

pH 測定によるアセチル化でん粉のアセチル化度の検証

南館 正知*, 五十嵐 智大*, 竹元 賢治*, 片山 貴之*

Research on quantitative analysis of acetyl substitution in acetylated starch with pH meter

Yoshitomo MINAMIDATE*, Tomohiro IGARASHI*, Kenji TAKEMOTO* and Takayuki KATAYAMA*

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

In the Customs Tariff Schedule, modified starch is classified under heading 35.05 and starch (unmodified) is classified under heading 11.08. There is a large difference in their tax rates, and so it is important to distinguish whether starch is modified or not to ensure appropriate customs procedures. Acetylated starch, a kind of modified starch, is defined by degree of acetyl substitution (DS) in the glucose group of starch. In the Japan Customs Analysis Method, DS is determined by acid-base titration with phenolphthalein as a pH indicator. However, starch sometimes blurs the color of the solution and it is difficult to distinguish whether the color has changed or not. In this study, we investigated a titration method with pH meter, instead of phenolphthalein.

1. 緒 言

実行関税率表において、変性でん粉の一種であるアセチル化でん粉はアセチル化度（以下、DS 値という）により第 35.05 項または第 11.08 項に分類され、両者の税率格差は非常に大きいことから、正確な分類が求められている。

アセチル化でん粉の分類は、国内分類例規において、「アセチル化でん粉に関し、でん粉と DS 値の非常に低いアセチル化でん粉との区別が化学的及び物理的に困難である」ことから、「アセチル化でん粉については、DS 値 0.01（グルコース単位 1,000 個に対し置換基 10 個）以上のものを変性でん粉として分類する」とこととされている。

現在、アセチル化でん粉の DS 値の測定は、税関分析法「でん粉誘導体の分析法」¹⁾に従い、試料を水に懸濁させ、水酸化ナトリウムによる過剰塩基条件下で懸濁液中のアセチル基を反応させた後に、フェノールフタレインを指示薬とし、塩酸で滴定（以下、比色法という）を行い、同様の操作を原料でん粉又は同種の未変性でん粉に対して行った際の滴定値との差から DS 値を算出している。しかし、この方法では、滴定の際に試料が白濁しているため、指示薬のわずかな変色の確認が阻害され、正確な滴定が行えない場合がある。

このため、本研究では、精度の高い滴定を行うことを目的に、指示薬の変色に影響を受けない、pH メーターで pH 値を測定することで滴定の終点を確認する方法（以下、pH 法という）を検討したので報告する。

2. 実 験

2.1 試 料

- ・未変性でん粉（トウモロコシ由来）（和光純薬工業製）
- ・未変性でん粉（小麦由来）（和光純薬工業製）
- ・未変性でん粉（タピオカ由来）（松谷工業化学製）
- ・アセチル化でん粉（小麦由来）1 検体（輸入品）
- ・アセチル化でん粉（タピオカ由来）3 検体（輸入品）

2.2 試 薬

- ・酢酸ビニル（和光純薬工業製）
- ・0.45 M 水酸化ナトリウム水溶液：水酸化ナトリウム（和光純薬工業製）36 g を 1 L に定容したもの
- ・4 %水酸化ナトリウム水溶液：水酸化ナトリウム（和光純薬工業製）4 g を 100 mL に定容したもの
- ・5 mM 水酸化ナトリウム水溶液：上記 4 %水酸化ナトリウム水溶液を 200 倍希釈したもの
- ・酢酸（和光純薬工業製）
- ・1 %フェノールフタレイン溶液：フェノールフタレイン（和光純薬工業製）1 g をエタノール 90 mL に溶解させた後、蒸留水で 100 mL に定容したもの
- ・0.25 M 塩酸（林純薬工業製）
- ・0.05 M 塩酸：上記 0.25 M 塩酸を 5 倍希釈したもの

2.3 分析装置

- ・pH メーター：SevenEasy pH（METTLER TOLEDO 製）
- ・pH 電極：InLab Routine Pro（METTLER TOLEDO 製）

