

ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) による でん粉誘導体のヘッドスペースガス分析

井上 純*, 明渡 計晃*, 廣瀬 達也*, 川口 利宗**

Analysis of Headspace Gas of Starch Derivatives by Gas Chromatograph Mass Spectrometer (GC/MS)

Jun INOUE*, Kazuaki AKEDO*, Tatsuya HIROSE* and Toshimune KAWAGUCHI**

*Osaka Customs Laboratory

4-10-3, Chikko, Minato-ku, Osaka 552-0021 Japan

**Present address: Kansai Airport Customs Branch, Osaka Customs

1 Minami, senshu-kuko, sennan, Osaka 549-0021 Japan

Analysis of starch derivatives is defined in Customs Analysis Method No. 403. Nevertheless, it is difficult to confirm whether there is any substitution in the case of a starch derivative with a low degree of substitution, and some analytical methods are so complicated that the results depend on skill. At present there is no simple analytical method that can be used for different types of starch derivative. This study aims to establish the headspace (HS) method for measurement by means of GC/MS as a new analytical method for starch derivatives. Using three major starch derivatives - starch acetate, hydroxypropyl starch and cationic starch - as analytical samples, reaction conditions for eliminating substituents and GC/MS measurement conditions for detecting resultant compounds were examined. As a result, compounds originating in substituents were detected in gases produced by the reactions of reagents with starch acetate, hydroxypropyl starch and cationic starch. Quantitative determination was performed on starch acetate with methyl butyrate selected as an internal standard substance and its DS value was compared with that obtained by the titration method.

1. 緒 言

でん粉誘導体は、でん粉に官能基を導入、付加したもので、糊化温度の低下、糊液の透明性の向上、老化の抑制、造膜性の向上などでん粉の物性を改善できることが知られている。これらの性質は、付加した官能基の種類や置換度 (DS 値 : Degree of Substitution) によって異なっており、主に DS 値が 0.01~0.1、すなわちでん粉中のグルコース残基 100 個あたり平均 1~10 個の官能基が付加しているでん粉誘導体が実用化されている。関税分類において、加工していない未処理でん粉は税番第 11.08 項に分類されるのに対して、でん粉誘導体のうち、アセチル化でん粉については DS 値が 0.01 以上のもの、その他のでん粉誘導体については、官能基が付加し物性が未処理でん粉と異なるものはでん粉誘導体として税番第 35.05 項に分類され、税率格差がある。

でん粉誘導体の分析法は税關分析法 No.403 で定められている。アセチル化でん粉の定性法は赤外吸収スペクトル (IR) で

エステルの吸収を確認する方法、定量法は水酸化ナトリウムでアセチル基を加水分解し、塩酸で滴定する方法で行っている。しかし、IR 法は、置換度の低いアセチル化でん粉ではエステルの吸収を確認しにくい点、滴定法は前処理及び滴定が煩雑であることから、滴定に高い技術を要する点がある。ヒドロキシプロピル化でん粉の分析は、よう化水素酸で分解して生成したプロピレンを GC で検出する方法 1) を用いているが、前処理が煩雑であり発生したプロピレンが極微量で分析が困難な場合がある。カチオン化でん粉の分析は、エオシン Y で染色して吸着性を観察する方法で行っているが、置換度が低い試料では色素の吸着が明瞭でないことがある。このように、各種でん粉誘導体に共通する短時間で行える簡易な定性法が無いのが現状である。

今回、でん粉誘導体の新たな分析法として、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) を用いたヘッドスペース (HS) 法に注目した。HS 法とは、一般的な GC/MS の測定のように、バイアル中の溶液を注入するのではなく、バイアル上部つまりヘ

*大阪税關業務部 〒552-0021 大阪府大阪市港区築港 4-10-3

**現在所属 大阪税關関西空港税關支署

〒549-0021 大阪府泉南市泉州空港南 1

ヘッドスペースの気体 (HS ガス) を GC/MS に注入するサンプリング法の事である。バイアル中で各種でん粉誘導体に特有の置換基由来の化合物を発生させ GC/MS で検出する分析法を確立するため、置換基脱離反応の反応条件及び GC/MS での検出条件の検討を行った。また、DS 値に基準を設けていたアセチル化でん粉については、定量する必要があることから、HS 法による定量性についても併せて検討した。

2. 実験

2. 1 試料及び試薬

2. 1. 1 試料

アセチル化でん粉 3 種類 (松谷化学提供)

ヒドロキシプロピル化でん粉 5 種類 (松谷化学提供)

カチオン化でん粉 2 種類 (松谷化学提供)

未処理でん粉 (とうもろこし及び馬鈴薯各 1 種類)

2. 1. 2 試薬

Trimethylsulfonium hydroxide (以下 TMSH) 0.2M メタノール溶液 (東京化成製)

Phenyltrimethylammonium hydroxide (以下 PTAH) 20~25% メタノール溶液 (東京化成製)

m-(Trifluoromethyl) phenyltrimethylammonium hydroxide (以下 m-TFPTAH) 5% メタノール溶液 (東京化成製)

よう化水素酸 (和光純薬製・特級)

酢酸メチル (和光純薬製・特級)

