

# カルボキシ基及び第4級アンモニウム基を有する両性でん粉の分析

松本 健志\*, 渡辺 惣汰\*, 八木 潤\*, 野口 大\*

## Analysis of amphoteric starch containing carboxy groups and quaternary ammonium groups.

MATSUMOTO Tsuyoshi\*, WATANABE Sota\*, YAGI Jun\* and NOGUCHI Hiroshi\*

\*Tokyo Customs Laboratory 2-7-11 Aomi, Koto-ku, Tokyo, 135-8615 Japan

Amphoteric starch containing carboxy groups and quaternary ammonium groups (cationic group) is one type of modified starch. In this study, four samples of amphoteric starch containing carboxy and cationic groups were prepared from native corn starch by cationization using (3-chloro-2-hydroxypropyl) trimethylammonium chloride via oxidation using sodium hypochlorite. Three of them were cation rich and one of them was anion rich. Characteristics of all samples were examined by ash content, iodine color reaction, microscopic observation, eosin Y adsorption test, methylene blue test, viscosity measurement, and analytical instruments based on fourier transform infrared spectrometry (FT-IR), X-ray powder diffraction (XRD), pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry (Py-GC/MS), and proton nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H NMR). Identification of oxidation of anion rich samples could be carried out by ash content, methylene blue test, FT-IR and <sup>1</sup>H NMR. Identification of cationization of all samples could be carried out by eosin Y adsorption test, Py-GC/MS, and <sup>1</sup>H NMR. Degree of Substitution (DS) of cationic groups could be easily measured by <sup>1</sup>H NMR, by using the signal area ratio of anomeric proton of anhydrous glucose unit and trimethylammonium protons (-N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) of cationic groups. DS measured by <sup>1</sup>H NMR were basically in agreement with DS calculated by nitrogen content derived from cationic groups.

## 1. 緒 言

でん粉は、D-グルコースを構成単位とする天然の高分子（重合体）であり、冷水には溶解しないが、加熱すると膨潤糊化（ $\alpha$ 化）し、低濃度の糊液でも高い粘性を示す<sup>1)</sup>。天然のでん粉に加工を施して、もとの性質を変化させたものを変性でん粉といい、「加工（化工）でん粉」ともいいう、様々なな種類の変性でん粉が工業的に利用されている<sup>1)</sup>。

製紙の内添剤として使用される変性でん粉の一つに、酸化及びカチオン化の両加工を施したでん粉（以下、「カチオン化酸化でん粉」と表記する）がある<sup>2,3)</sup>。カチオン化酸化でん粉は、アニオン性のカルボキシ基とカチオン性の第4級アンモニウム基（以下、「カチオン基」と表記する）の両方を有する両性でん粉であり、同じ用途で使用されるカチオン化でん粉よりも分子全体における電荷の偏りが小さく、水中における安定性が高いという利点があるとされる<sup>3)</sup>。

税関において、変性でん粉の分析は、税関分析法No.403などに基づいておこなわれている。カチオン化でん粉の分析方法は税関分析法No.403に、酸化でん粉の分析方法は第9版食品添加物公定書にそれぞれ収載されているが、カチオン化酸化でん粉の分析方法はいずれの既存分析法にも収載されていない。

そこで本研究では、(1) カルボキシ基とカチオン基の含有量が異なる4種類のカチオン化酸化でん粉を作製し、(2) 各加工の確認（定性）における既存分析法の有効性を確認し、(3) 各種の機器分析をおこなったので、その結果を報告する。

## 2. 実 験

### 2.1 試料・原料・試薬・試液

#### 2.1.1 試料

##### (1) 分析試料

カチオン化酸化でん粉 4種（下記の2.3で作製したもの）

##### (2) 対照試料

精製でん粉 1種（原料のとうもろこしでん粉を多量の水で洗浄したもの）

酸化でん粉 4種（下記の2.3で作製したもの）

カチオン化でん粉 1種（下記の2.3で作製したもの）

#### 2.1.2 原料及び試料作製用試薬

とうもろこしでん粉（富士フィルム和光純薬）

次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素：5%以上）（富士フィルム和光純薬）

（3-クロロ-2-ヒドロキシプロピル）トリメチルアンモニウムクロリド約65%水溶液（東京化成）（以下、「CHPTAC 溶液」と表記する）

#### 2.1.3 滴定用試薬

0.05 N 水酸化ナトリウム水溶液（富士フィルム和光純薬）

0.05 mol/L 硫酸（関東化学）

#### 2.1.4 試液

よう素液：よう素 1.3 g, よう化カリウム 4 g を水に溶かし、希塩酸 1

滴を加え、水で100mLとしたもの。

1%エオシンY溶液：エオシンY1gを水に溶かして100mLとしたもの。

メチレンブルー溶液：メチレンブルー0.1gをエタノール(95)に溶かして100mLとしたものを、水で100倍に希釈したもの。

## 2.2 でん粉の質量について

以下の実験及び「3. 結果及び考察」において、でん粉の質量(g)及び単位質量当たりの含有量(g/100g及びmmol/100g)は、原則として乾物換算した値を示す。水分を含む質量の場合はwetと付記する。

## 2.3 試料の作製

### 2.3.1 でん粉の酸化<sup>4)</sup>

約30°Cに設定した水浴中において、とうもろこしでん粉200gの40%水懸濁液に3%水酸化ナトリウム溶液を添加してpH11に調整した後、次亜塩素酸ナトリウム溶液を滴下した。次亜塩素酸ナトリウム溶液の滴下量は20, 40, 80及び120mLの4通りとし、10-60分間かけて滴下した。反応(攪拌)は、次亜塩素酸ナトリウム溶液の滴下が終了してから1.5時間が経過するまでおこなった。カルボキシ基の生成により低下するpHは、3%水酸化ナトリウム溶液を添加して9以上に維持した。反応終了後、5%塩酸でpHを7に調整し、吸引ろ過をおこない、残留物を水で洗浄した。残留物に約15倍量(3L)の水を加えて攪拌した後、再度吸引ろ過をおこない、残留物を水次いでエタノールで洗浄した。残留物を室温で一昼夜以上乾燥し、酸化でん粉の白色粉末を得た。

### 2.3.2 でん粉のカチオン化<sup>5)</sup>

2.3.1で作製した4種の酸化でん粉の各半量に塩基性エタノール溶液を加え、CHPTAC溶液を添加してカチオン化をおこなった。すなわち、酸化でん粉100gに、水酸化ナトリウム2.7gを溶解した水-エタノール混合溶液を加えて懸濁した。このとき、酸化でん粉と水の質量比が1:1で、かつ、エタノールと水の容量比が65:35になるように調製した(例えば、酸化でん粉110g(wet)に水分10gが含まれる場合、水90g(mL)に水酸化ナトリウム2.7gを溶解し、これにエタノール186mLを加えてよく混合した後、酸化でん粉にこの塩基性エタノール溶液を全量加えた)。40°Cに設定した水浴中において、CHPTAC溶液を8.4mL添加し、8時間振とうした。振とう終了後、5%塩酸エタノール溶液でpH7に調整した後に吸引ろ過をおこない、残留物を80%エタノール水溶液で洗浄した。残留物に5倍量(500mL)の80%エタノール水溶液を加えて攪拌した後、吸引ろ過をおこなった。残留物に10倍量(1L)の水を加えて攪拌した後、吸引ろ過をおこない、水次いでエタノールで洗浄した。残留物を室温で一昼夜以上乾燥し、カチオン化酸化でん粉の白色から乳白色の粉末を得た。

また、原料とうもろこしでん粉も同手順でカチオン化をおこない、カチオン化でん粉の白色粉末を得た。

## 2.4 試料情報の確定

### 2.4.1 カルボキシ基含有量の測定

酸化でん粉及び精製でん粉のカルボキシ基含有量を、第9版食品添加物公定書D成分規格・保存基準各条「アセチル化酸化デンプン」の純度試験(2)の方法により測定した。すなわち、でん粉3g(wet)をビーカー

に量り取り、希塩酸(塩酸を120倍希釈したもの)25mLを加えて30分間攪拌した後、吸引ろ過をおこない、塩化物の反応がなくなるまで残留物を水で洗浄した。残留物をビーカーに移し入れ、水300mLを加えて懸濁し、攪拌しながら沸騰水浴中で加熱して糊化させた後、さらに15分間加熱した。フェノールフタレンを指示薬として、溶液が熱いうちに0.05N水酸化ナトリウム溶液(力価f=1.003)で滴定した(消費量:SmL)。

ブランクとして、別に量り取った同量のでん粉に水10mLを加えて30分間攪拌した後、吸引ろ過をおこない、残留物を水で洗浄した。残留物に水300mLを加えて懸濁し、以下は上記本試験と同様の操作をおこなった(消費量:BmL)。

次式により、カルボキシ基の含有量(mmol/100g及びg/100g)を算出した。

Carboxy content (mmol/100g)

$$= \{ (S-B) \times 0.05 \times f / \text{sample mass (g, dry matter)} \} \times 100$$

