

2. 学会発表

・棚田千尋, 井之上浩一, 杉本直樹, 関 俊哲, 轟木堅一郎, 豊岡利正, 穂山 浩「UPLCによるクチナシ黄色素の成分分析に関する検討」日本食品化学学会 第 20 回総会・学術大会, 2013 年 8 月 (名古屋)

・井之上浩一「LC/MS を基盤とする天然添加物および含有成分の食品分析技術に関する研究」日本食品化学学会 第 20 回総会・学術大会, 2014 年 5 月 (東京)

・西川弘晃, 井之上浩一, 棚田千尋, 杉本直樹, 関 俊哲, 轟木堅一郎, 穂山 浩, 豊岡利正「高速向流クロマトグラフィーによる加水分解クチナシ黄色素クロセチンの単離精製」日本食品化学学会 第 20 回総会・学術大会, 2014 年 5 月 (東京)

・Hiroaki Nishikawa, Shuuichi Harada, Chihiro Tanada, Jun Z Min, Kenichiro Todoroki, Koichi Inoue, Toshimasa Toyo'oka "Application of High-Speed Countercurrent Chromatography for the Purification of Various Natural Chemicals from Raw Materials" PITTCON 2015 Conference & Expo, 2015 年 3 月 (New Orleans, LA USA)

H. 知的財産権の出願, 登録状況

特になし

I. 参考文献

1) 8th Edition of JAPAN'S SPECIFICATIONS AND STANDARDS FOR FOOD ADDITIVES D479-D482.

2) 吉積智司, 奥山秀俊, 遠山良介; *食品工業* **23**, 41-67 (1980).

3) 日本食品添加物協会; 第 4 版 既存添加物自主規格 平成 20 年 10 月 13 日発行

4) 宮本文夫, 佐伯政信, 上条昌弥, 神田 宏, 中岡正吉, 西島基弘, 伊藤誉志男, 竹下隆三; *衛生化学* **37**, 542-551 (1991).

5) 西沢信, 長南隆夫, 赤城幾代, 杉井孝雄; *道*

衛研所報 **33**, 28-34 (1983).

6) 萩原勉, 天川映子, 平田恵子, 野沢竹志, 大西和夫, 坂井千三; *東京衛研年報* **36**, 245-250 (1985).

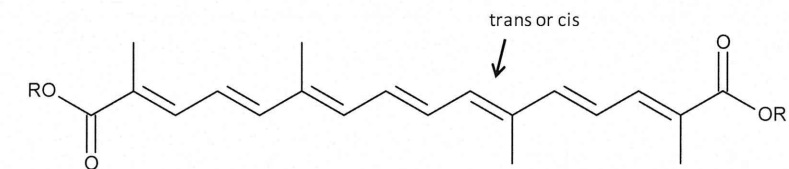
7) 長南隆夫, 堀義宏, 西沢信, 杉井孝雄; *道衛研所報* **35**, 34-39 (1985).

8) 山田貞二, 大島晴美, 斎藤勲, 早川順子; *食衛誌* **37**, 372-377 (1996).

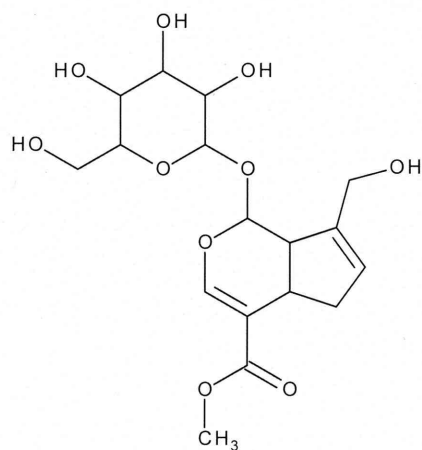
9) Lech, K., Witowska-Jarosz, J., Jarosz, M; *J. Mass Spectrom.* **44**, 1661-1667 (2009)

10) Cao, H., Feng, Q., Xu, W., Li, X., Kang, Z., Ren, Y., Du, L; *Biol. Pharm. Bull.* **33**, 1343-1348 (2010).

