

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 でん粉のアルファ化度の測定（第 2 報）

菅野 達朗*, 小川 浩史**, 馬越 秀一**, 松本 啓嗣**

Determination of the Degree of Alpha Conversion of Starch by HPLC with Refractive Index Detector (Second Report)

KANNO Tatsuro*, OGAWA Hirofumi**, UMAKOSHI Shuichi** and MATSUMOTO Yoshitsugu**

*Hakodate Customs Laboratory, Bibi, Chitose, Hokkaido, 066-0012 Japan

**Central Customs Laboratory, Ministry of Finance 6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba, 277-0882 Japan

In order to resolve some problems regarding the determination of the degree of alpha conversion of starch by HPLC-RID, the method using the HILIC column was studied. In order to prevent the deterioration of the peak shape, more than equal the amount of acetonitrile was added to the sample solution and found that a phase separation occurred in the mixed sample solution. For this reason, ethanol was substituted for acetonitrile in making the sample solution. When using the HILICpak VG-50 4E column, it was found that the peak shape of the internal standard had an abnormality. When XBridge BEH Amide column was used, however, an improvement was seen. As a result of comparing the HPLC method based on the above with the Japan Customs Analysis Method (JCAM) "Analysis Method for Determination of the Alpha Conversion of Starch", the gelatinization value of test samples by each method was found to be approximately equal. Therefore, equivalent results for both methods are expected.

1. 緒 言

アルファ化でん粉の変性の度合いを示す「アルファ化度」の測定は、税関分析法「でん粉のアルファ化度の測定法」（以下、「現行法」という。）に規定されており、酵素による加水分解により生じたグルコースの量を、滴定分析法であるハーネス法により定量し、このグルコース量をもとに算出するものである。この現行法には、1つの分析試料を測定するために4種類の検液を調製しなければならず、操作が煩雑である点、また、終点の判断や滴定量の読みなどが分析者の主観によるところが大きく客観性に欠けるなど、改善を望まれる点が多い。そのため、過去の研究において高速液体クロマトグラフィーによる分析方法（以下、「HPLC法」という。）が、繰り返し検討されてきた¹⁾³⁾。HPLC法の利点として、分析試料のアルファ化度の測定には2種類の検液を調製するだけで測定可能であり、機器分析であることから、客観性やデータの保存性も確保できる点が挙げられる。一方、既報¹⁾³⁾では税関分析法に採用可能な分析法を確立できておらず、その原因として使用するカラムと試料検液の組成が最適でないことが考えられる。例えば、配位子交換カラムを使用した場合、試料検液中に存在するバリウムや亜鉛、ナトリウム等の陽イオンが、カラムの対イオンと交換され、カラムの劣化や、それ

に伴う分離能及び定量精度の低下を招くことが報告されている³⁾⁵⁾。また、アミノカラムを含む親水性相互作用クロマトグラフィーカラム（以下、「HILICカラム」という。）を使用した場合、既報¹⁾³⁾のように試料検液を水のみで調製すると、ピーク形状が悪化することが報告されている⁷⁾⁹⁾。加えて、アミノカラムをグルコースなどの還元糖の分析に使用すると還元糖がアミノ基に結合してしまい、特に低アルファ化度の試料の定量精度が低下するおそれがある⁹⁾。さらに、既報¹⁾において、検液を70回程度注入するとカラム背圧が上昇し、ガードカラムを交換する必要があることを確認しており、HPLC法を税関分析法に採用する上での課題となっている。

本研究では、アミノカラムに代えて、他のHILICカラムを使用することで、これらの課題の解消を図り、いくつかの知見が得られたので報告する。

2. 実 験

2.1 試料及び試薬

アルファ化とうもろこしでん粉（日澱化学）、未加工とうもろこしでん粉、アセトン（高速液体クロマトグラフィー用）（以上、関東化学）、グルコアミラーゼ（*Rhizopus* sp.由来）、アセトニトリ

* 函館税関業務部分析室 〒066-0012 北海道千歳市美々

** 財務省関税中央分析所 〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-5

ル（高速液体クロマトグラフ用）、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（以上、富士フィルム和光純薬）

