

核磁気共鳴分光法によるアセチル化でん粉のDS値の測定

小川 竜平*, 福岡 翔平*, 市川 智一*, 柴田 正志*, 村上 孝之*, 笹谷 隆*

Determination of degree of substitution of starch acetates with NMR spectrometry

Ryohei OGAWA*, Shohei FUKUOKA*, Toshikazu ICHIKAWA*, Masashi SHIBATA*, Takayuki MURAKAMI* and Takashi SASATANI*

*Tokyo Customs Laboratory

2-7-11, Aomi, Koto-ku, Tokyo 135-8615 Japan

The analysis of starch derivatives is currently defined in Customs Analysis Method No. 403. Starch acetate is a starch derivative, and it needs to be analyzed not only qualitatively but also quantitatively. Absorption of the ester group is confirmed with IR. In addition, the amount of acetyl group is determined by titration. According to this method, starch acetates must be washed with a large amount of distilled water before analysis, but this method cannot be applied to water soluble starches such as pregelatinized starch. To solve this problem, determination of the degree of substitution (DS value) of starch acetate with NMR spectrometry was examined and compared with the Customs Analysis Methods.

1. 緒 言

でん粉は、その物理的性質及び化学的特性により食用から工業用に至るまで幅広く利用されている。でん粉の有する機能をさらに向上させるために、でん粉を化工、変性して利用する例が多くある。でん粉は、 α -グルコースを構成単位とした天然高分子である。でん粉は α -グルコースより構成され、グルコースの構造的特徴は、酸素原子を含む6員環複素環で第1級または2級アルコール及びアノメリックプロトン（アセタール構造）を有していることである。

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もので、でん粉誘導体の一種である。未処理でん粉に比べ、耐老化性や透明性が改善されているため焼き鳥やみたらし団子のたれ、冷凍麺の食感改良と安定化、冷凍卵焼の離水防止などに用いられている^{1,2)}。また、アルファ化したアセチル化でん粉は使用温度によって膨潤度が変わらないので、ベーカリー製品の食感改良剤として使用されている³⁾。

でん粉は、変性や誘導化の有無により関税分類が異なる。でん粉の化工の種類により税率格差があり、これらを正確に識別することは税関分析において重要である。アルファ化したアセチル化でん粉のように変性を施したでん粉誘導体は、税表分類上でん粉誘導体に分類される。そのため変性したでん粉誘導体は、置換基の有無を確認する必要がある。アセチル化でん粉は置換度（DS値：Degree of Substitution）が0.01以上のもの、つまり、でん粉中のグルコース残基100個あたり平均1個以上のアセチル基が置換したものでん粉誘導体としている。このため、アセチル化でん

粉の分析では、定性だけでなく置換度の正確な定量が求められる。

アセチル化でん粉は、税関分析法No.403「でん粉誘導体の分析法」に従い、エステル基を赤外吸収スペクトルにより確認し、水酸化ナトリウムでアセチル基を加水分解し、過剰の水酸化ナトリウムを塩酸で逆滴定することでアセチル基の定量を行っている。一般に分析試料は酢酸等の不純物を含み、置換度の測定に影響を及ぼすため試料の洗浄が不可欠である。水に溶解又は膨潤するものは多量の蒸留水による試料の洗浄ができないため、分析が困難な場合がある。滴定法は個人差を生じやすい方法であり、原料でん粉や試料の洗浄などの前処理に時間を要し、分析操作が煩雑であることが指摘されている^{4,5)}。これらの問題を解決するため、本報では、核磁気共鳴分光法（NMR法）を用いたアセチル化でん粉のDS値の測定法を検討した。

¹H NMRスペクトル上ではアセチル化でん粉中のアセチル基由来シグナルと酢酸由来シグナルは異なる化学シフトで観測されることに着目した⁶⁾。分析試料に酢酸等の不純物が残留した場合でも、置換度の測定に影響がないものと考えられる。さらに、NMR法は構成する原子（核スピン）を直接観測しており、基準となるシグナルを指標とすることで定量分析が可能である。ヒドロキシプロピルでん粉では置換度の定量にNMR法を用いた例が報告されている⁷⁾。

本報では、内標準物質を加え基準シグナルとする方法（NMR-内標準法）とでん粉由来の特定のシグナルを利用する方法（NMR-アセタール法）の定量性を検討し、税関分析法が定める滴定法と比較した。

* 東京税関業務部 〒135-8615 東京都江東区青海2-7-11

2. 実験

2.1 試料及び試薬

2.1.1 試料

アセチル化タピオカでん粉 (No.1-4)