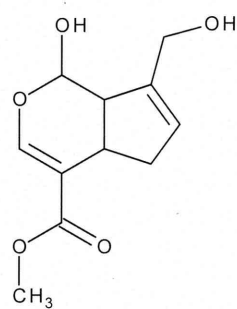
11) Nam, K.N., Choi, Y.S., Jung, H.J., Park, G.H., Park, J.M., Moon, S.K., Cho, K.H., Kang, C., Kang, I., Oh, M.S., Lee, E.H.; *Int. Immunopharmacol.* **10**, 493-499 (2010).



R = H: Crocetin
R = Gentiobiosyl: Crocin



Geniposide



Genipin

Fig. 1 クチナシ黄色素の含有成分に関する化合物



サフラン

A694

A12

Fig. 2 8 版公定法に基づくクチナシ黄色素の確認試験 (1)

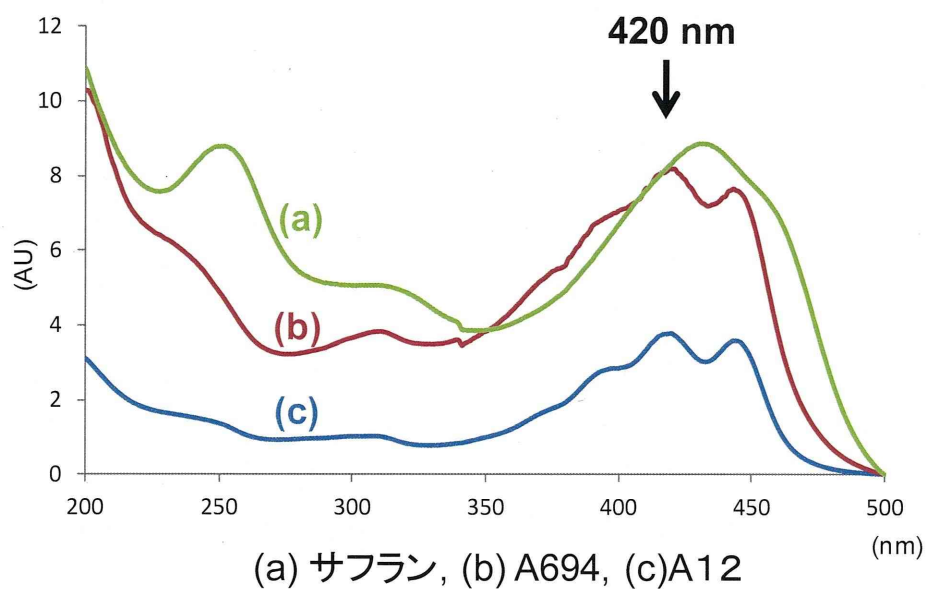


Fig. 3 8 版公定法に基づくクチナシ黄色素の確認試験 (2)

