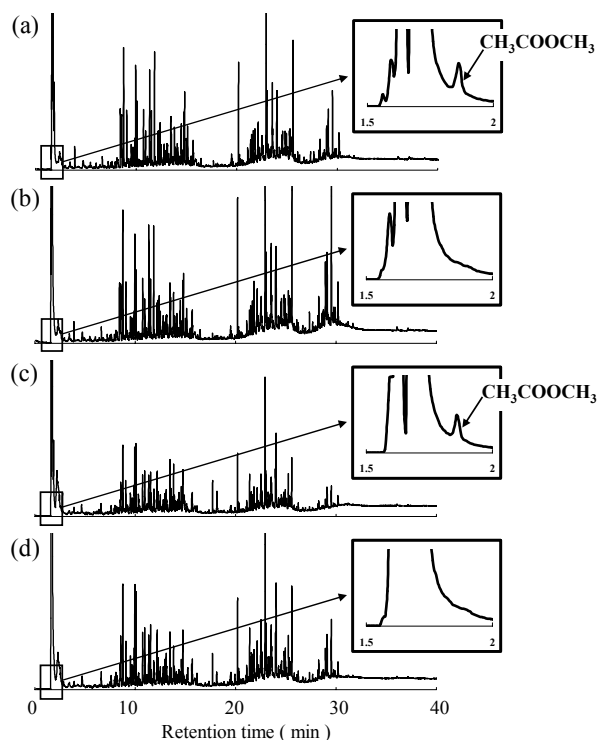


Fig.1 Pyrograms of non-modified starch and acetylated starch in the presence of TMAH

- (a) acetylated starch synthesized from HACS
- (b) raw HACS
- (c) acetylated starch synthesized from ordinary corn starch
- (d) raw ordinary corn starch

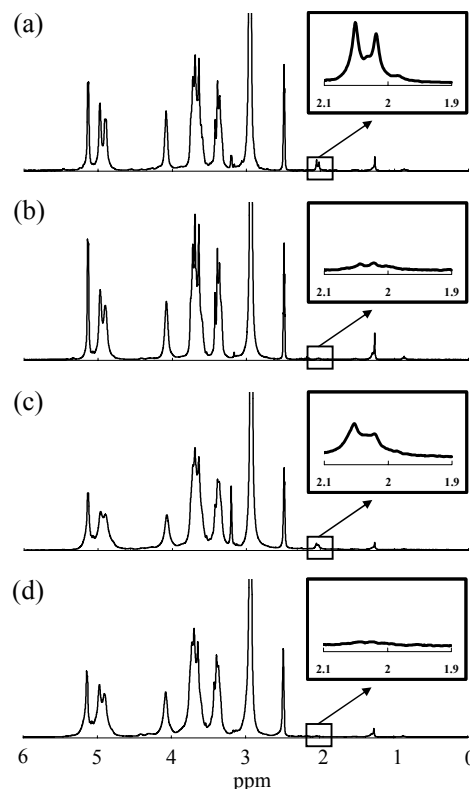


Fig.2 ¹H NMR spectra of non-modified starch and acetylated starch

- (a) acetylated starch synthesized from HACS
- (b) raw HACS
- (c) acetylated starch synthesized from ordinary corn starch
- (d) raw ordinary corn starch

