

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によるアセチル化でん粉のアセチル化度の測定及び穀粉・アセチル化でん粉混合物中のアセチル化でん粉の定量

東内 一博*, 前田 康宏*, 氏原 覚*

Determination of the degree of substitution of starch acetate and a quantitative analysis of starch acetate in mixtures of flour and starch acetate using high performance liquid chromatography (HPLC)

Kazuhiro TONAI*, Yasuhiro MAEDA* and Satoru UJIHARA*

*Osaka Customs Laboratory

4-11-28, Nankohigashi, Suminoe-ku, Osaka 559-0031 Japan

In customs laboratories, the degree of substitution (DS value) of starch acetate, which is a starch derivative, is measured by a titration method or an enzyme method. However, these methods have some shortcomings, such as errors caused by differences between individuals' handling and the high cost of the reagent. Starch acetate in processed products, which are a mixture of flour and starch acetate, is quantitatively analyzed by the Kjeldahl method. This method also has some shortcomings, such as long analysis time and a heavy environmental impact. To resolve these shortcomings, we studied a quantitative analysis method using HPLC for measuring the DS value, and for quantitatively analyzing the content of starch acetate in processed products which are a mixture of flour and starch acetate. As a result, we found that our method can accurately analyze both the DS value and content of starch acetate with small errors.

1. 緒 言

アセチル化でん粉は、でん粉にアセチル基が結合したエステル化でん粉で、変性でん粉の一種である。でん粉中のグルコースのうち、アセチル化されているものの割合をアセチル化度 (DS 値) といい、関税分類上、DS 値 が 0.01 以上のものは変性でん粉として分類され、DS 値 が 0.01 未満のものは、変性されていないでん粉として分類される。

でん粉と変性でん粉の間には大きな税率格差が生じていることから、アセチル化でん粉の DS 値の測定は重要である。現在、DS 値の測定法として、税関分析法に滴定法及び酵素法が記載されているが、滴定法は滴定の終点を目視で確認するため、個人差による誤差が生じる虞があり、酵素法には試薬が高価で有効期限も短いという欠点がある。

次に、穀粉と変性でん粉を混合した穀粉調製品は、穀粉の含有率が 85% 以下の場合には従価税が適用されるが、85% を超えると従量税が課せられるため、大きな税率格差が生じる。穀粉調製品における穀粉含有率の算出に際して、現在、輸入者に対し原料の提出を慫慂し、入手した原料を使用して税関分析法に従いケルダール法で算出している。ケルダール法は自動化された装置が普及しており分析自体は比較的簡便な手法ではあるが、分析に長時間

を要する、重金属を含有した廃液が大量に発生する、という欠点もある。

現行の税関分析法には上記のような問題を含んでいることから、今回、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いてアセチル化でん粉中のアセチル基含有量を定量し、アセチル化でん粉の DS 値を測定する手法を検討した。

また、穀粉とアセチル化でん粉を混合した穀粉調製品について、アセチル化でん粉の含有量と DS 値が HPLC で同時に定量可能になれば、現在、個々の分析法に従い行っている分析について一連の操作で迅速に行うことが可能になることから、穀粉調製品中のアセチル化でん粉の含有率を定量する方法についても検討した。

2. 実 験

2.1 試料及び試薬

アセチル化でん粉 (輸入品 2 種、標準品 3 種 (東海澱粉製))、小麦粉 (日清製粉製薄力粉)、トリスヒドロキシメチルアミノメタン (和光純薬工業 試薬特級)、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、1.0 mol/l 水酸化ナトリウム水溶液、0.5 mol/l 水酸化ナトリウム水溶液、1.0 mol/l 塩酸、0.5 mol/l 塩酸、濃塩酸、りん酸二水素カリウム、りん酸、60% 過塩素酸、トリクロロ酢酸、水酸化バリウム 8 水和物、

* 大阪税関業務部分析部門 〒559-0031 大阪府大阪市住之江区南港東 4-11-28

硫酸亜鉛 7 水和物、こはく酸 (以上、キシダ化学 試薬特級)、アセトニトリル、蒸留水 (以上、キシダ化学 HPLC 用)