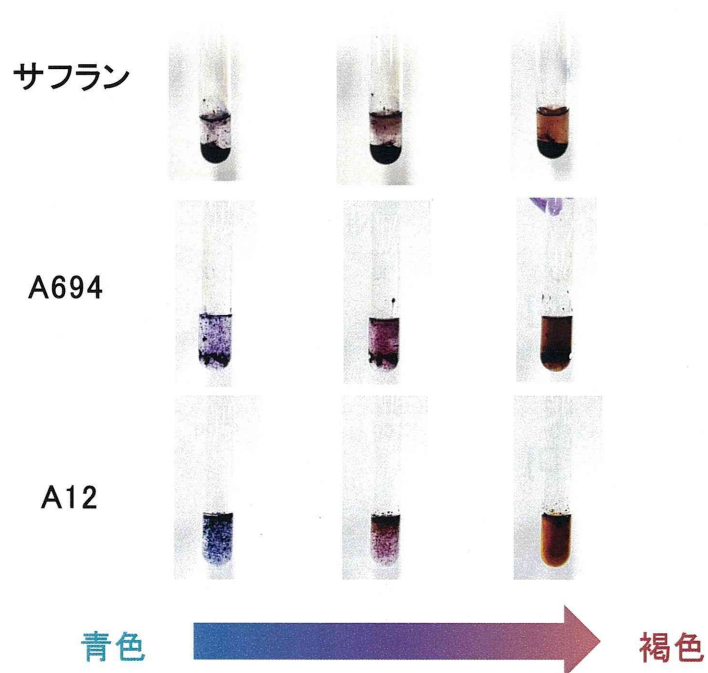


Fig. 4 8 版公定法に基づくクチナシ黄色素の確認試験 (3)

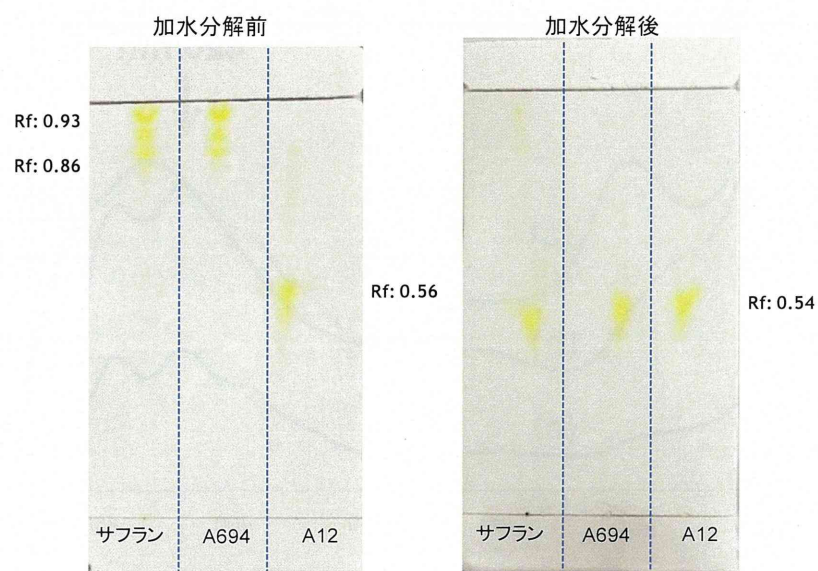


Fig. 58 版公定法に基づくクチナシ黄色素の確認試験 (4)

