

HPLC法によるでん粉アルファー化度測定法の検討

岡本 健*, 三浦 昌子*, 野口 源司*

Study of a method to determine the degree of gelatinization of starch by HPLC

Ken OKAMOTO*, Masako MIURA* and Genji NOGUCHI*

*Nagoya Customs Laboratory

2-3-12, Irifune, Minato-ku, Nagoya, Aichi 455-0032 Japan

In this study, we examined a simple HPLC method as an alternative to the Hanes method provided in Customs Analytical Method No. 110. For the quantitative determination of reducing sugar, the Hanes method involves far more complicated experimental operations and requires higher professional skills. Therefore, for quantitative analysis of glucose, we used the HPLC method instead. We found that the HPLC method can be used for analysis by using citric acid and phosphoric acid concurrently to adjust pH. As a result, the degree of starch gelatinization determined by the HPLC method coincided well with that measured by the Hanes method.

1. 緒 言

2. 実 験

糊化済でん粉（アルファー化でん粉）は、でん粉を水の存在下で加熱処理することで糊化（アルファー化）させ乾燥したものであり、製紙工業、繊維工業、食品工業等に使用されている。関税率表上の分類においては、アルファー化の程度（アルファー化度）によって関税率表第 35.05 項と第 11.08 項に分類される。この 2 つの項の税率格差が大きいことから、アルファー化度を正確に測定することは重要である。

現在、税関分析において、でん粉のアルファー化度は、税関分析法 No.110 「でん粉のアルファー化度の測定法」¹⁾により測定している。同法は、でん粉が強アルカリ溶液中でアルファー化し、それに伴って酵素（アミラーゼ）に対する反応性が急激に高くなるという性質を利用したものであり、アルカリ処理により完全にアルファー化した試料と未処理の試料をグルコアミラーゼにより酵素分解させて、両者の生成した還元糖量の違いからアルファー化度を算出する方法である。

同法による生成した還元糖の定量は、滴定法であるハーネス法を採用しているが、この方法は、実験操作が複雑で熟練が必要である。そこで、より簡便にでん粉のアルファー化度を測定する方法として、ゲル系カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により、生成したグルコースを定量することでアルファー化度を算出する方法を検討した。

2.1 試料及び試薬

ばれいしょでん粉、トウモロコシでん粉、タピオカでん粉、うるち米でん粉

*各でん粉について、未加工のものとアルファー化したものを東海澱粉(株)より購入

水酸化ナトリウム、グリセリン（試薬一級 片山化学工業）

リン酸、グルコース（試薬特級 Aldrich）

クエン酸（試薬一級 林純薬工業）

2.2 装置及び測定条件

HPLC

装置：LC-20 システム（島津製作所）

カラム：MCI GEL CK08EC（三菱化学）

ガードカラム：MCI GEL CK08ECG（三菱化学）

カラム温度及び流速：75℃、0.5 ml/min

移動相：水

注入量：10 µl

検出器：示差屈折率検出器（島津製作所）

2.3 測定方法

以下の測定方法は、税関分析法 No.110 及び外山らの方法²⁾を参考にし、また 2.4 の測定条件の検討の結果から決定した。

* 名古屋税関業務部 〒455-0032 愛知県名古屋市中区入船 2-3-12

2.3.1 測定の概要

Fig.1 の系統図に従い、でん粉アルファ化度の測定を行った。

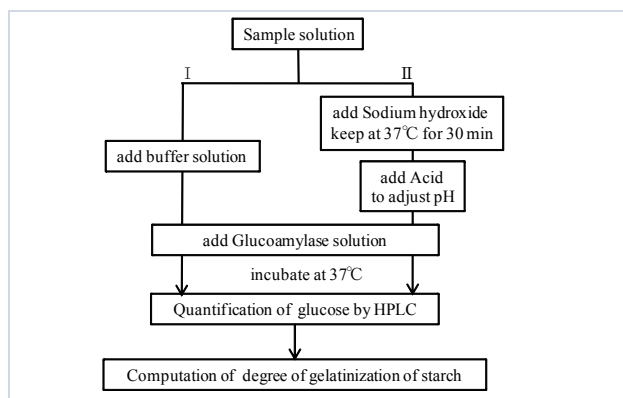


Fig.1 Procedure of HPLC method to determine the degree of gelatinization of starch