* 財務省関税中央分析所 〒272-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-5

2.4 実験方法

2.4.1 アセチル化でん粉の調製

低置換度アセチル化でん粉の調製法は複数報告されており、今回は操作の簡便な酢酸ビニルででん粉を修飾する方法²⁾を用いた。1000 mL 容ビーカーに未変性でん粉（トウモロコシ由来）約 200 g を採取し、蒸留水約 600 mL を加え分散させた。4%水酸化ナトリウム水溶液で pH10.5–10.6 に調整し、酢酸ビニルを加え 37 °C で 1 時間攪拌し、反応させた。pH 値が 7 を下回っているのを確認し、ろ別した。ろ物を 3 L の水に分散させ、ろ別洗浄を行った。更に 2 回ろ別洗浄を行った後、メタノールで置換ろ別し、室温で風乾した。

なお、使用する酢酸ビニルの量は 10 g, 20 g, 30 g とし、調製試料を 3 検体作成した。

2.4.2 標準酢酸溶液の調製

酢酸 3.70 g を 100 mL 容メスフラスコに採取し、蒸留水で定容し標準酢酸原液とした。200 mL 容メスフラスコにホールピペットで標準酢酸原液を 10 mL 採取し蒸留水で定容し、標準酢酸溶液とした。なお、この溶液は 10 mL 中に DS 値 0.01 のアセチル化でん粉 5 g に相当するアセチル基を含有しているものと同等である。

2.4.3 フェノールフタレインの変色点における pH 値の確認

200 mL 容ビーカーに蒸留水約 100 mL, 1%フェノールフタレイン溶液 0.5 mL, 0.45 M 水酸化ナトリウム水溶液 25 mL 及び標準酢酸溶液 10 mL を加えた。薄い赤色になるまで 0.25 M 塩酸を滴下した後、赤色が消失するまで 0.05 M 塩酸を滴下し、変色点における pH 値を pH メーターで測定した。

2.4.4 酢酸回収率の確認

2.4.4(1) 比色法における酢酸の回収率

200 mL 容ビーカーに蒸留水約 100 mL 及び 1%フェノールフタレイン溶液 0.5 mL を加え、わずかに赤色に着色するまで 5 mM 水酸化ナトリウム水溶液を滴下した。0.45 M 水酸化ナトリウム水溶液 25 mL 及び標準酢酸溶液 10 mL を加えた後に、フェノールフタレインの色が消失するまで 0.25 M 塩酸で滴定した。

ブランクとして標準酢酸溶液を加えずに同様の操作を行い、滴定量の差から酢酸の回収率を求めた。回収率の算出方法は Formula 1 のとおりである。

Formula 1

$$\text{Recovery rate (\%)} = (V_0 - V)FN/n_{\text{AcOH}} \times 100$$

V_0 : Blank titer (mL)

V : Sample titer (mL)

F : Factor of hydrochloric acid solution

N : Normality of hydrochloric acid solution (M)

n_{AcOH} : Calculated mole number of acetic acid (mol)

2.4.4(2) pH 法における酢酸の回収率

200 mL 容ビーカーに蒸留水約 100 mL を加え、pH メーターで測定しながら 2.4.3 で求めたフェノールフタレインの変色点における pH 値（以下、変色点 pH 値という）以上になるまで 5 mM 水酸化ナトリウム水溶液を滴下した。0.45 M 水酸化ナトリウム水溶液 25 mL 及び標準酢酸溶液 10 mL を加えた後に、変色点 pH 値以下になるま

で 0.25 M 塩酸で滴定した。

ブランクとして酢酸溶液を加えずに同様の操作を行い、滴定量の差から酢酸の回収率を求めた。回収率の算出方法は Formula 1 のとおりである。

2.4.5 DS 値の測定

2.4.5(1) 測定試料の水分

2.4.1 の調製試料 3 検体及び輸入品のアセチル化でん粉 4 検体をそれぞれ秤量缶に約 2 g 採取し、135 °C で 1 時間加熱して水分を測定した。ここで求めた水分を用いて各試料の重量をドライベース重量に補正した。

