

蒸発光散乱検出器を用いた高速液体クロマトグラフィーによる でん粉のアルファー化度の測定

能一 訓久*, 杢島 紋子*, 大田 朋規*, 中山 清貴*

Determination of the degree of alpha conversion of starch by HPLC with evaporative light scattering detection

Kuniyoshi NOICHI*, Ayako MATSUSHIMA*, Tomoki OTA* and Kiyotaka NAKAYAMA*

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance

6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882 Japan

In customs laboratories, the degree of alpha conversion of pre-gelatinized starch, which is a starch derivative, is measured by the Customs Analysis Method. The method involves quantitative analysis of glucose by titration. The step of determining the quantity of glucose by titration needs many experimental operations and analysis takes a long time. In this study, we examined a quantitative analysis method using high performance liquid chromatography (HPLC) with evaporative light scattering detection (ELSD) instead of the titration method for determining glucose more simply. As a result, the degree of alpha conversion of pre-gelatinized starches determined by the HPLC method was consistent with those by the titration method.

1. 緒 言

糊化済みでん粉（アルファー化でん粉）は、でん粉を水懸濁液中で加熱処理したものやアルカリ処理したものを乾燥させることで得られ、製紙工業、繊維工業や食品工業等幅広い分野において使用されている。

アルファー化でん粉はその糊化の度合い（アルファー化度）により、関税率表上の所属が異なる。未処理の生でん粉であれば第11.08 項に分類され、糊化済でん粉であれば第35.05 項に分類される。この両者の間の税率格差は非常に大きいことから、アルファー化度を正確に測定することは関税分類上、重要な分析である。

税関においてでん粉のアルファー化度の測定は、税関分析法「でん粉のアルファー化度の測定法」(以下、「税関分析法」という。)に従っている¹⁾。この分析法は、均質なでん粉懸濁液の調製後、酵素（グルコアミラーゼ）を用いてでん粉の加水分解を行い、生成したグルコース量をハーネス法による滴定操作で定量し、その値からアルファー化度を算出している。しかし、手作業による滴定操作は複雑であり、多検体を測定する場合において分析に長い時間を要している。

高速液体クロマトグラフィー（HPLC 法）は、さまざまな化合物の分離や定量に幅広く用いられている分析手法であり、グルコースなど少糖類の定量分析にも利用されている。光吸収の乏しい少糖類の分析では、検出器に汎用性の高い示差屈折率検出器

（RID）が用いられることが多いが、同じく汎用性が高い蒸発光散乱検出器（ELSD）も利用されている²⁾。

本研究は、税関分析法のグルコースの定量部分について、滴定操作の代わりに、より簡便な機器分析で行うことを目的とし、検出感度が高くベースラインの安定性が高い特長をもつ蒸発光散乱検出器（ELSD）を用いた高速液体クロマトグラフィー（HPLC 法）による方法を検討したので報告する。

2. 実 験

2.1 試料及び試薬

未加工タピオカでん粉、アルファー化タピオカでん粉（以上、松谷化学工業(株)）、グルコアミラーゼ（*Rhizopus* sp.由来 生化学用）、グルコース、スクロース、アセトニトリル（HPLC 用）（以上、和光純薬工業(株)）

2.2 分析装置及び分析条件

高速液体クロマトグラフ

装 置：Alliance e2695（Waters）

カラム：Asahipak NH2P-50 4E (4.6mm I.D. × 250mm)

（昭和電工(株)）

ガードカラム：Asahipak NH2P-50G 4A（昭和電工(株)）

カラム温度：40

* 財務省関税中央分析所 〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-5

移動相：アセトニトリル/水=75/25

流速：0.5 ml/min (検出器が ELSD の場合) 1.0 ml/min (検出器が RID の場合)