2.2 装置及び測定条件

高速液体クロマトグラフ

装置：1260Infinity II（Agilent）

検出器：示差屈折率検出器（1260infinity II RID）（Agilent）

カラム：① HILICpak VG-50 4E, 250 mm×4.6 mm I.D.（Shodex）

② XBridge BEH Amide XP Column, ポアサイズ 130Å,
粒子径 2.5µm, 150 mm×4.6 mm I.D.（Waters）

分析条件（カラム①の場合）

カラム温度：60℃

移動相：水/アセトン/アセトニトリル = 15/20/65

流速：1.0 mL/min

注入量：10 µL

分析条件（カラム②の場合）

カラム温度：85℃

移動相：水/アセトン = 16/84（トリエチルアミン 0.05 %添加）

流速：1.0 mL/min

注入量：20 µL

2.3 調製

2.3.1 試薬の調製

2.3.1(1) 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、pH4.8 に調整した 0.2 M 酢酸緩衝液を用いて溶解した。

2.3.1(2) グルコース標準液

グルコース 5 g を精秤し、蒸留水を用いて 200 mL に定容した。

2.3.1(3) スクロース標準液（内部標準溶液）

スクロース 25 g を精秤し、蒸留水を用いて 500 mL に定容した。

2.3.1(4) 酢酸－水酸化ナトリウム混液

2 mol/L 酢酸と 2 mol/L 水酸化ナトリウムを 3:2 の体積比になるように混合した。

2.3.1(5) 2 mol/L 酢酸

酢酸 30 g を量り取り、蒸留水を用いて 250 mL に定容した。

2.3.1(6) 2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液

水酸化ナトリウム 20 g を量り取り、蒸留水を用いて 250 mL に定容した。

2.3.2 模擬試料の調製

アルファ化とうもろこしでん粉のアルファ化度を現行法により測定したところ、3 回測定の平均が 93.5 %であったことから、その結果をもとにアルファ化度の理論値が 80 %及び 30 %程度になるように、未加工とうもろこしでん粉（アルファ化度が 0 %と仮定）と混合したものを模擬試料とし、アルファ化度の理論値が 80 %及び 30 %のものを 3 検体ずつ作成した。模擬試料の作成にあたり、実際に量り採ったアルファ化とうもろこしでん粉及び未加工とうもろこしでん粉の重量と模擬試料のアルファ化度の理論値を Table 1 に示す。なお、模擬試料の重量は現行法で使

用するものは 0.6 g、HPLC 法で使用するものは 2.5 g になるように量り採った。

Table 1 Ingredient of test samples

Method	Sample No.	Sample weight (g)	Geratinized starch (g)	Raw starch (g)	Theoretical value (%)
Titration (JCAM)	T-80-1	0.6	0.5140	0.0870	80.0
	T-80-2		0.5140	0.0870	80.0
	T-80-3		0.5141	0.0868	80.0
	T-30-1	0.6	0.1932	0.4082	30.0
	T-30-2		0.1930	0.4075	30.1
	T-30-3		0.1928	0.4076	30.0
HPLC	H-80-1	2.5	2.1410	0.3617	80.0
	H-80-2		2.1394	0.3610	80.0
	H-80-3		2.1406	0.3614	80.0
	H-30-1	2.5	0.8040	1.6983	30.0
	H-30-2		0.8025	1.6984	30.0
	H-30-3		0.8030	1.6981	30.0

2.4 実験

2.4.1 HPLC 法の概要

本研究における HPLC 法による測定は、試料検液の酵素分解及び中和操作までは既報¹⁾と同じ手順を採用することとした。ただし、既報¹⁾の検量線用検液及び試料検液中のグルコース濃度は、示差屈折率検出器を用いた定量分析を実施する上では希薄であると考えられたため、試料の採取量及び検量線用検液のグルコース濃度を変更することとした。実験系統図を Fig.1 に示す。

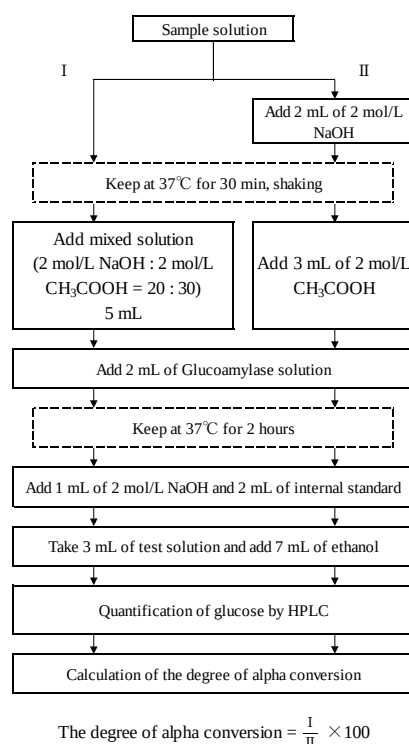


Fig.1 Flow-diagram indicating the degree of alpha conversion of starch
I and II in the formula are glucose content in test solution I and II, respectively.