2.2 装置及び分析条件

2.2.1 振とう器

室温 : RECIPRO SHAKER SR-2W (TAITEC)

加温 : Water Bath Incubator BT47 (ヤマト科学)

2.2.2 高速液体クロマトグラフ (HPLC)

共通条件

装置 : LC-2000 (日本分光)
検出器 : フォトダイオードアレイ検出器 (検出波長 210 nm)
注入量 : 20 μ l

条件 A

カラム : Synergi 4 μ Hydro-RP (250 \times 4.6 mm) (Phenomenex)
ガードカラム : Synergi 4 μ Hydro-RP (4 \times 3.0 mm) (Phenomenex)
カラム温度 : 22 $^{\circ}$ C
移動相 : 20 mM リン酸二水素カリウム水溶液
流速 : 0.7 ml/min

条件 B

カラム : YMC Hydrosphere C18 (250 \times 4.6 mm) (YMC)
ガードカラム : YMC Packed Column (YMC)
カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C
移動相 : 20 mM リン酸二水素カリウム水溶液
流速 : 1.0 ml/min

条件 C

カラム : KINETEX 2.6 μ C18(150 \times 4.6 mm) (Phenomenex)
ガードカラム : HPLC KrudKatcher Ultra Column In-Line Filter (Phenomenex)
カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C
移動相 : 20 mM リン酸二水素カリウム水溶液
流速 : 2.0 ml/min

条件 D

カラム : Asahipak NH2P-50 4E (250 \times 4.6 mm) (昭和電工)
ガードカラム : Asahipak NH2P-50G 4A (4.0 \times 3.0 mm) (昭和電工)
カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C
移動相 : 100 mM トリス緩衝液 / アセトニトリル
流速 : 1.0 ml/min

2.3 実験方法

2.3.1 滴定法によるアセチル化でん粉の DS 値の測定

2.3.1(1) 水分測定

多量の蒸留水で洗浄し、一晚自然乾燥させた試料約 2.0 g を恒量済の秤量びんに精秤し、105 $^{\circ}$ C で 5 時間乾燥させ、水分を測定した。

2.3.1(2) 滴定及び DS 値の算出

税関分析法に従って滴定を行い、DS 値を算出した。

2.3.2 HPLC 法の条件検討

2.3.2(1) アセチル基の加水分解条件の検討

条件 A, B 及び C の場合は、アセチル化でん粉約 1.5 g を正確に量りとり水 50 ml に分散させ、そこに水酸化ナトリウム水溶液 (濃度は 0.1~1.0 mol/l の間で調整) を 10 ml 加え、混合した。この溶液を室温で 30 分間振とうすることで、アセチル基を加水分解した。加水分解後、同濃度の塩酸 10 ml で中和し、内標準溶液として 0.1% こはく酸水溶液 5 ml を加え、孔径 0.45 μ m のメンブレンフィルターでろ過して検液とした。また、小麦粉とアセチル化でん粉を混合した穀粉調製品についても、採取量を約 10 g とする以外は同様の条件で加水分解した。

条件 D の場合には、アセチル化でん粉約 1.5 g を正確に量りとりアセトニトリル 40 ml に分散させ、そこに水酸化ナトリウム水溶液 (濃度は 0.3~1.0 mol/l の間で調整) を 10 ml 加え、混合した。この溶液を室温、または 40 $^{\circ}$ C から 85 $^{\circ}$ C (還流) で 1 時間振とうすることで、アセチル基を加水分解した。加水分解後、1.5~5.0 mol/l の塩酸 2 ml で中和し、内標準アセトニトリル溶液を加え、孔径 0.45 μ m のメンブレンフィルターでろ過して検液とした。小麦粉とアセチル化でん粉を混合した穀粉調製品の場合には、採取量を約 10 g とし、ろ過前に 2 時間静置した。

2.3.2(2) 移動相の検討

条件 A, B 及び C の場合は、リン酸二水素カリウム 2.72 g を水約 800 ml に溶解させ、リン酸で pH を調整した。これを水で 1000 ml に定容して、20 mM リン酸二水素カリウム水溶液移動相とし、pH を 2.5~2.9 の範囲で変化させて検討した。