2.3.2 試薬の調整

2.3.2(1) リン酸 クエン酸緩衝溶液 (pH=4.0 - 5.0)

10 M 水酸化ナトリウム水溶液 1.5 ml に 1 M リン酸 15 ml、0.1 M クエン酸 17 ml を加えて、pH=4.0 - 5.0 に調整した。

2.3.2(2) グルコアミラーゼ溶液

Rhizopus niveus グルコアミラーゼ (TOYOBO 製) を、力価が 1 ml 当たり約 10 ユニットになるように、脱イオン水を用いて溶解させた。

2.3.2(3) 除たんぱく剤 (A 及び B)

A : $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 水溶液 (1.8%(W/V))

B : $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ 水溶液 (2.0%(W/V))

2.3.2(4) グリセリン標準液

グリセリン 1.0 g を脱イオン水を用いて 25 ml に定容した。

2.3.3 検液の調製

均一な懸濁液 (でん粉試料 1.25 g/100 ml 脱イオン水) を作製し、その懸濁液 4.0 ml ずつを 2 本の 50 ml 三角フラスコにとり、1 本には、リン酸-クエン酸緩衝溶液 3.35 ml を加えて I 液とした。他の 1 本には、10 M 水酸化ナトリウム水溶液 0.15 ml を加えて、37°C で 30 分間加温して完全にアルファ化させた後に、1 M リン酸 1.5 ml と 0.1 M クエン酸 1.7 ml を加えて II 液とした。

両液を 37°C 恒温槽に置き、温度を安定させた後にグルコアミラーゼ溶液 2.0 ml を加え、振とうさせながら 120 分間反応させた。その後、除たんぱく A 液 5.0 ml、B 液 5.0 ml 及びグリセリン標準液 1.0 ml を加え、溶液を 50 ml 遠沈管に移し、4000 rpm で 5 分間遠心分離を行った。その上澄み液をメンブランフィルター (0.45 μm) に通してから HPLC 用検液 (I 液及び II 液) とした。

2.3.4 HPLC によるグルコースの定量

グルコース 3 - 4.2 mg/ml と内部標準としてグリセリン 4 mg/ml を含む水溶液を 3 本調整し、HPLC に注入し、濃度比とクロマトグラムの面積比より検量線を作成した。次に I 液及び II 液を HPLC に注入し、生成したグルコース重量を定量した。

2.3.5 アルファ化度の算出

アルファ化度は、II 液のグルコース重量(g)を基準として、I

液のグルコース重量(g)の割合として、次式のように算出した。

$$\text{アルファ化度}(\%) = \frac{\text{I 液のグルコース重量(g)}}{\text{II 液のグルコース重量(g)}} \times 100$$

2.4 測定条件の検討

2.4.1 酸の検討

でん粉試料としてアルファ化ばれいしょでん粉を用いて、Fig.1 の II 液の工程に従い、pH を調整するために添加する酸について、酢酸、プロピオン酸、酪酸、クエン酸、リン酸で検討した。

2.4.2 最適な水酸化ナトリウム量の検討

でん粉試料として未加工ばれいしょでん粉を用いて、Fig.1 の II 液の工程に従い、アルファ化時の水酸化ナトリウム濃度が、0.12 M、0.24 M、0.35 M、0.45 M、0.55 M になるように水酸化ナトリウムを添加した 5 本の検液を調製し、生成したグルコースを定量した。

2.4.3 酵素分解反応時間の検討

アルファ化ばれいしょでん粉と未加工ばれいしょでん粉を 1:1 で混合したでん粉試料を用いて、酵素分解反応時間が 20、40、60、80、100、120、180、240 分間の時点で検液を沸騰浴で 10 分間加温することでグルコアミラーゼを失活させた。他の手順については、2.3 の測定手順に従い、I 液、II 液のグルコース重量の測定及びアルファ化度の算出を行った。

