

示差屈折率検出器を用いた高速液体クロマトグラフィーによる でん粉のアルファー化度の測定

菅野 達朗*，山岡 裕貴*，森 賢一郎***，池田 啓久*，中山 清貴*

Determination of the degree of alpha conversion of starch by HPLC using refractive index detector

Tatsuro KANNO*, Yuki YAMAOKA*, Ken-ichiro MORI***, Yoshihisa IKEDA* and Kiyotaka NAKAYAMA*

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance

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

**Present address: Higashimikawa Agriculture, Forestry and Fisheries Office, Aichi Prefectural Government

11-40, Takayama, Imure-chou, Toyohashi, Aichi 440-0833 Japan

In the Customs Analysis Method, "Analysis method for α -starch in starch products", the titration method is stipulated as a quantitative method of analyzing glucose content. Since last year, we have studied the high performance liquid chromatography (HPLC) method as an alternative to the titration method. In last year's study, Noichi and his group found that the glucose content determined by HPLC using evaporative light scattering detector (ELSD) was almost the same as the data obtained by the titration method. On the other hand, when using refractive index detector (RID) as a detector, the sample with a lower degree of alpha conversion showed a tendency that the glucose content determined by HPLC using RID was different from that determined by the titration method. Consequently, in this study, we prepared many more types of test samples than last year's study and statistically compared the data obtained by the HPLC method with RID and ELSD. As a result, when conducting the analysis six times, we found that the degrees of alpha conversion of pre-gelatinized starches determined by using the HPLC method using RID coincided with those using the HPLC method with ELSD.

1. 緒 言

でん粉の水懸濁液に熱を加え、あるいはアルカリを加えると、分子をつなぐ結合が緩み、そこに水が入ることによりでん粉粒子は次第に膨潤し始め、最終的には粘性を持った透明または半透明のでん粉糊液になる。このような糊液の状態になることをアルファー化という。そして、この糊液をホットロールやスプレー乾燥機などで直ちに乾燥した粉末はアルファー化でん粉と呼ばれ、製紙工業、織維工業及び食品工業等の分野で広く用いられている^{1,2)}。

アルファー化でん粉は、その糊化の度合い(以下、「アルファー化度」という。)により関税率表上の所属が異なり、未処理のでん粉であれば第11.08項に分類され、糊化済でん粉であれば第35.05項に分類される。この両者の間で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関税分類上重要である。

現在、税關におけるでん粉のアルファー化度の測定は、税關分析法「でん粉のアルファー化度の測定法」(以下、「税關分析法」という。)に定められた方法で行っており、手作業による滴定の結

果を用いてアルファー化度を算出している³⁾。関税中央分析所報第54号において、能一らにより、簡便で繰り返し精度の期待できる高速液体クロマトグラフィーによる測定法(HPLC法)によって、アルファー化でん粉と未加工でん粉の混合割合が100:0, 80:20, 30:70, 0:100の検体について測定した結果、検出器として蒸発光散乱検出器(ELSD)を用いたHPLC法(以下、改良法(ELSD))という。)は現行法と同程度の精度を有する測定法であることが示された⁴⁾。また、示差屈折率検出器(RID)を用いたHPLC法(以下、改良法(RID))という。)については、アルファー化度が高い検体において現行法と同程度の精度を有することが示された⁴⁾。

本研究では、未加工でん粉とアルファー化でん粉の混合比をより細かく設定した模擬試料を作成し、それぞれについて改良法(RID)及び改良法(ELSD)によるアルファー化度の測定を6回行い、その結果を統計学的に比較することで、改良法(RID)の精度について検討した。

* 財務省関税中央分析所

〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-5

** 現 愛知県東三河農林水産事務所

〒440-0833 愛知県豊橋市飯村町高山 11-40

2. 実験

2.1 試料及び試薬

未加工タピオカでん粉、アルファー化タピオカでん粉（以上、松谷化学工業(株)）グルコアミラーゼ (*Rhizopus* sp.由来 生化学用) 水酸化ナトリウム、酢酸、酢酸ナトリウム、グルコース、スクロース、アセトニトリル (HPLC 用)（以上、和光純薬工業(株)）

2.2 分析装置及び分析条件

高速液体クロマトグラフ

装置：Alliance e2695 (Waters Corp.)