3. 3 モノでん粉りん酸エステル

反応 Py-GC/MS 測定により得られたパイログラムを Fig.3 に示す。(a)及び(b)の HACS に関してのパイログラムを比較すると、モノでん粉りん酸エステルのパイログラム(a)では、保持時間 5.3 分付近に未処理でん粉のパイログラム(b)には観測されないりん酸トリメチルエステルのピークが観測された。これは、(c)及び(d)のモノりん酸エステル化コーンスターチと未処理のコーンスターチの場合と同様の結果を示している。このりん酸トリメチルエステルは、側鎖中のエステル結合が TMAH の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る。また、モノでん粉りん酸エステルの(a)と(c)及び未処理でん粉の(b)と(d)のパイログラムをそれぞれ比較すると、モノでん粉りん酸エステルである、(a)モノりん酸エステル化 HACS 及び(c)モノりん酸エステル化コーンスターチに共通して、保持時間 5.3 分付近にりん酸トリメチルエステルのピークが現れるが、それ以外では、いずれも測定結果に大きな違いは見られない。このことより、(a)と(d)のパイログラムの比較、つまり、モノりん酸エステル化した HACS と通常のコーンスターチとの比較によっても、りん酸トリメチルエステルのピークを手がかりとして、りん酸エステル化の有無の判別を行うことが可能であると考えられる。

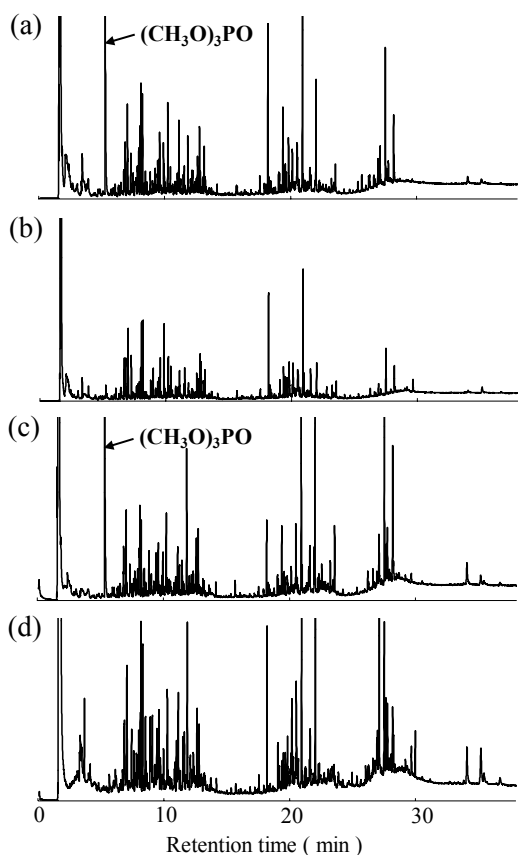


Fig.3 Pyrograms of non-modified starch and phosphorus monoesterified starch in the presence of TMAH
(a) phosphorus monoesterified starch synthesized from HACS
(b) raw HACS
(c) phosphorus monoesterified starch synthesized from ordinary corn starch
(d) raw ordinary corn starch

なお、 ^1H NMR 測定の結果からは、変性の有無によるスペクトルの変化は観測されず、りん酸基に由来するシグナルは観測されなかった。

3. 4 カルボキシメチル化でん粉

^1H NMR スペクトルを測定した結果を Fig.4 に示す。(a)及び(b)の HACS に関してのスペクトルを比較すると、カルボキシメチル化 HACS のスペクトル(a)では、化学シフト値が 4~4.1 ppm 付近に未処理 HACS のスペクトル(b)には観測されないシグナルが観測されており、(c)及び(d)のカルボキシメチル化コーンスターチと未処理コーンスターチの場合と同様である。このシグナルは、一般的なエーテル基とカルボキシル基のついたメチレン基の化学シフト値と一致している⁸⁾。また、カルボキシメチル化でん粉の(a)と(c)及び未処理でん粉の(b)と(d)のスペクトルをそれぞれ比較すると、カルボキシメチル化でん粉ではどちらも化学シフト値が 4~4.1 ppm 付近に特異的なシグナルが現れるが、それ以外では、いずれも測定結果に大きな違いは見られない。このことより、(a)と(d)のスペクトルの比較、つまりカルボキシメチル化 HACS と通常のコーンスターチとの比較によっても、このシグナルを手がかりとして、カルボキシメチル化の有無の判別を行うことが可能であると考えられる。