Carboxy content (g/100g)

$$= \{ (S-B) \times 0.05 \times f \times 0.045 / \text{sample mass (g, dry matter)} \} \times 100$$

### 2.4.2 カチオン基の含有量及び置換度の測定

試料の窒素量を、ケルダール法に基づく自動窒素測定装置(Vapodest 50S, Gerhardt)により測定した。

カチオン化の前後における窒素量の差(增加分)をカチオン基に由来する窒素量(g/100g, 以下、「N<sub>cation</sub>」と表記する)とみなし、次式によりカチオン基の含有量(mmol/100g)及び置換度(DS: Degree of Substitution)を算出した<sup>6,7)</sup>。

Cation content (mmol/100g) = (N<sub>cation</sub> / 14.01) × 1000

$$DS = 162.1 \times N_{cation} / (1401 - 151.6 \times N_{cation})$$

## 2.5 既存分析法

### 2.5.1 灰分の定量(税関分析法No.403)

試料の灰分(g/100g)を直接灰化法で測定した(550°Cで4時間灰化した後、水を数滴加えて残留物を分散させ、乾燥し、さらに1時間550°Cで灰化した)。

### 2.5.2 よう素呈色反応(税関分析法No.403)

試料約0.5g(wet)に5mLの水を加えて懸濁した後、よう素液を2滴滴下してよく振とうし、呈色の状態を観察した。

### 2.5.3 光学顕微鏡観察(税関分析法No.403)

試料のでん粉粒及び偏光十字を倍率400倍で検鏡した。

### 2.5.4 エオシンY吸着試験によるカチオン化(カチオン基)の確認(税関分析法No.403)

試料約0.5g(wet)に1%エオシンY溶液3mLを添加して懸濁した。この懸濁液1滴をろ紙上に滴下し、でん粉粒におけるエオシンYの吸着状態を目視により観察した。

### 2.5.5 メチレンブルー試験による酸化(カルボキシ基)の確認(食品添加物公定書)

試料約50mg(wet)にメチレンブルー溶液25mLを加えて懸濁し、と

きどき攪拌した。攪拌終了後、でん粉粒が沈降するまで放置し、上澄み液を除いた。沈殿物を水で洗浄した後、倍率200倍で検鏡した。また呈色板に移し、目視による観察も併せておこなった。

#### 2.5.6 ビスコグラフによる粘度測定（税関分析法No.403）

ビスコグラフにより試料の粘度を測定した。装置及び測定条件は、以下のとおり。

装置：Brabender VISCOGRAPH-E (Brabender)

濃度：7.8% (試料35 g) に水を加えて全量を450 gに調整)

温度：35 °C → (1.5 °C/min) → 95 °C (15 min hold)

→ (-1.5 °C/min) → 50 °C (15 min hold)

スピード：75 rpm

測定範囲：700 cmg

スプリット比：50:1

キャリヤーガス：ヘリウム

流量：1 mL/min

m/z範囲：29 - 550

#### 2.6.4 プロトン核磁気共鳴分光分析（<sup>1</sup>H NMR）

##### (1) 調製

試料約30 mg (wet) を1.5 mLエッペンチューブに量り取り、重水1 mLを加えてよく攪拌した。遠心分離し、上澄み液を除いた後、エッペンチューブの1 mLの目盛りまで重水を加えて懸濁し、懸濁液640 μLをNMR試料管に移して密栓した。沸騰水浴中で30 - 60分間加熱して糊化した後、<sup>1</sup>H NMRスペクトルを測定した。

##### (2) 装置

装置：JNM-ECZ400S (JEOL)

プローブ：5 mm FG/ROデジタルオートチューンプローブ (JEOL)

##### (3) 測定条件

観測スペクトル幅：-5 - 15 ppmを含む40 ppm

デジタル分解能：0.25 Hz

観測中心：4.67 ppm

試料管スピノン：OFF

フリップ角：90°

取り込み時間：4.0 s

<sup>13</sup>Cデカッピング：ON

ダミースキャン：4回

積算回数：32回

繰返し待ち時間：15 s

温度：80 °C

##### (4) 解析条件

解析ソフトウェア：Delta v5.1.3 (JEOL)

窓関数処理：なし

ゼロフィーリング：2倍

位相補正：マニュアル法

ベースライン補正：マニュアル法

積分：マニュアル法

化学シフト値の基準：残留軽溶媒 (HDO) 4.67 ppm

##### (5) 置換度DSの算出とケルダール法との比較

分析試料のカチオン基の置換度DSを次式により算出し、ケルダール法によるDS (2.4.2参照) と比較した。

$$DS = (I_{\text{trimethyl}} / I_{\text{anomeric}}) \times (H_{\text{anomeric}} / H_{\text{trimethyl}}) \times 100$$

各記号の意味は以下のとおり。

- $I_{\text{trimethyl}}$ ：トリメチルアンモニウム基の水素の信号強度
- $I_{\text{anomeric}}$ ：アノメリック水素の信号強度 (100.00に設定)
- $H_{\text{anomeric}}$ ：アノメリック水素の水素数 (=1)
- $H_{\text{trimethyl}}$ ：トリメチルアンモニウム基の水素数 (=9)

#### 2.6 機器分析

##### 2.6.1 赤外分光分析 (FT-IR)

###### (1) 試料のFT-IR

試料の赤外吸収スペクトルをKBr錠剤法により測定した。装置及び測定条件は、以下のとおり。

装置：NICOLET 6700 (Thermo Fisher Scientific)

スキャン：32回

範囲：4000 - 400 cm<sup>-1</sup>

分解能：4 cm<sup>-1</sup>

###### (2) 試料の塩酸処理と塩酸処理後のFT-IR

試料を2.4.1 (カルボキシ基含有量の測定) と同様の手順で塩酸処理した後、吸引ろ過をおこない、残留物を水次いでエタノールで洗浄した。残留物を50 °Cで4時間減圧乾燥したものを「塩酸処理後の試料」として、上記(1)と同一条件で赤外吸収スペクトルを測定した。

##### 2.6.2 X線回折 (XRD)

試料に水を添加して攪拌し、吸引ろ過をおこなった後、残留物をすみやかにXRDの測定に供した<sup>4)</sup>。装置及び測定条件は、以下のとおり。

装置：MiniFlex (リガク)

X線出力：40 kV, 15 mA

波長：CuK $\alpha$  1.54 Å

スキャンスピード：5 %/min

ステップ間隔：0.01 °

スキャン範囲：2 - 40 °

##### 2.6.3 热分解ガスクロマトグラフィー質量分析 (Py-GC/MS)

試料の熱分解生成物をPy-GC/MSにより測定した。装置及び測定条件は、以下のとおり。

###### (1) 热分解部 (誘導加熱型)

装置：JCI-22 (日本分析工業)

パイロホイル：F590 (キューリー点590 °C) (日本分析工業)

試料量：約0.1 mg (wet)

分解時間：5 s

###### (2) GC-MS部

装置：7890B/5977A (Agilent Technologies)

カラム：HP-5MS (長さ30 m × 内径250 μm, 膜厚0.25 μm)

カラム温度：40 °C (2 min hold) → (10 °C/min) → 320 °C (10 min hold)

注入口温度：320 °C

### 3. 結果及び考察

#### 3.1 試料の情報一覧

試料の情報（試料名、加工の種類、原料、カルボキシ基の含有量、窒素量、カチオン基の含有量及びDS）をTable 1にまとめて示す。

分析試料1-4のカチオン基含有量は18.7-20.8 mmol/100gであった。分析試料1-4のカルボキシ含有量が原料の酸化でん粉1-4と同じ2.4-25.2 mmol/100gであるとすると、カチオン基及びカルボキシ基（アニオン基）の含有量は、分析試料1-3ではカチオン基>アニオン基（以下、「カチオナリッヂ」と表記する）、分析試料4ではカチオン基<アニオン基（以下、「アニオナリッヂ」と表記する）となる。

#### 3.2 既存分析法の結果

灰分、よう素呈色反応、エオシンY吸着試験及びメチレンブルー試験の結果をまとめてTable 2に示す。以下において、各結果について述べる。

##### 3.2.1 灰分

まず、酸化でん粉の灰分の結果について述べる。酸化でん粉1-4の灰分（g/100g）は、番号が進むにしたがって増加し、カルボキシ基含有量（g/100g）と正の完全相関を示した（Fig.1）。一般に、水溶液中のカルボン酸のpKaは5よりも小さい<sup>8)</sup>ため、pH7で最終調整した酸化でん粉1-4のカルボキシ基のカウンターイオンは、水素イオン（H<sup>+</sup>）ではなくナトリウムイオン（Na<sup>+</sup>）になっていると考えられる（以下、カウンターイオンがNa<sup>+</sup>のカルボキシ基を「Na塩型カルボキシ基」と表記する）。この場合、灰分として炭酸ナトリウムが残留すると考えられ、実際に酸化でん粉1-4の灰分の赤外吸収スペクトル（以下、「IRS」）と表記する）は炭酸塩の吸収を示した。このため、酸化でん粉1-4の灰分は、カルボキシ基含有量と正の完全相関を示したと推測する。

