

税関分析法「でん粉のアルファー化度の測定法」の改善

大田 朋樹*, 松島 紋子*, 中山 清貴*, 赤崎 哲也*

Possible amendment of Customs Analysis Method “ Analysis method for α -starch in starch products”

Tomoki OTA*, Ayako MATSUSHIMA*, Kiyotaka NAKAYAMA and Tetsuya AKASAKI*

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

Due to the methodological problem of the present Customs Analysis Method which provides alpha conversion degrees of more than 100% for pre-gelatinized starches with higher degrees, we checked the entire procedure of the method. After a comprehensive review, we found that insufficient pH adjustment of the test solution in the present method, following the alkaline-gelatinization of a starch sample, caused the incomplete reaction of the subsequent enzymatic digestion. In order to optimize the pH of the solution, in this study, we proposed to increase the volume of 2 mol/L acetic acid from 2 ml to 3 ml. The modification required additional neutralization for the test solution for complete deproteinization and accurate quantitative analysis. The adequacy of the improved Customs Analysis Method was proved by validation tests with starch samples of known alpha conversion degrees, and the test clarified that the improved method provides more accurate results than the present method.

1. 緒 言

税関分析法「でん粉のアルファー化度の測定法」は、穀粉、あずき等の調製品で、でん粉の糊化度を測定するための分析法とされており、糊化済(アルファー化)でん粉にも適用されている¹⁾。関税率表上、でん粉は、そのアルファー化度により所属区分が異なり、税番第 35.05 項の糊化済でん粉又は第 11.08 項の(未処理の)でん粉に分類される。この両者の間には、大きな税率格差があり、更に第 11.08 項のでん粉は関税割当品目であることから、でん粉のアルファー化度を正確に測定することは、関税行政において重要である。

税関分析法は、でん粉のアルファー化度の増加に比例して、でん粉に対する酵素(グルコアミラーゼ)の分解作用の及ぶ範囲が増大する性質を利用したものである。実際の測定においては、試料そのものと、試料をアルカリで完全にアルファー化したものと、両方にグルコアミラーゼを作用させ、両者から生成したグルコースを定量し、その量比からアルファー化度を算出している。

他方で、税関分析法に従い高アルファー化度のでん粉を分析すると、アルファー化度が 100%を超える事例が報告され、酵素反応の部分に問題がある可能性が指摘された。これを受けて、本分析法の早急な見直しが要請されている。

本研究では、現行の税関分析法(以下、現行法と呼ぶ。)の問

題点を確認し、その部分の見直しを行った。そして、修正した税関分析法(以下、改良法と呼ぶ。)で測定したアルファー化度の真度及び精度を調査し、現行法との比較検証を行った。

2. 実 験

2.1 試料及び試薬

2.1.1 試料

タピオカでん粉(日澱化学)、とうもろこしでん粉、ばれいしょでん粉(和光純薬工業)、アルファー化タピオカでん粉及びアルファー化とうもろこしでん粉並びにそれらの原料でん粉(松谷化学工業)

2.1.2 試薬

グルコアミラーゼ, *Rhizopus* sp. (クモノスカビ属) 由来(生化学用、和光純薬工業): Unit definition: One unit causes the formation of 10 mg of glucose for 30 min at pH 4.5 and 40 °C.

グルコアミラーゼ, *Aspergillus niger* (クロコウジカビ) 由来(生化学用、SIGMA): Unit definition: One unit causes the formation of 1 μ mol of glucose for 1 min at pH 4.8 and 60 °C.

水酸化ナトリウム、酢酸、酢酸ナトリウム、水酸化バリウム八水和物、フェリシアン化カリウム、よう化カリウム、塩化ナトリウム、でん粉(溶性)、0.1 mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液(容量

