

核磁気共鳴分光法によるでん粉誘導体の分析

竹元 賢治*, 三浦 徹*, 梅田 寛*, 水田 完*, 村上 孝之*, 笹川 邦雄*, 倉嶋 直樹**, 朝長 洋祐**

Analysis of Modified Starch by NMR Spectrometry

Kenji TAKEMOTO*, Toru MIURA*, Hiroshi UMEDA*, Yutaka MIZUTA*, Takayuki MURAKAMI*, Kunio SASAKAWA*,
Naoki KURASHIMA and Hirotsuke TOMONAGA*

Abstract

This study aims to establish a qualitative analysis method that can be applied to various modified starches, especially for samples having a low DS value, by using the nuclear magnetic resonance (NMR) method. Using six starch derivatives - starch acetate, hydroxypropyl starch, cationic starch, starch sodium octenylsuccinate and acetylated distarch adipate - as analytical samples, ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were measured and analyzed. We also examined application of the method to rice flour preparations mixed modified starches. As a result, we assigned the substituents of starch acetate, hydroxypropyl starch, cationic starch, starch sodium octenylsuccinate and acetylated distarch adipate. We also confirmed that rice flour preparations mixed starch acetate contained acetyl groups.

1. 緒 言

でん粉は、増粘効果、分散・乳化効果、保水効果といったその高分子特性から、食品を始め、製紙、接着剤、電池等の工業製品などに様々な用途で幅広く使用されている。また、でん粉が持っている欠点である老化現象を改善し、更に用途の拡大を図る為に、でん粉分子の一部を官能基に置換、酸化分解等の変性を施し、でん粉にはない特性をもたせた各種の変性でん粉も広く一般社会に流通している。

これらの変性でん粉は、単体での輸入のみならず、米粉や小麦粉等の穀粉と混合し、調製食料品として輸入されることも多い。関税率表において、変性でん粉（第35.05項）と未変性でん粉（第11.08項）の間には大きな税率格差が存在し、また穀粉そのものと穀粉とそれらの変性でん粉との混合調製品として輸入される場合も同様に、大きな税率格差が発生するため、変性でん粉の有無を確認する事は税関分析において重要な分析項目の一つとなっている。変性でん粉のうち、官能基による置換がなされたでん粉誘導体の分析は、税関分析法No.403に従って行われているが、現在のところ、各種でん粉誘導体ごとに分析法が定められており、それぞれの誘導体に対応する分析法で分析が行われている。その為、変性の種類が不明なでん粉誘導体を分

析する場合、所定の分析法を網羅的に行う必要があり、分析に時間を要するという問題点がある。従って、簡易にでん粉の変性の種類を定性することができれば非常に便利であり、有効であると考えられる。簡易な変性でん粉の定性法として、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）法が報告されている¹⁾。

そこで今回、簡易かつ迅速に、でん粉の変性の種類にかかわらず適用できる定性分析法として核磁気共鳴分光法（NMR法）を検討した。これまで、でん粉誘導体分析へのNMR法の適用は、山崎らが3種のでん粉誘導体について固体NMR法で測定し、報告している²⁾。本研究では、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、オクテニルコハク酸でん粉、りん酸架橋でん粉及びアジピン酸架橋アセチル化でん粉といった、さらに多種類のでん粉誘導体の分析を行い、これら誘導体の種類の定性が可能かどうか検証したので報告する。

また、米粉調製品中の変性でん粉の変性の有無についても同様に、NMR法により検討したので合わせて報告する。

2. 実 験

2. 1 試料及び試薬

* 東京税関業務部 〒135-8615 東京都江東区青海2-56

** 財務省関税中央分析所 〒277-0882 千葉県柏市柏の葉6-3-5

2. 1. 1 試料

未変性タピオカでん粉：日澱化学(株)提供

りん酸架橋でん粉：日澱化学(株)製

アセチル化タピオカでん粉：日澱化学(株)製；DS値の異なるもの3種類（DS値

No.1=0.0048, No.2=0.0109,

No.3=0.112）（DS値0.01はグルコース単位1000個に対し置換基10個）

ヒドロキシプロピル化でん粉：日澱化学(株)製；DS値=0.0946

オクテニルコハク酸でん粉：輸入品

カチオン化でん粉：輸入品

アジピン酸架橋アセチル化でん粉：輸入品

アセチル化でん粉米粉調製品（重量比 アセチル化でん粉17%，米粉83%），原料アセチル化でん粉及び原料米粉：輸入品

2. 1. 2 試薬

重水：99.9%（和光純薬工業(株)製）

2. 2 測定機器及び分析条件

NMR装置：JMN-LA-300（日本電子(株)製），MERCURY-300（VARIAN製）

観測核： ^1H ， ^{13}C

待ち時間：5sec

^1H 積算回数：128～1024

^{13}C 積算回数：2048～8192

測定法：一次元NMR，二次元NMR（COSY（Correlation Spectroscopy，相関分光法）及びHMQC（Heteronuclear Multiple Quantum Coherence，異核間の多量子コヒーレンス））