次いで、分析試料の灰分の結果について述べる。分析試料の灰分とカ

ルボキシ基含有量は、酸化でん粉1-4とは異なり、正の完全相関の関係を示さなかった（Fig.1）。分析試料1-3の灰分は0.01 g/100g未満と極微量であったのに対し、分析試料4の灰分は0.36 g/100gであった。分析試料間のこの差異は、カルボキシ基のカウンターイオンの種類と灰化における挙動の違いで説明できる。つまり、分析試料1-3はカチオナリッヂであり、カルボキシ基のカウンターイオンは全てカチオン基と考えられるため、灰分が残留しなかったと推測する。これに対し、分析試料4はアニオナリッヂであり、一部のカルボキシ基のカウンターイオンはNa<sup>+</sup>であるため、酸化でん粉と同様に灰分が残留したと考えられる。Fig.1の酸化でん粉の回帰式（y=1.195x+0.0052）に分析試料4の灰分0.36 g/100gを代入して計算すると、カルボキシ基の含有量は6.6 mmol/100gと算出され、Table 2の2列目「カチオン基-カルボキシ基含有量」の絶対値と一致した。これは、分析試料4がNa塩型カルボキシ基を含有すること、またその分析試料4中のNa塩型カルボキシ基が、灰化の際に酸化でん粉中のNa塩型カルボキシ基と同じ挙動をとることを示す。

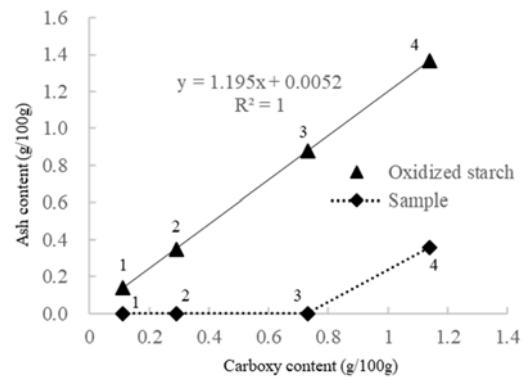


Fig.1 Relationship between carboxy content and ash content (g/100g) of sample 1-4 and oxidized starch 1-4.

Table 1 Information of all samples and all control samples.<sup>(a)</sup>

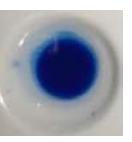
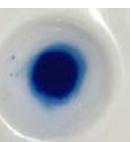
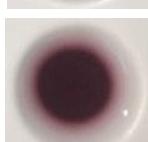
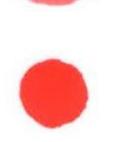
Sample name	Modified	Material	Carboxy content		Nitrogen content (g/100g)		Cation content (mmol/100g)	DS of Cation
			mmol/100g	g/100g	Total N	N derived from cation <sup>(b)</sup>		
Washed starch	None(Washed)	Corn starch	0.03	<0.01	0.045	N.A. <sup>(c)</sup>	N.A.	N.A.
Oxidized starch 1		Corn starch	2.4	0.11	0.010	N.A.	N.A.	N.A.
Oxidized starch 2	Oxidized	Corn starch	6.5	0.29	0.009	N.A.	N.A.	N.A.
Oxidized starch 3		Corn starch	16.3	0.73	0.007	N.A.	N.A.	N.A.
Oxidized starch 4		Corn starch	25.2	1.14	0.006	N.A.	N.A.	N.A.
Cationic starch	Cationized	Corn starch	Not determined		0.369	0.324	23.1	0.0389
Sample 1	Pre-oxidized and cationized	Oxidized starch 1	Not determined		0.301	0.291	20.8	0.0348
Sample 2		Oxidized starch 2	Not determined		0.288	0.279	19.9	0.0333
Sample 3		Oxidized starch 3	Not determined		0.274	0.267	19.1	0.0318
Sample 4		Oxidized starch 4	Not determined		0.268	0.262	18.7	0.0312

<sup>(a)</sup>All measurements show dry matter value.

<sup>(b)</sup>N derived from cation = Total N of modified starch after cationization - Total N of material starch.

<sup>(c)</sup>N.A. means "Not Available"

Table 2 Results of ash content, iodine color reaction, eosin Y adsorption test, and methylene blue test.

Sample name	Cation—Carboxy content <sup>(a)</sup> (mmol/100g)	Ionic character	Ash (g/100g)	Iodine color reaction	Eosin Y adsorption test	Methylene blue test
Washed starch	N.A.	Slightly anionic	0.04			
Oxidized starch 1	N.A.	Anionic	0.14			
Oxidized starch 2	N.A.	Anionic	0.34			
Oxidized starch 3	N.A.	Anionic	0.88			
Oxidized starch 4	N.A.	Anionic	1.36			
Cationic starch	23.1	Cationic	0.01			
Sample 1	18.4	Amphoteric (Cation rich <sup>(b)</sup> )	<0.01			
Sample 2	13.4	Amphoteric (Cation rich <sup>(b)</sup> )	<0.01			
Sample 3	2.8	Amphoteric (Cation rich <sup>(b)</sup> )	<0.01			
Sample 4	-6.6	Amphoteric (Anion rich <sup>(c)</sup> )	0.36			

<sup>(a)</sup> Cation—Carboxy content (mmol/100g) = Cation content of sample  $i$  (mmol/100g) – Carboxy content of oxidized starch  $i$  (mmol/100g) ( $i = 1, 2, 3, 4$ )

<sup>(b)</sup> Cation rich means “Cation—Carboxy content (mmol/100g) > 0”

<sup>(c)</sup> Anion rich means “Cation—Carboxy content (mmol/100g) < 0”

### 3.2.2 よう素呈色反応

精製でん粉及び酸化でん粉は、よう素呈色反応において、いずれも紫色を呈した。カチオン化でん粉は、褐色を呈した。

分析試料1-4は褐色から赤紫色を呈し、カチオン化でん粉と、精製でん粉・酸化でん粉の中間的な色を示した。

### 3.2.3 光学顕微鏡観察

でん粉粒及び偏光十字の有無は、でん粉の糊化を判定する一つの目安になる<sup>9)</sup>。でん粉粒及び偏光十字が確認できない場合、でん粉の糊化が推測される。

すべての試料において、でん粉粒及び偏光十字が観察され、未加工の精製でん粉から分析試料1-4に至るまで、差異は認められなかつた。したがつて、2.3の作製条件では、でん粉の糊化は進行しなかつたと推察する。例として、精製でん粉及び分析試料4の観察画像を、それぞれFig.2及びFig.3に示す。

### 3.2.4 エオシンY吸着試験によるカチオン化（カチオン基）の確認

エオシンY吸着試験は、税関分析法No.403において、カチオン化でん粉の定性に用いられている。分析対象のでん粉粒が同種の未加工でん粉粒よりもエオシンYを強く吸着すると認められる場合に、カチオン基が陽性（+）と判定する。

目視による観察の結果（Table 2）、エオシンYの吸着性は、強い方から順に、カチオン化でん粉 > 分析試料 > 精製でん粉 > 酸化でん粉であった。すなわち分析試料は、いずれもカチオン基が陽性と判定された。分析試料の中では、強い方から順に、分析試料1 > 分析試料2 > 分析試料3 > 分析試料4であり、この順番はTable 2の2列目「カ

チオンーカルボキシ含有量」の値の降順と一致した。

### 3.2.5 メチレンブルー試験による酸化（カルボキシ基）の確認

メチレンブルー試験は、第9版食品添加物公定書の「アセチル化酸化でん粉」において、カルボキシ基の確認試験に採用されている。同試験法では、検鏡によって濃青色を呈する粒子が認められる場合に、カルボキシ基が陽性（+）と判定する。本研究では検鏡に加えて、呈色板上で目視による観察もおこなつた。

まず、検鏡の結果（Fig.4）について、濃青色の粒子が観測されたものから順に述べる。酸化でん粉1-4及び分析試料4では、濃青色の粒子が多数認められた。精製でん粉では、濃青色を呈する粒子は認められなかつたが、淡青色を呈する粒子は認められた。分析試料1-3及びカチオン化でん粉では濃青色を呈する粒子は認められなかつた。すなわち、分析試料の中では、分析試料4はカルボキシ基が陽性と判定されたが、分析試料1-3は陽性と判定されなかつた。

次いで、呈色板上での目視による観察結果（Table 2）を述べる。メチレンブルーによる着色の程度は、強い方（青色が濃い方）から順に、酸化でん粉 ≈ 分析試料4 > 精製でん粉 > 分析試料1-3 ≈ カチオン化でん粉であり、検鏡と同様の結果を示した。

メチレンブルー試験の結果は、分析試料のカチオン基及びアニオン基の多寡を示したといえる。

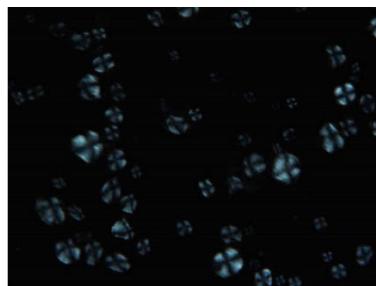
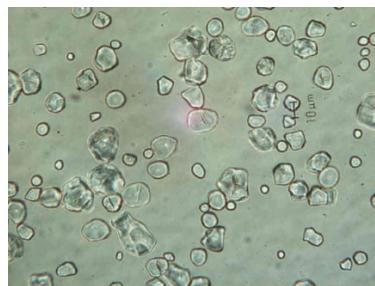


Fig.2 Microscopic images of washed starch ( $\times 400$ ).