カラム：Asahipak NH2P-50 4E (4.6 mm I.D. × 250 mm)

（昭和電工(株)）

ガードカラム：Asahipak NH2P-50G 4A (昭和電工(株))

カラム温度：40°C

移動相：アセトニトリル/水 = 75/25

流速：1.0 mL/min (検出器が RID の場合)

0.5 mL/min (検出器が ELSD の場合)

注入量：10 μL

検出器（ ）示差屈折率検出器 (RID)：Waters 2414

検出器温度：40°C

（ ）蒸発光散乱検出器 (ELSD)：Waters 2424

ドリフトチューブ温度：60°C

ネプライザー温度：50°C

ゲイン：100

2.3 HPLC 法

2.3.1 HPLC 法の概要

HPLC 法による測定は、能一らの報告⁴⁾のものを採用した。Fig.1

に実験系統図を示す。

2.3.2 調製

2.3.2(1) 模擬試料の調製

アルファー化タピオカでん粉と未加工タピオカでん粉の重量割合が 100:0、90:10、80:20、70:30、60:40、50:50、40:60、30:70、20:80、10:90、0:100 になるように量り取り、よく振り混ぜて混合した。

2.3.2(2) 試薬の調製

(A) 酵素溶液

グルコアミラーゼを力価が 1 mL あたり 20 unit になるように、0.2 mol/L 酢酸緩衝液 (pH 4.8) を用いて溶解した。

(B) グルコース標準液

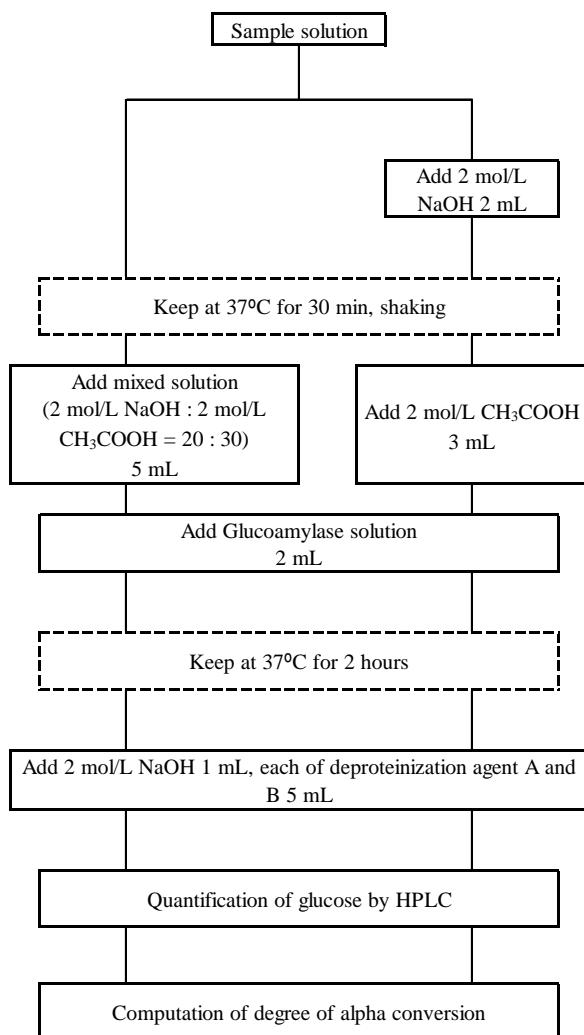
グルコース 2.5 g を正確に量り取り、蒸留水を用いて 250 mL に定容した。

(C) スクロース標準液 (内部標準溶液)

スクロース 2.5 g を量り取り、蒸留水を用いて 250 mL に定容した。

(D) 酢酸 水酸化ナトリウム混液

2 mol/L 酢酸 30 mL に 2 mol/L 水酸化ナトリウム 20 mL を加えよう混和した。



$$\text{Degree of alpha conversion} = \frac{\text{I}}{\text{I} + \text{II}} \times 100$$

Fig.1 Procedure of determining the degree of alpha conversion.