2.5 HPLC 法の検証

2.5.1 混合したでん粉試料を用いた検証

アルファ化でん粉 1.25 g と未加工でん粉 1.25 g を各々摩砕し、脱イオン水で 100 ml に定容して、各々の懸濁液を作製した。次に、アルファ化でん粉懸濁液と未加工でん粉懸濁液を、0:100、25:75、50:50、75:25、100:0 の割合で総量が 4.0 ml になるように採取し、各々をアルファ化度 0%、25%、50%、75%、100% の試料懸濁液として、2.3 の測定手順に従いアルファ化度の測定を行った。

2.5.2 ハーネス法との比較による検証

未加工ばれいしょでん粉 30 g と脱イオン水 450 ml を混合した懸濁液をビスコグラフにかけた。測定は、開始温度 30°C、昇温 1.5°C/分、63°C 到達後、昇温 0.5°C/分、75°C 到達後 15 分保持の条件で行い、温度が 64.5°C、65.3°C、66.8°C の時点において、駒込ピペットを使用して、約 10 ml 採取した。すばやく氷水で冷却し、脱イオン水で希釈した後に、アルファ化度の測定に用いた。

3. 結果及び考察

3.1 測定条件の検討

3.1.1 酸の検討

pH を調整するために用いる酸について検討した。使用できる酸は、グルコアミラーゼの最適 pH である pH=4.0 - 5.0 に安定して調整できるものであり³⁾、しかも HPLC のクロマトグラムにおいて、グルコースのピークに影響を与えないものである必要がある。

Fig.2 は、酢酸を用いた場合の HPLC クロマトグラムである。こ

のクロマトグラムから、酢酸のリーディングピークがグルコースのピークと重なることがわかる。プロピオン酸と酪酸についても検討したが、酢酸と同様の重なりが生じた。

Fig.3 は、クエン酸を用いた場合の HPLC クロマトグラムであり、(1)と(2)は、それぞれクエン酸濃度が 0.13 mol/l と 0.018 mol/l の場合のクロマトグラムである。このクロマトグラムから、クエン酸のピークが終わる保持時間は、濃度に依り、その濃度を低く抑えることで完全に分離したグルコースのピークが得られることがわかる。

そこで、クエン酸とは別の酸を用いて中性付近まで調整した後に、クエン酸を用いてグルコアミラーゼの最適 pH 付近に調整する方法について検討した。その結果、リン酸を用いることで容易に pH=6 付近に調整でき、グルコースのピークに影響を与えないことがわかった。

Fig.4 は、このリン酸とクエン酸を併用して用いた場合の HPLC クロマトグラムである。このクロマトグラムから、この条件において完全に分離したグルコースのピークが得られることがわかる。

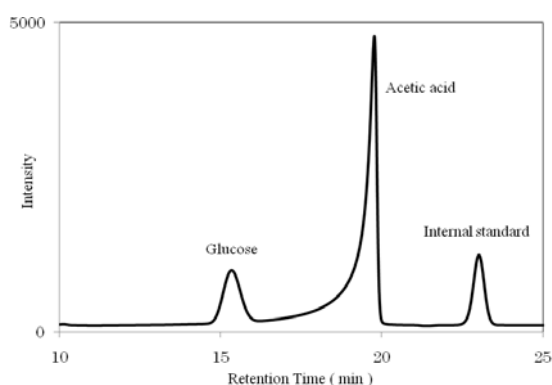


Fig.2 Liquid chromatogram of glucose, acetic acid and internal standard

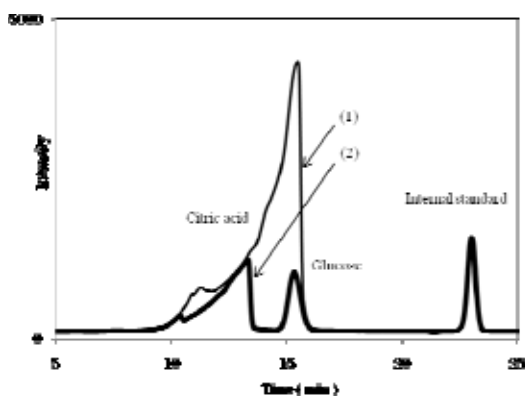


Fig.3 Liquid chromatograms of glucose, citric acid and internal standard
(1) 0.13 mol/l citric acid (2) 0.018 mol/l citric acid