[Left] No polarized light, [Right] Under polarized light.

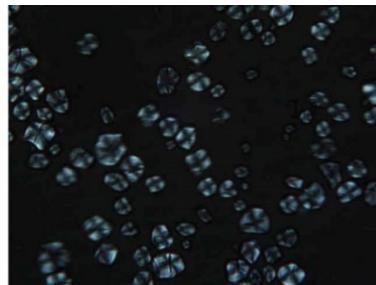
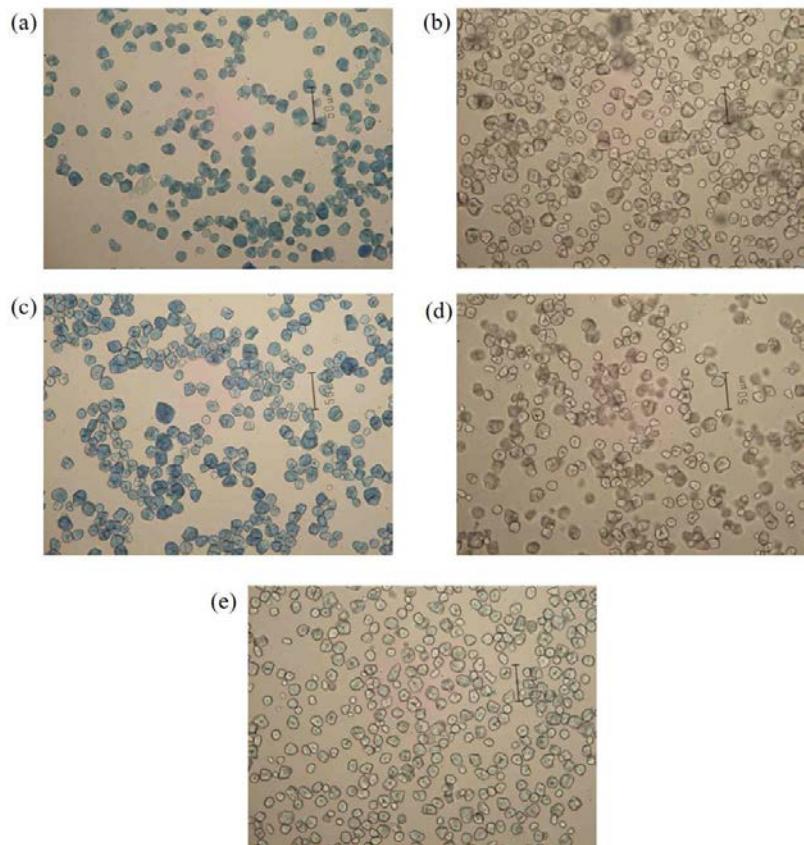


Fig.3 Microscopic images of sample 4 ( $\times 400$ ).

[Left] No polarized light, [Right] Under polarized light.

Fig.4 Microscopic images in methylene blue test ( $\times 200$ ).

(a) oxidized starch 4, (b) cationic starch, (c) sample 4, (d) sample 3, (e) washed starch.

### 3.2.6 ビスコグラフによる粘度測定

まず、対照試料の粘度について述べる。カチオン化でん粉は、精製でん粉よりも粘度上昇温度が低下した（グラフの立ち上がり開始時間が早くなつた）一方で、最高粘度は増加した（Fig.5）。酸化でん粉1-4は、番号が進むにしたがつて、精製でん粉よりも粘度上昇温度が低下した。また、酸化でん粉1を除き、精製でん粉と比較して、最高粘度も低下する傾向を示した（Fig.6）。

次いで、分析試料の粘度について述べる（Fig.7）。分析試料1は、酸化でん粉1よりも粘度上昇温度がさらに低下した一方で、最高粘度は増加した。分析試料2は、酸化でん粉2よりも、粘度上昇温度及び最高粘度がともにさらに低下した。分析試料3及び4は、いずれも粘度上昇をほとんど示さなかつた。つまり分析試料は、精製でん粉、酸化でん粉及びカチオン化でん粉のいずれとも異なる粘度を示したことになる。

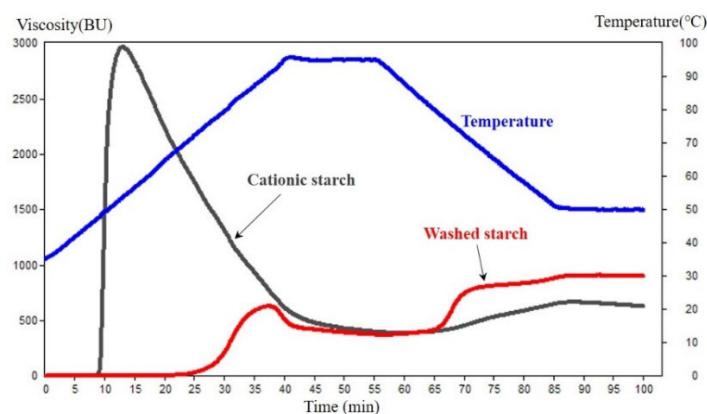


Fig.5 Viscograms of cationic starch and washed starch.

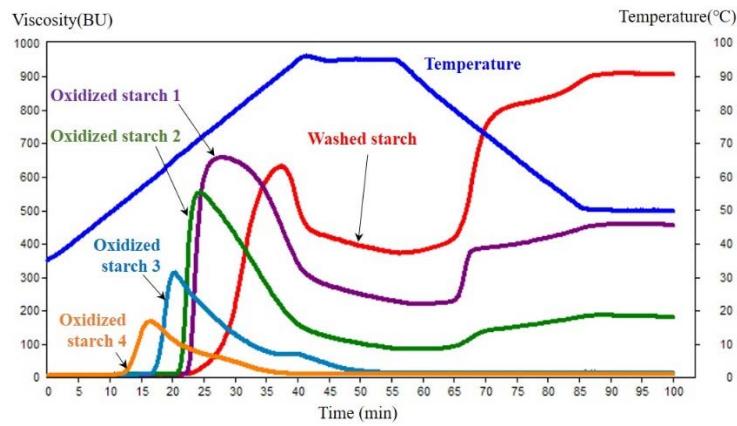


Fig.6 Viscograms of oxidized starches and washed starch.

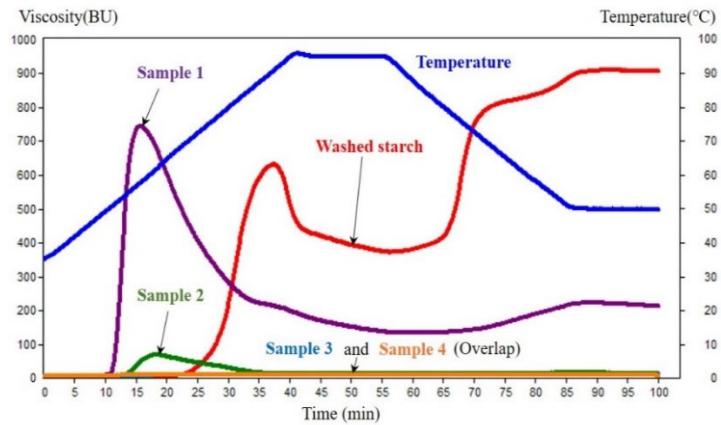


Fig.7 Viscograms of samples and washed starch.

