

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4594792号
(P4594792)

(45) 発行日 平成22年12月8日 (2010. 12. 8)

(24) 登録日 平成22年9月24日 (2010. 9. 24)

(51) Int. Cl.

F 1

GO 1 N 30/88 (2006. 01)

GO 1 N 30/88

C

GO 1 N 30/06 (2006. 01)

GO 1 N 30/06

Z

GO 1 N 30/26 (2006. 01)

GO 1 N 30/26

A

GO 1 N 30/74 (2006. 01)

GO 1 N 30/74

E

請求項の数 4 (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願2005-131279 (P2005-131279)
 (22) 出願日 平成17年4月28日 (2005. 4. 28)
 (65) 公開番号 特開2006-308415 (P2006-308415A)
 (43) 公開日 平成18年11月9日 (2006. 11. 9)
 審査請求日 平成19年12月13日 (2007. 12. 13)

(73) 特許権者 000000918
 花王株式会社
 東京都中央区日本橋茅場町 1 丁目 1 4 番 1
 〇号
 (74) 代理人 110000084
 特許業務法人アルガ特許事務所
 (74) 代理人 100068700
 弁理士 有賀 三幸
 (74) 代理人 100077562
 弁理士 高野 登志雄
 (74) 代理人 100096736
 弁理士 中嶋 俊夫
 (74) 代理人 100117156
 弁理士 村田 正樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒドロキシヒドロキノン量の測定法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

コーヒー飲料又はコーヒー抽出物含有食品に酸を添加してpHを5以下に調整し、かつキレート剤を添加した試料溶液を液体クロマトグラフィーに付すことを特徴とするコーヒー飲料又はコーヒー抽出物含有食品中のヒドロキシヒドロキノン量の測定法。

【請求項 2】

試料溶液を、さらにカチオン交換樹脂処理する請求項1記載のヒドロキシヒドロキノン量の測定法。

【請求項 3】

液体クロマトグラフィーが、逆相液体クロマトグラフィーである請求項1又は2記載のヒドロキシヒドロキノン量の測定法。

【請求項 4】

液体クロマトグラフィーの溶離液のpHが5以下である請求項1～3のいずれか1項記載のヒドロキシヒドロキノン量の測定法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、コーヒー飲料又はコーヒー抽出物含有食品中のヒドロキシヒドロキノン量を安定して正確に測定する方法に関する。

【背景技術】

10

20

【 0 0 0 2 】

コーヒー飲料やコーヒー抽出物含有食品には、クロロゲン酸、カフェ酸、フェルラ酸等が含まれており、これらの成分は優れた血圧降下作用を示すことが報告されている（特許文献 1 ～ 3）。しかしながら、クロロゲン酸類を多量に含むことが知られているコーヒー飲料では、明確な血圧降下作用が認められず、逆に血圧を上昇させるという報告もある（非特許文献 1）。

【 0 0 0 3 】

一方、コーヒー中に存在するヒドロキシヒドロキノン（HHQ）は、共存するマトリックスの影響で、大気下に放置しておくだけで酸化、重合又は抱合体を形成し、安定に存在することが困難である。このため、逆相液体クロマトグラフィーや、ヒドロキシル基をトリメチルシリル化した後ガスクロマトグラフィーによる定性的な分析が行なわれているにすぎない（非特許文献 2）。

【特許文献 1】特開 2 0 0 2 - 3 6 3 0 7 5 号公報

【特許文献 2】特開 2 0 0 2 - 2 2 0 6 2 号公報

【特許文献 3】特開 2 0 0 2 - 5 3 4 6 4 号公報

【非特許文献 1】Eur. J. Clin. Nutr., 53(11), 831(1999)

【非特許文献 2】J. Appl. Microbiol., 88, 764(2000)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 4 】

本出願人は、コーヒー飲料がクロロゲン酸を含んでいるにもかかわらず、十分な血圧降下作用を示さないことに着目し、血圧降下作用とコーヒー飲料成分との関係について種々検討した結果、コーヒー飲料に含まれているヒドロキシヒドロキノンがクロロゲン酸類の血圧降下作用を阻害していることを見出した。そして、更に検討した結果、コーヒー飲料中のクロロゲン酸類量を一定範囲に保持し、ヒドロキシヒドロキノン含量を通常含まれる量より十分少ない一定量以下に低下させれば、優れた血圧降下作用を有するコーヒー飲料組成物が得られることを見出した。従って、従来は定量的に測定する必要性のなかった、コーヒー飲料やコーヒー抽出物含有食品中のヒドロキシヒドロキノン量の安定で、正確な測定法の開発が必要となった。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 5 】