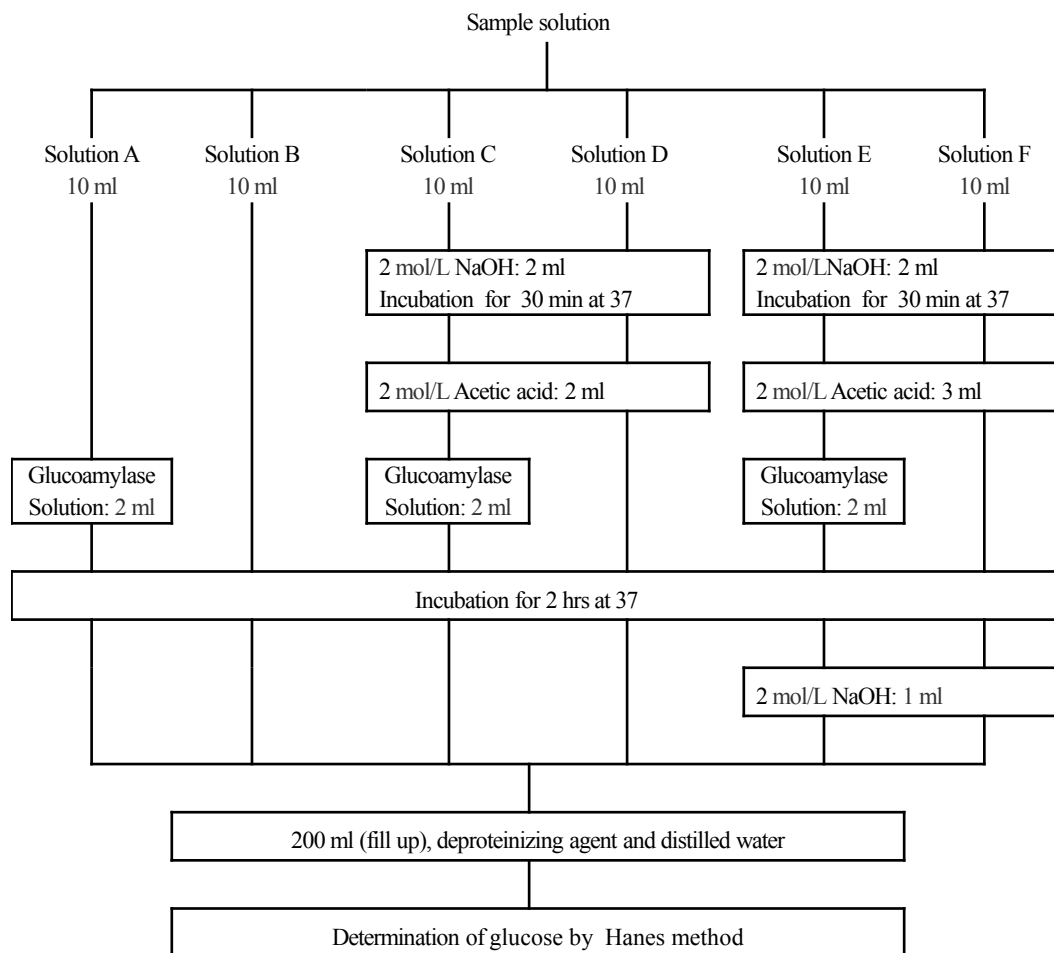
* 財務省関税中央分析所 〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-5

分析用 \ グルコース (以上、和光純薬工業) 硫酸亜鉛七水和物、
無水炭酸ナトリウム (以上、関東化学)

2.2 でん粉のアルファ化度の測定

2.2.1 測定の概要

現行法及び改良法の実験系統図を Fig.1 に示す。これらの測定法は、既報¹⁾⁻³⁾及び本研究の検討結果から決定した。



$$\text{Alpha conversion degree} = \frac{a-b}{c-d} \quad (\text{Custom Analysis Method})$$

$$\text{Alpha conversion degree} = \frac{a-b}{e-f} \quad (\text{Improved Method})$$

Fig. 1 Procedure of the Customs Analysis Method and the improved method to determine the alpha conversion degree of pre-gelatinized starch
a, b, c, d, e and f in the formulas indicate the consumed amount of sodium thiosulfate for the test solutions A, B, C, D, E and F, respectively.

2.2.2 試薬の調製

2.2.2 (1) 酵素溶液

グルコアミラーゼの力価が 1 ml 当たり *Rhizopus* sp.由来のものについては 10 units 以上、*Aspergillus niger* 由来のものについては 75 units 以上になるように、0.2 mol/L 酢酸緩衝液 (pH 4.8) を用いて溶解した。なお、特に記載のない限り、酵素溶液は *Rhizopus* sp. 由来のグルコアミラーゼを用いて調製した。

2.2.2 (2) 除たんぱく剤 (A 液及び B 液)

A 液 : 硫酸亜鉛七水和物 20 g を蒸留水に溶解し、1000 ml に定容した。

B 液 : 水酸化バリウム八水和物 18 g を蒸留水に溶解し、1000 ml に定容した。

2.2.3 現行法

現行法の実験手順は、既報¹⁾に従う。なお、アルファ化度は、次式により算出した。

$$\text{アルファ化度}(\%) = (a-b)/(c-d) \times 100$$

a、b、c 及び d は、それぞれ検液 A、B、C 及び D のチオ硫酸ナトリウム消費量を示す (Fig.1 参照)。

2.2.4 改良法

改良法は、現行法の手順「4. 加水分解操作」のうち、次の 2

点を変更した。

- (1) 2 mol/L 酢酸水溶液の添加量を 2 ml から 3 ml に変更した。
- (2) 加水分解反応終了後、2 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液を 1 ml 加えて中和する操作を追加した。

なお、アルファ化度は、次式により算出した。

$$\text{アルファ化度}(\%) = (a-b)/(e-f) \times 100$$

a と b は、2.2.3 の現行法と同じ。e と f は、それぞれ検液 E と F のチオ硫酸ナトリウム消費量を示す (Fig.1 参照)。

2.3 実験

2.3.1 分析試料の調製

2.3.1(1) アルファ化でん粉の調製

未加工でん粉 0.60 g を 50 ml 容の共栓付き三角フラスコに正確に量り採り、蒸留水 30 ml を加えスターラーで攪拌しながら加熱した。15 分間沸騰させた後冷却し、この全量を 100 ml 容メスフラスコに移し入れ、蒸留水で定容した。