### 3.3 機器分析の結果

#### 3.3.1 FT-IR

##### (1) 試料のFT-IR

試料（精製でん粉を除く）のIRSは、いずれも精製でん粉に概ね類似する吸収を示したが（Fig.8参照）、酸化でん粉と分析試料のIRSは、精製でん粉のIRSとはわずかに異なっていた。酸化でん粉1-4及び分析試料1-4のIRSでは、番号の進行にともない、1620 cm<sup>-1</sup>付近の吸収が増大した（Fig.9及びFig.10）。酸化でん粉1-4と分析試料1-4のカルボキシ基含有量は、試料の番号が進むにしたがって増加する。カウンターアイオンに違いはあるが、酸化でん粉と分析試料のカルボキシ基はいずれも塩型になっていると考える。塩型のカルボキシ基（カルボン酸塩）の吸収は1610-1550 cm<sup>-1</sup>付近に強く出現するため<sup>10</sup>、番号の進行に伴って増大する1620 cm<sup>-1</sup>付近の吸収は、番号の進行に伴って増加するカルボキシ基に由来すると考えられる。

##### (2) 塩酸処理後の試料のFT-IR

塩酸処理の前後において、精製でん粉、カチオン化でん粉及び分析試料1-3のIRSに変化はなかったが、酸化でん粉1-4と分析試料4のIRSには変化があった。また、塩酸処理後において、酸化でん粉1-4と分析試料1-4のIRSに差異が観測された。

まず、酸化でん粉の変化について述べる（Fig.9とFig.11の比較）。酸化でん粉1-4では、塩酸処理後に二つの変化が観測された。一つは、塩

酸処理後に1740 cm<sup>-1</sup>付近に吸収が出現し、番号が進むにつれて、この吸収が増大したことである。もう一つは、番号の進行に伴う1620 cm<sup>-1</sup>付近の吸収の増大が、塩酸処理後には観測されなくなったことである。この二つの変化は、いずれも塩酸処理によって、カルボキシ基のカウンターアイオンがNa<sup>+</sup>からH<sup>+</sup>に置き換わったことに由来すると考えられる<sup>10</sup>。

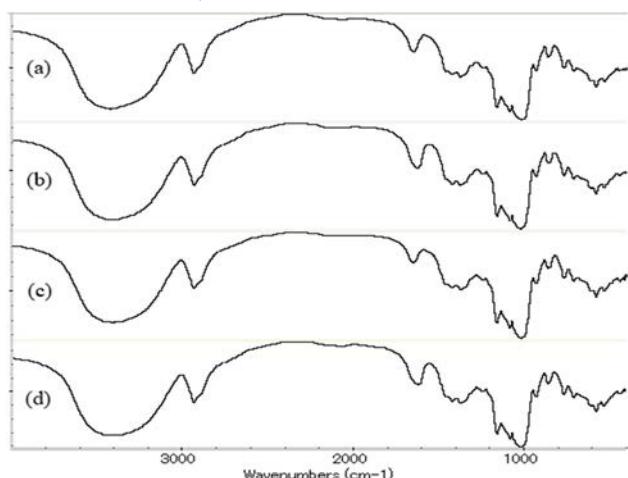


Fig.8 IR spectra of (a) washed starch, (b) oxidized starch 4, (c) cationic starch, (d) sample 4.

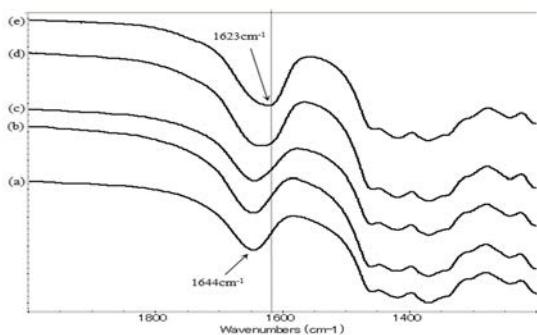


Fig.9 Enlarged IR spectra of (a) washed starch, (b) oxidized starch 1, (c) oxidized starch 2, (d) oxidized starch 3, (e) oxidized starch 4.

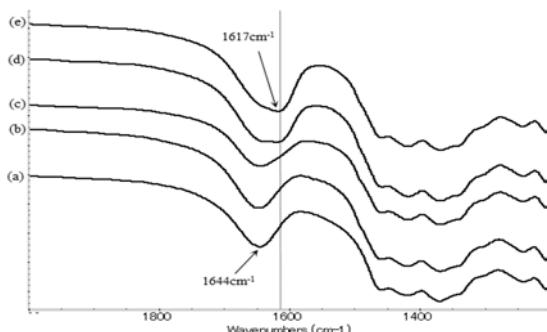


Fig.10 Enlarged IR spectra of (a) washed starch, (b) sample 1, (c) sample 2, (d) sample 3, (e) sample 4.

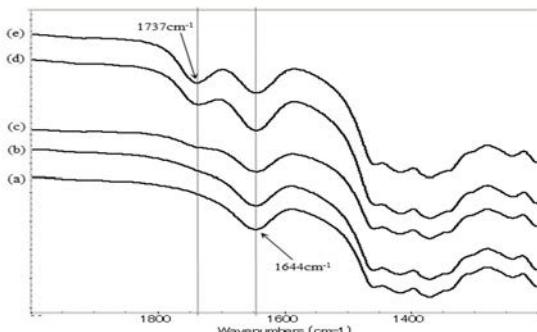


Fig.11 Enlarged IR spectra of (a) washed starch, (b) oxidized starch 1, (c) oxidized starch 2, (d) oxidized starch 3, (e) oxidized starch 4, after HCl pretreatment.

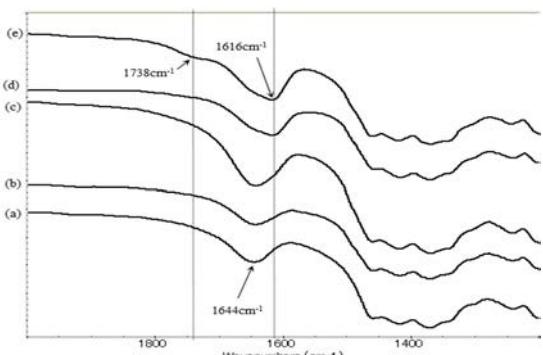


Fig.12 Enlarged IR spectra of (a) washed starch, (b) sample 1, (c) sample 2, (d) sample 3, (e) sample 4, after HCl pretreatment.

次いで、分析試料4の変化について述べる(Fig.10とFig.12の比較)。分析試料4においても、酸化でん粉と同様に塩酸処理後に1740 cm<sup>-1</sup>附近に吸収が出現した。分析試料4はアニオントリッヂであるため、Na<sup>+</sup>型カルボキシ基を含有すると考える。塩酸処理によってカルボキシ基のカウンターイオンがNa<sup>+</sup>からH<sup>+</sup>に置き換わり、酸化でん粉と同様に1740 cm<sup>-1</sup>附近に吸収が出現したものと推測する。

最後に、塩酸処理後における酸化でん粉1-4と分析試料1-4のIRの差異を二つ示す(Fig.11とFig.12の比較)。一つ目の差異は、1740 cm<sup>-1</sup>の吸収である。酸化でん粉1-4は、番号の進行にしたがって1740 cm<sup>-1</sup>の吸収が増大する傾向を示したが、分析試料1-4はその傾向を示さず、分析試料4でのみ1740 cm<sup>-1</sup>の吸収が観測された。この傾向の違いは、灰分の結果(Fig.1)と一致する。二つ目の差異は、1620 cm<sup>-1</sup>附近の吸収である。酸化でん粉1-4では、塩酸処理後に1620 cm<sup>-1</sup>附近の吸収が観測されなくなったが、分析試料1-4では、番号の進行に伴う1620 cm<sup>-1</sup>附近の吸収の増大が、塩酸処理後においても観測された。酸化でん粉と分析試料におけるこれら二つの差異は、いずれもカルボキシ基のカウンターイオンの種類及び挙動の違いで説明できる。つまり、酸化でん粉のカルボキシ基のカウンターイオンはNa<sup>+</sup>であり、塩酸処理によってNa<sup>+</sup>からH<sup>+</sup>に置き換わるのに対し、分析試料1-3のカルボキシ基のカウンターイオンはカチオン基(分析試料4では一部Na<sup>+</sup>)であり、塩酸処理をおこなってもカルボキシ基が塩型のまま変化しないため、と考えられる。

### 3.3.2 XRD

試料のX線回折図をFig.13に示す。でん粉のX線回折図は、とうもろこしでん粉が示すA型、ばれいしょでん粉が示すB型、その中間の图形を示すC型の3種類に分類される<sup>3)</sup>。試料のX線回折図は、いずれもA型を示し、未加工の精製でん粉から分析試料1-4に至るまで、差異が認められなかった。この結果は、3.2.3の光学顕微鏡による観察結果と矛盾せず、2.3の作製条件ではでん粉の糊化が進行しなかったことを示唆する。

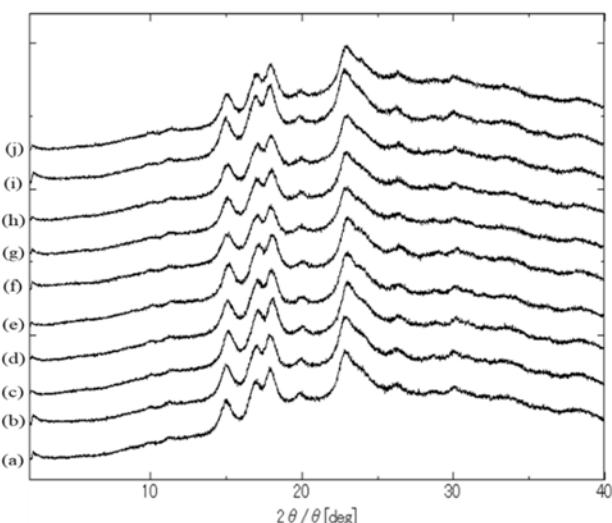


Fig.13 X-ray diffraction patterns of (a) washed starch, (b) oxidized starch 1, (c) oxidized starch 2, (d) oxidized starch 3, (e) oxidized starch 4, (f) cationic starch, (g) sample 1, (h) sample 2, (i) sample 3, (j) sample 4.