そこで本発明者は、コーヒー飲料組成物等を試料として液体クロマトグラフィーによりヒドロキシヒドロキノン量を測定するに際し、試料中のヒドロキシヒドロキノン経時的変化を抑制し、かつ他の成分との分離性を向上させるべく種々検討した結果、コーヒー飲料等に酸を添加して pH を 5 以下に調整し、これにキレート剤を添加したものを試料溶液とすれば、ヒドロキシヒドロキノンが液体クロマトグラフィー測定環境で安定に存在することが可能となり、コーヒー飲料等の組成物中のヒドロキシヒドロキノンが正確に測定できることを見出した。

【 0 0 0 6 】

すなわち、本発明は、コーヒー飲料又はコーヒー抽出物含有食品に酸を添加して pH を 5 以下に調整し、かつキレート剤を添加した試料溶液を液体クロマトグラフィーに付すことを特徴とするコーヒー飲料又はコーヒー抽出物含有食品中のヒドロキシヒドロキノン量の測定法を提供するものである。

【発明の効果】

【 0 0 0 7 】

本発明方法によれば、コーヒー飲料又はコーヒー抽出物含有食品中のヒドロキシヒドロキノン含量を安定して、正確に測定できる。従って、クロロゲン酸の持つ高血圧改善効果をコーヒー中で発現させるために、その効果の阻害成分であるヒドロキシヒドロキノンに極力除去したコーヒーを製造し、そのコーヒー中のヒドロキシヒドロキノン量を安定かつ正確に測定できる。また、高血圧改善効果のあるコーヒー及びコーヒー飲料を製造する際

に、阻害成分であるヒドロキシヒドロキノンがある一定量以上に存在しないことを確認するために、安定かつ正確にヒドロキシヒドロキノン量を測定することが可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

本発明方法に用いられるコーヒー飲料又はコーヒー抽出物含有食品としては、焙煎コーヒー抽出液を含有するコーヒー飲料、インスタントコーヒー組成物、容器詰コーヒー飲料、コーヒー抽出物含有チューインガム、コーヒー抽出物含有菓子類等が挙げられる。

【0009】

本発明においては、まずこれらの試料に酸を添加してpHを5以下に調整する。酸を添加することにより、試料中のヒドロキシヒドロキノンが測定操作中安定に維持される。用いる酸としては、試料溶液のpHを5以下にすることができるものであればよく、リン酸、塩酸、硝酸、硫酸等の鉱酸；ギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸等の有機酸等が挙げられる。また、これらの酸の使用量は、pHを5以下にする量であればよく、特に限定されない。また、好ましいpHは1～5であり、より好ましいpHは2～4である。

【0010】

また、試料には、キレート剤も添加する。キレート剤の添加により、試料中のヒドロキシヒドロキノンが測定操作中さらに安定に維持される。用いるキレート剤としては、EDTA等のポリアミノカルボン酸類；クエン酸等のヒドロキシカルボン酸類；メタリン酸、ポリリン酸等のリン酸類；1-ヒドロキシエタン-1,1-ジホスホン酸（HEDPO）、エトリロトリスメチレンホスホン酸（NTPO）等のホスホン酸類が挙げられる。これらキレート剤の使用量は、試料溶液中、0.01～1.0 mmol/L以上、さらに0.02～0.5 mmol/L、特に0.1 mmol/L程度が好ましい。

【0011】

さらに、酸の添加によりpH5以下に調整され、かつキレート剤が添加された試料溶液をカチオン交換樹脂処理することが、ヒドロキシヒドロキノンの定量性を向上させるうえで好ましい。カチオン交換樹脂としては、スルホン酸、硫酸等の酸残基を有する強カチオン交換樹脂、カルボン酸等の酸残基を有する弱カチオン交換樹脂が挙げられる。このうち、プロピルベンゼンスルホン酸（SCX）、プロピルスルホン酸（PRS）、エチルカルボン酸（CBA）等のカチオン交換基を有する樹脂が特に好ましい。カチオン交換樹脂による処理は、これらのカチオン交換樹脂を固相化したカラムに試料溶液を通過させるのが好ましい。