水酸化ナトリウム (キシダ化学製・特級)

2. 2 装置及び分析条件

ガスクロマトグラフ質量分析計 : GCMS-QP2010 (島津製作所製)

カラム : DB-5 (30m × 0.25mm I.D. × 0.25 μ m)

注入口温度 : 200°C

検出器温度 : 210°C

キャリアガス : ヘリウム

カラム流量 : 1.00mL/min

スプリット比 : 定性分析 100 : 1, 定量分析 50 : 1

シリジン : 2.5mL

注入量 : 定性分析 250 μ L, 定量分析 1000 μ L

オートサンプラー : AOC-5000 (島津製作所製)

2. 3 実験方法

2. 3. 1 定性分析

(1) アセチル化でん粉

HS 用バイアルにアセチル化でん粉 30mg を入れ TMSH 0.2 mol/L メタノール溶液 0.2mL を加えて密栓し、アジテーター中 50°C で 3 分間加熱攪拌した。その後、HS ガスを GC/MS に注入し、50°C 定温で 5 分間測定した。

また TMSH 溶液に代えて、アセチル基のメチルエステル化剤として PTAH 20~25% メタノール溶液 0.5mL、あるいは m-TFPTAH 0.5% メタノール溶液 1 mL をバイアルに加えて同様の

条件で測定を行った。

(2) ヒドロキシプロピル化でん粉

HS 用バイアルにヒドロキシプロピル化でん粉 10mg を入れよう化水素酸 1 mL を加えて密栓し、アジテーター中 100°C で 3 分間加熱攪拌した。その後、HS ガスを GC/MS に注入し、50°C の定温で 5 分間測定した。

(3) カチオン化でん粉

HS 用バイアルにカチオン化でん粉 100mg を入れ 10mol/L 水酸化ナトリウム 1 mL を加えて密栓し、アジテーター中 150°C で 5 分間加熱攪拌した。その後、HS ガスを GC/MS に注入し、50°C 定温で 5 分間測定した。

2. 3. 2 定量分析

(1) 内標準原液の調製

酢酸メチルを 0.25% (w/v) 溶液となるように 100mL メスフラスコに採取し、メタノールで定容して、これを内標準原液とした。

(2) 標準酢酸メチル原液の調製

酢酸メチル約 100mg、約 500mg を精秤し 100mL 容メスフラスコ 2 本にそれぞれ採取した。メタノールで定容して 2 種類の濃度 (0.1%, 0.5% (w/v)) の標準酢酸メチル原液を調製した。

(3) 反応試薬希釈液 (TMSH) の調製

TMSH 0.2mol/L メタノール溶液をメタノールで 4 倍に希釈して、TMSH 0.05mol/L メタノール溶液を調製した。

(4) 検量線用標準溶液の調製

(2) で調製した 0.1% 標準酢酸メチル原液 1 mL, 2 mL 及び 4 mL, 0.5% 標準酢酸メチル原液 2 mL 及び 4 mL を 20mL 容メスフラスコ 5 本にホールピペットでそれぞれ正確に量りとった。更に (1) で調製した内標準原液 4 mL, 反応試薬 m-TFPTAH 5% メタノール溶液 3 mL をそれぞれホールピペットで加え、メタノールで定容した。これら 5 種類の溶液を検量線用標準溶液 (m-TFPTAH) とした。

また、反応試薬として m-TFPTAH 5% メタノール溶液に代えて (3) で調製した TMSH 0.05mol/L メタノール溶液 5 mL をホールピペットで加え、それ以外については同様の操作を行い、検量線用標準溶液 (TMSH) を調製した。

(5) 検量線の作成

内容量 10mL の HS 用バイアルに超純水 5 mL をホールピペットで加え、(4) で調製した検量線用標準溶液 10 μ L をマイクロシリジンで加え密栓した。バイアルをアジテーター中、60°C で 30 分間加熱攪拌し、その後 HS ガスを GC/MS で 35°C 定温で 5 分間測定した。各濃度について 5 回ずつ測定を行い、内標準物質と酢酸メチルの重量比と定量イオンの面積比について検量線を作成した。

(6) 反応溶液の調製

20mL 容メスフラスコに内標準原液 4 mL, 反応試薬 m-TFPTAH 5% メタノール溶液 3 mL をそれぞれホールピペットで加え、メタノールで定容し、反応溶液 (m-TFPTAH) を調製した。また、20mL 容メスフラスコに内標準原液 4 mL, 反応試薬 TMSH 0.2mol/L メタノール溶液 5 mL をそれぞれホールピペット

トで加え、メタノールで定容し、反応溶液（TMSH）を調製した。

(7) 反応操作手順

50mLナス型フラスコにアセチル化でん粉100mgと(6)で調製した反応溶液（酪酸メチル500 μ L/mL, m-TFPTAH0.75%）6mLを入れ、スターラーで攪拌して室温で反応させた。1時間おきに反応溶液10 μ Lをバイアルに採取して、超純水5mLで希釈し密栓した。アジテーター中、60°Cで30分間加熱攪拌し、その後HSガスをGC/MSで35°C定温で5分間測定して酢酸メチルの生成量を測定した。また反応溶液（酪酸メチル500 μ L/mL, TMSH 0.05mol/L）についても同様の操作を行った。