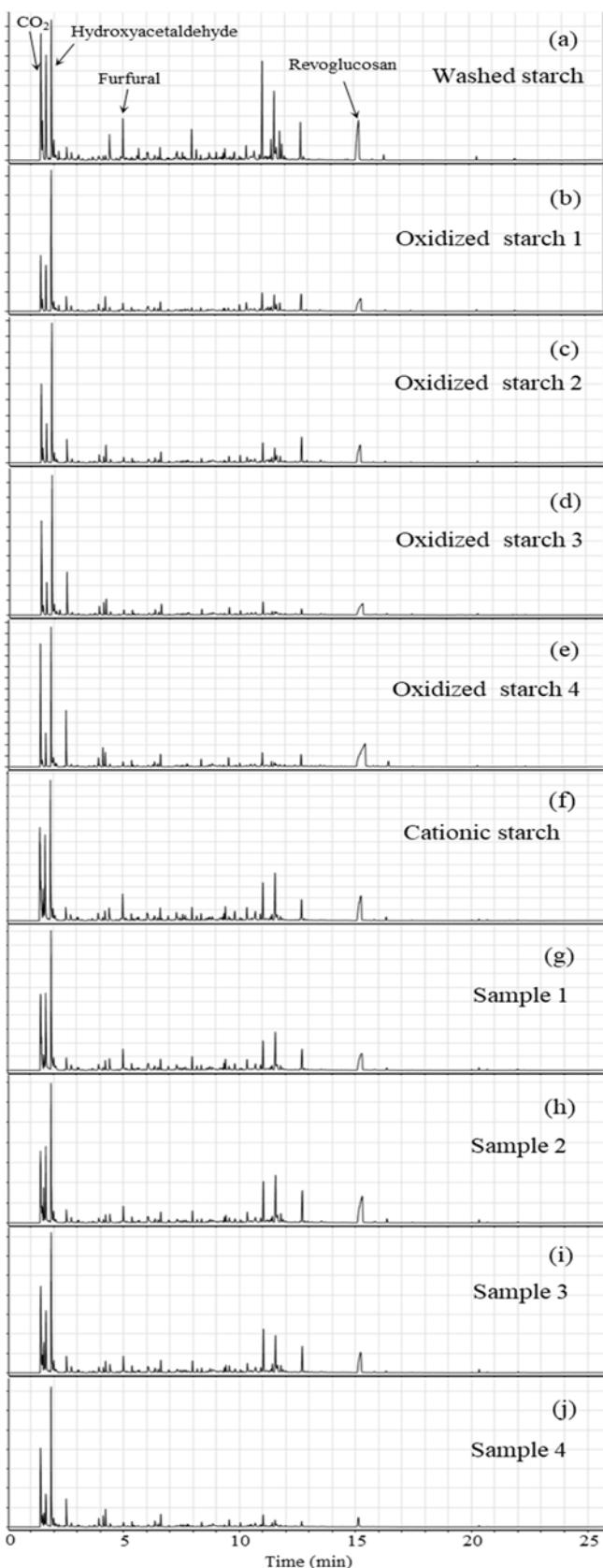


Fig.14 Pyrograms of (a) washed starch, (b) oxidized starch 1, (c) oxidized starch 2, (d) oxidized starch 3, (e) oxidized starch 4, (f) cationic starch, (g) sample 1, (h) sample 2, (i) sample 3, (j) sample 4.

### 3.3.3 Py-GC/MS

試料のパイログラムを Fig.14 に示す。

まずは、酸化でん粉 1 - 4 と精製でん粉の Py-GC/MS の結果について述べる。いずれからも、熱分解生成物として二酸化炭素、ヒドロキシアセトアルデヒド、フルフラール、レボグルコサン等が検出された。酸化でん粉 1 - 4 のパイログラムにおいて、酸化に由来する特異的な成分を見つけることはできなかったが、熱分解生成物のピーク強度比は精製でん粉と異なっていた（例えば、二酸化炭素やフルフラールの強度）。

続いて、分析試料 1 - 4 とカチオン化でん粉の Py-GC/MS の結果について述べる。いずれにおいても、前述の酸化でん粉及び精製でん粉の Py-GC/MS の結果で例示した熱分解生成物が検出されたほか、カチオン基由来の特異的な成分と考えられるトリメチルアンモニウムが検出された（Fig.15）。また、分析試料 4 を除き、クロロメタンが検出された（Fig.16）。クロロメタンは、カチオン基のメチル基と、カチオン基のカウンターイオンである塩化物イオン ( $\text{Cl}^-$ ) に由来すると考える。分析試料 4 でクロロメタンが検出されなかった理由は、分析試料 4 はアニオナリッヂであり、カチオン基のカウンターイオンが全てカルボキシ基になっているためと考えられる。

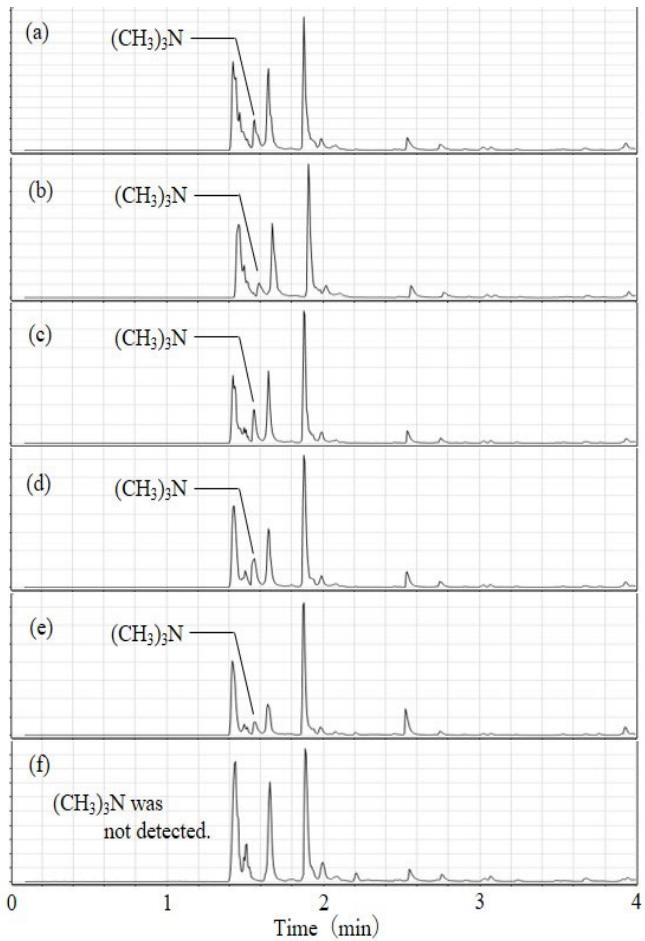


Fig.15 Pyrograms (0 - 4 min) of (a) cationic starch, (b) sample 1, (c) sample 2, (d) sample 3, (e) sample 4, (f) washed starch.

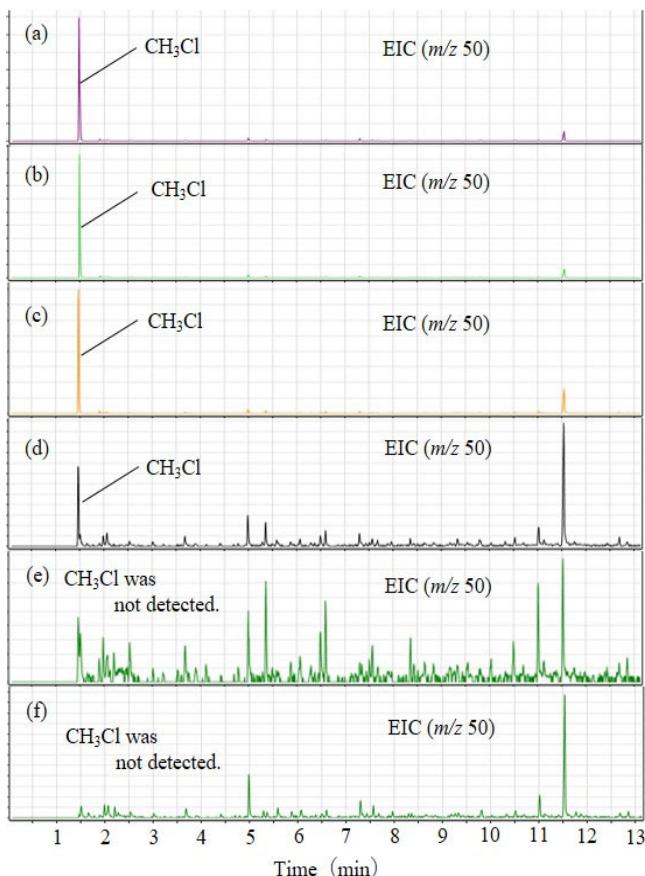


Fig.16 EIC ( $m/z$  50, 0 - 13 min) of (a) cationic starch, (b) sample 1, (c) sample 2, (d) sample 3, (e) sample 4, (f) washed starch.