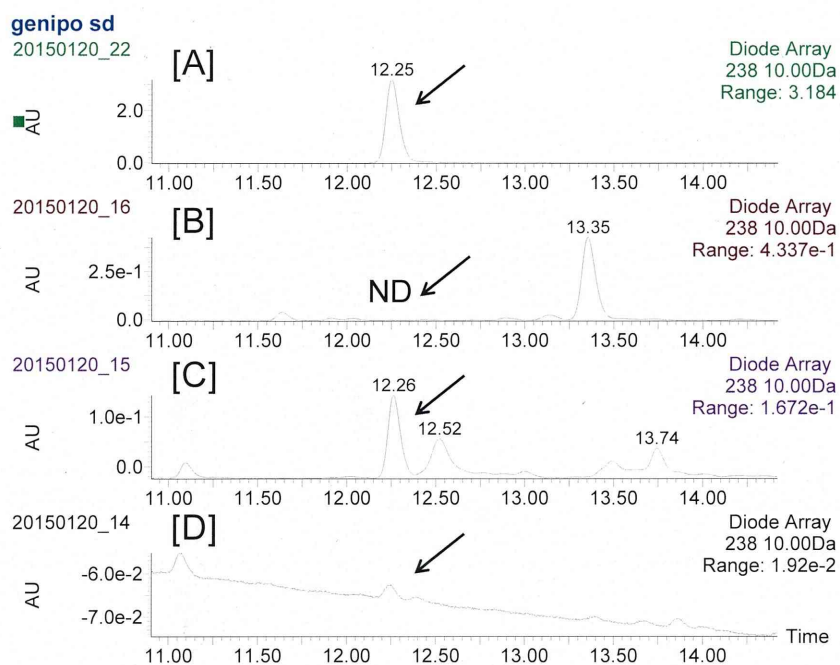


Fig. 68 版公定法に基づくクチナシ黄色素の不純物試験 (ゲニポシド)

- [A] ゲニポシド標準溶液
- [B] サフラン色素
- [C] クチナシ黄色素 (A694)
- [D] クチナシ黄色素 (A12)

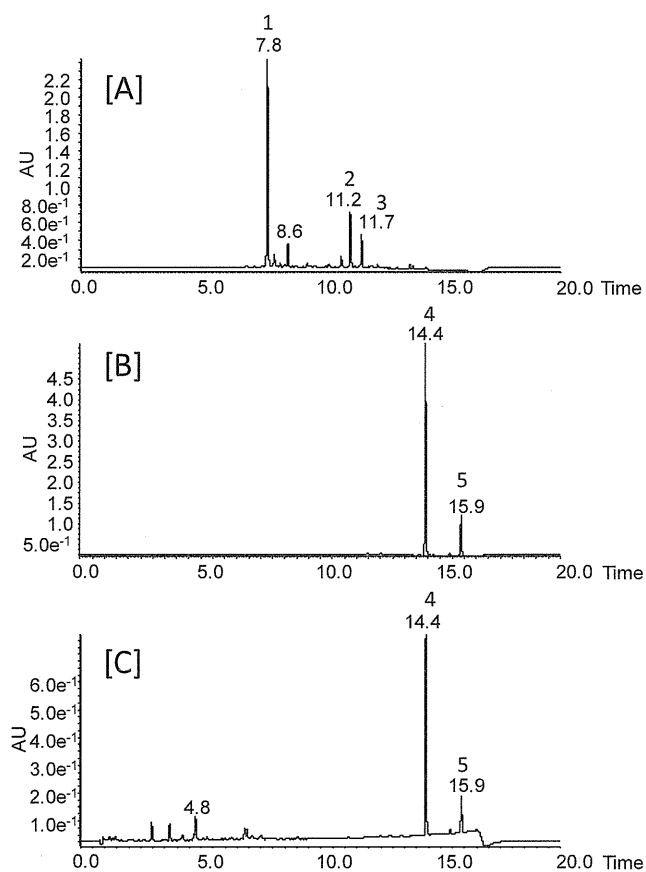


Fig. 7 クチナシ黄色素の HPLC クロマトグラム
 [A] クチナシ黄色素 (A694: 加水分解なし)
 [B] クチナシ黄色素 (A12: 加水分解なし)
 [C] クチナシ黄色素 (A694: 加水分解あり)

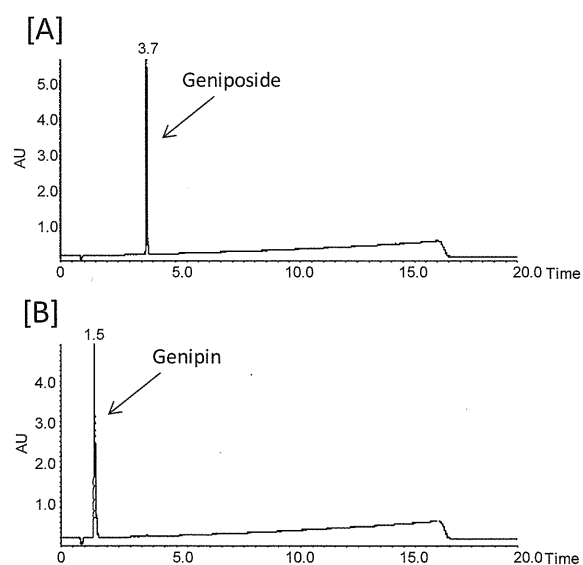


Fig. 8 ゲニポシドの HPLC クロマトグラム
 [A] ゲニポシド
 [B] ゲニポシド加水分解 (ゲニピン)