I and II in the formula are glucose content in test solution I and II, respectively.

(E) 除たんぱく剤

A 液：硫酸亜鉛七水和物 18 g を量り取り、蒸留水を用いて 1000 mL に定容した。

B 液：水酸化バリウムハ水和物 20 g を量り取り、蒸留水を用いて 1000 mL に定容した。

2.3.2(3) 検液の調製

模擬試料の水懸濁液 (約 0.9 g/150 mL) 10 mL を 2 本の 50 mL 容三角フラスコに正確に量り取り、一方を 液、他方を 液とした。 液については 2 mol/L 水酸化ナトリウム 2 mL を加えた後、37°C に設定した振とう恒温水槽中で 30 分間アルファー化を行った。次に、 液に酢酸 水酸化ナトリウム混液を 5 mL、 液に 2 mol/L 酢酸を 3 mL 加えた後、両液に酵素溶液 2 mL を加え、37°C の恒温水槽中で 2 時間加水分解を行った。両液に 2 mol/L 水酸化ナトリウム 1 mL を加え中和操作を行った後、除たんぱく剤 A 液

及びB液をそれぞれ5mLずつ加えた。内部標準としてスクロース標準液10mLをそれぞれに加え、この溶液をろ紙(JIS P 3801〔ろ紙(化学分析用)〕に規定される5種C相当のもの)及びメンブランフィルター(0.45μm)でろ過したものをHPLC用の検液とした。

2.3.3 グルコースの定量

50mL容メスフラスコにスクロース標準液5mLと希釈後に濃度が0.1, 0.5, 1, 2mg/mLになるようグルコース標準液を採取し、蒸留水で定容したものを検量線作成用検液とした。各検量線作成用検液10μLをHPLCに注入し、得られたクロマトグラムにおけるグルコースとスクロースの面積比と重量比から検量線を作成した。次に、2.3.2(3)で調製した検液10μLをHPLCに注入し、検液中のグルコース量を定量した。

2.3.4 アルファー化度の算出

アルファー化度は、次式により算出した。

$$\text{アルファー化度}(\%) = \frac{\text{検液 のグルコース量(g)}}{\text{検液 のグルコース量(g)}} \times 100$$

2.4 実験

2.4.1 検量線の作成

50mL容メスフラスコにスクロース標準液5mLと定容後に濃度が0.1, 0.5, 1, 2mg/mLになるようグルコース標準液を採取し、蒸留水で定容した。これらの各溶液について、HPLCに1回ずつ注入し、得られたクロマトグラムのスクロースのピーク面積(As)に対するグルコースのピーク面積(Ax)の比(Ax/As)を求めた。

この値と各溶液中のスクロースの重量(Ws)に対するグルコースの重量(Wx)の比(Wx/Ws)をELSDの測定結果は両対数で、RIDの測定結果は線形でプロットした。

2.4.2 HPLCによるアルファー化度の測定

2.3.3の実験手順に従い、各模擬試料につき6回分の検液を作成し、改良法(RID)及び改良法(ELSD)によりアルファー化度を測定した。なお、アルファー化度の測定に供するHPLC用検液については、二法において同一のバイアルの検液を用いた。

3. 結果及び考察

3.1 等分散の検定

各模擬試料について、改良法(RID)及び改良法(ELSD)によるアルファー化度の測定値及び測定値から算出した標準偏差をTable 1に示した。標準偏差は6回の測定値の絶対的なばらつきの度合いを表す。二法間における測定値のばらつきの度合いに差はないという帰無仮説を検定するため、測定値のばらつきがF分布に従うと仮定した上で、模擬試料ごとに等分散の検定を実施した。その結果、Table 2に示すようなp値(F分布上の確率)が得られ、各模擬試料の混合割合に関わらず今回設定した有意水準0.05(両側確率5%)を超えることから、帰無仮説は棄却されない。すなわち、二法間におけるアルファー化度の測定値のばらつきに有意な差があるとは言えないということになる。