### 3.3.4 NMR

#### (1) $^1\text{H}$ NMR スペクトル

例として、精製でん粉、酸化でん粉4、カチオン化でん粉及び分析試料4の $^1\text{H}$  NMRスペクトルをFig.17に示す。精製でん粉の信号の帰属は、文献<sup>11),12)</sup>を参考にした。信号の分解能は、分析試料4 ≈ 酸化でん粉4 > 精製でん粉 > カチオン化でん粉の順であり、測定溶液の粘度が信号の分解能に大きな影響を及ぼしていると考えられる。

まず、酸化でん粉の $^1\text{H}$  NMRスペクトルについて述べる。酸化でん粉1-4及び精製でん粉の $^1\text{H}$  NMRスペクトルの拡大図をFig.17に示す。酸

化でん粉1-4のスペクトルでは、番号が進むにしたがって、精製でん粉では観測されない多数の微小信号(3.6 ppm, 4.5 ppm, 4.7 ppm, 5.7 ppmなど)が出現した。でん粉の酸化は、C6のカルボキシ基への変化、C2及びC3のケトン基への変化、C2-C3結合の開裂によってアルデヒド基となった後のカルボキシ基への変化、グルコシド結合のC-C結合の切断による解重合などが起こっているとされる<sup>1),4)</sup>。多数の微小信号の出現は、これらの反応に由来すると推測する。

次に分析試料の $^1\text{H}$  NMRスペクトルについて述べる。分析試料4及び酸化でん粉4の $^1\text{H}$  NMRスペクトルの拡大図をFig.18に示す。分析試料4では、新たに3.7 ppm, 3.9 ppm, 4.8 ppm及び6.0 ppmに信号が出現した。2.6.4とは別に調製して測定したCHPTACのスペクトルや分析試料4の一次元TOCSY、二次元NMRスペクトルなどから、3.7 ppm, 3.9 ppm及び4.8 ppmの信号をそれぞれカチオン基のトリメチルアンモニウム基の水素(H4')、メチレン水素(H3')及びメチン水素(H2')と帰属した。残りの6.0 ppmの信号を選択励起して一次元TOCSYスペクトルを測定したところ、この信号は5.8 ppmのアノメリック水素H1(α-1,4結合)及び5.4 ppmのH1(α-1,6結合)と同様のスピンド結合ネットワークを示した。これに加え、文献<sup>1),13)</sup>によるとカチオン化は主にC2の水酸基に起こることから、この6.0 ppmの信号を、C2の水酸基にカチオン基が置換した無水グルコースユニットのH1と帰属した。なお、カチオン基のH1'(エーテル結合のα位)の信号は4.1 - 4.3 ppmに出現し、でん粉の信号と重なっていた。

#### (2) $^1\text{H}$ NMRによるカチオン基のDSの測定

酢酸でん粉、オクテニルコハク酸でん粉ナトリウムなどでは、アノメリック水素(H1)と官能基由来の水素の信号強度比を用いたDSの測定が報告されている<sup>14),15)</sup>。分析試料においても、H1の信号及びトリメチルアンモニウム基の水素の信号強度を用いてカチオン基のDSを測定した。その結果をTable 3に示す。積分範囲はFig.19に示したとおりである。

$^1\text{H}$  NMR法により測定したDSは、ケルダール法の窒素量から算出したDSよりも、わずかに大きくなる傾向があった。これは、3.7 ppm トリメチルアンモニウム基の水素の信号が酸化の進行により出現した3.6 ppmの微小信号と重なって、わずかではあるが信号強度が過大評価されたためと考える。

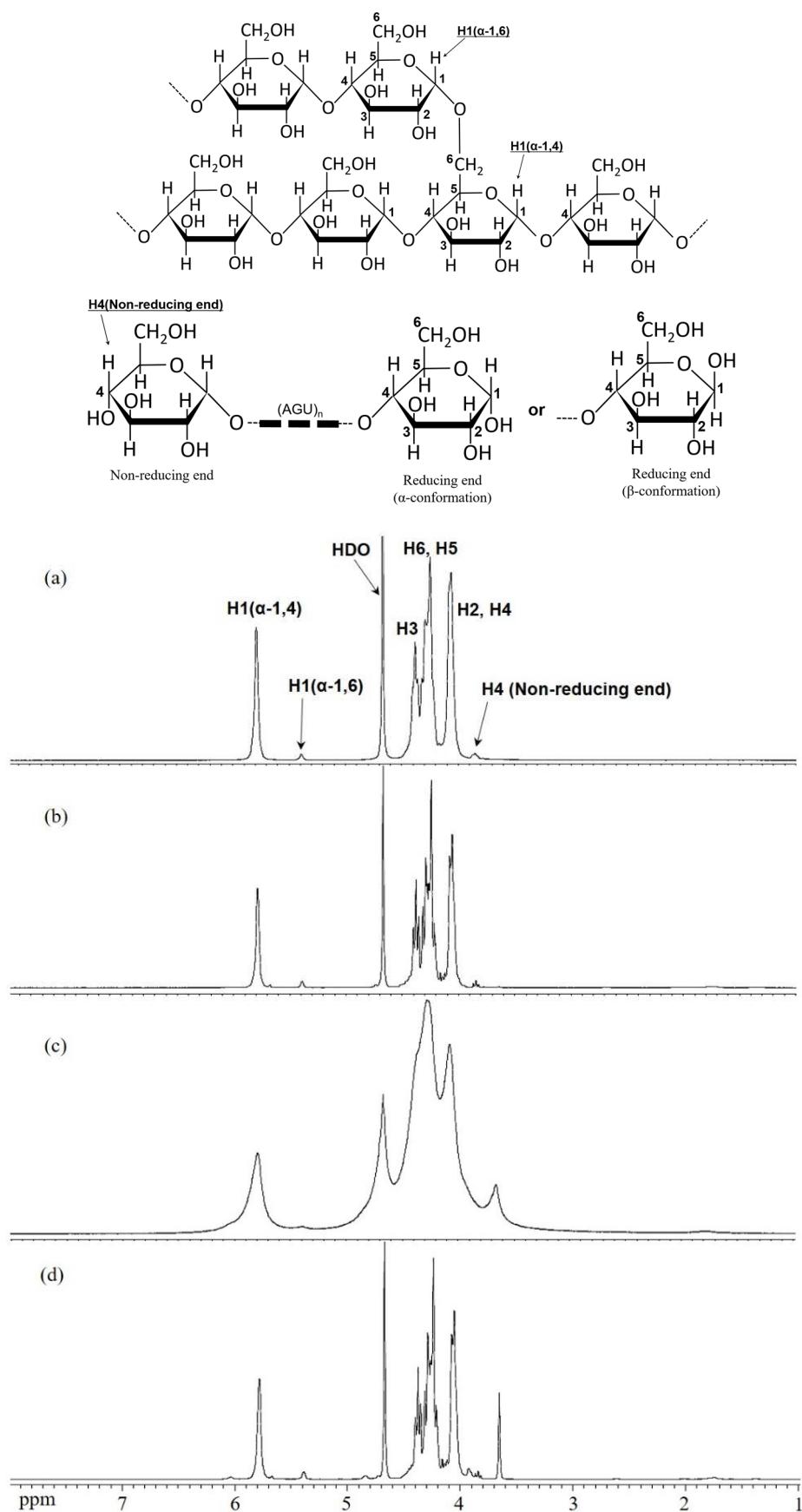


Fig.17 <sup>1</sup>H NMR spectra of (a) washed starch, (b) oxidized starch 4, (c) cationic starch, (d) sample 4, in D<sub>2</sub>O at 80 °C

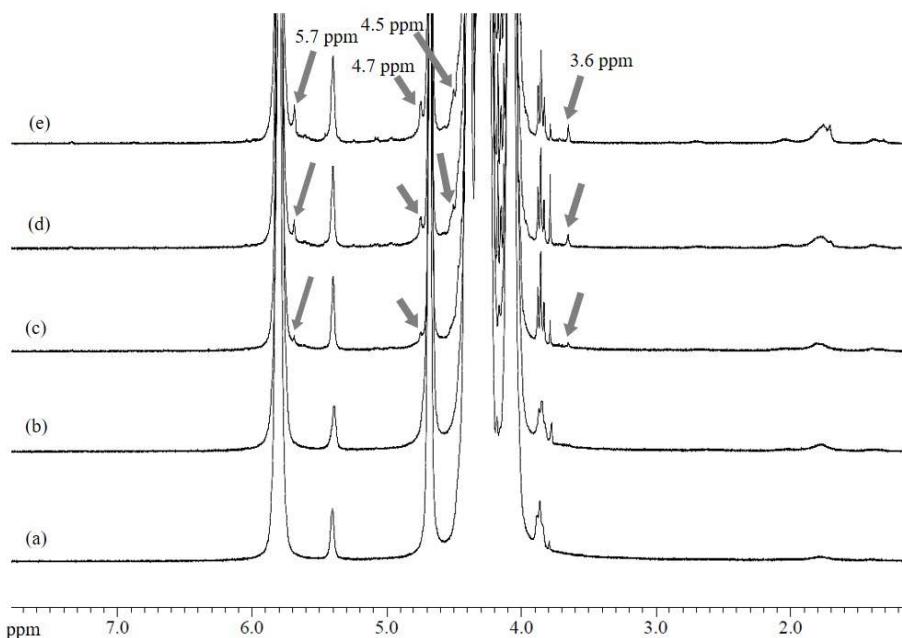


Fig.18 Comparison of  $^1\text{H}$  NMR spectra of (a) washed starch, (b) oxidized starch 1, (c) oxidized starch 2, (d) oxidized starch 3, (e) oxidized starch 4.