2.3.1(2) 模擬試料の調製

未加工でん粉の懸濁液 (0.60 g/100 ml) と 2.3.1(1) に従い調製したアルファ化でん粉を、種々の割合で混合した。

2.3.1(3) 室間共同試験用試料の調製

アルファ化でん粉とその原料でん粉をそれぞれ量り採り、それらを十分に混合した後、約 30 g ずつ袋に小分けした。

2.3.2 現行法の改善

2.3.2(1) 問題点の調査

タピオカでん粉を用いて、2.3.1(1)の方法に従い調製したアルファ化でん粉を、現行法の手順に従い、30、60、90、120、150 及び 180 分間加水分解反応を行った。反応の停止は、各液を沸騰浴中で 10 分間加熱し、グルコアミラーゼを失活させることにより行った³⁾。生成したグルコース量は、ハーネス法により定量した。pH の測定は、pH メーター (SevenEasy、Mettler Toledo 製) を用いて行った。

2.3.2(2) 2 mol/L 酢酸水溶液の添加量と溶液の pH

未加工タピオカでん粉の懸濁液 10 ml に、2 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液を 2 ml を加えてでん粉をアルカリ変性させた後、0.2 mol/L 酢酸緩衝液 (pH4.8) を 2 ml 加え、2 mol/L 酢酸水溶液を段階的に加えた溶液の pH を測定した。

2.3.2(3) 検液の pH が除たんぱく剤の効果に及ぼす影響

200 ml メスフラスコに 2 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液を 2 ml、0.2 mol/L 酢酸緩衝液 (pH4.8) を 2 ml 採取し、2 mol/L 酢酸水溶液をそれぞれ 2、3 及び 4 ml 加えた。これらの溶液に、除たんぱく剤 A 液及び B 液を各々 10 ml 加え、蒸留水で定容し、沈殿物を観察した。また、除たんぱく剤を加える前に 2 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液を用いて溶液の pH を中性に調整した場合についても、同様にして沈殿物を観察した。

2.3.2(4) 検液の pH がハーネス法の滴定値に及ぼす影響

200 ml メスフラスコにグルコース水溶液 (1.0144 g/100 ml) を 5 ml、2 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液を 2 ml、0.2 mol/L 酢酸緩衝液 (pH4.8) を 2 ml 採取し、2 mol/L 酢酸水溶液をそれぞれ 2.0、2.5、3.0、3.5 及び 4.0 ml 加えた後、蒸留水で定容したものを検液

とし、ハーネス法でグルコースの定量を行った。グルコースの回収率は、ハーネス法で定量したグルコース量の測定値を採取したグルコース量で除することにより算出した。また、検液の pH を 1 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液を用いて中性に調整した場合についても、同様にしてグルコースの回収率を算出した。

2.3.2(5) 2 mol/L 酢酸水溶液の添加量とグルコースの生成量の関係

タピオカでん粉を用いて、2.3.1(1)の方法に従い調製したアルファ化でん粉 10 ml に、2 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液を 2 ml を加え、2 mol/L 酢酸水溶液をそれぞれ 2.0、2.5、3.0、3.5 及び 4.0 ml 添加した。これらの溶液に、酵素溶液を 2 ml 加えて 37 °C で 120 分間加水分解を行い、生成したグルコース量をハーネス法で定量した。また、対照として、アルファ化でん粉 10 ml に酵素溶液 2 ml 加えて同様の条件で加水分解を行った場合についても、生成したグルコースを定量した。

2.3.2(6) 酵素活性とグルコースの生成量の関係

グルコアミラーゼの力価が 1 ml 当たり *Rhizopus* sp.由来のものについては 5, 10, 15, 20, 25 units、*Aspergillus niger* 由来のものについては 25, 50, 75, 100, 125 units になるように酵素溶液を調製した。これらの酵素溶液を用いて、2.3.1(1)の方法に従い調製したアルファ化タピオカでん粉を改良法の条件で加水分解し、生成したグルコースをハーネス法で定量した。

2.3.3 改良法の検証

2.3.3(1) 現行法と改良法の比較

タピオカでん粉、ばれいしょでん粉及びとうもろこしでん粉を用いて、2.3.1(2)に従い調製した模擬試料のアルファ化度を現行法及び改良法で測定した。模擬試料に含まれるアルファ化でん粉の割合は、タピオカでん粉では 0、25、50、75 及び 100%、とうもろこし及びばれいしょでん粉では 0、30、80 及び 100%とした。現行法及び改良法によるアルファ化度の測定は、タピオカでん粉では各 5 回、とうもろこし及びばれいしょでん粉では各 3 回行った。各模擬試料のアルファ化度の理論値は、次式により算出した。

$$\text{アルファ化度の理論値}(\%) = A + B \cdot X/100$$

A : 模擬試料に含まれるアルファ化でん粉の割合 (%)

B : 模擬試料に含まれる未加工でん粉の割合 (%)

X : 現行法及び改良法で測定した未加工でん粉のアルファ化度の平均値 (%)