2.4.5(2) 比色法による DS 値の測定

2.4.1 の調製試料 3 検体及び輸入品のアセチル化でん粉 4 検体をそれぞれ 200 mL 容ビーカーに約 5 g 採取し、蒸留水約 100 mL を加え、スターラーで攪拌し懸濁させた。1%フェノールフタレイン溶液を 0.5 mL 加え、わずかに赤色に着色するまで 5 mM 水酸化ナトリウム水溶液を滴下した。次に、0.45 M 水酸化ナトリウム水溶液 25 mL を加え、ポリエチレンフィルムで密封し、室温で 30 分間攪拌した。その後、0.25 M 塩酸でフェノールフタレインの色が消失するまで滴定した。

ブランクとして、アセチル化でん粉の代わりに同種の未変性でん粉を用いて同様の操作を行い、滴定量の差から DS 値を求めた。DS 値の算出方法は Formula 2 のとおりである。

Formula 2

$$DS = 162A / (4300 - 42A)$$

$$A = (V_0 - V)FN \times 0.043 \times 100 / m$$

DS : Substitution degree

A : Content rate of acetyl group (dry basis) (%)

V_0 : Blank titer (mL)

V : Sample titer (mL)

F : Hydrochloric acid factor

N : Normality of hydrochloric acid solution (M)

m : Amount of sample (dry basis) (g)

2.4.5(3) pH 法による DS 値の測定

2.4.1 の調製試料 3 検体及び輸入品のアセチル化でん粉 4 検体をそれぞれ 200 mL 容ビーカーに約 5 g 採取し、蒸留水約 100 mL を加え、スターラーで攪拌し懸濁させた。pH メーターで測定しながら変色点 pH 値以上になるまで 5 mM 水酸化ナトリウム水溶液を滴下した。次に、0.45 M 水酸化ナトリウム水溶液 25 mL を加え、ポリエチレンフィルムで密封し、室温で 30 分間攪拌した。その後、0.25 M 塩酸で変色点 pH 値以下になるまで滴定した。

ブランクとして、アセチル化でん粉の代わりに同種の未変性でん粉を用いて同様の操作を行い、滴定量の差から DS 値を求めた。DS 値の算出方法は Formula 2 のとおりである。

3. 結果及び考察

3.1 フェノールフタレインの変色点における pH 値の確認

2.4.3 において、フェノールフタレインの変色点における pH 値を 10 回測定した測定値及び測定値の平均値を Table 1 に示す。

pH 値は 7.74–7.84 で平均値は 7.80 であったため、変色点の pH 値を 7.80 とした。

No	pH of phenolphthalein color changing point
1	7.79
2	7.78
3	7.75
4	7.74
5	7.82
6	7.84
7	7.80
8	7.84
9	7.80
10	7.82
Average	7.80

3.2 酢酸回収率の確認

2.4.4(1), 及び 2.4.4(2)において測定した、標準酢酸溶液の比色法及び pH 法による酢酸回収率、酢酸回収率の平均値及び標準偏差を Table 2 に示す。

酢酸回収率の平均値は比色法では 99.5%, pH 法では 99.4%とともに良好な回収率を得られた。また精度に関しても、標準偏差は比色法で 0.75, pH 法で 1.20 と遜色の無い値が得られ、pH 法でも比色法と同様に測定が行えることが確認できた。

No	AcOH recovery rate by colorimetric method [%]	AcOH recovery rate by pH method [%]
1	99.2	97.9
2	98.4	99.6
3	98.4	99.6
4	99.2	98.8
5	99.2	101.2
6	100.9	99.6
7	100.0	101.2
8	100.0	100.4
9	100.0	97.9
10	100.0	97.9
Average	99.5	99.4
Standard deviation	0.75	1.20

3.3 調製試料及び輸入品の測定

2.4.5(2)及び 2.4.5(3)において測定した、2.4.1 の調製試料 3 検体及び輸入品のアセチル化でん粉 4 検体について比色法及び pH 法による測定回数、DS 値の平均値、標準偏差、pH 法における DS 値の平均値に対する比色法における DS 値の平均値の比(C/pH)、F 検定の有意確率 (p 値)、t 検定の有意確率 (p 値) 及び二法の平均値における有意差の有無を Table 3 に示す。