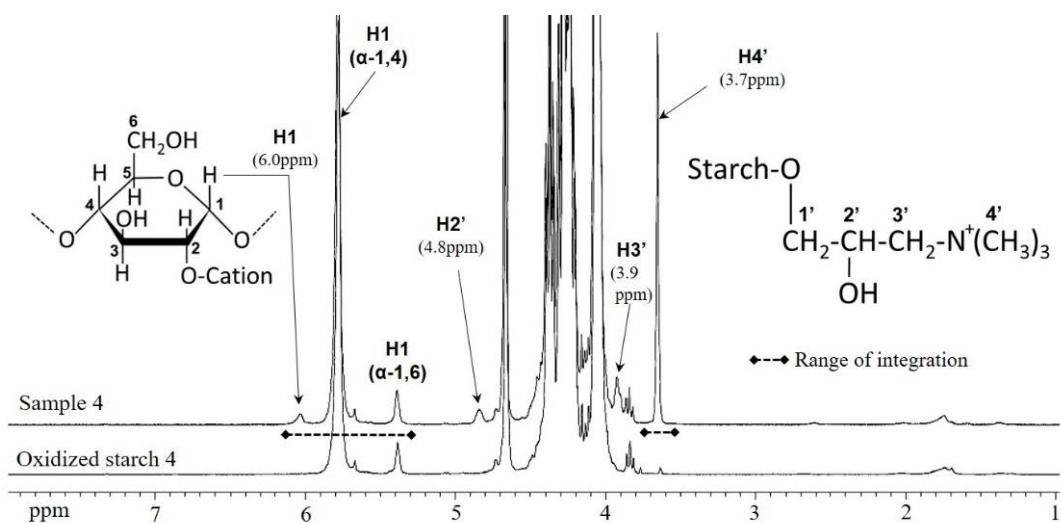


Fig.19 Signal assignment of cationic group of sample 4 in  $^1\text{H}$  NMR spectrum.

Table 3 Comparison of DS measured by NMR method and Kjeldahl method.

Sample name	NMR method		Kjeldahl method
	DS <sup>(*)</sup>	RSD (%)	
Sample 1	0.0354	0.28	0.0348
Sample 2	0.0340	0.29	0.0333
Sample 3	0.0322	0.18	0.0318
Sample 4	0.0314	0.18	0.0312

<sup>(\*)</sup> DS measured by NMR method was the mean of three test samples.

## 3.4 結果のまとめ

これまでの結果をTable 4にまとめて示す(ただし、よう素呈色反応及び光学顕微鏡観察の結果を除く)。

酸化(カルボキシ基)の確認は、カチオンリッチでカルボキシ基が最

も少ない分析試料1において困難であった。カチオン化(カチオン基)の確認は、カチオン基とアニオン基の多寡にかかわらず、すべての分析試料で可能であった。

Table 4 Results of analysis of all samples and all control samples.

Sample name	Ionic character	Ash (g/100g)	Beginning of gelatinization (°C)	Maximum viscosity (BU)	Identification of oxidation			Identification of cationization			
					Methylene blue	FT-IR <sup>(a)</sup>	<sup>1</sup> H NMR	Eosin Y	Py-GC/MS	<sup>1</sup> H NMR	
Washed starch	Slightly anionic	0.04	Criterion	Criterion	(-) <sup>(f)</sup>	Criterion	(-)	Criterion	(-)	(-)	(-)
Cationic starch	Cationic	0.01	↓ <sup>(d)</sup>	↑ <sup>(e)</sup>	(-)	① : (-) ② : (-)	N.A.	(+) <sup>(g)</sup>	(+)	(+)	N.A.
Sample 1 (Cation rich)	Amphoteric	<0.01	↓	↑	(-)	① : (-) ② : (±) <sup>(h)</sup>	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
Sample 2-3 (Cation rich)	Amphoteric	<0.01	↓	↓	(-)	① : (-) ② : (+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Sample 4 (Anion rich)	Amphoteric	0.36	↓	↓	(+)	① : (+) ② : (+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
Oxidized starches	Anionic	0.14 - 1.36	↓	↓ <sup>(i)</sup>	(+)	① : (+) ② : (-)	(+) <sup>(j)</sup>	(-)	(-)	(-)	(-)

<sup>(a)</sup> After HCl pretreatment. The absorption of 1620 cm<sup>-1</sup> of oxidized starches was shifted to 1740 cm<sup>-1</sup> by HCl pretreatment.

<sup>(b)</sup> It was assumed that these signals were derived from oxidation.

<sup>(c)</sup> These signals were assigned to cationic group.

<sup>(d)</sup> “↓” means the decrease in comparison with the criterion.

<sup>(e)</sup> “↑” means the increase in comparison with the criterion.

<sup>(f)</sup> “(-)” means “Negative” or “Not detected”.

<sup>(g)</sup> “(+)” means “Positive” or “Detected”.

<sup>(h)</sup> “(±)” means “Undeterminable”.

<sup>(i)</sup> Except oxidized starch 1.

## 4. 要 約

本研究では、カルボキシ基とカチオン基の含有量が異なる4種類のカチオン化酸化でん粉(分析試料)を作製し、各加工の確認における既存分析法の有効性を確認し、さらに機器分析をおこなった。

作製した分析試料4種のうち、3種はカチオン基含有量がカルボキシ基よりも多く(カチオンリッチ)、1種はカルボキシ含有量がカチオン基よりも多かった(アニオンリッチ)。

酸化(カルボキシ基)は、カチオンリッチな分析試料では確認するこ

とができないものがあったが、アニオンリッチな分析試料では、メチレンブルー試験、FT-IR及び<sup>1</sup>H NMRにより確認することができた。

カチオン化(カチオン基)は、カチオン基とアニオン基の多寡を問わず、エオシンY吸着試験、Py-GC/MS及び<sup>1</sup>H NMRにより、すべての分析試料において確認することができた。<sup>1</sup>H NMRでは定量(DSの測定)もおこなうことができた。

酸化及びカチオン化は、いずれもでん粉の粘度を変化させ、両加工を施した分析試料は、未加工の精製でん粉、酸化でん粉及びカチオン化でん粉のいずれとも異なる粘度を示した。

## 文 献

- 1) 島下昌夫:澱粉科学, **38**, 55-63 (1991)
- 2) 砂田美和:応用糖質科学, **1**, 29-(2011)
- 3) 独立行政法人農畜産業振興機構:「紙に使用されるデン粉」 ([http://www.alic.go.jp/joho-d/joho7\\_000044.html](http://www.alic.go.jp/joho-d/joho7_000044.html))
- 4) 中村道徳, 貝沼圭二編:“澱粉・関連糖質実験法”, PP.72-77, 298-299 (1986), 学研出版センター
- 5) Prakash R. Bhirud, Frank W. Sosulski, Robert T. Tyler, Meera Kweon : U.S.Patent 5827372 (1998.10.27)
- 6) Ali Hebeish, Amal Abdel-Rahman, Zeinb El-Hilw, Mohamed Hashem : *Starch*, **57**, 616-623 (2005)
- 7) Yingbin Wang, Wenlei Xie : *Carbohydrate Polymers*, **80**, 1172-1177 (2010)
- 8) John McMurry : “マクマリー有機化学”, P.788 (2001), 東京化学同人
- 9) 不破英次, 小巻利章, 檜作進, 貝沼圭二編:“澱粉科学の辞典”, P.59 (2003), 朝倉書店
- 10) 堀口博:“赤外吸光図説総覧”, PP.214-215 (1993), 三共出版
- 11) H.N. CHENG, THOMAS G. NEISS : *Polymer Reviews*, **52**, 81-114 (2012)
- 12) Jianwei Zhao, Zhenghong Chen, Zhengy Jin, Pieter de Waard, Piet Buwalda, Harry Gruppen, Henk A. Schols : *Carbohydrate Polymers*, **131**, 424-431 (2015)
- 13) Shiroza. T, Furihata. K, Endo. T, Seto. H, Otake. N : *Agricultural and Biological Chemistry*, **46**, 1425-1427 (1982)
- 14) R.A. de Graaf, G. Lammers, L.P.B.M. Janssen, A.A.C.M. Beenackers : *Starch*, **47**, 469 -475 (1995)
- 15) Morgan J. Tizzotti, Michael C. Sweedman, Daniel Tang, Christian Schaefer, Robert G. Gilbert : *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**, 6913-6919 (2011)