2. 3 実験方法

2. 3. 1 ^1H NMR

NMR用試料管（外径5mm）に試料約20mgを量り取り，重水約0.5mlを加えて混合し，熱湯浴中で溶液が透明になるまで加熱した。放冷後，NMR装置で ^1H NMRスペクトルを測定した。

2. 3. 2 ^{13}C NMR

NMR用試料管（外径5mm）に試料約50mgを量り取り，重水約0.5mlを加えて混合し，熱湯浴中で溶液が透明になるまで加熱した。放冷後，NMR装置で ^{13}C NMRスペクトルを測定した。

2. 3. 3 二次元NMR（COSY，HMQC）

カチオン化でん粉及びオクテニルコハク酸でん粉の ^{13}C NMR測定用サンプルを用い，COSY及びHMQCスペクトルを測定した。

3. 結果及び考察

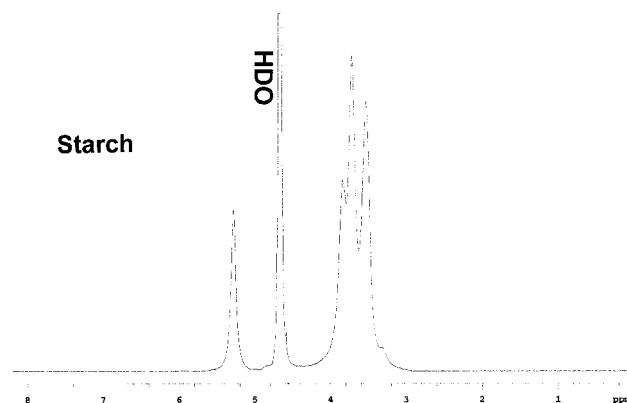


Fig.1 ^1H NMR spectrum of unmodified tapioca starch.

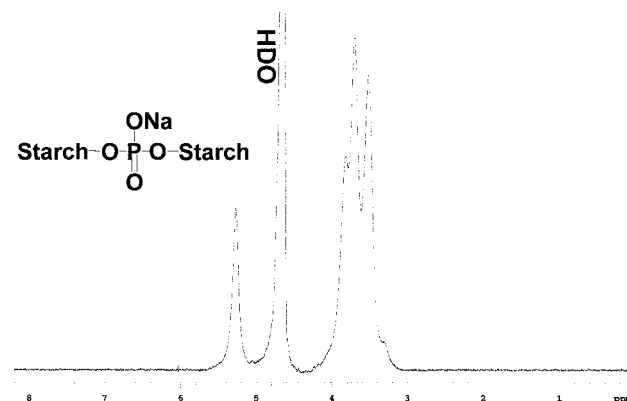


Fig.2 ^1H NMR spectrum of distarch phosphate.

3. 1 各種でん粉誘導体のNMRスペクトル及びその帰属

3. 1. 1 りん酸架橋でん粉

未変性タピオカでん粉及びりん酸架橋でん粉の ^1H NMRスペクトルを測定した結果をFig.1, 2に示す。未変性タピオカでん粉と比較して，りん酸架橋でん粉についてはスペクトルに変化は見られず，りん酸基の検出はできなかった。

3. 1. 2 アセチル化でん粉

アセチル化でん粉を水で洗浄する前及び洗浄後に ^1H NMRスペクトルの測定を行った結果をFig.3に示す。洗浄前のアセチル化でん粉のスペクトルにおいて未変性タピオカでん粉では検出されないシグナルが2本，高磁場側に検出された（2.07，1.85ppm）。これらの化学シフト値は，一般的なアセチル基の化学シフト値と一致している。また，洗浄により，遊離の酢酸を除去した試料のスペクトルでは，1.85ppmのシグナルが消失した。従って，1.85ppmのシグナルは遊離の酢酸のメチルプロトンであり，2.07ppmのシグナルはアセチル化でん粉のアセチル基のメチルプロトンと帰属した。