3. 結果及び考察

3. 1 定性分析

3. 1. 1 アセチル化でん粉

(1) TMSH

未処理のタピオカでん粉及びアセチル化でん粉をTMSHと反応させたところ、いずれのHSガスのトータルイオンクロマトグラム上にも保持時間1.57分付近に巨大なピークが現れ（Fig.1）、マススペクトルを検索した結果、いずれもジメチルスルフィドと同定された。しかし、アセチル化でん粉のクロマトグラムに現れたピークのマススペクトルを観察したところ、ジメチルスルフィドのフラグメントイオンの他にアセチル化でん粉由来の酢酸メチルのフラグメントイオンと思われるm/z 43, 59, 74も確認され、酢酸メチルの生成が示唆された。

(2) PTAH

アセチル基のメチルエステル化剤としてPTAHを用いて(1)と同様の操作を行った。アジテーター中50°Cで10分間加熱攪拌したところ、酢酸メチルはほとんど検出されなかった。そこで、アジテーターの温度を120°Cに昇温し10分間加熱攪拌したところ、わずかに酢酸メチルが検出された（Fig.2）。

(3) m - TFPTAH

アセチル基のメチルエステル化剤としてm-TFPTAHを用いて(1)と同様の操作を行った。すると、アセチル化でん粉とm-TFPTAHとのHSガスのマスクロマトグラムには、1.6分付近に原料でん粉には無いピークが認められた（Fig.3）。このピークはマススペクトルより酢酸メチルと同定され、でん粉中のアセチル基が脱離していることが確認された。

以上3種類のメチルエステル化剤を用いてアセチル化でん粉の置換基脱離反応を行った結果、m-TFPTAHが最適であることが分かった。

3. 1. 2 ヒドロキシプロピル化でん粉（HPS）

未処理でん粉あるいはHPSをよう化水素酸と反応させたところ、いずれのHSガスからもよう化メチルが検出された。またHPSのHSガス中には2.05分付近にヒドロキシプロピル基由來のよう化プロピルが大きく検出された（Fig.4）。置換度の異なる5種類のHPS（DS値約0.02-約0.10）について同様の分析を行ったが、いずれのHSガスからもよう化プロピルが検出された。

3. 1. 3 カチオン化でん粉

未処理でん粉あるいはカチオン化でん粉を水酸化ナトリウム水

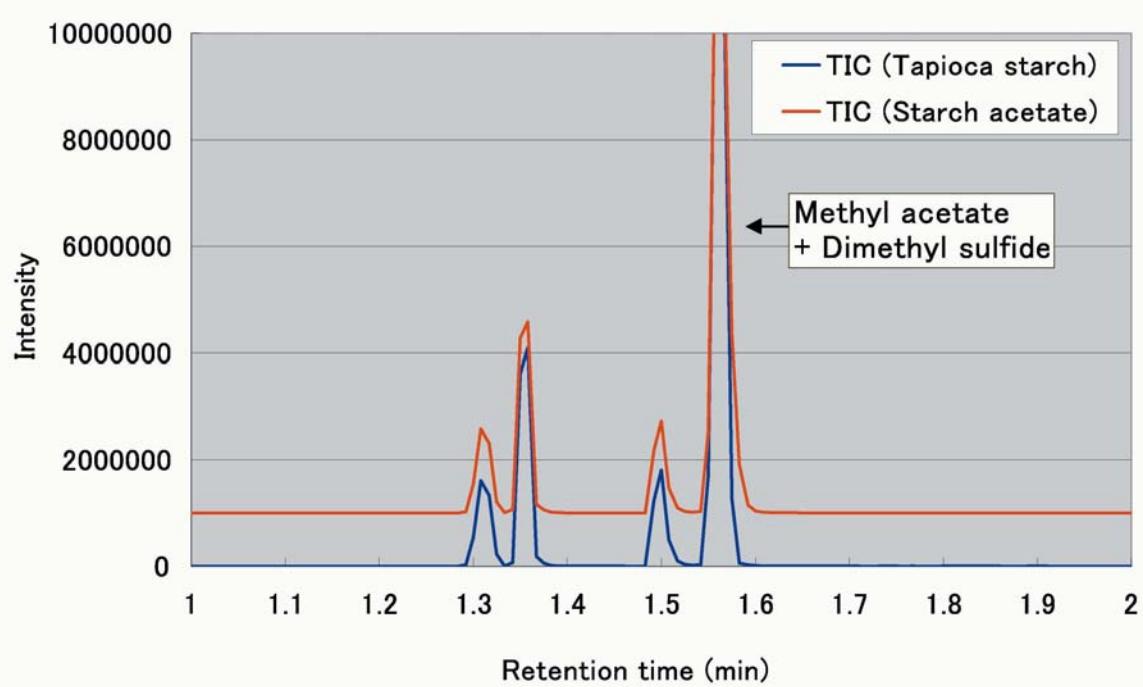


Fig. 1 Total ion chromatograms of headspace gases over starch or starch acetate with TMSH