2.4.2 試料検液の調製

2.4.2(1) 除たんぱく操作前まで

2.3.2 で調製した HPLC 法用の模擬試料の水懸濁液 (約 2.5 g/100 mL) を、2 本の 50 mL 容 (または 30 mL 容) 三角フラスコにマグネティックスターラーで攪拌しながら正確に 10 mL 量り採り、一方をI液、他方をII液とした。

まず、II液に 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 分間振とうし、でん粉のアルファー化を行った。次に、I液に酢酸-水酸化ナトリウム混液を 5 mL、II液に 2 mol/L 酢酸を 3 mL 加えた後、双方に酵素溶液 2 mL を加え、37°C の恒温水槽中で 2 時間静置し、でん粉の加水分解を行った。加水分解終了後、双方に 2 mol/L 水酸化ナトリウム 1 mL を加え中和操作を行い、内部標準としてスクロース標準液 2 mL を双方に加えた。

2.4.2(2) 除たんぱく操作について

2.4.2(1) で得られたI液及びII液それぞれにつき、検液 3 mL 及びエタノール 7 mL を混合したものをメンブレンフィルター (0.20 µm) によりろ過し、HPLC 測定用の試料検液とした。

2.4.3 HPLC 法によるアルファー化度の測定

2.4.3(1) 検量線の作成

5 本の 200 mL 容メスフラスコそれぞれにスクロース標準液 10 mL を採取し、次いでグルコース標準液 1, 5, 15, 30 及び 50 mL をそれぞれ加え、エタノールを 120 mL 加えた後に蒸留水で定容したものを、検量線用検液とした (グルコース濃度 0.1–6.3 mg/mL)。各検量線用検液 20 µL を HPLC に注入し、スクロースのピーク面積 (A_s) に対するグルコースのピーク面積 (A_g) の比 (A_g/A_s) を求めた。この値と、各溶液中のスクロースの重量 (W_s) に対するグルコースの重量 (W_g) の比 (W_g/W_s) から検量線を作成し、直線性を確認した。なお、測定の繰り返し回数は 3 回とした。

2.4.3(2) グルコースの定量及びアルファー化度の算出

2.4.2 で調製した検液 20 µL を HPLC に注入し、2.4.3(1) で作成した検量線をもとに試料検液中のグルコースを定量した。模擬試料のアルファー化度は、定量したグルコース量をもとに次式により算出した。なお、測定の繰り返し回数は 3 回とした。

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

3. 結果及び考察

3.1 試料検液の調製

緒言で述べた通り、溶媒組成が水 100 % の試料検液を HILIC カラムで測定すると、ピーク形状に悪影響を与える。これを踏まえ、本研究では試料検液の溶媒組成を水 100 % にしないことを目的として、2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 1 mL を加えて中和した試料の酵素分解液に等量以上のアセトニトリルを加えることとした。これにより、ピーク形状への悪影響の解消を図るとともに、有機

溶媒のたんぱく質凝集効果による除たんぱく⁹⁾及び未分解のでん粉残基の排除を図った。しかし、検液とアセトニトリルを混合した後、室温に静置したところ、水層とアセトニトリルの相分離が観察された (Fig.2)。この現象は冷蔵保管下で顕著であり、3 °C 前後の環境においては、アセトニトリルと混合する前の試料検液を蒸留水で 5 倍に薄めたものを同様に混合した場合でも相分離が観察された。以上より、中和後の試料の酵素分解液に加える有機溶媒としてアセトニトリルを使用するのは適当でないと考えられたことから、アセトニトリルに替えてエタノールを用いることとし、検液 3 mL とエタノール 7 mL を混合し、メンブレンフィルター (0.20 µm) でろ過したものを HPLC 測定用の試料検液とすることとした。



Fig.2 The state of phase separation

3.2 HPLC 法によるアルファー化度の測定

3.2.1 カラムの検討

試料検液について、HILIC カラムである HILICpak VG-50 4E により得られたクロマトグラムを Fig.3 に示す。内部標準であるスクロースのピーク形状に異常が認められた。検量線用検液のクロマトグラムではスクロースのピーク形状は正常であったことから、模擬試料からの試料検液の調製過程で生じた何らかの成分が、スクロースのピークと重なったものと考えられた。これを受け、カラムを XBridge BEH Amide XP Column に変更した上で再度測定を行ったところ、Fig.4 に示すとおりスクロースのピーク形状が改善されたことから、本研究において調製した各試料検液は、以後、当該カラムを使用して測定を行った。