: 輸入品 (DS値の異なるもの5種類)

アルファ化アセチル化サゴでん粉 (No.5)

: 敷島スター (株) 提供

アルファ化アセチル化タピオカでん粉 (No.6)

: 輸入品

2.1.2 試薬

重水、99.9% (和光純薬工業 (株) 製)

3-(Trimethylsilyl)propane-1-sulfonic acid, sodium salt (以下、TSPSA)、97% (Aldrich 製)

2.2 装置及び分析条件

NMR 装置: MERCURY-300 (VARIAN 製)

観測核: ^1H

待ち時間: 1.5 秒

積算回数: 512 回

測定温度: 室温

2.3 実験方法

2.3.1 滴定法

(1) 水分測定

多量の蒸留水で洗浄した試料約 1.0 g を精秤し、105°Cで4時間、常圧乾燥させた。

(2) アセチル基置換度の算出法

税関分析法 No.403 の滴定法に従い、DS 値を求めた。

2.3.2 NMR-内標準法

(1) 水分測定

未洗浄の試料約 1.0 g を量り取り、105°Cで4時間、常圧乾燥させた。

(2) NMR 測定

TSPSA を重水に溶解させ、約 0.15%(w/w)に調製した (C_{TSPSA})。

NMR 用試料管 (外径 5 mm) に未洗浄の試料約 15 mg を秤量 (W_s) し、TSPSA 重水溶液を約 850 mg 量り加えた (W_{TSPSA})。NMR 用試料管を激しく攪拌し、熱湯中で溶液が透明になるまで加熱した。放冷後、 ^1H NMR スペクトルを測定した。

(3) アセチル基置換度の算出法

試料中のアセチル基含有量及び置換度は、TSPSA 中のトリメチルシリル基 (以下、TMS 基) の積分比から以下の式を用いて算出した。(以下、NMR-内標準法)。0.00 ppm の基準とする TMS 基の積分比 (I_{TMS}) 及び 2.18 ppm 付近に観測されるアセチル基の積分比 (I_{Ac}) は 5.40 ppm 付近に観測されるアノメリックプロトン (アセタール基) の積分値を 100 として求めた。

$$A = \frac{H_{\text{TMS}}/H_{\text{Ac}} \times I_{\text{Ac}}/I_{\text{TMS}} \times (W_{\text{TSPSA}} \times C_{\text{TSPSA}})}{(W_s \times (100-m)/100) \times M_{\text{Ac}}/M_{\text{TSPSA}} \times 100}$$

$$DS = 162A/(4300-42A)$$

A : 試料中のアセチル基含有量 (%(w/w))

H : プロトン数

I : 積分比

C : 重量濃度 (%(w/w))

W : 重量 (mg)

M : 分子量

m : 試料の水分割合 (%(w/w))

Ac : アセチル基

s : 試料

2.3.3 NMR-アセタール法

(1) NMR 測定

NMR 用試料管 (外径 5 mm) に未洗浄の試料約 15 mg をとり、重水を約 850 mg 加えた。NMR 用試料管を激しく攪拌し、熱湯中で溶液が透明になるまで加熱した。放冷後、 ^1H NMR スペクトルを測定した。

(2) アセチル基置換度の算出法

試料中のアセチル基置換度は、以下の式を用いて算出した。アセチル基は 2.18 ppm 付近に観測され、その積分比 (I_{Ac}) は 5.40 ppm 付近に観測されるアノメリックプロトン (アセタール基) の積分値を 100 として求めた。