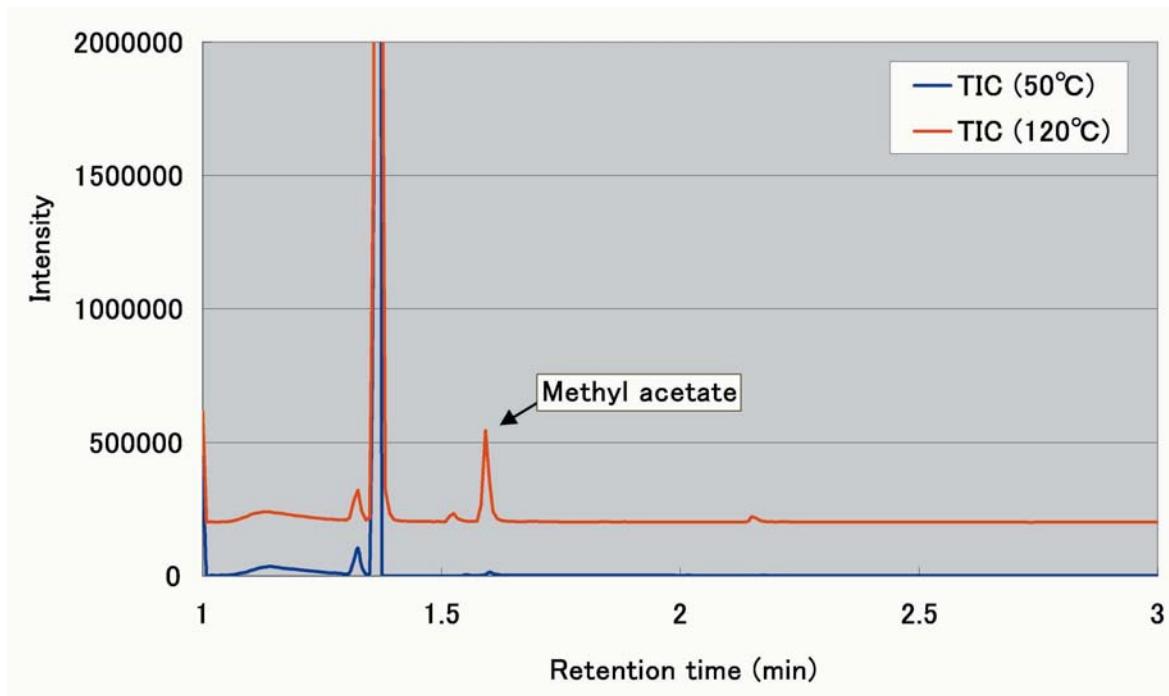


Fig. 2 Total ion chromatograms of headspace gases over starch and starch acetate with PTAH

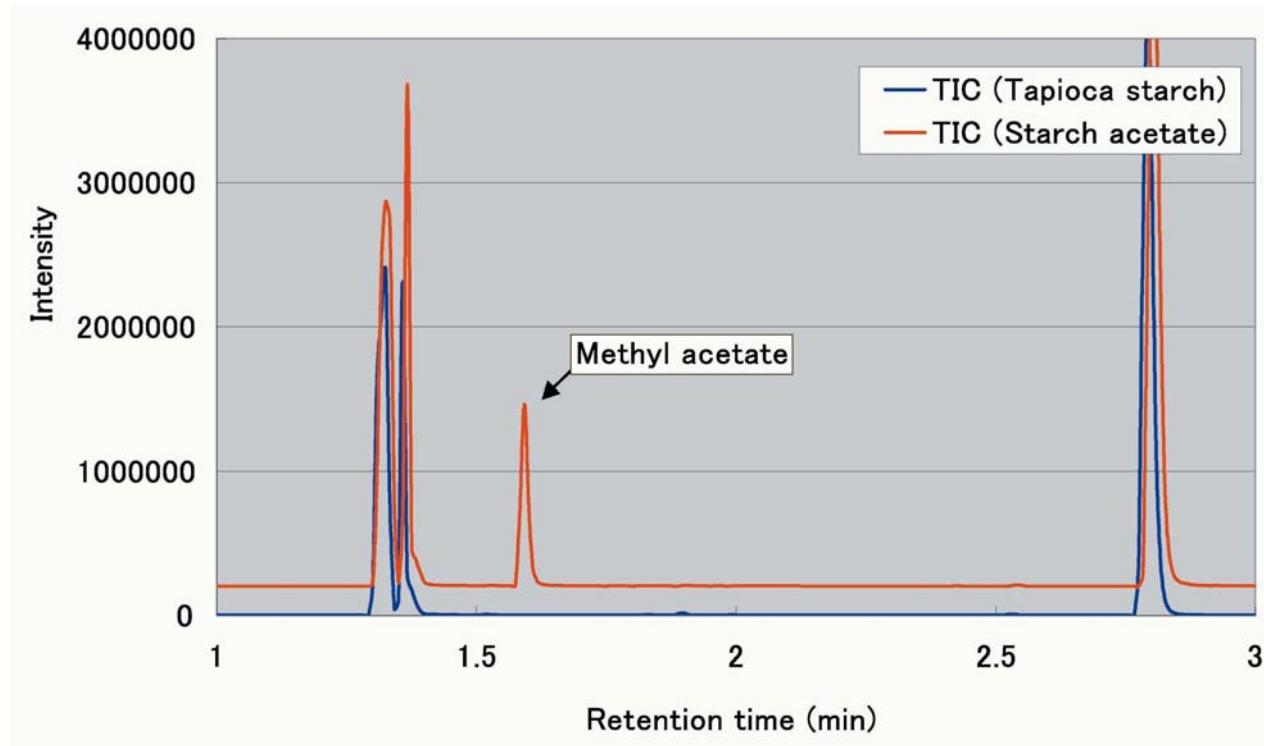


Fig. 3 Total ion chromatograms of headspace gases over starch and starch acetate with m-TFPTAH