次に，未変性タピオカでん粉及びアセチル化でん粉の ^{13}C NMRスペクトルを測定した結果をFig.4, 5に示す。アセチル化でん粉の ^{13}C NMRスペクトルは未変性タピオカでん粉のスペクトルと比較して，低磁場側及び高磁場側にそれぞれ，未変性タピオカでん粉では検出されない2本のシグナル（173.5，

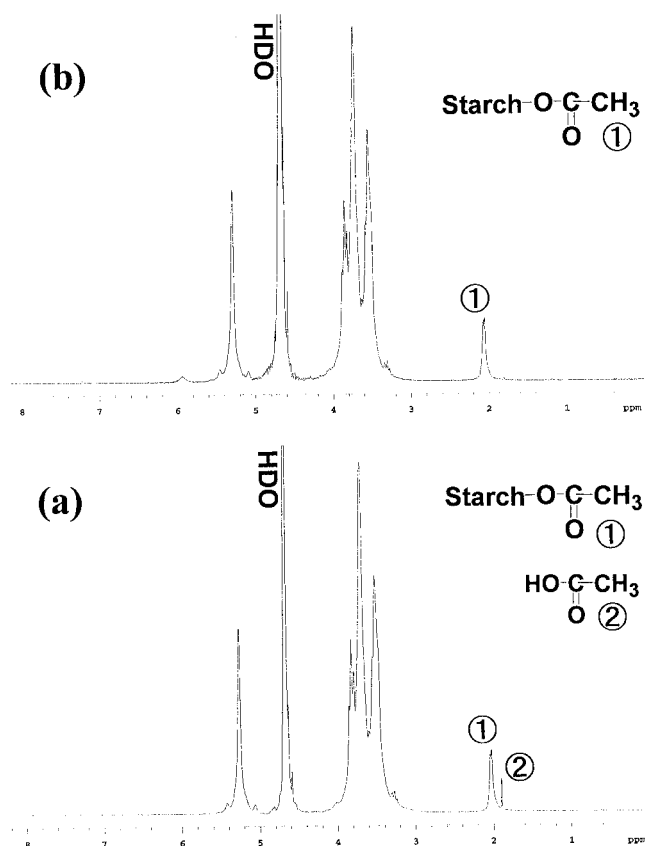


Fig.3 ^1H NMR spectra of (a) unwashed and (b) washed starch acetate.

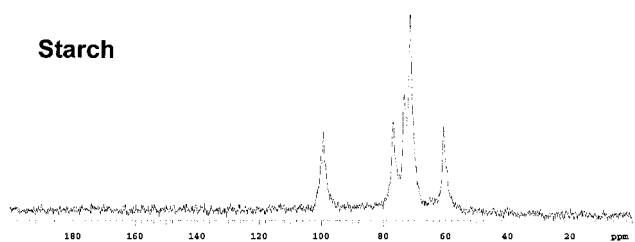


Fig.4 ^{13}C NMR spectrum of unmodified tapioca starch.

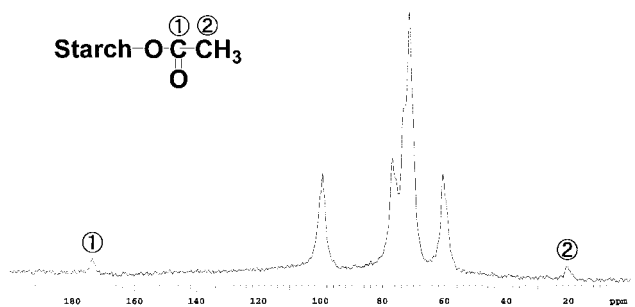


Fig.5 ^{13}C NMR spectrum of starch acetate.

20.8ppm) が検出された。173.5ppmのシグナルは、アセチル基のカルボニル炭素、20.8ppmのシグナルはアセチル基のメチル

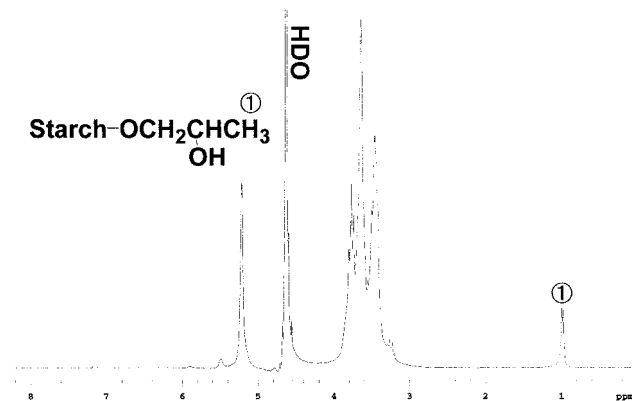


Fig.6 ^1H NMR spectrum of hydroxypropyl starch.