2.3.3(2) 異なる生物種由来のグルコアミラーゼを用いて測定したアルファ化度の比較

タピオカでん粉を用いて、2.3.1(2)に従って模擬試料を調製し、それらのアルファ化度を *Aspergillus niger* 及び *Rhizopus* sp.由来の各グルコアミラーゼを用いて改良法により測定した。

2.3.3(3) 室間共同試験による検証

室間共同試験には 10 試験室が参加した。各試験室には試料を 6 種類 (Material 1-6) 配布し、それぞれの試料について 3 回測定するように依頼した。Material 1, 2, 5 及び 6 はタピオカでん粉、Material 3 及び 4 はとうもろこしでん粉を用いて、アルファ化でん粉と原料でん粉の混合割合が Material 1, 3 及び 5 では 30 : 70、Material 2, 4 及び 6 では 80 : 20 程度になるように調製した。

外れ値の検出は、まずマンデルの h, k 統計量計算を実施し、1%棄却限界値を超えたデータを棄却した。次に、コ克蘭検定、シングルグラブス検定、ペアグラブス検定の順に行い、1%棄却限界値を超えたデータを棄却した。併行精度及び室間再現精度は、外れ値を除いたデータを用いて、文献⁴⁾に従って求めた。

3. 結果及び考察

3.1 現行法の改善

3.1.1 問題点の調査

現行法の酵素反応時における各検液の pH を測定したところ、分析試料に酵素溶液を加えた検液 (A 液) では pH4.8 であったのに対して、分析試料を 2mol/L 水酸化ナトリウム水溶液でアルカリ変性させ、2mol/L 酢酸水溶液で中和した後に酵素溶液を加えた検液 (C 液) では pH6.0 であった (Fig.1 参照)。本研究で用いた酵素 (*Rhizopus* sp.由来のグルコアミラーゼ) の至適 pH は 4.5-5.0⁵⁾ であることから、アルカリ変性させたでん粉の加水分解が至適 pH 下で行われていないことが判明した。

現行法に従いアルファ化でん粉を加水分解した際に生成するグルコース量の経時変化を Fig.2 に示す。グルコースの生成速度は、酵素の至適 pH に調整されていない C 液の方が A 液より遅く、現行の反応時間 (120 分) では、アルカリ変性後のでん粉の加水分解が、十分に進んでいないことを確認した。

以上より、現行法では、でん粉をアルカリ変性させた溶液の pH が、酵素の至適 pH に調整されていないことが原因で、アルファ化でん粉の加水分解が十分に進まず、グルコースの生成量が少なくなり (すなわち、2.2.3 で示した式において c 値が小さくなる) 結果として、アルファ化度が高めに算出されることが明らかになった。

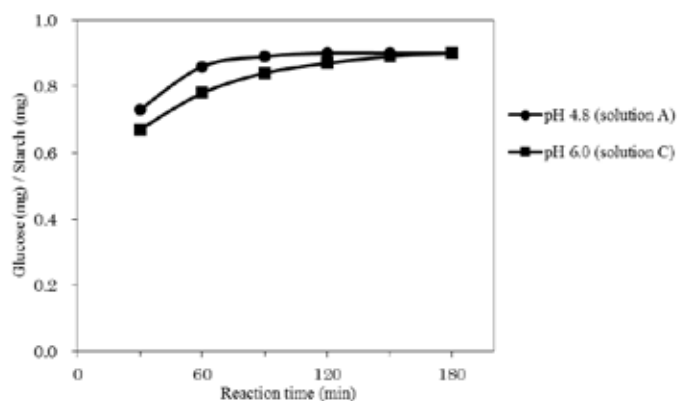


Fig. 2 Effect of pH value and reaction time on the hydrolysis of pre-gelatinized starch
The solutions A and C were prepared according to the Customs Analysis Method (see Fig. 1).

3.1.2 2 mol/L 酢酸水溶液の添加量と溶液の pH

前述の問題点を改善する方法として、酵素の至適 pH で加水分解反応を行う、加水分解の反応時間を長くする、酵素の添

加量を多くするなどが考えられる。本研究では、現行法のアルカリ変性後に添加する 2 mol/L 酢酸水溶液量に着目し、その添加量を変えることで酵素の至適 pH で加水分解反応を行える条件を調べた。

でん粉のアルカリ変性後の 2 mol/L 酢酸水溶液の添加量と溶液の pH との関係を図 3 に示す。2 mol/L 酢酸水溶液の添加量が 3-5 ml で溶液の pH が 4.5-5.0 となり、グルコアミラーゼの酵素の至適 pH に至ることが分かった。