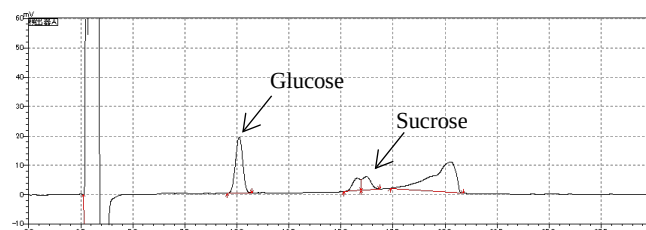


Fig.3 HPLC chromatogram of test solution (H-80-1_I) by HILICpak VG-50 4E column

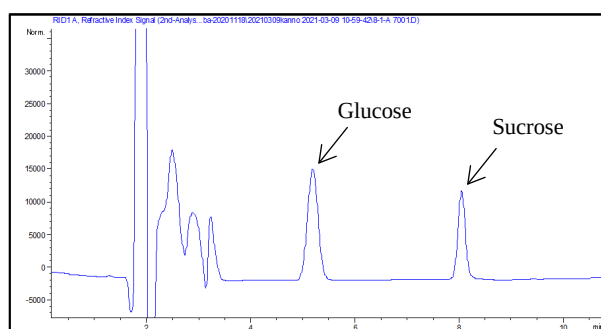


Fig.4 HPLC chromatogram of test solution (H-80-1_I) by XBridge BEH Amide XP Column

3.2.2 検量線の作成

2.4.3 より得られたグルコースの検量線を Fig.5 に示す。グルコース濃度 0.1–6.3 mg/mL の範囲における、スクロースに対するグルコースの重量比とピーク面積比との関係は、決定係数が 0.99999 となり、良好な直線性を示した。

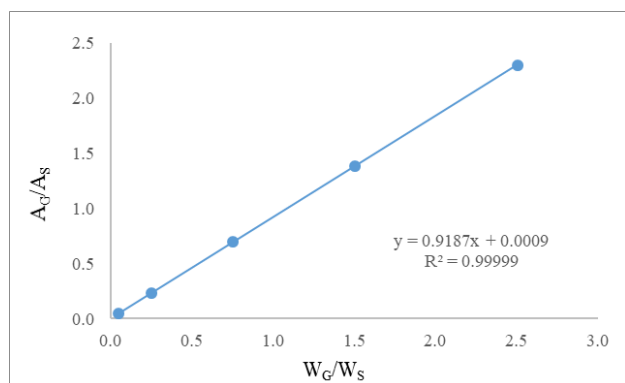


Fig.5 Calibration curve of glucose

A_G : peak area of glucose, A_S : peak area of internal standard,
 W_G : weight of glucose, W_S : weight of internal standard

3.2.3 アルファ化度の測定結果

2.4.3(2)によりグルコースを定量し、アルファ化度を算出した結果を Table 2 に示す。また、比較のため行った現行法によるアルファ化度の測定結果を Table 3 に示す。HPLC 用及び現行法用に作成した模擬試料のアルファ化度の理論値は 2.3.2 で示した Table 1 のとおりであるが、実際に HPLC 及び現行法により測定したアルファ化度と当該理論値とのずれの傾向を見ると、理論値 80 % の模擬試料についてはおおむね理論値どおり、理論値 30 % の模擬試料については約 10 % 程度高くなる傾向が共に見られた。

なお、理論値 30 % の模擬試料で実際のアルファ化度の測定結果が理論値と比較して大幅に高くなったことから、模擬試料の作成に使用した未加工とうもろこしでん粉も僅かにアルファ化していることが推定された。そこで、未加工とうもろこしでん粉のアルファ化度を現行法により測定したところ、3 回測定の平均が 14.1 % であった。この値を基に模擬試料のアルファ化度の理論値を再計算したところ、測定値と理論値の差異は Table 4

のとおりであり、測定値は理論値と近似した。今後、より多様なアルファ化度の模擬試料の測定を行い、現行法との定量性を比較する必要があるが、任意のアルファ化度の模擬試料を調製するにあたっては、アルファ化とうもろこしでん粉のみならず、未加工とうもろこしでん粉についても現行法によるアルファ化度の測定を行う必要があると考えられる。