Table 1 Repeatability of the degree of alpha conversion determined by HPLC method with RID and ELSD

		the degree of alpha conversion (%)										
		the content ratio of pre-gelatinized starches in test sample										
		100%	90%	80%	70%	60%	50%	40%	30%	20%	10%	0%
RID	1	100.7	94.9	85.2	79.3	84.0	61.8	56.6	42.2	45.6	22.4	23.6
	2	98.3	94.1	84.4	77.0	70.5	58.8	55.8	39.2	43.5	20.1	19.8
	3	98.2	92.8	84.3	75.0	70.2	58.3	55.8	38.8	35.8	17.8	17.0
	4	98.2	91.6	83.9	74.8	69.8	57.7	55.6	38.7	35.5	15.2	15.0
	5	97.2	90.3	83.8	74.2	68.9	57.0	51.6	34.9	33.4	15.0	14.7
	6	96.6	89.7	83.7	73.0	64.9	55.5	50.4	33.4	30.7	11.7	11.2
	Ave.	98.2	92.2	84.2	75.5	71.4	58.2	54.3	37.8	37.4	17.0	16.9
ELSD	SD	1.27	1.89	0.53	2.05	5.96	1.95	2.39	2.93	5.35	3.53	3.97
	1	99.6	90.3	86.4	78.8	79.0	63.6	55.7	41.6	42.5	26.0	19.9
	2	96.7	90.3	86.4	76.6	70.0	59.9	53.8	40.0	36.5	22.7	18.9
	3	96.5	90.2	85.0	75.9	69.3	58.6	52.1	39.4	34.4	20.3	17.1
	4	96.5	90.2	84.0	75.4	67.4	58.2	50.9	39.1	31.0	19.1	17.1
	5	95.7	89.4	83.1	72.4	67.1	57.8	48.6	34.7	28.7	17.5	14.6
	6	94.8	88.1	83.1	70.5	63.7	55.8	45.8	33.6	25.6	17.3	12.8
	Ave.	96.6	89.8	84.7	74.9	69.4	59.0	51.2	38.1	33.1	20.5	16.7
	SD	1.49	0.79	1.37	2.72	4.74	2.40	3.26	2.90	5.51	3.04	2.40

Ave. : Average

SD : Standard Deviation

Table 2 p-value (Test for equality of variance)

the content ratio of pre-gelatinized starches in test sample											
	100%	90%	80%	70%	60%	50%	40%	30%	20%	10%	0%
p-value	0.73	0.08	0.06	0.55	0.63	0.66	0.51	0.98	0.95	0.75	0.29

3.2 アルファー化度の測定値の定量性について

Fig.2-1 及び Fig.2-2 は、改良法 (RID) 及び改良法 (ELSD) による 6 回のアルファー化度の測定値について平均値を求め模擬試料ごとにプロットし、その平均値をもとに最小二乗法により算出した回帰直線を示したものである。改良法 (ELSD) と比較し、改良法 (RID) では、アルファー化でん粉重量比が 40% 以下の検体のアルファー化度の平均値が回帰直線からずれる傾向が見られた。このようなアルファー化度が比較的低い検体における測定値

の傾向に関して、既報³⁾によると、改良法 (RID) と滴定法とのアルファー化度の測定値においても見られている。一方、各模擬試料のアルファー化でん粉重量比とアルファー化度の平均値との関係は、改良法 (RID) においては回帰方程式 : $Y = 0.8547X + 15.739$ ($R^2 = 0.9835$)、改良法 (ELSD) においては回帰方程式 : $Y = 0.8394X + 15.663$ ($R^2 = 0.9931$) となり、二法において良好な直線性が示された。また、ほぼ同様の回帰方程式が得られたことから、二法における定量性は同程度であると思料される。