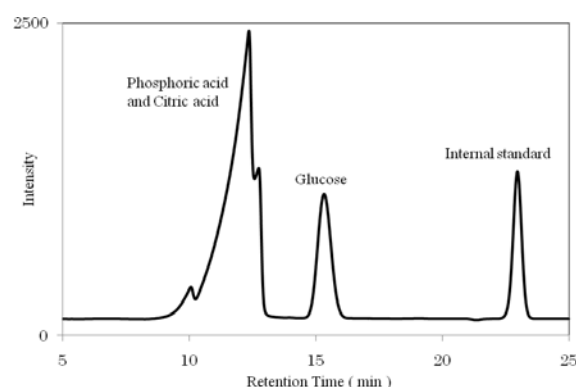


Fig.4 Liquid chromatogram of glucose, phosphoric acid, citric acid and internal standard

3.1.2 最適な水酸化ナトリウム量の検討

Fig.1 のⅡ液において使用する水酸化ナトリウムについて、37℃、30 分の条件で完全にアルファ化させるのに必要な濃度を検討した。

Fig.5 は、水酸化ナトリウム濃度によるグルコース重量を表したものである。この図から、水酸化ナトリウム濃度が 0.35 M 以上において、グルコース重量が平衡値に達すると考えられる。

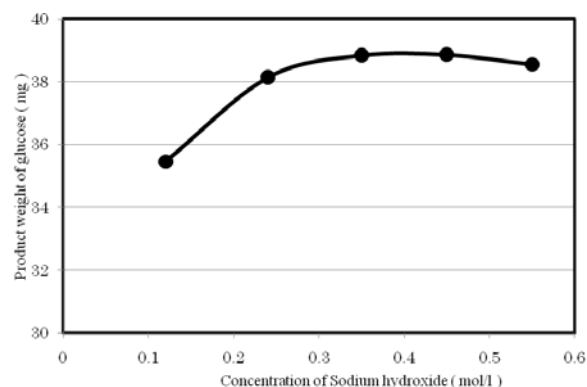


Fig.5 Product weight of glucose for different concentrations of sodium hydroxide

3.1.3 酵素分解反応時間の検討

酵素分解反応時間を決定するために、アルファ化ばれいしょでん粉と未加工ばれいしょでん粉を 1:1 で混合したでん粉試料を用いて酵素分解の時間経過を調べた。

Fig.6 は、Fig.1 中のⅠ液、Ⅱ液の時間経過におけるグルコース重量を表したものである。グルコース重量が平衡に達する時間は、アルファ化度により異なると考えられ、Ⅰ液（アルファ化度 50%）については 40 分間以上、Ⅱ液（アルファ化度 100%）については 100 分間以上反応させることで平衡値に達すると考えられる。また、Fig.7 は、Ⅰ液及びⅡ液のグルコース重量を用いて算出したアルファ化度を表したものである。この図から、100 分間以上反応させることで理論値（50%）に近い値で安定することがわかる。