Table 2 The degree of alpha conversion determined by HPLC method

	The degree of alpha conversion (%)					
	Sample No.					
	H-80-1	H-80-2	H-80-3	H-30-1	H-30-2	H-30-3
1	78.3	80.9	80.1	40.8	41.7	42.6
2	78.2	80.9	80.5	40.8	41.8	42.8
3	77.9	80.4	81.1	40.8	41.7	42.8
Ave.	78.1	80.7	80.6	40.8	41.7	42.7
SD	0.26	0.37	0.60	0.09	0.17	0.29
Difference	-1.9	0.7	0.6	10.8	11.7	12.7

Ave. : Average

SD : Standard Deviation

Difference : Difference from theoretical value of the degree of alpha conversion (%)

Table 3 The degree of alpha conversion determined by Titration method

	Sample No.					
	T-80-1	T-80-2	T-80-3	T-30-1	T-30-2	T-30-3
The degree of alpha conversion (%)	82.2	80.5	80.3	38.8	39.6	39.3
Difference	2.2	0.5	0.3	8.8	9.5	9.3

Difference : Difference from theoretical value of the degree of alpha conversion (%)

Table 4 The Comparison of the difference from recalculated theoretical value

	Sample No.					
	T-80-1	T-80-2	T-80-3	T-30-1	T-30-2	T-30-3
Difference	0.2	-1.5	-1.7	-0.8	0.0	-0.3
	H-80-1	H-80-2	H-80-3	H-30-1	H-30-2	H-30-3
	-3.9	-1.3	-1.4	1.2	2.1	3.1
Theoretical value (Recalculated)	82.0	82.0	82.0	39.6	39.6	39.6

Difference : Difference from theoretical value of the degree of alpha conversion (%)

4. 要 約

本研究では、既報¹⁾³⁾で判明した、使用するカラムと試料検液の組成が最適でないことに起因する課題、特にアミノカラムを使用することで判明した課題を解消すべく、アミノカラム以外の HILIC カラムを用いる方法を検討した。

HILIC カラムによるアルファ化度の測定を行うため、試料検液に等量以上のアセトニトリルを混合したところ、相分離を起こすことが判明したため、アセトニトリルに替えてエタノールを混合することとした。

模擬試料 2 種類各 3 検体を、HILIC カラムを用いた HPLC 法により測定した結果、良好なピーク形状で測定可能であることを確認し、アルファ化度の測定値の傾向は現行法とおおむね一致した。以上より、示差屈折率検出器を用いた高速液体クロマトグラ

フィーにより、でん粉のアルファー化度の測定を、現行法と同等に実施できる可能性が示唆された。

文 献

- 1) 菅野達朗, 山岡裕貴, 森賢一郎, 池田啓久, 中山清貴: 関税中央分析所報, **55**, 123
- 2) 能一訓久, 杉島紋子, 大田朋楓, 中山清貴: 関税中央分析所報, **54**, 13
- 3) 岡本健, 三浦昌子, 野口源司: 関税中央分析所報, **51**, 45
- 4) 昭和電工株式会社. “Shino ちゃんの液クロ SOS「糖分析 (1: SUGAR シリーズ)」”. 昭和電工株式会社.
<https://www.shodex.com/ja/dso/009.html>, (参照 2021-6-10)
- 5) 住化ケムテックス株式会社. “イオン交換樹脂のイオンに対する選択性について”. 住化ケムテックス株式会社.
<https://www.chemtex.co.jp/seihin/ion/topics/page/3/>, (参照 2021-6-10)
- 6) 日本ウォーターズ株式会社. “食品成分分析: 糖類の高分離高感度分析—ACQUITY UPLC H-Class/QDa を用いた直接分析—”. 日本ウォーターズ株式会社. <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/mkt14163.pdf>, (参照 2021-3-18)
- 7) 昭和電工株式会社. “Shino ちゃんの液クロ SOS「アミノカラムで糖を分析する方に」”. 昭和電工株式会社.
<https://www.shodex.com/ja/dso/033.html>, (参照 2021-3-18)
- 8) 塚本友康, 長江徳和. “発表スライド「HILIC? 逆相? 2 本目に選ぶならどのカラム? C18 とは分離を変えたいそんな時」”. 株式会社クロマニクテクノロジー, http://chromanik.co.jp/info/wp-content/uploads/2020/12/jasis2020s_b.pdf, (参照 2021-3-18)
- 9) 株式会社同仁化学研究所. “DOJIN NEWS No.87(1998)”. 株式会社同仁化学研究所. <https://www.dojindo.co.jp/letter/087/news87.pdf>, (参照 2021-6-10)