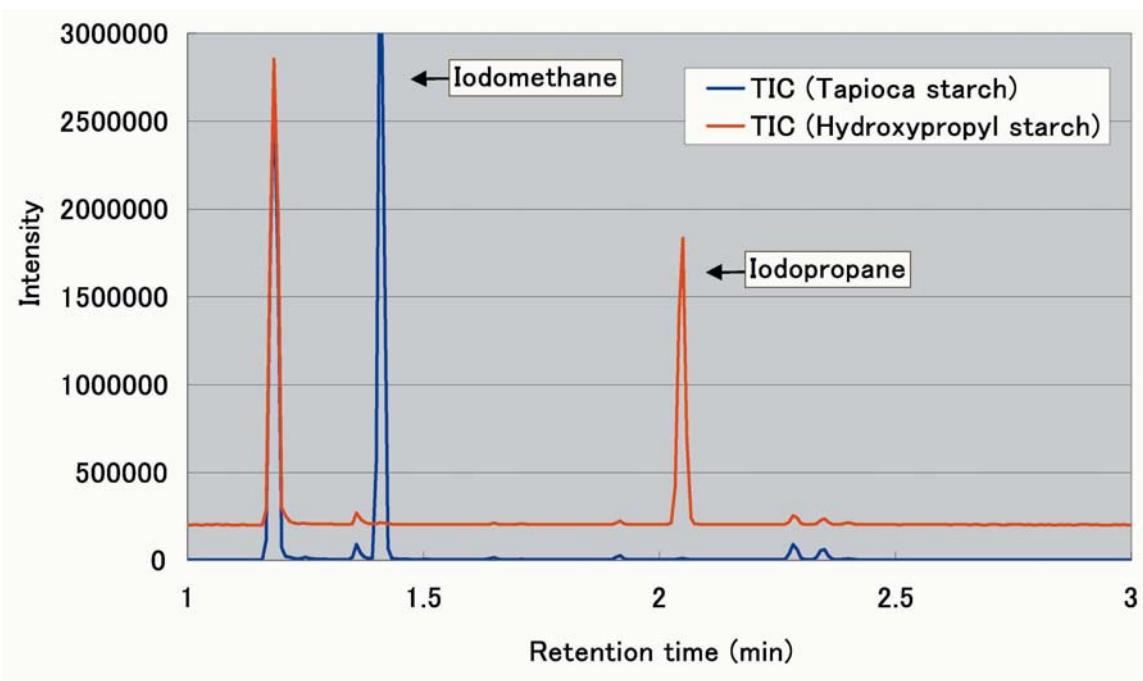


Fig. 4 Total ion chromatograms of the headspace gases over starch and HPS with hydroiodic acid