$$DS = I_{\text{Ac}}/100H_{\text{Ac}}$$

H : プロトン数

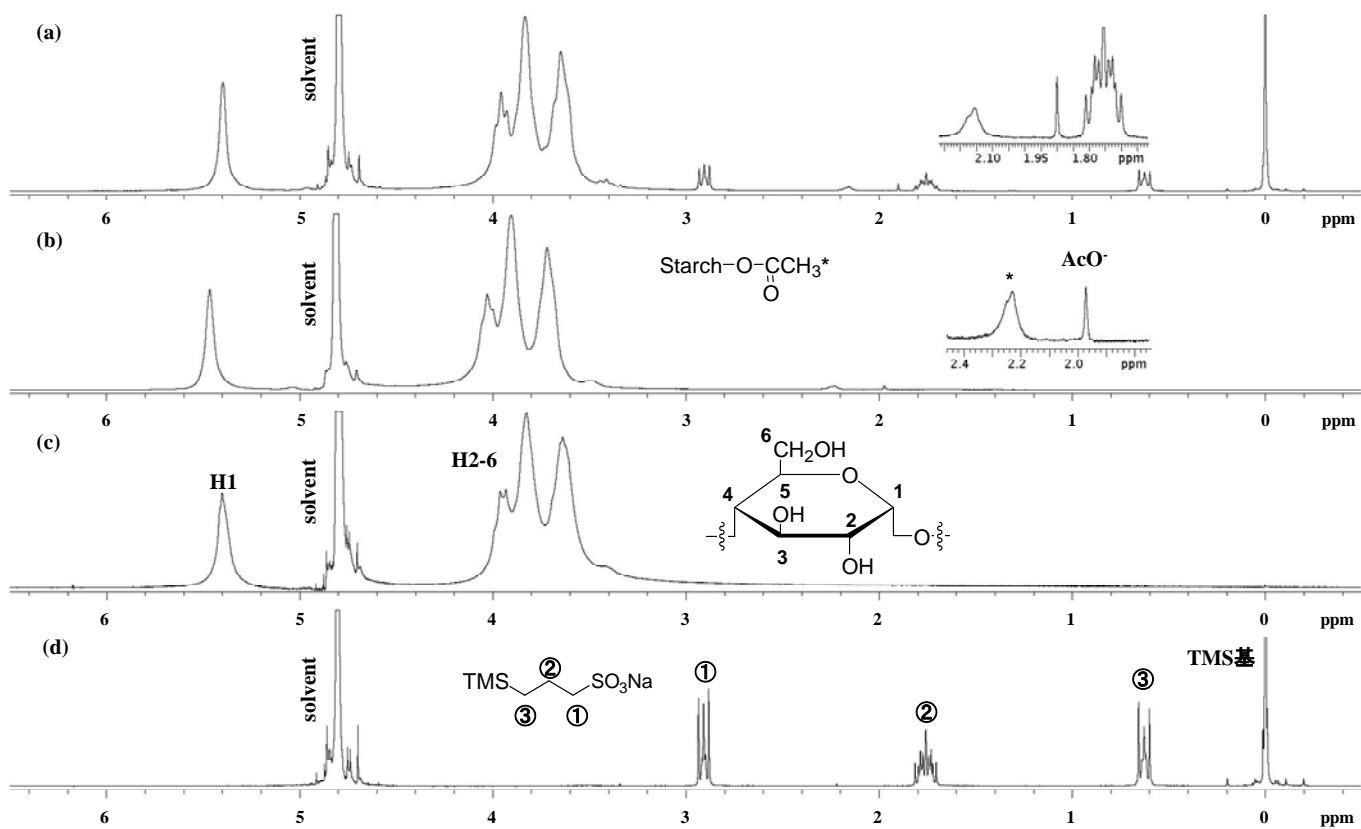
I : 積分比

Ac : アセチル基

3. 結果及び考察

3.1 NMR スペクトル

TSPSA を添加した未洗浄のアセチル化でん粉、未洗浄のアセチル化でん粉、未処理でん粉及び TSPSA の ^1H NMR スペクトルを Fig.1 に示す。アセチル化でん粉のスペクトルは未変性でん粉のものに酷似し、5.40 ppm にアノメリックプロトン (H_1)、2.18 ppm にアセチル基に由来するシグナルが観測された^{6,8)}。また、1.89 ppm (一重線) に遊離酢酸、2.91 ppm (多重線)、1.76 ppm (多重線)、0.63 ppm (多重線)、0.00 ppm (一重線) に TSPSA に起因するシグナルが現れた。

Fig.1 ^1H NMR spectra of (a) starch acetate (DS value; 0.0111) added TSPSA, (b) starch acetate, (c) non-modified starch and (d) TSPSA in D_2O

3.2 各手法による DS 値の測定

各種アセチル化でん粉を滴定法、NMR-内標準法及びNMR-アセタール法により DS 値を測定した。その平均値及び変動係数（以

下、CV 値）を Table 1 に示す。No.1 及び No.5 は 10 回、その他は 3 回測定した。アルファ化アセチル化でん粉 No.5-6 については、滴定法は行っていない。

Table 1 DS values determined by titration and NMR method

Sample No.	Titration method		NMR-internal standardization method		NMR-acetal method		n
	DS value	CV /%	DS value	CV /%	DS value	CV /%	
1	0.0111	4.4	0.0103	2.7	0.0111	0.6	10
2	0.0204	0.0	0.0177	2.3	0.0180	3.1	3
3	0.0345	5.1	0.0297	2.4	0.0312	1.0	3
4	0.0741	0.8	0.0700	1.6	0.0715	1.9	3
5	—	—	0.0116	2.3	0.0114	1.2	10
6	—	—	0.0136	1.9	0.0154	2.6	3