【0012】

本発明においては、前記の試料溶液を用いて液体クロマトグラフィーによりヒドロキシヒドロキノン量を測定する。本発明の液体クロマトグラフィーに用いるカラムは、逆相液体クロマトグラフィー用カラム、例えばオクタデシルシリル化シリカゲル、オクチルシリル化シリカゲル等を充填したカラムを用いるのが好ましい。また、これらカラムに用いられる充填剤の粒子径は平均粒径3～5 mmが好ましい。

【0013】

液体クロマトグラフィーに用いる溶離液は、ヒドロキシヒドロキノンを実験的に分析するため、酸及びキレート剤を含むものが好ましい。酸としては、前記試料溶液の調製に用いたものと同じものが挙げられるが、その添加量は溶離液のpHを5以下にする量が好ましい。またキレート剤も、前記試料溶液の調製に用いたものと同じものが挙げられる。キレート剤の使用量も、前記試料溶液と同じ量が好ましい。また溶離液には、試料溶液中の夾雑成分とHHQの分離向上の点から1～10容量%の低級アルコール、特にメタノールを含有させるのが好ましい。

【0014】

液体クロマトグラフィーの流速は、液体クロマトグラフィー条件であれば特に制限されないが、0.05～10 mL/min、さらに0.2～1.5 mL/minが好ましい。またカラム温度は、20～50℃、さらに30～40℃が好ましい。本発明の液体クロマトグラフィーにおける検出手段としては、UV検出（UV/VIS多波長検出含む）が一般的である

が、F L（蛍光）検出、C L（化学発光）検出、E C（電気化学）検出、M S（質量分析）検出等により検出することもできる。

【実施例】

【0015】

以下の実施例における略語は次のとおりである。

H E D P O：1 - ヒドロキシエタン - 1，1 - ジホスホン酸水溶液

N T P O：ニトリロトスメチレンホスホン酸三ナトリウム塩

S C X：プロピルベンゼンスルホン酸修飾シリカゲル

P R S：プロピルスルホン酸修飾シリカゲル

C B A：エチルカルボン酸修飾シリカゲル

10

【0016】

実施例 1、2 及び比較例 1、2

市販缶コーヒーを開缶直後、10 g をスクリー管に正確にはかりとる。そこに 0.1 % リン酸、0.1 mmol / L H E D P O 及び 5 % メタノール溶液 10 mL を正確にはかりとり、よく混ぜる。

この溶液を溶液 A 5 mL でコンディショニングした S C X 固相カラムに、最初 2 mL を通過させ廃棄した後、再度 5 mL を通過させ、その溶液（溶液 B）を液体クロマトグラフィーに注入する。

【0017】

標準試料溶液は、以下の方法により作成した。

20

H H Q 10 mg をメスフラスコにはかりとり、0.1 % リン酸、0.1 mmol / L H E D P O 及び 5 % メタノール溶液（溶液 A，pH 2.6）にて溶解させ正確に 100 mL とした。この 100 mg / L 溶液を母液として順次希釈し、0.2 mg / L、0.4 mg / L、0.6 mg / L、0.8 mg / L、1.0 mg / L 溶液を作成し、標準試料とした。

【0018】

液体クロマトグラフィー条件は以下のとおりである。

装置：H P 1 1 0 0

カラム：I n e r t s i l O D S - 3 4.6 mm i.d. × 250 mm（粒子径 5 μm）

検出器：U V 検出器 288 nm

溶離液：0.1 % リン酸、0.1 mmol / L H E D P O 5 % メタノール溶液（pH 2.6）

30

流速：1.0 mL / min

注入量：20 μL

カラム温度：35

【0019】

上記溶液 A を直接液体クロマトグラフィーに注入した場合（実施例 1）の結果を図 1 に示す。その結果、リテンショタイム 7.3 分にヒドロキシヒドロキノンのピークが生じた。