条件 D の場合には、トリスヒドロキシメチルアミノメタン 12.11 g を水約 800 ml に溶解させ、濃塩酸で pH を調整した。これを水で 1000 ml に定容してトリス緩衝液とし、アセトニトリルと混合して移動相とし、トリス緩衝液の pH を 20 $^{\circ}$ C に換算しておよそ 6.9~7.2 の範囲で変化させ、またトリス緩衝液とアセトニトリルの混合比を 25 対 75~50 対 50 の範囲で変化させて検討した。

2.3.2(3) 除たんぱく法の検討

条件 A, B 及び C の場合は、小麦粉とアセチル化でん粉を混合した穀粉調製品の加水分解物溶液について、除たんぱく液 (1.8% 水酸化バリウム水溶液及び 2.0% 硫酸亜鉛水溶液)、過塩素酸及びトリクロロ酢酸を用いて除たんぱくを試みた。

条件 D の場合には、小麦粉とアセチル化でん粉を混合した穀粉調製品の加水分解物溶液について、アセトニトリルを 2~4 倍量添加することで除たんぱくを試みた。

2.3.2(4) 内標準物質の検討

条件 A, B 及び C の場合には、内標準物質としてこはく酸を選択した。こはく酸約 0.1 g を精秤し、水に溶解させて 100 ml に定容することで、内標準液とした。

条件 D の場合に、内標準物質として、炭素数が酢酸に近い、ギ酸及びプロピオン酸を候補として検討した。それぞれ約 0.1 g を精秤し、水またはアセトニトリルに溶解させ、100 ml に定容することで、内標準液とした。

2.3.3 検量線の直線性の確認

0.06%標準酢酸水溶液及び0.1%標準プロピオン酸水溶液を調製した。標準溶液中の酢酸濃度が0.003, 0.006, 0.009, 0.012, 0.018及び0.027%となるように、標準酢酸水溶液を5, 10, 15, 20, 30及び45 ml ずつ、プロピオン酸濃度はいずれも0.01%となるように、標準プロピオン酸水溶液を10 ml ずつ精確に採取し、水で100 ml に定容した。これら6種の標準溶液を、2.3.2で設定した条件で分析し、検量線を作成し、直線性の確認を行った。この酢酸濃度は、DS 値に換算して約0.005~0.045となる。

2.3.4 HPLC 法によるDS 値の測定

2.3.4(1) 水分測定

2.3.1(1)と同様に水分を測定した。

2.3.4(2) 滴定及びDS 値の算出

アセチル化でん粉（輸入品2種及び標準品3種）を、2.3.2で検討した条件で分析した。そして、税関分析法に記載されているDS 値の計算式を基に、DS 値を算出する計算式（Equation 1）を設定し、DS 値を算出した。

$$\begin{aligned} \text{Peak area ratio of sample} \times \frac{\text{Weight of acetic acid in standard sample}}{\text{Peak area ratio of standard sample}} &= \text{Weight of acetic acid in sample} \\ \frac{\text{Weight of acetic acid in sample}}{\text{Dried weight of sample}} \times 0.7185 &= \text{Content of acetyl residue} \\ \frac{162 \times \text{Content of acetyl residue}}{4300 - 42 \times \text{Content of acetyl residue}} &= \text{DS value} \\ \text{Station means acetic acid per internal standard} & \end{aligned}$$

Equation 1 Equation for calculating DS value.

2.3.5 HPLC 法による小麦粉とアセチル化でん粉を混合した穀粉調製品中のアセチル化でん粉の定量

アセチル化でん粉のアセチル基含有率と小麦粉とアセチル化でん粉（標準品3種）を混合した穀粉調製品のアセチル基含有率を、2.3.2で検討した条件で測定することで、小麦粉とアセチル化でん粉を混合した穀粉調製品中のアセチル化でん粉を定量した。