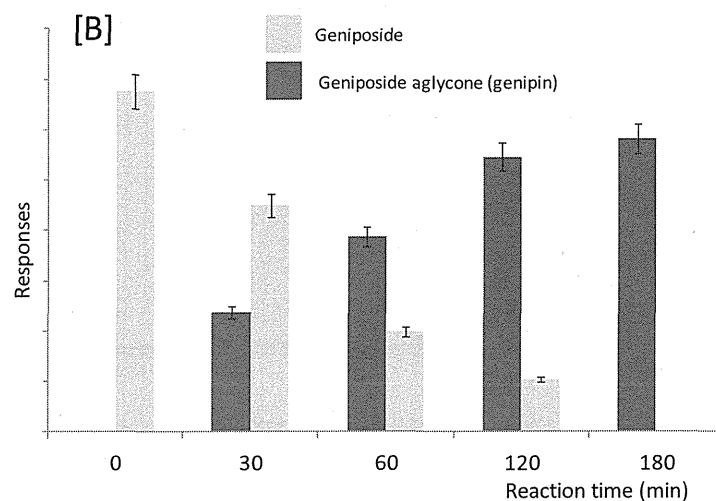
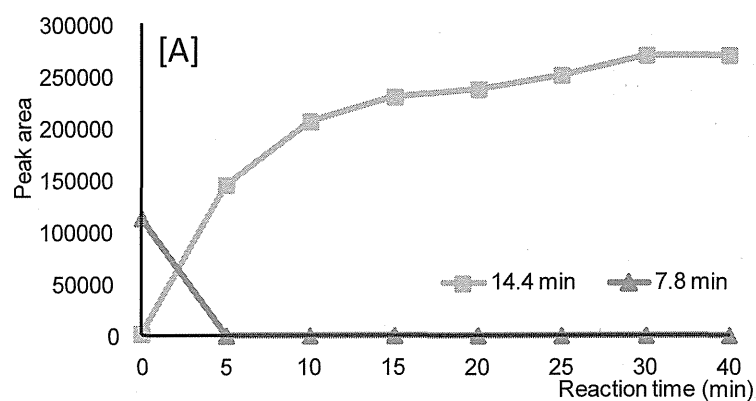