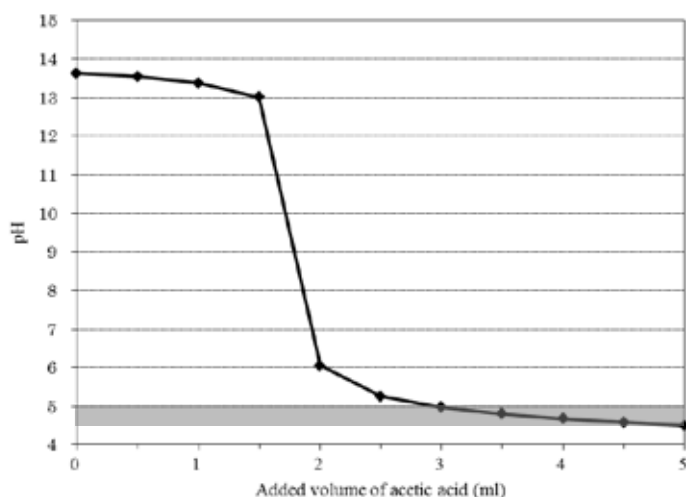


Fig. 3 Relationship between the pH value of pre-gelatinized starch solution prepared following the Customs Analysis Method and the added volume of 2 mol/L acetic acid
Grey indicates the optimum pH range (4.5 to 5.0) for hydrolysis with glucoamylase.

3.1.3 検液の pH が除たんぱく剤の効果に及ぼす影響

アルカリ変性後の 2 mol/L 酢酸水溶液の添加量を現行法より増やした場合における除たんぱく剤の効果について調べた。2 mol/L 酢酸水溶液の添加量が 2 ml (現行法) では、酵素反応後の溶液に除たんぱく剤を加えると、かさ高い沈殿物が生成したのに対して、添加量を 3 ml 以上に増やした場合では、沈降性の悪い微粒子状の沈殿物が観察された。硫酸亜鉛・水酸化バリウム系の除たんぱく剤は、生成するかさ高い大きな沈殿で、溶液内のたんぱく質を包み込んで除去するものであり、その効果に溶液の pH が影響することが報告されている⁶⁾。このことから、2 mol/L 酢酸水溶液の添加量を増やすと、溶液の pH の低下により、除たんぱく剤の効果に悪影響を及ぼすことが示唆された。

そこで、アルカリ変性後に添加する 2 mol/L 酢酸水溶液を 3 ml 以上に増やした場合について、水酸化ナトリウム水溶液で中和し、液性を中性付近に調整した後に除たんぱく剤を加えたところ、いずれもかさ高い大きな沈殿が観察された。このことから、2 mol/L 酢酸水溶液の添加量を現行法の条件より増やした場合、除たんぱく操作のために、酵素反応後の液性を中性にする必要があることが示された。

3.1.4 検液の pH がハーネス法の滴定値に及ぼす影響

ハーネス法は、アルカリ性下において還元糖がフェリシアニド

をフェロシアニドに還元する反応を利用した定量法である⁷⁾。このため、アルカリ変性後に加える2 mol/L 酢酸水溶液量を増やし、滴定用検液の pH が低下した場合、ハーネス法の滴定値に影響を及ぼす可能性が考えられる。そこで、標準グルコース水溶液を用いて、2 mol/L 酢酸水溶液の添加量が異なる条件下において添加回収実験を行い、それらの回収率を比較した (Table 1)。

2 mol/L 酢酸水溶液の添加量が2 ml (現行法) では、グルコースの回収率はほぼ100%であったが、添加量が増加 (pH は低下) するに従い、回収率も100%を超えて増加した。一方、2 mol/L 酢酸水溶液の添加量を増加させた場合であっても、検液を水酸化ナトリウム水溶液で中和すると、グルコースの回収率はほぼ100%の値を示した。以上より、ハーネス法を用いて検液中のグルコース量を正確に定量するためにも、酵素反応後に液性を中性にする必要があることが示された。

Table 1 Effect of pH value on the accuracy of determining glucose using Hanes' method

Added volume of acetic acid (ml)	pH	Recovery (%)	RSD (%) ^{b)}
2.0	6.0	100.0	0.15
2.5	5.3	100.9	0.46
3.0	5.0	101.5	0.30
3.5	4.8	101.1	0.40
4.0	4.7	102.0	0.69
2.5	neutral ^{a)}	100.0	0.67
3.0	neutral ^{a)}	100.1	0.76
3.5	neutral ^{a)}	100.1	0.93
4.0	neutral ^{a)}	100.1	1.40

a) neutral :pH was adjusted to the neutral value by adding 1 mol/L sodium hydroxide.

b) RSD: relative standard deviation

3.1.5 2 mol/L 酢酸水溶液の添加量とグルコースの生成量の関係

でん粉のアルカリ変性後の2 mol/L 酢酸水溶液の添加量と酵素反応で生成したグルコース量との関係を Fig.4 に示す。グルコースの生成量は、2 mol/L 酢酸水溶液の添加量が3 ml 以上でほぼ一定であり、アルファ化でん粉に酵素溶液を直接加えた際に生じるグルコース量と同程度であった。このことは、アルカリ変性後における2 mol/L 酢酸水溶液の添加量を3 ml 以上にすることより、でん粉が十分に加水分解されたことを示唆している。

以上のことから、アルカリ変性後の2 mol/L 酢酸水溶液の添加量を3 ml 以上とし、酵素反応を至適 pH で行った後、水酸化ナトリウム水溶液を加えて中和することで、酵素が確実に作用し、かつその後の操作に影響を与えないことが示された。