3. 結果及び考察

3.1 HPLC 法の条件検討1（HPLC 条件を条件A、BまたはCとした場合）

3.1.1 アセチル基の加水分解条件及びHPLC 条件（条件A）の検討

2.3.2(1)の条件で、標準アセチル化でん粉のアセチル基の加水分解を行ったところ、水酸化ナトリウム水溶液の濃度が0.3 mol/l 未満では、0.3~0.5 mol/l の場合より検出される酢酸の量が少なく、完全に加水分解できていないと考えられた。また、0.6 mol/l 以上ではでん粉が糊化し、メンブレンフィルターを反応溶液が通過しなかった。そのため、水酸化ナトリウム水溶液の濃度は、糊化しない中で可能な限り高い0.5 mol/l として加水分解を行った。

この加水分解条件及びHPLC 条件で、アセチル化でん粉由来の酢酸及び内標準物質のこはく酸のピークは明瞭に分離し、DS 値はアセチル基を定量することで測定可能であったが、小麦粉とアセチル化でん粉を混合した穀粉調製品を加水分解すると、小麦粉

由来の夾雑物が酢酸のピークと重なり、アセチル基を定量することは不可能であった。そのため、移動相のpHを変化させて酢酸と夾雑物の分離を試みたが、分離はできなかった。そのクロマトグラムをFig. 1に示す。

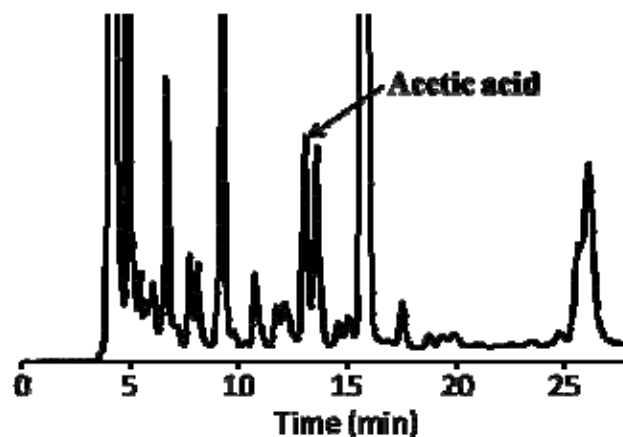


Fig. 1 Chromatogram of an alkaline-hydrolysate of a mixture of wheat flour and starch acetate (analyzed under condition A, pH 2.7).

3.1.2 除たんぱく法の検討

小麦粉はでん粉以外の成分のほとんどがたんぱく質である¹⁾ため、小麦粉とアセチル化でん粉を混合した穀粉調製品の加水分解物のクロマトグラム上で観察される主なピークは、たんぱく質やその分解物由来と予想される。そこで、夾雑物のピークを除去するために、除たんぱく剤による処理を検討した。

しかし、水酸化バリウム・硫酸亜鉛、過塩素酸及びトリクロロ酢酸のいずれを用いても、クロマトグラム上に現れる夾雑物のピークを減少させることはできなかった。

3.1.3 HPLC 条件（条件B及びC）の検討

条件B及びCにおいて、3.1.1と同様に小麦粉加水分解物の分析を行ったが、いずれも酢酸と夾雑物のピークを分離することができず、アセチル基を定量することは不可能であった。

3.2 HPLC 法の条件検討2（HPLC 条件を条件Dとした場合）

3.2.1 除たんぱく法の検討

条件Dでは、移動相に緩衝液とアセトニトリルの混合液を用いているため、試料溶液にもアセトニトリルを混合するが、これにより除たんぱくの効果も得られる^{2,3)}。小麦粉とアセチル化でん粉からなる混合物の加水分解後に加えるアセトニトリルの添加量を検討したところ、試料溶液の4倍量添加することで、条件A、B及びCに比較すると夾雑物のピークは少なくなり、さらにトリス緩衝液のpH及び移動相の組成を調整すれば、酢酸のピークと夾雑物のピークを分離できることが分かった。

3.2.2 内標準物質の検討

内標準物質として、ぎ酸及びプロピオン酸を検討したが、より揮発性が低く、また溶出時間がより酢酸に近接しているプロピオン酸を内標準物質として用いることにした。

3.2.3 アセチル基の加水分解条件の検討

3.1.1 で検討した条件でアセチル化でん粉のアセチル基を加水分解し、最後にアセトニトリルを加えて除たんぱくを行うと、生成した酢酸の濃度が低く、HPLC を用いて測定した場合、ノイズレベルから求めた定量下限以下であった。そこで、アセトニトリル中で加水分解を行い、最終的に試料溶液中にアセトニトリルが水の4倍含まれるように変更した。