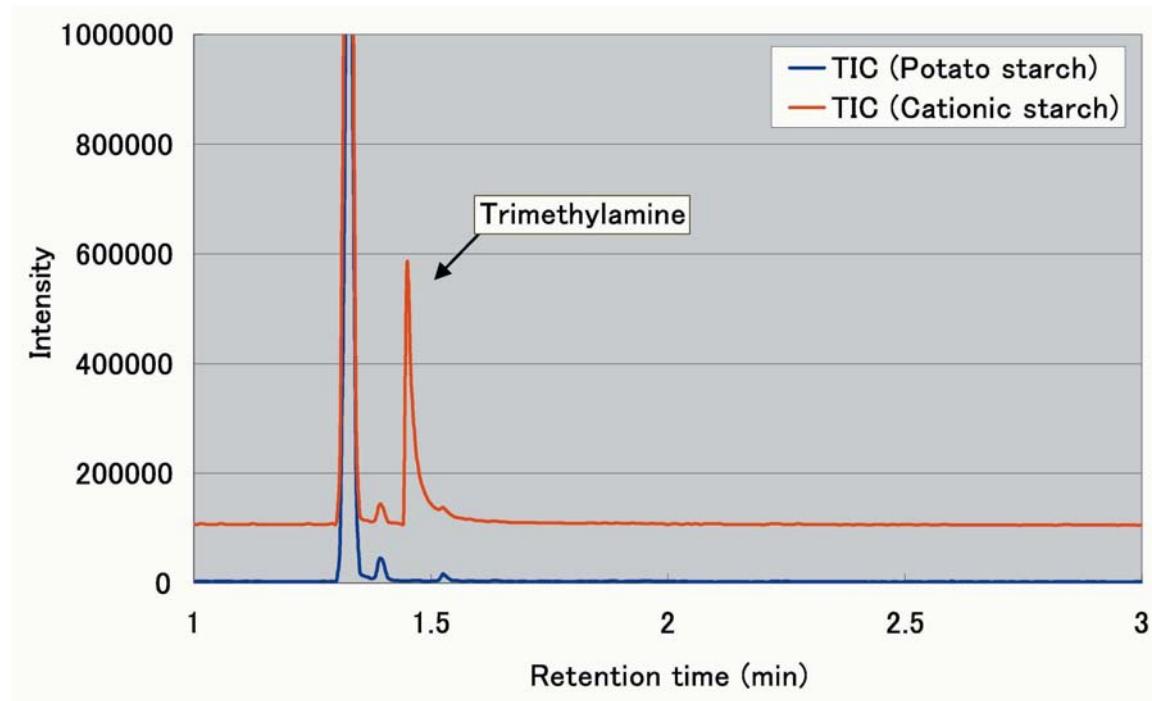


Fig. 5 Total ion chromatograms of headspace gases over starch and cationic starch with sodium hydroxide solution

溶液と反応させたところ、カチオン化でん粉の HS ガス中からは、保持時間 1.44 分付近に置換基由来と考えられるトリメチルアミンが検出された (Fig.5)。この反応は DS 値が約 0.02 のもの

と約 0.05 の 2 種類のカチオン化でん粉について行ったが、いずれの HS ガスからもトリメチルアミンが検出された。

3. 2 アセチル化でん粉の DS 値の決定

3. 2. 1 m-TFPTAH による定量

(1) 検量線の作成

アセチル化でん粉の DS 値の定量を行うにあたり、①メチルエステル化剤には影響を受けない、②GC/MS で測定する際、定量する酢酸メチルとピークが重ならない、という 2 点を考慮して検討した結果、内標準物質に酪酸メチルを選択した。

50~1000 μL/mL の 5 種類の検量線用酢酸メチル標準溶液を調製し、各々の標準溶液について内容量 10mL の HS 用バイアルに 10 μL ずつ採取して超純水 5 mL で希釈し密栓した。これらの標準希釈溶液をアジテーター中 60°C で 30 分加熱攪拌し、気液平衡に達したところで HS ガスを GC/MS に注入して 35°C 定温で 5 分間測定した。

標準希釈溶液のトータルイオンクロマトグラムには、定性分析の結果と同様に、酢酸メチルは 1.6 分付近、酪酸メチルは 3.7 分付近にピークが認められ、そのピーク付近には定量を阻害する妨害ピークは認められなかった (Fig.6)。

酢酸メチル及び酪酸メチルのマススペクトルより定量イオンを酢酸メチルは m/z 74、酪酸メチルは m/z 87 に決定し、各イオンの面積比と濃度比について検量線を作成したところ、相関係数 0.999 の良好な直線性を示し、DS 値の定量は十分可能であると判断した (Fig.7)。また、各濃度について 5 回ずつ測定したところ面積比の変動係数は 1.6~3.3% と繰り返し精度は良好であった (Table 1)。

(2) 反応時間の検討

アセチル化でん粉と m-TFPTAH との反応時間について検討した。50mL ナス型フラスコ中、メチルエステル化溶液 (酪酸メチル 500 μL/mL, m-TFPTAH 0.75%) 6 mL に DS 値の異なるアセチル化でん粉 (A, B, C) 100mg を加え、スターラーで攪拌して室温で反応させた。1 時間おきに反応溶液 10 μL を採取し、検量線作成時と同様に希釈し HS ガスを GC/MS で測定し、酢酸メチルの生成量を観測した (Fig. 8)。

縦軸にそのアセチル化でん粉のアセチル基全てが脱離した場

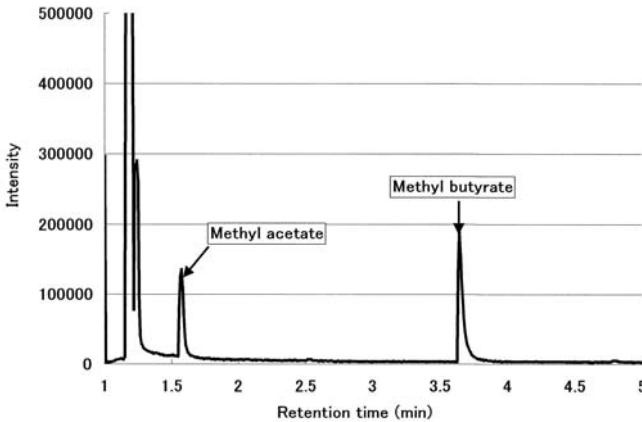


Fig. 6 Total ion chromatograms of headspace gases over starch acetate with TMSH

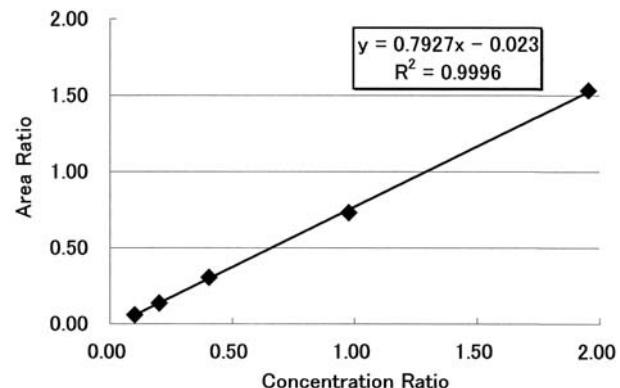


Fig.7 Calibration curve of methyl acetate eliminated of constituents by m-TFPTAH

Table 1 Reproducibility of methyl acetate to methyl butyrate peak area ratios (n=5)