注入量：10 μ l

検出器 (1) 蒸発光散乱検出器 (ELSD): Waters 2424

ドリフトチューブ温度：60

ネブライザー温度：50

ゲイン：100

(2) 示差屈折率検出器 (RID): Waters 2414

検出器温度：40

2.3 HPLC 法

2.3.1 HPLC 法の概要

HPLC 法による測定は、既報^{1),3)-5)}及び本研究の検討結果から決定した。Fig.1 に実験系統図を示す。

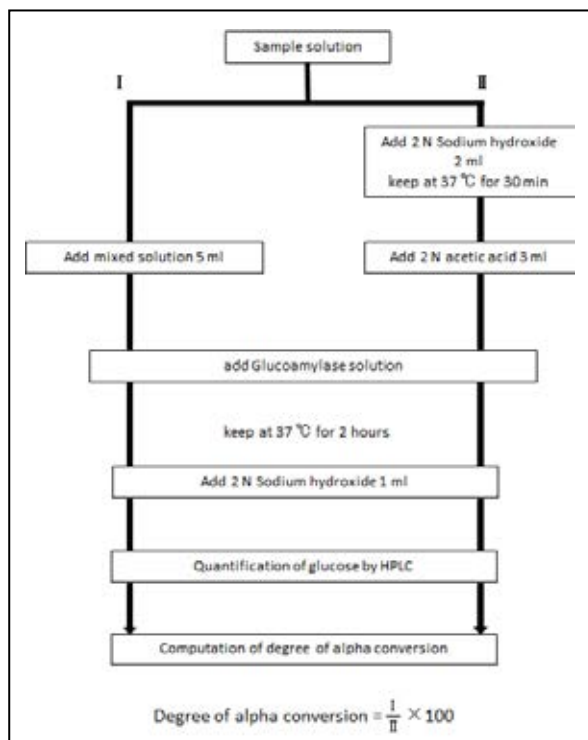


Fig. 1 Procedure of determining the degree of alpha conversion
I and II in the formula are glucose content in the test solution I and II, respectively.

2.3.2 試薬の調製

2.3.2(1) 酵素溶液

グルコアミラーゼを力価が 1 ml あたり 20 unit になるように、0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 4.8) を用いて溶解した。

2.3.2(2) グルコース標準液

グルコース 2.5 g を正確に量り採り、蒸留水を用いて 250 ml に定容した。

2.3.2(3) スクロース標準液 (内部標準溶液)

スクロース 2.5 g を量り採り、蒸留水を用いて 250 ml に定容した。

2.3.2(4) 酢酸 - 水酸化ナトリウム混液

2 mol/L 酢酸 30 ml に 2 mol/L 水酸化ナトリウム 20 ml を加えよく混和した。

2.3.2(5) 除たんぱく剤

A 液：硫酸亜鉛七水和物 20 g を量り採り、蒸留水を用いて 1000 ml に定容した。

B 液：水酸化バリウム八水和物 18 g を量り採り、蒸留水を用いて 1000 ml に定容した。

2.3.3 検液の調製

分析試料の水懸濁液 (約 0.6 g/100 ml) 10 ml を 2 本の 50 ml 容三角フラスコに正確に量り採り、一方を 液、他方を 液とした。両液を 37 に設定した振とう恒温水槽中に置き、液については 2 mol/L 水酸化ナトリウム 2 ml を加えて 30 分間アルファ化を行った。次に、液に酢酸 - 水酸化ナトリウム混液 5 ml、液に 2 mol/L 酢酸 3 ml をそれぞれ加えた後、両液に酵素溶液 2 ml を加え 37 で 2 時間加水分解を行った。液及び液にそれぞれ 2 mol/L 水酸化ナトリウム 1 ml を加え中和操作を行った後、除たんぱく剤 A 液及び B 液をそれぞれ 5 ml ずつ加えた。内部標準としてスクロース標準液 10 ml をそれぞれに加え、この溶液をろ紙及びメンブランフィルター (0.45 μ m) でろ過したものを HPLC 用の検液とした。

2.3.4 グルコースの定量

50 ml 容メスフラスコにスクロース標準液 5 ml と希釈後に濃度が 0.05 - 2 mg/ml になるようグルコース標準液を採取し、蒸留水で定容したものを検量線作成用検液とした。各検量線作成用検液 10 μ l を HPLC に注入し、得られたクロマトグラムにおけるグルコースとスクロースの面積比と重量比から検量線を作成した。次に、2.3.3 で調製した検液 10 μ l を HPLC に注入し、検液中のグルコース量を定量した。