炭素と帰属した。

3. 1. 3 ヒドロキシプロピル化でん粉

ヒドロキシプロピル化でん粉の ^1H NMRスペクトルをFig.6に示す。ヒドロキシプロピル化でん粉を重塩酸で加水分解し、生成するジヒドロキシプロパンのメチルプロトンのシグナルについて、1.2ppmに検出されることが国際標準化機構 (ISO)³⁾ 及び丸山ら⁴⁾ により報告されているが、加水分解されていないヒドロキシプロピル化でん粉についても、加水分解により生成したジヒドロキシプロパンと類似して、0.99ppmにダブルットのシグナルが検出された。従って、このシグナルをヒドロキシプロピル基のメチルプロトンと帰属した。なお、ジヒドロキシプロパンのメチレンプロトンは3.5~4ppm付近に重複しているものと推定される。

3. 1. 4 カチオン化でん粉

カチオン化でん粉の ^1H NMRスペクトル及び ^{13}C NMRスペクトルをFig.7, 8に示す。カチオン化でん粉の ^1H NMRスペクトルは、未変性タピオカでん粉のものでは検出されないシグナルが、高磁場側に検出された (3.14ppm)。また、 ^{13}C NMRスペクトルにおいても未変性タピオカでん粉では検出されないシグナルが高磁場側に検出された (54.5ppm)。これらのシグナルを帰属する為に、HMQCスペクトルを測定し、 ^1H - ^{13}C 相関 (直接結合しているプロトンと炭素との間の相関) を検出した。スペクトルをFig.9に示す。 ^1H NMRスペクトルにおける3.14ppmのシグナルと ^{13}C NMRスペクトルにおける54.5ppmのシグナルの間に相関が検出され、これらのシグナルが共に同じ官能基に由来するものであることがわかった。また、これらのシグナルのシグナル強度及び一般的な4級アミンのプロトン及びカーボンの化学シフト値から、それぞれ1,2-ジヒドロキシトリメチルアンモニウムクロリド基のトリメチルプロトン及びトリメチルカーボンと帰属した。

3. 1. 5 オクテニルコハク酸でん粉

オクテニルコハク酸でん粉の ^1H NMRスペクトルをFig.10に示す。未変性タピオカでん粉では検出されない複数の複雑なシグナルが高磁場側に検出された (2.61~1.88, 1.21, 1.16,

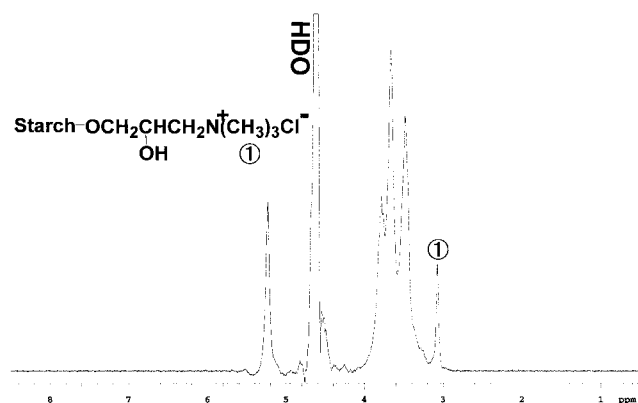
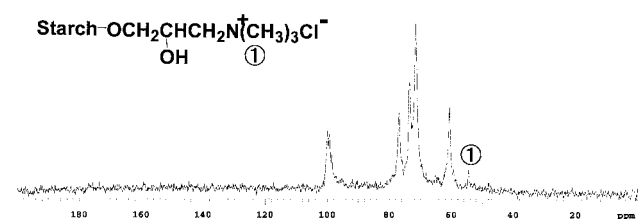
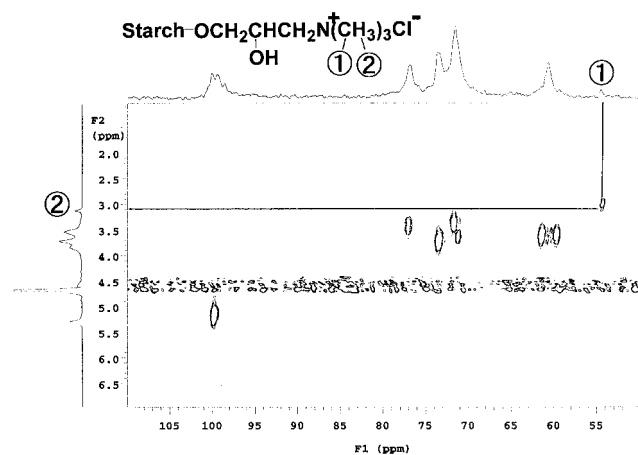
Fig.7 ^1H NMR spectrum of cationic starch.Fig.8 ^{13}C NMR spectrum of cationic starch.