Fig. 9 アルカリ加水分解による経時変化

[A] クチナシ黄色素におけるクロシンおよびクロセチンの経時変化

[B] ゲニポシドにおけるゲニピンへの経時変化

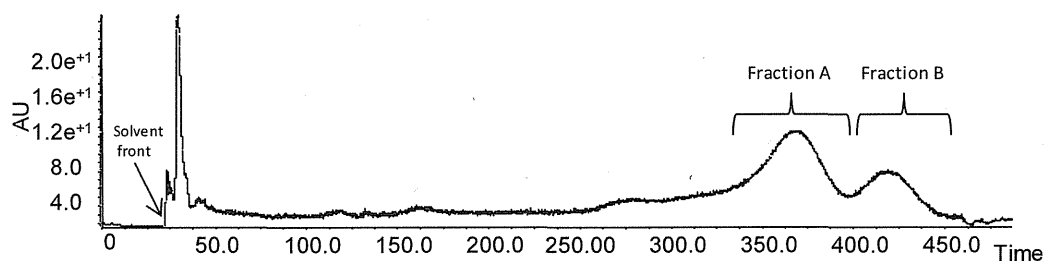


Fig. 10 加水分解クチナシ黄色素の HSCCC クロマトグラム

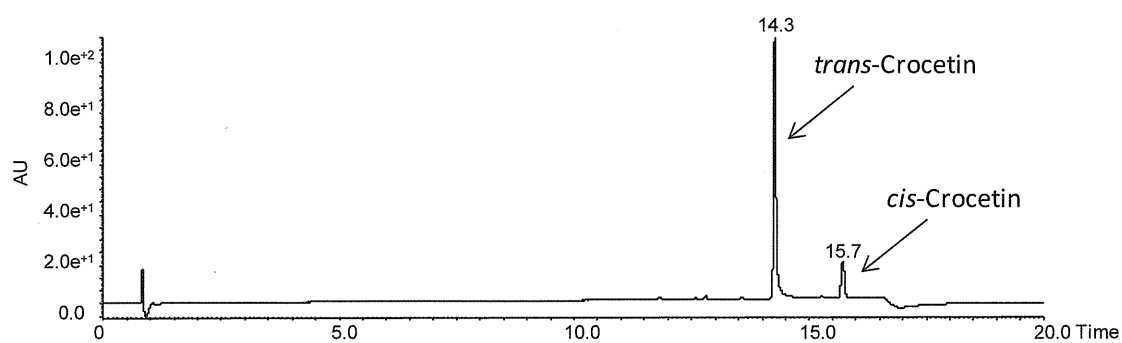


Fig. 11 HSCCC 分画 A の HPLC クロマトグラム

Table 1 クロセチンに関する HSCCC による 2 相分配溶液

Two-phase solvent system	Ratio (V/V)	Partition coefficient (K) $\pm$ SD (n=3)		α
		<i>trans</i> -Crocetin	<i>cis</i> -Crocetin	
Hexane/ethyl acetate/methanol/water	9/1/5/5	0.01 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.01	4.2
	8/2/5/5	0.09 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.02	2.1
	7/3/5/5	0.36 $\pm$ 0.11	0.49 $\pm$ 0.02	1.4
	6/4/5/5	0.74 $\pm$ 0.11	1.10 $\pm$ 0.05	1.5
	5/5/5/5	1.74 $\pm$ 0.09	1.77 $\pm$ 0.14	1.0
	4/5/4/5	7.52 $\pm$ 0.11	7.69 $\pm$ 0.24	1.0
Hexane/ethyl acetate/methanol/0.1% acetic acid in water	9/1/5/5	0.13 $\pm$ 0.03	0.36 $\pm$ 0.04	2.8
	8/2/5/5	0.66 $\pm$ 0.08	0.74 $\pm$ 0.14	1.1
	7/3/5/5	1.52 $\pm$ 0.32	1.23 $\pm$ 0.19	1.2
	6/4/5/5	3.35 $\pm$ 0.20	2.69 $\pm$ 0.06	1.2
	5/5/5/5	4.74 $\pm$ 0.14	3.11 $\pm$ 0.17	1.5
	4/5/4/5	7.86 $\pm$ 1.90	9.41 $\pm$ 1.80	1.2
Hexane/ethyl acetate/methanol/0.1% formic acid in water	9/1/5/5	0.58 $\pm$ 0.03	0.28 $\pm$ 0.04	2.1
	8/2/5/5	1.33 $\pm$ 0.08	0.61 $\pm$ 0.14	2.2
	7/3/5/5	2.51 $\pm$ 0.32	1.11 $\pm$ 0.19	2.3
	6/4/5/5	3.36 $\pm$ 0.20	1.63 $\pm$ 0.06	2.1
	5/5/5/5	5.57 $\pm$ 0.14	1.88 $\pm$ 0.17	3.0
	4/5/4/5	14.9 $\pm$ 1.90	3.04 $\pm$ 1.80	4.9

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
既存添加物の安全性確保のための規格基準設定に関する研究
(H26-食品-一般-001)