2.3.5 アルファ化度の算出

アルファ化度は、次式により算出した。

$$\text{アルファ化度}(\%) = \frac{\text{検液のグルコース量(g)}}{\text{検液のグルコース量(g)}} \times 100$$

2.4 実験

2.4.1 検出器に ELSD を用いたグルコースの定量方法の検討

2.4.1(1) 内部標準物質の検討

グリセリン、ソルビトール、フルクトース、ガラクトース、スクロース、マルトース、ラクトース、マルチトール、ラクチトールについて、それぞれ 1 mg/ml 水溶液を調製し、検出器に ELSD を用いて HPLC により、2.2 の条件で測定した。

2.4.1(2) 繰り返し精度

50 ml 容メスフラスコにスクロース標準液 5 ml とグルコース標準液 5 ml を正確に採取し、蒸留水で定容した。この溶液について、2.2 の分析条件で、12 回繰り返し測定を行った。得られたクロマトグラムからグルコースとスクロースのピーク面積の比の平均値と変動係数を算出した。

2.4.1(3) 検量線の作成

50 ml 容メスフラスコにスクロース標準液 5 ml と希釈後に濃度

が 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.7, 0.8, 1, 1.5, 2 mg/ml になるようグルコース標準液を採取し、蒸留水で定容した。これら各溶液について、HPLC に 3 回ずつ注入し、得られたクロマトグラムのスクロースのピーク面積 (A_s) に対するグルコースのピーク面積 (A_x) の比 (A_x/A_s) の平均値を求めた。この値と各溶液中のスクロースの重量 (W_s) に対するグルコースの重量 (W_x) の比 (W_x/W_s) を両対数でプロットした²⁾。

2.4.2 HPLC 法によるアルファ化度の測定

未加工タピオカでん粉とアルファ化タピオカでん粉の混合割合が 0:100、20:80、70:30、100:0 の模擬検体を調製し、それぞれを検体 1~4 とした。検体 1~4 について、HPLC 法及び滴定法により、アルファ化度を測定した。HPLC 法は、2.3 の実験手順に従い行った。HPLC 法において、 A_x/A_s の値は、各検液について同一バイアルから 3 回 HPLC に導入し、それらの平均値を用いた。滴定法の実験手順は、報告⁵⁾に基づき行った。滴定はマイクロビューレット(柴田科学(株))を用いて、各検液について 3 回行い、その平均値を滴定量とした。

3. 結果と考察

3.1 検出器に ELSD を用いたグルコースの定量方法の検討

3.1.1 内部標準物質の検討

本研究では、でん粉を酵素(グルコアミラーゼ)により加水分解した際に生成するグルコースの定量を対象としていることから、内部標準物質の条件として、目的成分であるグルコースのピークと分離していること、内部標準物質の検出感度が高いこと、でん粉の加水分解操作に用いる試薬由来のピークと分離していることが必要とされる。

まず、内部標準物質の検討と、これらを分離、定量できる HPLC 条件を検討した。2.2 の測定条件でグルコース及び内部標準物質の検討に用いた 7 種の化合物のクロマトグラムを Fig.2 に示す。グリセリン及びガラクトースのピークは観察されなかった。また、後述の 3.2 で詳細は述べるが、でん粉の加水分解操作に用いる試薬由来のピークは、グルコースの溶出時間以降には観察されなかった。これらの結果から、グルコース及びでん粉の加水分解操作に用いる試薬由来のピークとの分離がよく、ピークの検出感度も高い化合物の中から、価格の安いスクロースを内部標準物質として採用した。