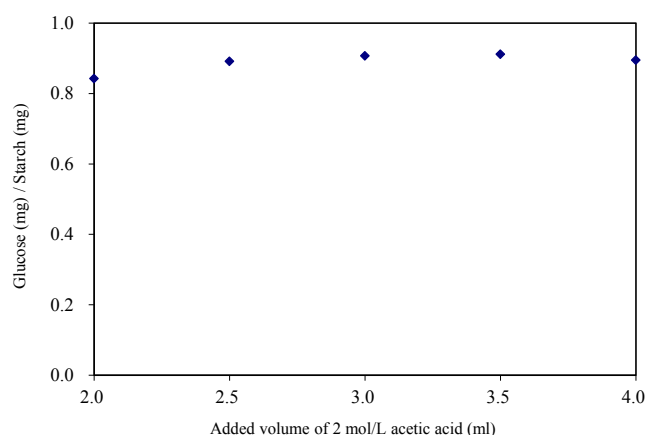


Fig. 4 Effect of added volume of 2 mol/L acetic acid on starch hydrolysis

Pre-gelatinized starch was hydrolyzed for 120 min at 37°C. The dotted line indicates the ratio of the weight of glucose generated from a pre-gelatinized starch by enzymatic hydrolysis at pH 4.8 and the original weight of the pre-gelatinized starch.

3.1.6 酵素活性とグルコースの生成量の関係

酵素溶液に含まれるグルコアミラーゼ濃度とでん粉を加水分解した際に生成するグルコース量との関係を Fig.5 に示す。グルコースの生成量は、*Rhizopus* sp.由来のグルコアミラーゼを用いた場合では酵素溶液の活性が10 unit/ml 以上で、*Aspergillus niger* 由来のグルコアミラーゼを用いた場合では75 unit/ml 以上で一定であった。

3.2 改良法の検証

3.2.1 現行法と改良法の比較

各種でん粉の模擬試料のアルファ化度を現行法及び改良法により測定した結果を Table 2 に示す。

タピオカでん粉では、いずれの試料においても、現行法で測定したアルファ化度は、改良法での値より高くなり、アルファ化でん粉においては、現行法での測定値は104.8%と100%を超える値を示したのに対して、改良法では、理論値(100%)に近似する値(99.3%)を示した。また、測定値のばらつきを表す標準偏差を比較したところ、いずれの試料においても、改良法で測定した場合の方が、現行法で測定した場合より小さい値を示し、改良法の方が現行法より精度よくアルファ化度が測定できることが分かった。一方、とうもろこし及びばれいしょでん粉では、改良法で測定したアルファ化度は、現行法での測定値とほぼ一致し、理論値に近似した。

タピオカでん粉を用いて調製した模擬試料のアルファ化度の測定値と理論値との関係を Fig.5 に示す。改良法では、アルファ化度の測定値と理論値の間に傾きが1に近似する良好な直線性が認められた。このことは、改良法で測定したアルファ化度が、分析試料のアルファ化度を正確に反映していることを示唆している。一方、現行法では、アルファ化度の測定値と理論値の間には、良好な直線性が見られるが、アルファ化度が高くなるにつれて測定値は実際より高い値を示した。

以上のことから、改良法を用いてアルファ化度を測定すると、現行法と比較して、真度と精度の両面において改善されることが示された。

Table 2 Comparison of the alpha conversion degrees of known samples determined by the present Customs Analysis Method and the improved method

Pre-gelatinized starch (%)	Degree of alpha conversion (%)		
	Theoretical value	Improved method ^{a)}	Customs Analysis method ^{a)}
Tapioca			
0	6.0	5.8±0.51	6.2±0.58
25	29.5	27.2±0.79	29.1±0.97
50	53.0	52.0±0.34	56.0±0.76
75	76.5	76.5±0.65	82.5±1.78
100	100.0	99.3±0.99	104.8±2.68
Corn			
0	8.8	8.7±0.31	8.8±0.31
30	36.1	33.5±0.50	33.9±0.22
80	81.8	81.0±0.50	81.3±0.14
100	100.0	99.8±0.14	100.1±0.33
Potato			
0	0.5	0.5±0.37	0.5±0.41
30	30.4	32.0±0.56	32.3±0.52
80	80.1	79.5±0.59	79.1±0.68
100	100.0	99.4±0.49	100.8±0.56

a) Mean ±Standard deviation, n=5 (tapioca), n=3 (corn and potato)

3.2.2 異なる生物種由来のグルコアミラーゼを用いて測定したアルファ化度の比較

Aspergillus niger 及び *Rhizopus* sp.由来のグルコアミラーゼを用いて測定した模擬試料のアルファ化度を Table 3 に示す。未加工でん粉では、*Aspergillus niger* 由来のグルコアミラーゼを用いた方が、*Rhizopus* sp.由来のものを用いた場合よりもアルファ化度は低くなった。このことは、*Aspergillus niger* 由来のグルコアミラーゼの方が、未加工でん粉に対する分解能力が低いことを示唆し、既報 ⁸⁾と一致する結果であった。また、未加工でん粉以外の試料においては、アルファ化度の測定値は、*Aspergillus niger* と *Rhizopus* sp.由来のいずれのグルコアミラーゼを用いた場合でも、ほぼ同程度であった。

Table 3 Comparison of the alpha conversion degrees of unknown samples, determined by the improved method using glucoamylase from *Aspergillus niger* and *Rhizopus* sp..