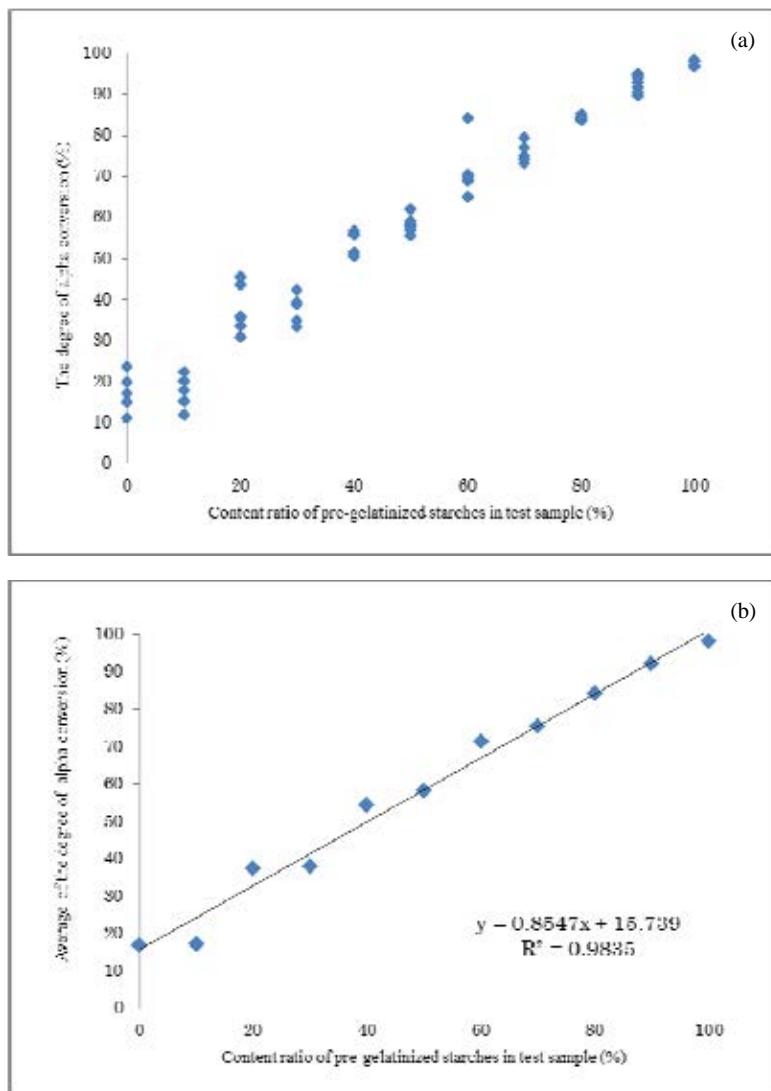


Fig.2-1 Relationship between the degree of alpha conversion and the content ratio of pre-gelatinized starches in test sample (RID).

(a) shows six determinations of the degree of alpha conversion of each test sample.

(b) shows the average determination of the degree of alpha conversion of each test sample.