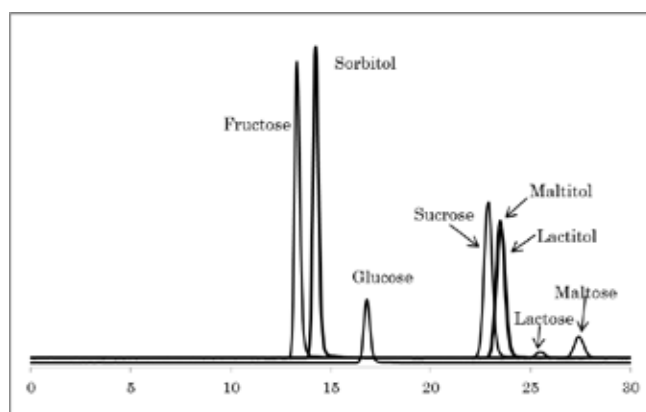


Fig. 2 Chromatogram of glucose and 7 possible internal standard materials

3.1.2 繰り返し精度

スクロースを内部標準物質として、1 mg/ml グルコースについて、2.2(1) の測定条件で ELSD を用いた HPLC 法により繰り返し測定 ($n=12$) を行った結果、グルコースとスクロースのピーク面積比は平均値 0.5782、変動係数 0.64 % となり、良好な繰返し精度を示した。

3.1.3 検量線の直線性

ELSD を用いた HPLC 法により作成したグルコースの検量線を Fig.3 に示す。グルコース 0.05 - 2 mg/ml の濃度範囲において、スクロースに対するグルコースの重量比の常用対数値とピーク面積比の常用対数値との関係は、相関式: $Y = 1.7834X - 0.4201$ (相関係数 $R^2 = 0.9999$) となり、良好な直線性を示した。

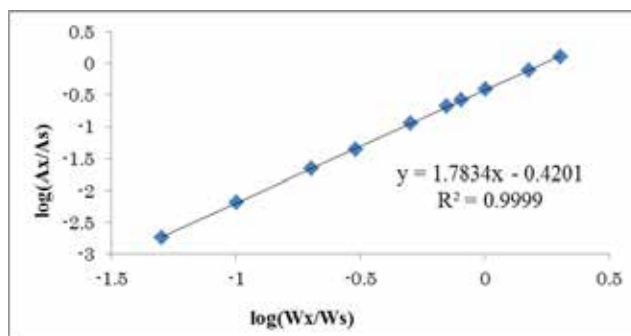


Fig. 3 Calibration curve of glucose

Ax: peak area of glucose, As: peak area of internal standard, Wx: weight of glucose, Ws: weight of internal standard

3.2 HPLC 法によるアルファ化度の測定

2.3.3 に従い加水分解した検体 2 の液のクロマトグラムを Fig.4 に示す。でん粉の加水分解操作で用いた試薬に由来する大きなピークが、保持時間 8 min 付近に観察される。このピークは、酢酸 - 水酸化ナトリウム混液を HPLC に導入した場合にも観察されることから、酢酸ナトリウムのピークと推測される。グルコース及びスクロースのピークは、それぞれ保持時間 17 min、23 min 付近に溶出し、ともに他のピークと重なることなく良好に分離している。

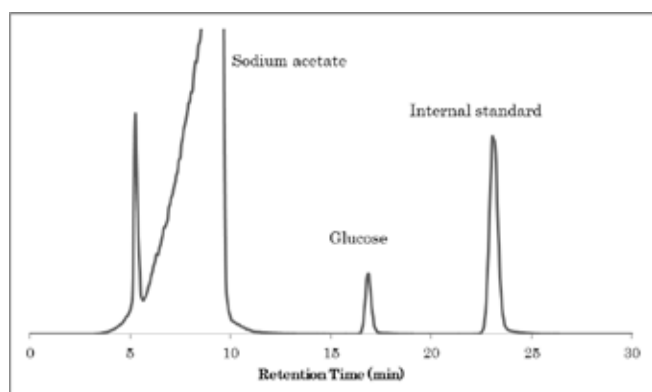


Fig. 4 Chromatogram of starch hydrolysate

Pre-gelatinized starch was hydrolyzed with glucoamylase for 120 min at 37°C.