Pre-gelatinized starch (%)	Degree of alpha conversion ^{a)} (%)	
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Rhizopus</i> sp.
0	3.3±0.45	5.8±0.51
25	27.5±0.40	27.2±0.79
50	52.5±0.56	52.0±0.34
75	76.4±0.17	76.5±0.65
100	100.7±0.29	99.3±0.99

a) Mean ±Standard deviation, n=3 (*Aspergillus niger*), n=5 (*Rhizopus* sp.)

3.2.3 室間共同試験による検証

各試験室から報告された室間共同試験の結果を Table 4 に示す。外れ値の検定を行ったところ、各試料について 1～2 試験室のデータが外れ値として検出された。外れ値の検定では、参加試験室の 2/9 を超える前に外れ値検定を終了するルールがある ⁹⁾が、本共同試験では、いずれの試料においても、2/9 を超えて外れ値を検出することはなかった。

外れ値を除いたデータを用いて、併行精度及び室間再現精度を算出した結果を Table 5 に示す。併行標準偏差 (S_r) は 0.8～1.4%、室間再現標準偏差 (S_R) は 2.7～4.6%、併行相対標準偏差 (RSD_r) は 1.5～2.8%、室間再現相対標準偏差 (RSD_R) は 3.4～12.5%、併行許容差 ($2.8 \times S_r$) は 2.2～3.4%、室間再現許容差 ($2.8 \times S_R$) は 6.3～10.7%であった。

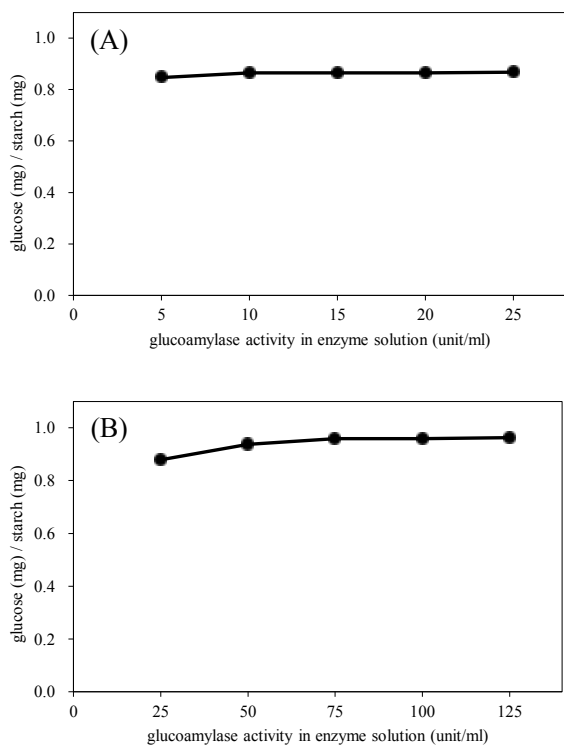


Fig. 5 Effect of glucoamylase activity on the hydrolysis of pre-gelatinized starch. Pre-gelatinized starch was hydrolyzed with glucoamylase from (A) *Rhizopus* sp. and (B) *Aspergillus niger* for 120 min at 37°C.

Table 4 Alpha conversion degrees determined by the improved method in interlaboratory study

Laboratory	Material 1, %			Material 2, %			Material 3, %			Material 4, %			Material 5, %			Material 6, %		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
A	35.7	36.4	35.6	78.7	79.0	79.8	39.3	39.5	38.7	80.4	79.3	79.8	42.0	44.3	42.9	80.9	82.1	82.0
B	45.2	46.7	45.9	85.3	86.7	86.8	43.2	44.2	44.9	76.9	76.9	75.9	36.3	38.5	35.5	81.1	81.3	81.3
C	41.3	42.9	41.0	84.9	83.8	84.4	41.7	40.5	41.2	80.1	81.8	82.0	37.4	37.8	37.0	78.2	79.1	78.0
D	42.1 ^{a)}	43.6 ^{a)}	48.7 ^{a)}	94.5 ^{a)}	96.4 ^{a)}	89.3 ^{a)}	46.1	46.8	43.6	89.8	91.4	87.2	48.1 ^{a)}	37.2 ^{a)}	46.9 ^{a)}	88.9 ^{a)}	80.4 ^{a)}	80.4 ^{a)}
E	39.5	39.1	42.2	80.7	82.7	82.7	39.9	39.5	40.9	82.1	80.1	80.5	40.1	39.7	39.6	84.3	81.0	81.3
F	32.4	32.5	31.3	80.3	76.5	80.0	30.9 ^{a)}	28.8 ^{a)}	35.0 ^{a)}	75.7 ^{a)}	58.0 ^{a)}	70.0 ^{a)}	35.1	37.5	36.9	80.7	77.0	77.8
G	33.3	33.9	32.9	81.2	82.8	80.0	37.6	37.8	37.5	98.4 ^{a)}	100.0 ^{a)}	98.9 ^{a)}	36.0	37.1	35.6	82.3	82.8	82.1
H	34.6	35.8	35.1	77.5	73.8	78.3	39.5	39.5	41.1	81.3	79.8	79.6	37.2 ^{a)}	38.5 ^{a)}	30.0 ^{a)}	77.3 ^{a)}	69.2 ^{a)}	82.4 ^{a)}
I	32.7	34.0	35.4	84.4	84.3	82.1	42.6	43.1	42.6	77.2	78.7	77.9	34.4	34.1	33.3	75.8	76.5	74.6
J	35.3	35.2	34.4	81.6	80.9	80.4	37.3	36.4	36.7	80.2	80.6	81.4						