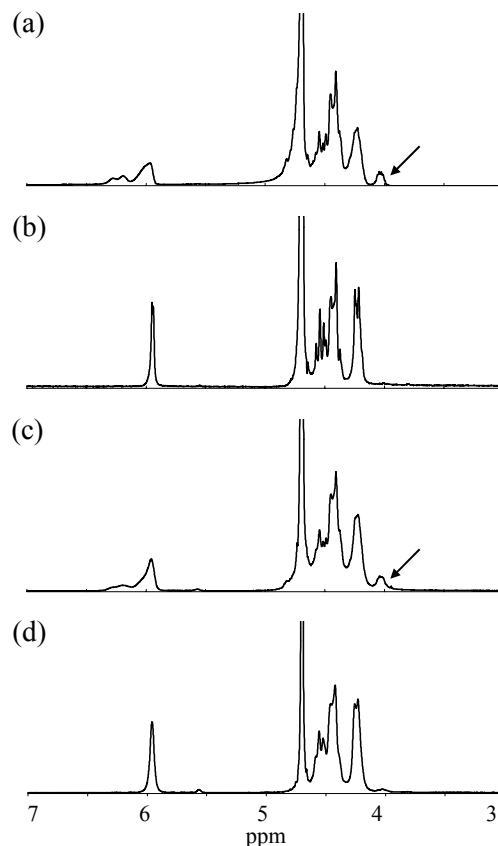


Fig.4 ^1H NMR spectra of non-modified starch and carboxymethylated starch
(a) carboxymethylated starch synthesized from HACS
(b) raw HACS
(c) carboxymethylated starch synthesized from ordinary corn starch
(d) raw ordinary corn starch

なお、反応 Py-GC/MS 測定を行ったところ、希塩酸でナトリウム塩を遊離としたカルボキシメチル化コーンスターチのパイログラムでは、保持時間 3.5 分付近に置換基由来の熱分解生成物であると考えられるグリコール酸メチルエステルのピークが観測された。しかしながら、この生成物は、微量ではあるが未処理コーンスターチのパイログラムにも観測されるため、低置換度の場合を考慮に入れると、このピークを識別に用いることは適当ではないと考えられる。

4. 要 約

HACS からアセチル化でん粉、モノでん粉りん酸エステル、カルボキシメチル化でん粉を合成し、反応 Py-GC/MS 及び ^1H NMR スペクトルを測定することにより、変性の有無を確認することができるか検討した。

上記の測定結果の両方又はいずれか一方から、各 HACS 誘導体についての変性の有無を確認することが可能であった。HACS の各誘導体と通常のコーンスターチの各誘導体との測定結果に明確な違いは見られず、HACS と通常のコーンスターチとを比較した場合も同様であることから、これらの3種の HACS の誘導体については、原料 HACS が入手できなくても、通常のコーンスターチについての反応 Py-GC/MS 及び ^1H NMR スペクトルと比較することにより、誘導体か否か判別できると考えられる。

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”，p.300（1977），（朝倉書店）
- 2) 東田紘一，中久喜輝夫：月刊フードケミカル，**10**，35，（1997）
- 3) 藤巻正生，三浦洋，大塚謙一，河端俊治，木村進編集：“食料工業”，p.124（1985），（恒星社厚生閣）
- 4) 倉嶋直樹，石田康行，大谷肇：関税中央分析所報，**44**，49（2004）
- 5) 竹本賢治，三浦徹，梅田寛，水田完，村上孝之，笹川邦雄，倉嶋直樹，朝長洋祐：関税中央分析所報，**44**，43（2004）
- 6) 関川義明，嶋田勝：関税中央分析所報，**27**，1（1987）
- 7) 鈴木繁男，中村道徳編集：“澱粉科学実験法”，p.253（1979），（朝倉書店）
- 8) Silverstein，Bassler，Morrill：“有機化合物のスペクトルによる同定法”，第5版，p.195（1992），（東京化学同人）