Concentration ratio	Area ratio	Coefficient of Variation (%)
0.1013	0.0613	2.790
0.2025	0.1373	3.293
0.4051	0.3060	2.421
0.9766	0.7312	2.621
1.9532	1.5334	1.618

合の理論値から計算した反応率、横軸に反応時間をとりプロットしたところ、DS 値の異なるどのでん粉も室温では反応速度は非常に遅く、3 時間後でも反応は 70% 程度しか終了しなかった。DS 値の最も低いアセチル化でん粉 A (DS 0.014) に対して、試薬である m-TFPTAH を約 30 当量と大過剰に加えているにも関わらず反応が完全に進まない事が判明したため、m-TFPTAH によるアセチル基脱離は困難であると判断し他の試薬を検討した。

3. 2. 2 TMSH による定量

(1) 検量線の作成

TMSH についても、m-TFPTAH の時と同濃度の 5 種類の検量線用酢酸メチル標準溶液を調製し、これらの標準希釈溶液を GC/MS で測定して検量線を作成した。この検量線は相関係数 0.999 の良い直線性を示した (Fig.9)。また、各濃度について 5 回ずつ測定したところ面積比の変動係数は 0.9~2.1% と繰り返し精度は良好であった (Table 2)。

(2) 反応時間の検討

TMSH の反応時間について検討した。m-TFPTAH と同様に、DS 値の異なる 3 種類のアセチル化でん粉を用いて TMSH と反応

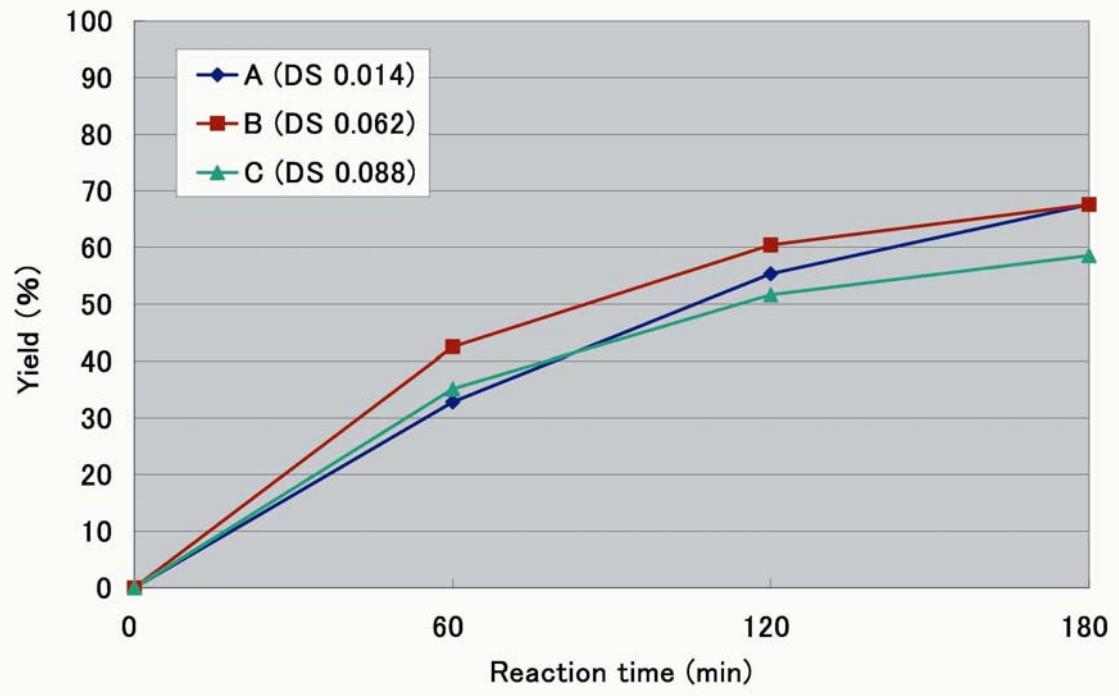


Fig. 8 Relationship between reaction time and yield of methyl acetate

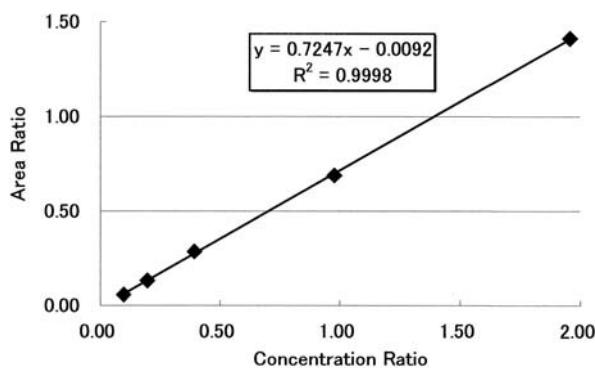


Fig. 9 Calibration curve of methyl acetate eliminated by TMSH

させ、1時間おきに $10\mu\text{L}$ を採取して同様の操作を行い、酢酸メチルの生成量を観測した (Fig.10)。

1時間後には 82～87% のアセチル基が脱離し酢酸メチルが生成していたが、3時間後でも反応は 90～95% に留まっており、TMSH によるメチルエステル化もやはり完全には進まない事が判明した。