また、上記のように溶液 A をカチオン交換樹脂である S C X 固相カラム処理した試料溶液 B を高速液体クロマトグラフィーに注入した場合（実施例 2）の結果を図 2 に示す。その結果、リテンショタイム 7.3 分にヒドロキシヒドロキノンのピークが生じ、8.2 mg / L のヒドロキシヒドロキノンと定量された。本試料溶液における標準ヒドロキシヒドロキノンのスパイクテストにおいて、その添加回収率は 98 % であった。

40

【0020】

一方、0.1 % リン酸を添加しないこと以外は、前記溶液 A と同様にして調製された溶液を、直接液体クロマトグラムに注入した場合（比較例 1）の結果を図 3 に示す。その結果、リテンショタイム 7.3 分に、図 1 及び図 2 に示されるようなヒドロキシヒドロキノンのピークが認められなかった。

また、0.1 % リン酸及び H E D P O の両者を添加しないこと以外は溶液 A と同様にして調製された溶液を直接液体クロマトグラムに注入した場合（比較例 2）も、比較例 1 の

50

場合と同様にリテンショタイム 7.3 分に、図 1 及び図 2 に示されるようなヒドロキシヒドロキノンのピークが認められなかった。

【0021】

実施例 3

実施例 2 において、0.1%リン酸 (pH 2.6) を 0.1%リン酸緩衝液 pH 2.0 ~ 4.0 に代えること以外は同様にして試料溶液を調製し、ヒドロキシヒドロキノン量を 12 時間連続して (1 時間に 1 回) 測定した。その結果、試料溶液を pH 2.0 ~ 4.0 に調製した場合、ヒドロキシヒドロキノンの定量値は、12 時間後でも初期 (0 時間) の 90% 以上の値を示した。

【0022】

10

実施例 4

実施例 2 において、0.1%リン酸 (pH 2.6) を、酢酸 50 mmol/L (pH 2.9)、ギ酸 100 mmol/L (pH 2.5)、トリフルオロ酢酸 10 mmol/L (pH 2.2)、又は塩酸 1 mmol/L (pH 2.9) に代えること以外は同様にして試料溶液を調製し、ヒドロキシヒドロキノン量を 24 時間連続して (2 時間に 1 回) 測定した。その結果、いずれの酸を用いた場合でもヒドロキシヒドロキノンの定量値は 24 時間後でも初期 (0 時間) の 90% 以上の値を示した。これらの酸のうち、リン酸、酢酸、ギ酸、トリフルオロ酢酸が特に良好であった。

【0023】

実施例 5

20

実施例 2 において、キレート剤である 0.1 mmol/L HEDPO を、0.1 mmol/L NTP O、0.1%メタリン酸ナトリウム又は 0.1 mmol/L EDTA - 2Na に代えること以外は同様にして試料溶液を調製し、ヒドロキシヒドロキノン量を 24 時間連続 (2 時間に 1 回) 測定した。その結果、いずれのキレート剤を用いた場合でもヒドロキシヒドロキノンの定量値は 24 時間後でも初期 (0 時間) の 90% 以上の値を示した。

【0024】

実施例 6

実施例 2 において、溶離液中の 0.1%リン酸に代えて pH 2.0 ~ 6.0 のリン酸緩衝液を用いること以外は実施例 2 と同様にしてヒドロキシヒドロキノン量を 24 時間連続して (2 時間に 1 回) 測定した。その結果、溶離液の pH が 2.0 ~ 5.0 の範囲内では、ヒドロキシヒドロキノンの定量値は 24 時間後でも初期 (0 時間) の 90% 以上の値を示した。

30

【図面の簡単な説明】

【0025】

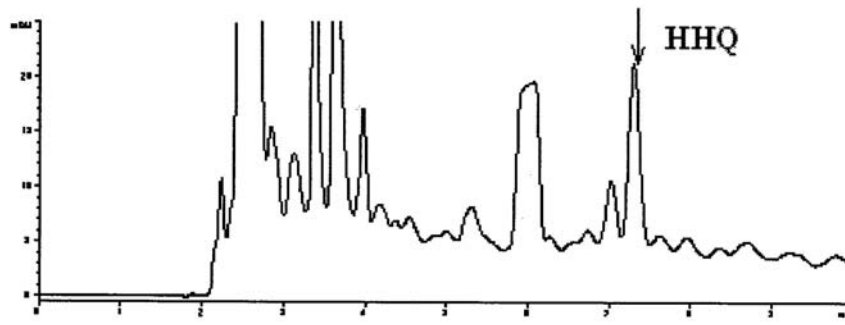
【図 1】0.1%リン酸及び 0.1 mmol/L HEDPO を添加した試料溶液 (pH 2.6) を用いた場合の液体クロマトグラムである。図中、HHQ はヒドロキシヒドロキノンを示し、矢印はヒドロキシヒドロキノンのピークを示す (以下、同じ)。