平成26年度分担研究報告書

分担研究課題：NMR を用いた既存添加物の成分規格試験法に関する研究

分担研究者 永津明人 金城学院大学薬学部

要旨 近年確立されたその qHNMR 法(定量 NMR 法)を既存添加物の規格試験法に適用の可能であるか明らかにする目的で研究を行った。すなわち、適用の可能性のあるものがあるか、可能性があるものに関しては実際に適用する場合の測定条件の確立を目的とした。26年度は「ヤマモモ抽出物」と「グルコサミン」に関する適用条件を探索した。すなわち、「ヤマモモ抽出物」ではこれに含有される myricitrin の、「グルコサミン」では glucosamine そのものの、それぞれ定量条件の確立を行った。「ヤマモモ抽出物」中の myricitrin の純度は、認証標準物質として PHP、仲介物質として HMD を用い、methanol- d_4 中で測定したスペクトルの 6 位または 8 位の水素シグナル面積から測定可能であることを示した。「グルコサミン」中の glucosamine の純度は、PHP を直接内部標準として用い、 D_2O 中で測定したスペクトルの 2 つのアノマーの 2 位の水素シグナル面積の和から測定可能であることを示した。

A. 研究目的

qHNMR 法は、SI トレーサブルな認証標準物質を内部標準として NMR スペクトルの測定することで、測定対象サンプルの絶対定量ができる方法である。対象化合物の標準品がなくても絶対定量が可能であることから、標準品が手に入りにくい天然物の定量に好適な測定法である。すなわち、対象物質の 1H -NMR スペクトルにおいてシグナルが独立して観測される条件さえ設定できれば、動植物の抽出物を用いる既存添加物の品質管理において非常に有用な品質管理手段となりうる。

26年度の本研究では、既存添加物のうち、「ヤマモモ抽出物」と「グルコサミン」を選択し、それぞれの主成分である myricitrin (Fig. 1)、glucosamine (Fig. 2) の定量に qHNMR 法を応用し、その定量法の確立を試みた。

B. 研究方法

1) 「ヤマモモ抽出物」中の myricitrin 含有量の定量

「ヤマモモ抽出物」は、ヤマモモ (*Myrica rubra* Siebold et Zuccarini) の果実、樹皮または葉から抽出して得られたもので、主成分は myricitrin であるとされている。主に酸化防止剤として用いられる既存添加物である。今回用いた「ヤマモモ抽出物」は myricitrin 含量が高くほとんどメタノールに溶けるため、そのまま methanol- d_4 の qHNMR 用標準液を加えて溶解させたもので myricitrin の定量を行なうことにした。

1-1) qHNMR 用標準液の調製と hexamethyldisilane (HMD) 濃度の決定

定量の基点となる認証標準物質はいくつか市販されているが、その 1H -NMR におけるシグナルは測定対象の化合物のシグナルなどと重なり合うことが多い。そのため、報告のある方法でも 0 ppm 付近にシグナルを持

つ hexamethyldisilane (HMD、Fig. 3)を仲介物質として測定している。今回もこの HMD を仲介物質として測定することにした。HMD 5.00 mg を methanol- d_4 に溶解して 20.0 ml としたものを qHNMR 用標準液(0.200 mg/ml)とした。この溶液 0.50 ml を認証標準物質 potassium hydrogen phthalate (PHP、Fig. 3) 12.00 mg を含む methanol- d_4 溶液 2.00 ml に加え、この混合溶液 0.60 ml を NMR 試料管にとり、qHNMR 用試料とした。7.57 ppm 及び 7.72 ppm 付近の PHP のシグナル面積と 0 ppm の HMD のシグナル面積を比較することにより(Fig. 4A)、式 1 に従って qHNMR 用標準液中の HMD の濃度を決定した。NMR の測定条件については後述する。

$$C_{\text{HMD}} = 4 \times \frac{I_{\text{HMD}}}{I_{\text{PHP}}} \times C_{\text{PHP}} \quad (1)$$