そして、2.3.2(1)の後段の条件で検討した結果、水酸化ナトリウム水溶液の濃度を、アセチル化でん粉の場合は0.3 mol/l、小麦粉とアセチル化でん粉を混合した穀粉調製品の場合は1.0 mol/lとし、40 °C の湯浴中で1時間振とうして分解する方法が、アセチル基を完全に加水分解でき、かつ、HPLC で分離した際に夾雑物のピークが最も少ない条件であった。

3.2.4 HPLC 条件の検討

HPLC の条件は2.3.2(2)の後段から、トリス緩衝液のpHを20 °Cにおいて6.9とし、トリス緩衝液とアセトニトリルの混合比を45対55とした。なお、分析時間は全ての夾雑物が溶出する60分とした。この条件下におけるアセチル化でん粉加水分解物のクロマトグラムをFig. 2に、小麦粉とアセチル化でん粉を混合した穀粉調製品の分解物のクロマトグラムをFig. 3に示す。

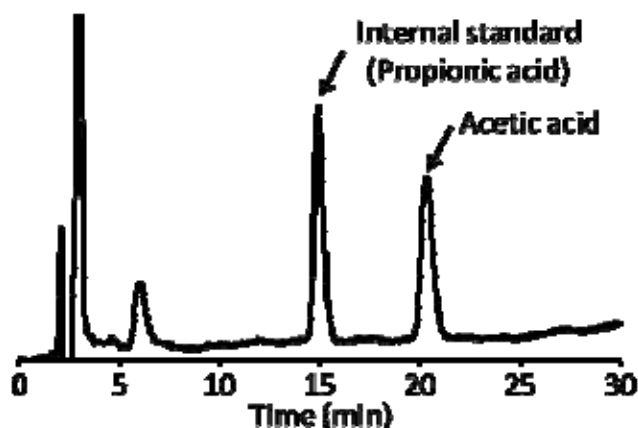


Fig. 2 Chromatogram of an alkaline-hydrolysate of starch acetate (analyzed under condition D, pH 6.9 (20 °C), Tris buffer/acetonitrile = 45/55).

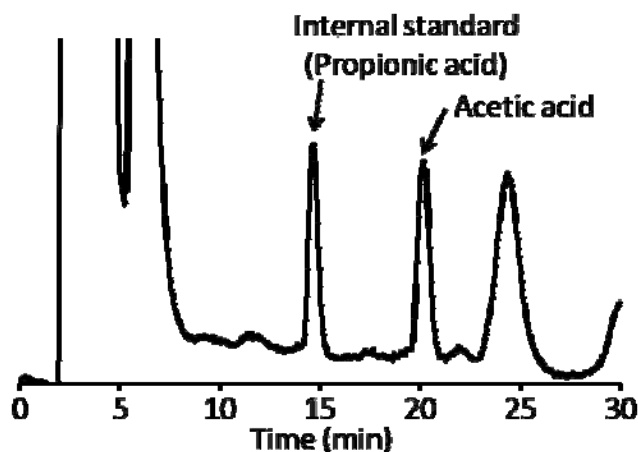


Fig. 3 Chromatogram of an alkaline-hydrolysate of a mixture of wheat flour and starch acetate (analyzed under condition D, pH 6.9 (20 °C), Tris buffer/acetonitrile = 45/55).