a) outlier

Table 5 Result of interlaboratory study for determination of alpha conversion degrees by the improved method

Material No.	1	2	3	4	5	6
No. of Lab. (outlier)	9 (1)	9 (1)	9 (1)	8 (2)	7 (2)	7 (2)
Mean (%)	37.0	81.5	40.8	80.9	37.7	80.0
S _r ^{a)}	0.93	1.4	0.80	1.1	1.0	1.2
S _R ^{b)}	4.6	3.2	3.0	3.9	3.1	2.7
RSD _r ^{c)} (%)	2.5	1.7	2.0	1.4	2.8	1.5
RSD _R ^{d)} (%)	12.5	3.9	7.3	4.9	8.1	3.4
2.8×S _r ^{e)}	2.6	3.8	2.2	3.1	2.9	3.4
2.8×S _R ^{f)}	7.3	10.7	6.3	8.7	8.1	9.6

a) Repeatability standard deviation ; b) Reproducibility standard deviation ; c) Repeatability relative standard deviation ;
d) Reproducibility relative standard deviation ; e) Repeatability tolerance ; f) Reproducibility tolerance

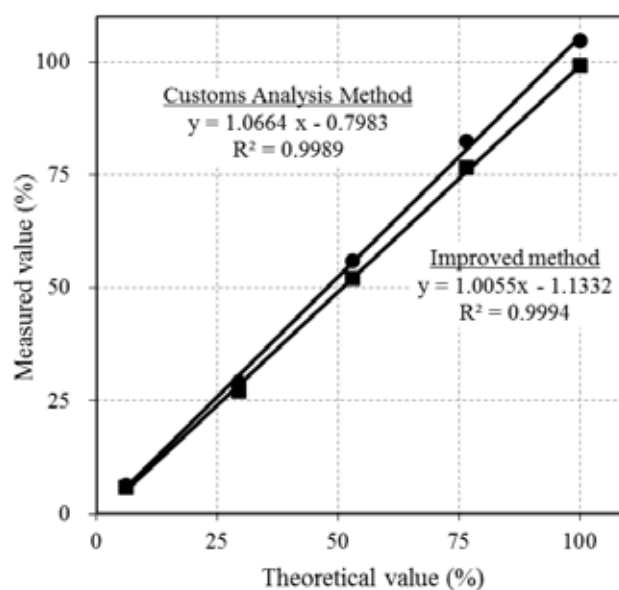


Fig. 6 Relationship between the theoretical values and the experimental ones, concerning the alpha conversion degree of starch samples

4. 要 約

税関分析法「でん粉のアルファー化度の測定法」の分析条件について再検討を行った。その結果、現行法の分析手順のうち、アルカリ変性後の 2 mol/L 酢酸水溶液の添加量を 2 ml から 3 ml に変

更し、酵素反応を至適 pH で行った後、水酸化ナトリウム水溶液を加えて中和することで、酵素が確実に作用し、かつその後の操作に影響を与えないことが示された。また、改良法を用いて測定したアルファー化度は、現行法と比較して、真度と精度の両面において改善されることが示された。

文 献

- 1) 関税中央分析所：税関分析法「でん粉のアルファー化度の測定法」
- 2) 岡本健，三浦昌子，野口源司：関税中央分析所報，**51**，45（2011）
- 3) 関川義明，加藤時信，関税中央分析所報，**25**，25（1985）
- 4) JIS Z 8402-2 “測定方法及び測定結果の精確さ（真度及び精度） - 第2部：標準方法の併行精度及び再現精度を求めるための基本的方法”（1999）
- 5) 不破英次，小巻利章，檜作進，貝沼圭二編集：“澱粉科学の事典”，P.267（2003），（朝倉書店）
- 6) 関川義明，加藤時信，関税中央分析所報，**26**，101（1986）
- 7) 福井作蔵著，瓜谷郁三，志村憲助，中村道徳，船津勝編集：“生物化学実験法1 還元糖の定量法”，P15（1969），（学会出版センター）
- 8) 池田英貴，郡司正之，高山義紀，富田健次：関税中央分析所報，**42**，41（2002）
- 9) AOAC Int. “Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis.” Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. 18th Edition（2005）