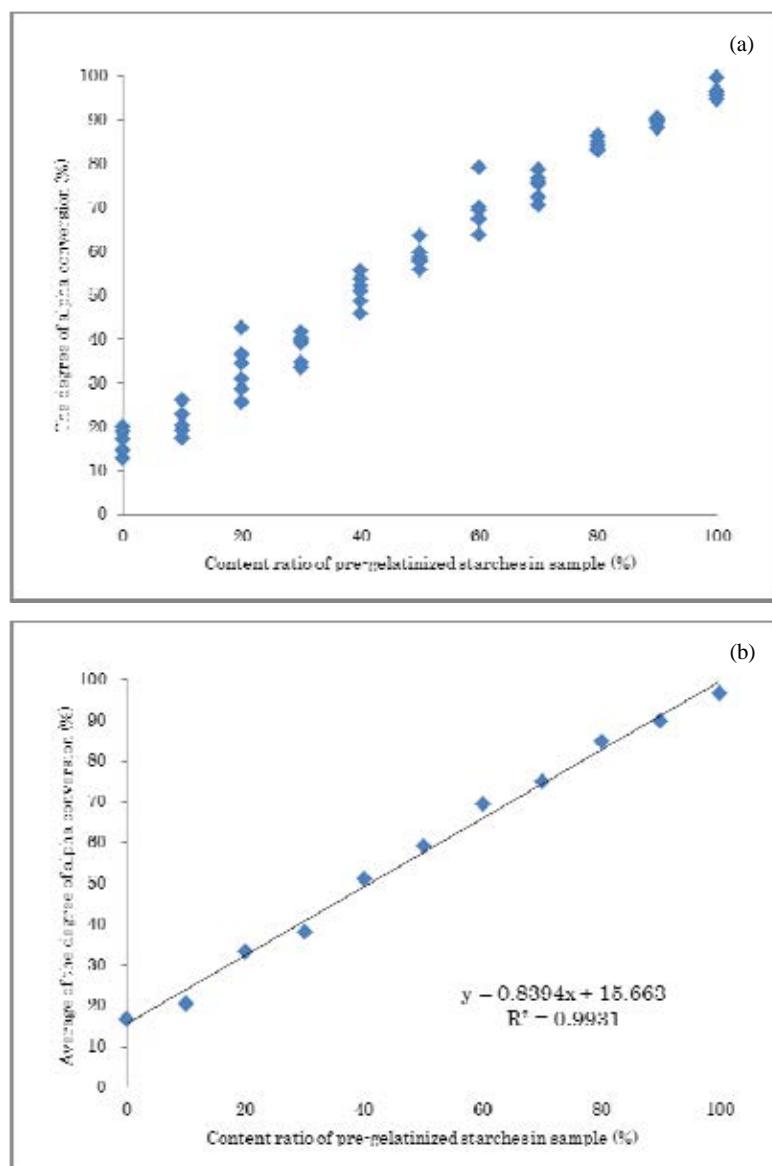


Fig.2-2 Relationship between the degree of alpha conversion and the content ratio of pre-gelatinized starches in test sample (ELSD).

(a) shows six determinations of the degree of alpha conversion of each test sample.
 (b) shows the average determination of the degree of alpha conversion of each test sample.

3.3 今後の課題について

本研究中のHPLCでグルコースを定量する段階において、模擬試料から調製した検液を70~80回程度測定すると、HPLCのシステム圧力が上昇し始める傾向が見られた。ガードカラムを新しいものに交換したところ、システム圧力の上昇が改善したことから、測定を繰り返すうちにガードカラムが劣化してしまうことが考えられる。よって、ガードカラムへの負担を軽減するため、HPLC用検液調製の最終段階に固相抽出を行う処理の追加等が必要であると考える。

4. 要約

RID及びELSDを用いたHPLC法によるでん粉のアルファ化度の測定を行った。

改良法(RID)及び改良法(ELSD)それぞれによる6回のアルファ化度の測定値から算出した標準偏差が表す測定値のばらつきに関して、等分散の検定を実施したところ、F分布上の確率であるp値が、各模擬試料の混合割合に関わらず有意水準0.05(両側確率5%)を超えたことから、二法間におけるアルファ化度の測定値のばらつきに有意な差を与えないことが示された。

また、模擬試料ごとに測定した6回のアルファ化度の平均値から回帰直線を求めたところ、二法において高い相関係数かつほぼ同様の回帰方程式が得られた。

文 献

- 1) 三和澱粉工業株式会社ホームページ：製品情報“アルファー化澱粉”(http://www.sanwa-starch.com/food_07.html)
- 2) 上野川修一, 駒野徹, 志村憲助, 中村研三, 山崎信行編集：“生物化学実験法 19 澱粉・関連糖質実験法”, P276 (1989), (学術出版センター)
- 3) 關税中央分析所ホームページ：税關分析法「でん粉のアルファー化度の測定法」(http://www.customs.go.jp/ccl_search/analysis_search/a_110_j.pdf)
- 4) 能一訓久, 桐島紋子, 大田朋樹, 中山清貴：關税中央分析所報, 54, 13 (2014)