3.3 検量線の直線性の確認

2.3.3 に示した区間における検量線をFig. 4に示す。測定した範囲において、相関係数が0.9997と良好な直線性を示した。なお、ノイズレベルから求めた定量下限は、DS値に換算して約0.005であり、得られた検量線も0.005程度まで直線性を維持していたことから、DS値0.005程度まで正確な定量が可能と考えられる。

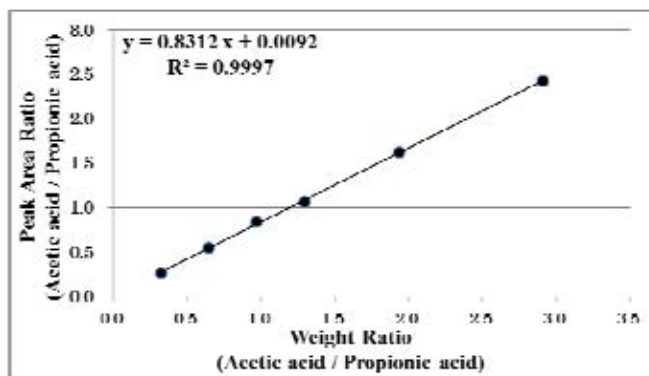


Fig. 4 Standard curve.

3.4 HPLC 法によるDS値の測定

各アセチル化でん粉について、2.3.1(2)で滴定法により求めたDS値と3.2で決定した条件で測定したDS値をTable 1に示す。滴定法で測定した値と大きな差はなく、相対標準偏差も小さな値となった。

Table 1 DS values measured by titration method and HPLC method.

Starch acetate	Titration method	HPLC method (n=5)		
	DS value	DS value	S. D.	C. V. (%)
Import 1	0.0146	0.0141	2.06×10^{-4}	1.46
Import 2	0.0301	0.0296	2.42×10^{-4}	0.82
Standard 1	0.0174	0.0181	2.58×10^{-4}	1.43
Standard 2	0.0201	0.0201	3.12×10^{-4}	1.55
Standard 3	0.0152	0.0145	2.48×10^{-4}	1.71

3.5 HPLC 法による小麦粉とアセチル化でん粉を混合した穀粉調製品中のアセチル化でん粉の定量

3.2で決定した条件で小麦粉とアセチル化でん粉を混合した穀粉調製品中のアセチル化でん粉含有率を定量した結果をTable 2に示す。混合した重量から算出した含有率とほぼ同じ値となり、相対標準偏差も小さな値となった。

Table 2 Starch acetate contents measured by HPLC method.

Starch acetate	Wheat flour	Weight Ratio Content (%)	HPLC method (n=5)		
			Content (%)	S. D.	C. V. (%)
Standard 1	Standard	16.2	16.2	0.258	1.59
Standard 2		15.8	16.1	0.197	1.23
Standard 3		15.5	15.5	0.261	1.68

4. 要 約

HPLC によるアセチル化でん粉の DS 値の測定法、及び小麦粉とアセチル化でん粉を混合した穀粉調製品中のアセチル化でん粉の含有率の定量法の検討を行った。今回検討した方法のうち、HPLC 条件を A～C とした場合には、酢酸のピークと夾雑物のピークが重なり、小麦粉とアセチル化でん粉を混合した穀粉調製品中のアセチル化でん粉の含有率の定量が不可能であった。しかし、HPLC 条件を D とし、加水分解条件も検討した結果、アセチル化でん粉の DS 値は滴定法により求めた値に、小麦粉とアセチル化

でん粉を混合した穀粉調製品中のアセチル化でん粉含有率は実際の含有率にそれぞれ近似した値で求めることができた。このことで、現在は個別に行っているアセチル化でん粉の DS 値の測定と小麦粉とアセチル化でん粉を混合した穀粉調製品中のアセチル化でん粉含有率の定量とを、一連の操作で迅速に行うことが可能になった。ただし、今回の条件では、クロマトグラムの酢酸のピーク付近に夾雑物が存在し、少しの移動相の調製のミスで溶出時間がずれ、酢酸と夾雑物のピークが重なってしまう虞がある。そのため、加水分解条件及び HPLC 条件については、さらなる最適化が必要と考えられる。

文 献

- 1) 文部科学省 科学技術・学術審議会 資源調査分科会報告: “日本食品標準成分表 2010”, P34 (2010), (全国官報販売協同組合)
- 2) 中村洋 監修: “分析試料前処理ハンドブック”, P179 (2003), (丸善).
- 3) 日本分析化学会関東支部 編: “高速液体クロマトグラフィーハンドブック”, P236 (2000), (丸善).