3.3 NMR-内標準法

アセチル化でん粉 No.1 の DS 値が 0.0103 (CV 値 : 2.7%) となり、アルファ化アセチル化でん粉 No.5 の DS 値は、0.0116 (CV 値 : 2.3%) であった (Table 1)。アセチル化でん粉では DS 値が大きくなるにつれ、滴定法との差が顕著になる傾向が見られた (Table 1)。

3.4 NMR-アセタール法

アセチル化でん粉 No.1 の DS 値が 0.0111 (CV 値 : 0.6%) とな

り、アルファ化アセチル化でん粉 No.5 の DS 値は、0.0114 (CV 値 : 1.2%) であった (Table 1)。アセチル化でん粉では DS 値が大きくなるにつれ、滴定法との差が顕著になる傾向が見られた (Table 1)。

3.5 各方法の比較

各方法を比較したところ、NMR 法は得られた DS 値の平均値が大きくなるにつれ、滴定法との差が顕著となつた。測定値の繰返し精度は、NMR 法が概ね良好な値を示した。NMR 法は、繰返し

測定してもその信号強度が比較的安定していることから、結果として良好な繰返し精度に繋がったと考えられる。

アセチル化でん粉No.1 及びNo.5 における NMR-アセタール法と NMR-内標法による DS 値の平均値について、t 検定を行なった。アセチル化でん粉No.1 については、統計量 $T=8.83$ 、棄却域 $t (0.05) =2.10$ により $|T|>t$ となったことから有意水準 5% で有意差があると判断された。同様にアルファ化アセチル化でん粉No.5 についても、統計量 $T=2.27$ 、棄却域 $t (0.05) =2.10$ により $|T|>t$ となったことから有意水準 5% で有意差があると判断された。また、NMR-アセタール法の CV 値は、NMR-内標法より小さかった。NMR-内標法では各試料の秤量や不均一性が測定値に影響し、NMR-アセタール法が良好な繰返し精度を示したと考えられる。

次に、アセチル化でん粉No.1 における滴定法と NMR-アセタール法による DS 値の平均値について、t 検定を行なったところ、統計量 $T=0.44$ 、棄却域 $t (0.05) =2.10$ により $|T|<t$ となったことから有意水準 5% で有意差がないと判断された。一方、同試料における滴定法と NMR-内標法による DS 値の平均値で t 検定を行なったところ、統計量 $T=4.15$ 、棄却域 $t (0.05) =2.10$ により $|T|>t$ となったことから有意水準 5% で有意差があると判断された。

NMR-内標法では各試料の秤量値が小さいため、測定値に影響がみられたと考えられる。

4. 要 約

分析時間の短縮及び煩雑な操作の改善、並びに水による洗浄が困難なアルファ化アセチル化でん粉における DS 値の測定を目的として、NMR 法による DS 値測定法を検討した。

NMR 法ではグルコース分子に結合するアセチル基と遊離酢酸由来のメチル基のピークが分離することから、アルファ化アセチル化でん粉のように水による洗浄が困難な試料についても洗浄することなく DS 値を測定できる可能性があることが分かった。また、分析における繰返し精度は、NMR 法の方が税関分析法に比べ良好であった。特に、NMR-アセタール法は分析の際に試料の重量や水分割合を必要としない方法であり、かつ DS 値が関税分類の基準である 0.01 付近の場合において税関分析法の結果とほぼ一致したことから、簡便な方法として利用できることが期待できる。一方、NMR 法が税関分析法（滴定法）に比べ少なく定量される傾向があり、今後はその原因を究明する必要がある。

文 献

- 1) 二國次郎監修、中村道徳、鈴木繁男編集：“澱粉科学ハンドブック”，P.504 (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) 高橋禮治：“でん粉製品の知識”，P.121 (2000)，(幸書房).
- 4) 梅田寛、水田完、原幸美、村上孝之、山崎光廣、印出進：関税中央分析所報，43, 21 (2003).
- 5) 井上純、明渡計晃、廣瀬達也、川口利宗：関税中央分析所報，43, 27 (2003).
- 6) 竹元賢治、三浦徹、梅田寛、水田完、村上孝之、笛川邦雄、倉嶋直樹、朝長洋祐：関税中央分析所報，44, 43 (2004).
- 7) 丸山幸美、水田完、辻井淳、村上孝之、山崎光廣、印出進：関税中央分析所報，42, 53 (2002).
- 8) 不破英次、小巻利章、檜作進、貝沼圭二：“澱粉科学の辞典”，P.179 (2003)，(朝倉書店).