各検体について HPLC 法及び滴定法を用いてアルファ化度の測定を行った (Table 1)。HPLC の検出器に ELSD を用いた場合、いずれの検体においても、その測定結果は滴定法で得られた値とほぼ同じ値を示した。一方、HPLC の検出器に RID を用いた場合は、アルファ化度が低い検体ほど滴定法で得られた値とのずれが大きくなった。

Table 1 Comparison of the degree of alpha conversion determined by the titration method and the proposed HPLC method

Sample	the degree of alpha conversion (%)		
	HPLC method		Titration method
	ELSD	RID	
1	100.0	99.5	98.7
2	82.4	81.9	81.1
3	34.6	36.2	34.1
4	7.4	10.1	6.9

n=3 (sample 1, 4), n=12 (sample 2, 3)

次に、検体 2 及び 3 を用いてそれぞれ 12 回測定を行い、各測定法の繰り返し精度を比較した (Table 2)。その結果、HPLC の検出器に ELSD を用いた場合、測定値の標準偏差及び変動係数は検体 2 については標準偏差 1.27、変動係数 1.54 %、検体 3 については標準偏差 1.10、変動係数は 3.17 %であった。また、検出器に RID を用いた場合では検体 2 では標準偏差 1.98、変動係数 2.42 %、検体 3 では標準偏差 2.16、変動係数 5.95 %であった。

Table 2 Repeatability of the degree of alpha conversion determined by the titration method and the proposed HPLC method

	the degree of alpha conversion (%)					
	Sample No.2			Sample No.3		
	HPLC method		Titration method	HPLC method		Titration method
	ELSD	RID		ELSD	RID	
1	83.0	78.9	78.4	36.2	40.1	34.7
2	83.5	84.6	80.2	34.1	35.3	33.9
3	83.1	83.7	81.8	32.2	31.7	34.5
4	82.4	79.4	82.4	34.5	36.8	34.7
5	83.5	84.1	84.1	35.1	37.3	33.2
6	82.5	79.3	80.4	36.2	39.9	35.5
7	82.4	82.4	78.6	34.9	35.8	34.5
8	80.2	83.6	79.6	34.6	33.9	34.7
9	82.8	80.9	82.3	33.4	37.6	33.2
10	82.9	81.3	82.6	36.1	36.5	33.0
11	83.6	81.4	83.2	35.2	35.4	32.6
12	83.0	78.9	79.0	34.4	35.8	33.3
average	82.4	81.9	81.1	34.6	36.2	34.1
S.D.	1.27	1.98	1.93	1.10	2.16	1.05
C.V.	1.54	2.42	2.38	3.17	5.95	3.08

S.D.: standard division

C.V.: Coefficient of variation

以上のことから、検出器に ELSD を用いて測定したアルファ化度の値は、滴定法を用いて測定した値とほぼ一致し、同程度の精度を有することが示された。一方、検出器に RID を用いて測定した場合は、アルファ化度が低い試料においては、測定値のばらつきが大きくなることが判明した。これは今回の条件ではアルファ化度が低く生成するグルコース量が少ない場合、検出器

に RID を用いた測定ではクロマトグラムのベースラインの乱れがグルコース及びスクロースのピーク面積値に与える影響が、相対的に大きくなるためと推測される。

4. 要 約

ELSD を用いた HPLC によるでん粉のアルファー化度の測定について検討を行った。その結果、ELSD を用いて測定したアルファー化度の値は、滴定法を用いて測定した値とほぼ一致し、滴定

法と同程度の精度を有する測定法であることが示された。また、検出器に RID を用いた測定法についても検討を行った結果、アルファー化度が高い検体においては、アルファー化度の測定値は滴定法を用いて測定した値とほぼ一致し、滴定法と同程度の精度を有することが判明した。

文 献

- 1) 関税中央分析所：税関分析法（2002）。
- 2) 寺田 英敏、早川 禎宏、三上 博久：CHROMATOGRAPHY, 32, 141（2011）
- 3) 三浦 誠、上野 勝、三浦 徹、渡邊 裕之、三枝 朋樹：関税中央分析所報, 48, 21（2008）
- 4) 岡本 健、三浦 昌子、野口 源司：関税中央分析所報, 51, 45（2011）
- 5) 大田 朋槻、松島 紋子、中山 清貴、赤崎 哲也：関税中央分析所報, 投稿中