【図 2】0.1%リン酸及び 0.1 mmol/L HEDPO を添加した試料 (pH 2.6) を SCX 処理した試料溶液を用いた場合の液体クロマトグラムである。

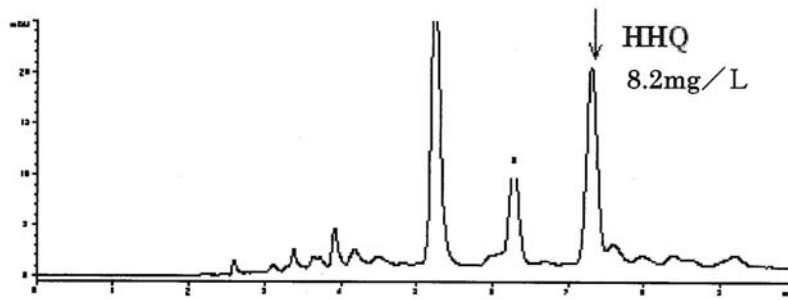
【図 3】0.1 mmol/L HEDPO を添加したが、0.1%リン酸を添加しなかった試料溶液を用いた場合の液体クロマトグラムである。

40

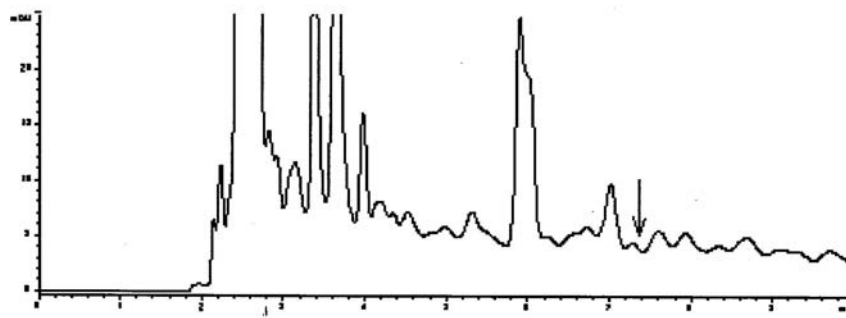
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



 フロントページの続き

- (74)代理人 100111028
弁理士 山本 博人
- (74)代理人 100101317
弁理士 的場 ひろみ
- (74)代理人 100134935
弁理士 大野 詩木
- (72)発明者 穂積 耕樹
栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内
- (72)発明者 直江 綾乃
栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内
- (72)発明者 小崎 一
栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内
- (72)発明者 辻村 久
栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内
- (72)発明者 草浦 達也
東京都墨田区文花 2 - 1 - 3 花王株式会社研究所内
- (72)発明者 増川 克典
栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内

審査官 河野 隆一郎

- (56)参考文献 特開平 0 4 - 0 5 4 1 4 2 (J P , A)
平本 一幸, 李 向紅, 牧本 光正, 加藤 哲太, 菊川 清見, コーヒーに含まれるベンゼン活性代謝物, 日本環境変異原学会 第 2 7 回大会 プログラム・要旨集, 1 9 9 8 年 1 0 月 1 5 日, P.106
Kazuyuki Hiramoto, Xianghong Li, Mitsumasa Makimoto, Tetsuta Kato, and Kiyomi Kikugawa, Identification of hydroxyhydroquinone in coffee as a agenerator of reactive oxygen species that break DNA single strands, Mutation Research, 1 9 9 8 年 1 1 月 9 日, Vol.419, No.1-3, P.43-51

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
G 0 1 N 3 0 / 8 8
G 0 1 N 3 0 / 0 6
G 0 1 N 3 0 / 2 6
C A p l u s (S T N)
J S T P l u s (J D r e a m I I)
J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I)