Fig.9 HMQC spectrum of cationic starch.

0.74ppm)。一般的な官能基の化学シフト値及びこれらのシグナルの積分比から、高磁場側から順にメチル基のメチルプロトン (0.74ppm)、メチレン連鎖のメチレンプロトン (1.16, 1.21ppm)、そしてキラル炭素(C*)に結合したプロトン及びC*に隣接するメチレン基によるシグナルと帰属した (2.61~1.88ppm)。また、COSYスペクトルを測定したところ (Fig.11)、メチル基と隣接するメチレン基の間 (J-Jスピン結合をもつ) に交差ピークが検出された。この結果は、これらの帰属と矛盾しない。

3. 1. 6 アジピン酸架橋アセチル化でん粉

アジピン酸架橋アセチル化でん粉の ^1H NMRスペクトルを

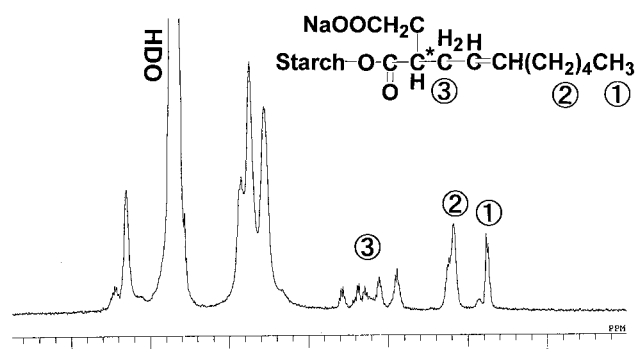
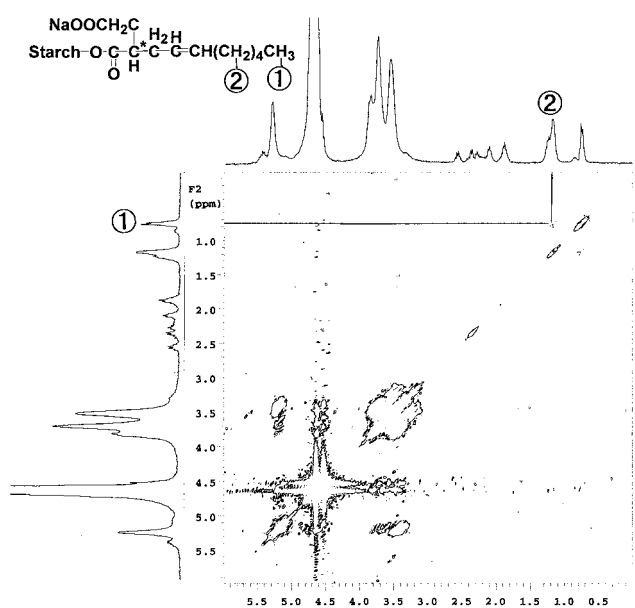
Fig.10 ^1H NMR spectrum of starch sodium octenylsuccinate.

Fig.11 COSY spectrum of starch sodium octenylsuccinate.