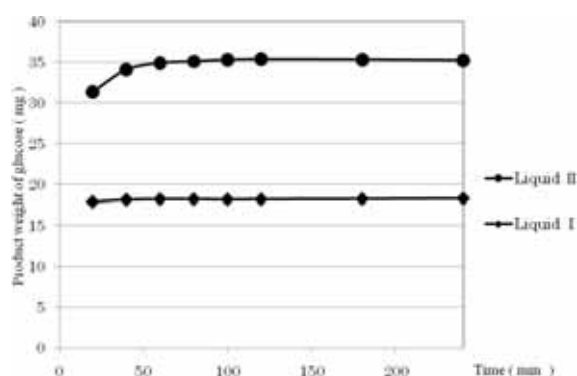


Fig.6 Product weight of glucose for different reaction times

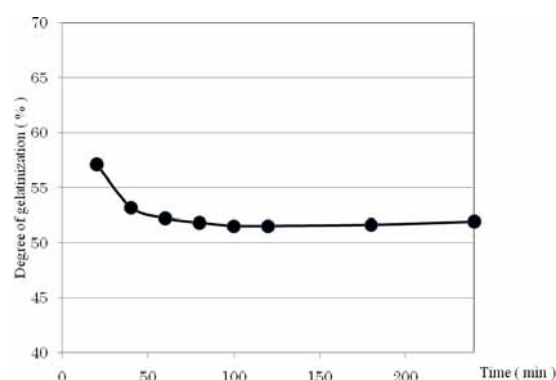


Fig.7 Degree of gelatinization for different reaction times

3.2 HPLC 法の検証

3.2.1 混合したでん粉試料を用いた検証

アルファ化ででん粉のアルファ化度を 100%、未加工ででん粉のアルファ化度を 0%として、それらを混合することにより、アルファ化度 0%、25%、50%、75%、100%の試料を作製した。この試料を用いてアルファ化度の測定を行い、この理論値に近

い値が測定させるかをばれいしょでん粉、とうもろこしでん粉、タピオカでん粉及びうるち米でん粉の 4 種類について検証した。

その結果を Table 1 に示した。とうもろこしでん粉とうるち米でん粉については、未加工ででん粉が僅かに分解されると考えられるものの、HPLC 法により測定された値は、理論値とほぼ一致した値として得られたことがわかる。

Table 1 Comparison of the content of gelatinized starch in starch and degrees of gelatinization of 4 different types of starch determined by the HPLC method (average of 3 determinations)

Theoretical value (%)	Potato (%)	Corn (%)	Tapioka (%)	Rice (%)
0.0	0.0	4.5	0.0	12.7
25.0	25.9	26.3	28.1	29.2
50.0	50.3	50.7	54.5	51.8
75.0	74.7	75.3	75.3	74.0
100.0	99.9	97.3	98.3	96.2

3.2.2 ハーネス法との比較による検証

ビスコグラフを用いてアルファ化が不十分なばれいしょでん粉を作製し、HPLC 法による測定値とハーネス法による測定値との比較を行った。Fig.8 は、ばれいしょでん粉のビスコグラムである。このビスコグラムの①、②、③の時点で試料を採取し、HPLC 法とハーネス法によりアルファ化度を測定した。その結果を Table 2 に示した。両法の測定値は、アルファ化の程度に依らず、良好な一致を示した。

Table 2 Comparison of HPLC and Hanes method (average of 3 determinations)

Sample	HPLC method (%)	Hanes method (%)
①	34.8	36.6
②	50.9	49.6
③	78.8	78.2

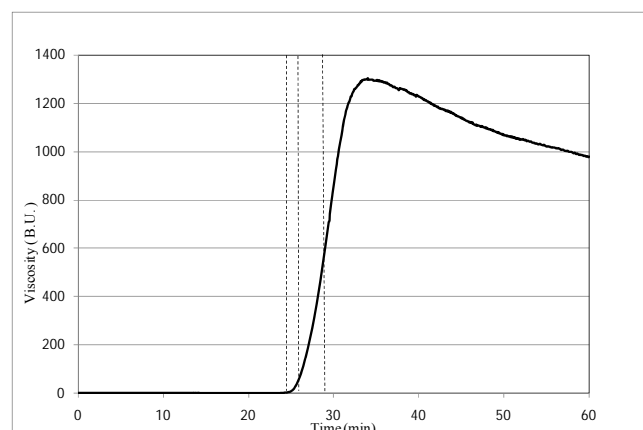


Fig.8 Viscogram of potato starch

4. 要 約

より簡便な測定法として、HPLC 法によるでん粉アルファー化度測定法について検討した。

測定条件の検討を行った結果、pH を調整するためにリン酸とク

エン酸を併用することにより HPLC での測定が可能となった。

また、混合したでん粉試料を用いて HPLC 法の検証を行った結果、理論値とほぼ一致した測定値が得られた。さらに、ビスコグラフにより作製したでん粉試料を用いて、ハーネス法との比較を行った結果、良好に一致した。

文 献

- 1) 関税中央分析所：税関分析法 No.110 (2002).
- 2) 外山忠男，檜作進，二國二郎：澱粉工誌，**13**,69 (1966).
- 3) 二國二郎：“澱粉科学ハンドブック”，P.445 (1991),(朝倉書店).