各試料について、pH 法における DS 値の平均値に対する比色法における DS 値の平均値の比(C/pH)は 0.994–1.007 であり、標準偏差は比色法で $(4.4-17.6) \times 10^{-5}$ で、pH 法で $(5.7-17.0) \times 10^{-5}$ となった。

また、各試料において、比色法と pH 法の DS 値について有意水準 5%で F 検定を行い分散が等しいか確認したところ、タピオカ由来の輸入品 2 以外の試料は有意確率が 0.05 を上回っていた。そのため測定値の平均値に有意差が有るか確認するために、輸入品 2 以外の試料は等分散であるとみなし Student の t 検定を、輸入品 2 については等分散であるとみなせないため Welch の t 検定をそれぞれ行った。その結果は、いずれの試料においても t 検定の有意確率 (p 値) は 0.05 を上回っており、二法の DS 値の平均値に有意差はなかった。

3.4 考 察

3.3 において実施した比色法と pH 法の測定値に対する t 検定の結果、DS 値の平均値に有意差が無いことから、pH 法でも比色法と遜色の無い精度で測定を行えることが確認できた。測定値の誤差の原因としては終点の確認方法よりも、ピペットやビュレット操作、サンプリングの精度の寄与が大きいものと思料される。

pH 法は比色法と比較して測定精度の向上は見られなかったが、滴定の終点を客観的に数値で観測できるため、より簡便な方法と考えられる。また、指示薬の代替として pH メーターによる滴定を行うため、今後は自動滴定装置を利用することで、より一層の測定の簡便化と精度の向上が期待できるものと思料される。

4. 要 約

税関分析法「でん粉誘導体の分析法」におけるアセチル化でん粉のアセチル化度の測定精度を向上させるために、同分析法の滴定の工程において、比色法滴定の代わりに pH 値を pH メーターで測定することで滴定を行う方法を検証した。

模擬試料を用いて二法の酢酸回収率を確認したところ、いずれも回収率は 99 %以上の良好な値を示し、遜色がなかった。

調製試料及び輸入品を用いて、二法でアセチル化度の測定を行ったところ、二法における測定値及び標準偏差に有意差は無く、pH 法は比色法と遜色の無い分析法といえる。

Table 3 Comparison of DS obtained by the colorimetric method and by the pH method

Category	Sample name	Colorimetric method			pH method			C/pH ^{b)}	F-test (Significance probability)	t-test for DS (Significance probability and Significant difference)
		n ^{a)}	DS average	Standard deviation	n ^{a)}	DS average	Standard deviation			
Corn product	Prepared 1	5	0.00953	0.000067	5	0.00947	0.000057	1.007	0.757	0.172 No significant difference
Corn product	Prepared 2	5	0.01365	0.000044	5	0.01362	0.000091	1.003	0.185	0.486 No significant difference
Corn product	Prepared 3	5	0.01415	0.000105	5	0.01419	0.000066	0.997	0.396	0.579 No significant difference
Wheat product	Import 1	9	0.01197	0.000131	9	0.01190	0.000170	1.006	0.487	0.357 No significant difference
Tapioca product	Import 2	9	0.01101	0.000176	8	0.01097	0.000063	1.004	0.014	0.563 No significant difference
Tapioca product	Import 3	9	0.03040	0.000143	9	0.03027	0.000104	1.004	0.381	0.058 No significant difference
Tapioca product	Import 4	10	0.01825	0.000147	10	0.01836	0.000113	0.994	0.446	0.099 No significant difference

a) n denotes the number of measurements.

b) C/pH denotes the ratio of the DS average by the colorimetric method to that by the pH method.

文 献

- 1) 関税中央分析所ホームページ「でん粉誘導体の分析法」(http://www.customs.go.jp/ccf_search/analysis_search/a_403_j.pdf)
- 2) 中村道徳, 貝沼圭二 編集: “澱粉・関連糖質実験法”, P289(1989), (株式会社 学会出版センター)