Fig.12に示す。未変性タピオカでん粉では検出されない4本のシグナルが高磁場側に検出された (2.16, 2.07, 1.85, 1.48ppm)。2.07ppmのシグナルはアセチル化でん粉のアセチル基のメチルプロトン、1.85ppmのシグナルは遊離の酢酸のメチルプロトンに由来するものであり (3.1.2参照)、他の2本のシグナルについては、アジピン酸架橋に由来するものと考えられる。また、これらの2本のシグナルが、アジピン酸ジメチルのメチレン連鎖の化学シフト値 (2.33, 1.68ppm) と類似していることから、アジピン酸架橋のメチレンプロトンによるものと帰属した。従って、アジピン酸架橋アセチル化でん粉のように、2種類以上の置換が導入されているでん粉誘導体についても、その置換の種類の定性が、1回の測定で可能であると考えられる。

3. 2 アセチル化でん粉の定性における測定限界

NMR法の測定限界について検討するため、DS値の異なるアセチル化でん粉3種類 (DS値が0.0048, 0.0109, 及び0.112) に

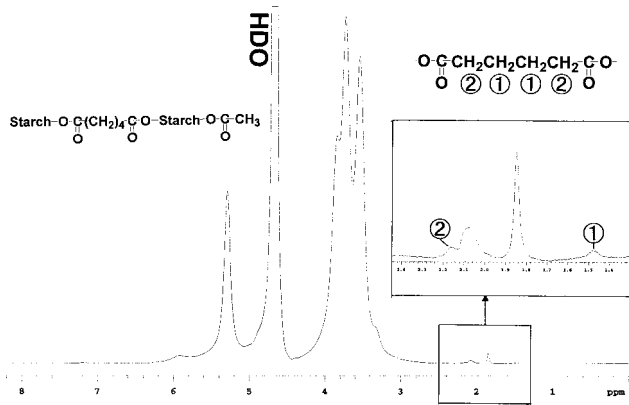


Fig.12 ^1H NMR spectrum of acetylated distarch adipate.

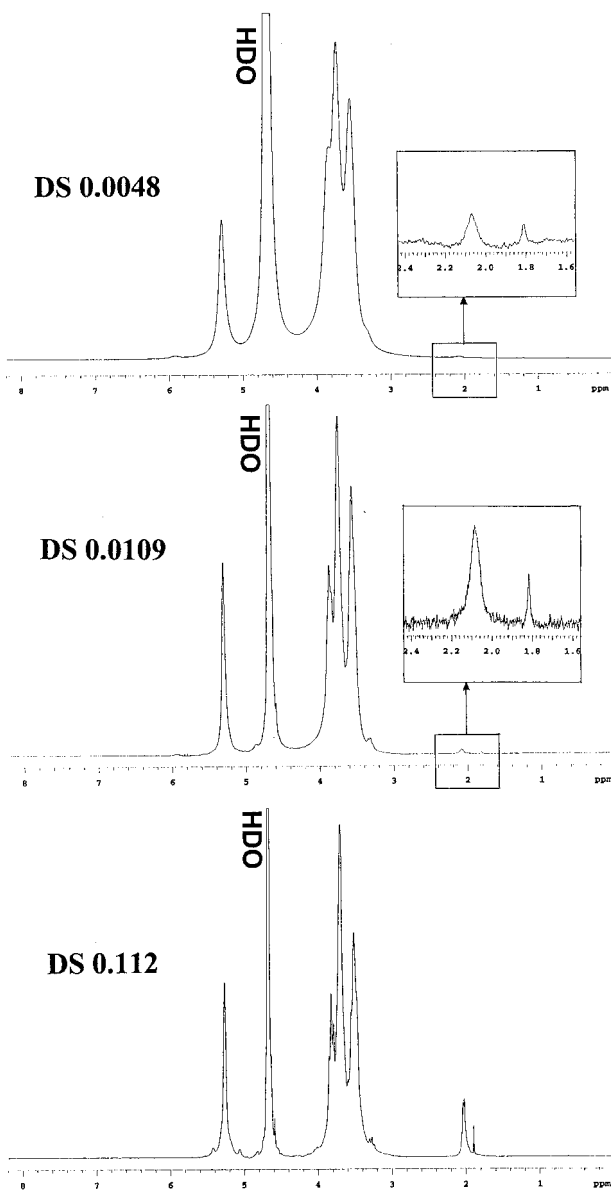


Fig.13 ^1H NMR spectra of three samples of starch acetate of different DS value.