4. 要 約

HS 法によるでん粉誘導体の定性及び定量分析について検討した。

Table 2 Reproducibility of methyl acetate to methyl butyrate peak area ratios ($n=5$)

Concentration ratio	Area ratio	Coefficient of Variation (%)
0.0985	0.0588	2.127
0.1971	0.1336	0.893
0.3942	0.2868	1.612
0.9781	0.6899	1.442
1.9562	1.4116	0.949

定性分析については、アセチル化でん粉、ヒドロキシプロピル化でん粉、カチオン化でん粉には、それぞれ m-TFPTAH メタノール溶液、よう化水素酸、水酸化ナトリウム水溶液を加えることで置換基特有の物質を発生させ、GC/MS で検出した。この HS 法はでん粉誘導体の簡易定性法として有効である。

定量分析については、内標準物質として酢酸メチルを用いて反応生成物である酢酸メチルとの検量線を作成したところ、酢酸メチルと酢酸メチルの濃度比と定量イオンの面積比の間には良好な直線性が認められた。また、繰り返し測定を行ったところ変動係数はほぼ 1～3 % で、HS 法による酢酸メチルの定量

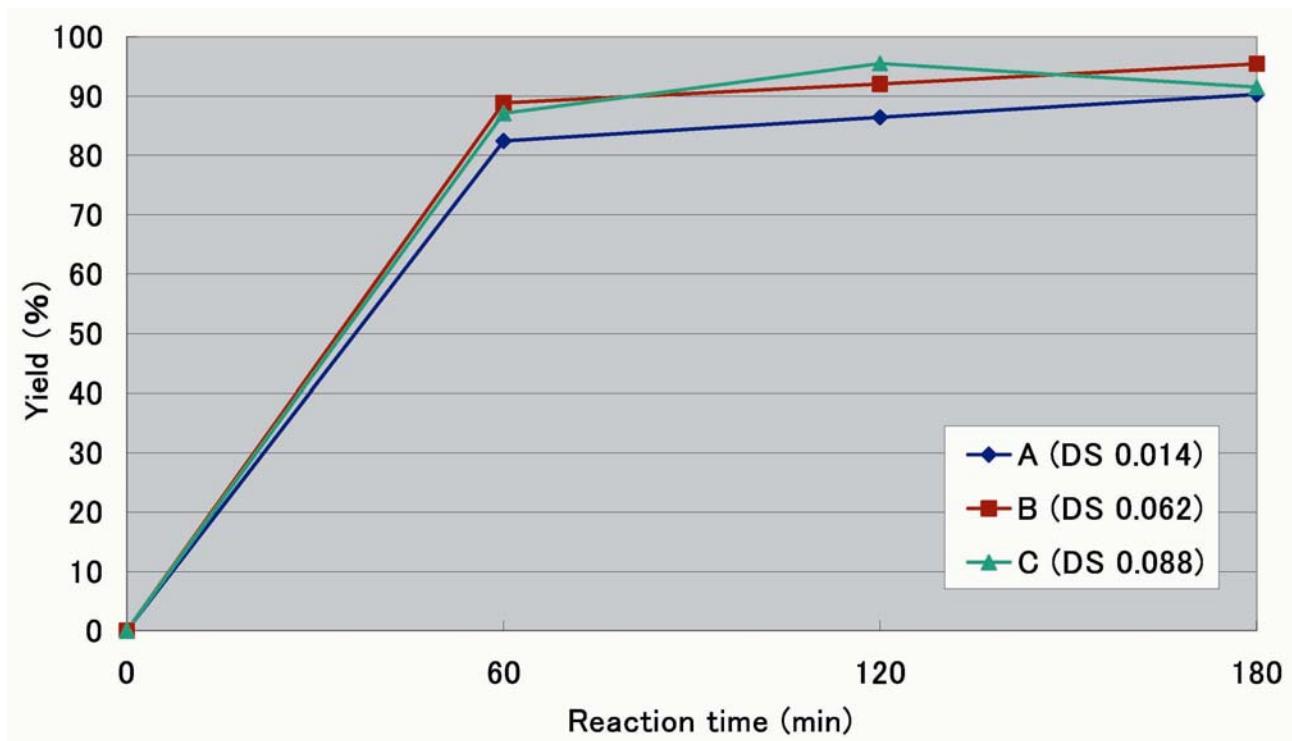


Fig. 10 Relationship between reaction time and yield of methyl acetate

は可能であることがわかった。アセチル化でん粉のアセチル基を完全に脱離できる試薬を用いることで、アセチル化でん粉のDS値が決定できるものと考えられる。

文 献

- 1) 川端省三, 井上昭朗: 関税中央分析所報, 22, 55 (1981)