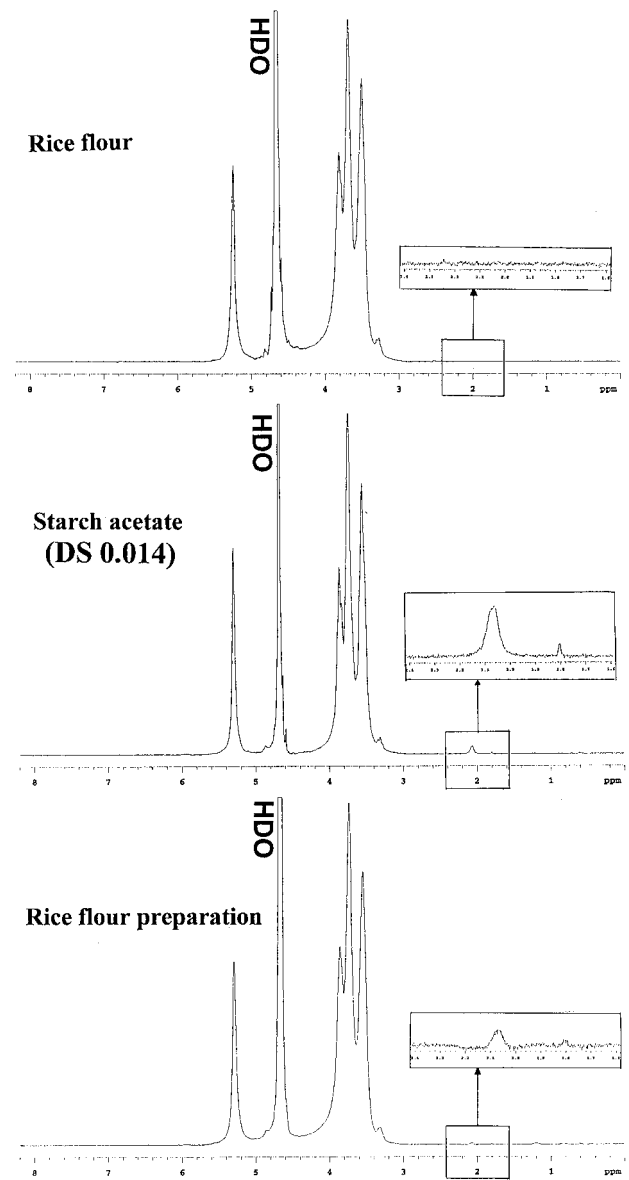


Fig.14 ^1H NMR spectra of rice flour, starch acetate and rice flour preparation.

ついて、それぞれ ^1H NMRスペクトルを測定した。その結果をFig.13に示す。2.07ppmのアセチル基のシグナルは、DS値0.0048のものについても、そのS/N比（シグナルとノイズの比）はDS値の大きいものと比較して小さくなるが、検出された。従って、置換度の小さい他のでん粉誘導体についても、その置換の種類の定性は可能であると考えられる。

3. 3 米粉調製品の ^1H NMRスペクトル測定

アセチル化でん粉米粉調製品（重量比 アセチル化でん粉17%，米粉83%），原料アセチル化でん粉及び原料米粉の ^1H NMRスペクトルをFig.14に示す。原料アセチル化でん粉だけでなく，米粉調製品についてもS/N比は小さくなるが，アセチル基のメチルプロトンのシグナルが検出され，置換の種類の定性

は可能であった。この結果は、米粉調製品のような製品を直接分析することにより、含有するでん粉誘導体の置換の種類を直接定性することができる可能性を示唆している。

4. 要 約

NMRによるでん粉誘導体の定性を行った。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、オクテニルコハク酸でん粉、アジピン酸架橋アセチル化でん粉においては、新しく出現したシグナルがでん粉誘導体の置換基に由来するものと帰属できた。これらの帰属されたシグナルにより、添付資料等により置換基の種類が推定できないでん粉誘導体についても、置換の種類が定性が可能である。

また、低置換度（DS値0.01未満）のアセチル化でん粉や、米粉調製品中に含まれるアセチル化でん粉についても定性が可能であった。

りん酸架橋でん粉については今回定性できなかった為、更に ^{31}P NMR等、他の分析方法を検討していく必要がある。

（謝 辞）

本研究を遂行するに当たり、貴重なご助言をくださったVARIAN社渡辺裕之氏に深くお礼申し上げます。

また、本研究を遂行するに当たり、試料を提供してくださった日澱化学株式会社遠藤靖夫氏に厚く感謝申し上げます。

文 献

- 1) 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）
- 2) 山崎幸彦，柴田正志，木村久美，赤崎哲也，熊沢勉：関税中央分析所報，**38**，91（1998）
- 3) Committee Draft, ISO/CD 11543（1999）
- 4) 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（1998）