ただし、 C_{HMD} 、 C_{PHP} はそれぞれ HMD 及び PHP のモル濃度(mol/ml)、 I_{HMD} 、 I_{ALK} はそれぞれ HMD の 6 個のメチル基及び PHP の芳香族水素 1 個あたりのシグナル面積。

1-2) qHNMR 法に用いる試料の調製

市販の「ヤマモモ抽出物」は減圧されたデシケーター中で over night 乾燥させた。その後、約 5 mg を精秤して 1.00 ml の qHNMR 用標準液に溶かし、この溶液 0.60 ml を NMR 試料管にとったものを用いて qHNMR の測定に供した。

1-3) qHNMR スペクトルの測定

$^1\text{H-NMR}$ を測定し、myricitrin の水素シグナルが δ 0.95~6.94 ppm に現れることを確認した。Fig. 4B にそれぞれのスペクトルを示した。qHNMR は table 1 に示した条件で測定した。前述の qHNMR 用標準液の HMD 濃度の算出のための測定も同じ条件で行なった。積算回数は、HMD 濃度の算出のための測定、および「ヤマモモ抽出物」の試料の測定では 8 回とした。測定によって得られたスペクトルから、myricitrin の水素シグナルと δ 0.04

ppm の HMD のシグナルの面積を比較して、式 2 に従って myricitrin の濃度を算出した。

$$C_{\text{MYR}} = \frac{I_{\text{MYR}}}{I_{\text{HMD}}} \times C_{\text{HMD}} \quad (2)$$

ただし、 C_{HMD} 、 C_{MYR} はそれぞれ HMD 及び myricitrin のモル濃度 (mol/ml)、 I_{HMD} 、 I_{MYR} はそれぞれ HMD の 6 個のメチル基及び myricitrin の水素 1 個あたりのシグナル面積。

各試料とも 3 検体ずつ調製して測定を行った。

2) 「グルコサミン」中の glucosamine 含有量の定量

既存添加物の「グルコサミン」は、「キチン」を塩酸で加水分解し、分離して得られたものである。成分は glucosamine で増粘安定剤、製造用剤として用いられる。

$^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定したところ、「グルコサミン」中の成分はほぼ glucosamine であると推定された。その glucosamine 定量にあたり、まず $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおいて glucosamine の各位置の水素シグナルが 2 ヶ所に別れて現れるということが判明した。これは、glucosamine の α 、 β それぞれのアノマーがある割合で平衡となって存在するからと考えられた。また、それぞれのアノマーの存在比はちょっとした条件の相違で変化する可能性も考えられた。そこで、両アノマー分子中の同じ位置の水素シグナルの積分値の和から算出することにした。候補として 1 位または 2 位の水素シグナルが挙げられる。これらシグナルが独立して観測される溶媒の検討を行った。Methanol- d_4 、pyridine- d_5 、DMSO- d_6 、DMSO- d_6 と D_2O の混合溶媒、 D_2O をそれぞれ溶媒として「グルコサミン」の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを比較したところ、 D_2O 中で 1 位、2 位の水素シグナルが他のシグナルと良好に分離することがわかり、好適であることがわかった。また、水溶性の認証標準物質である PHP の水素シグナル付近に他のシグナルも観測されないことから、「グルコ

サミン」の D₂O 溶液と PHP の D₂O 溶液を混合して定量することにした。

2-1) qHNMR 法に用いる試料の調製

市販の「グルコサミン」と PHP は減圧されたデシケーター中で over night 乾燥させた。「グルコサミン」約 15 mg を精秤して 1.50 ml の D₂O に溶かした溶液と、PHP 約 8 mg を精秤して 1.50 ml の D₂O に溶かした溶液を調製した。この 2 つの溶液を 0.40 mL ずつ取って混合し、この溶液 0.60 ml を NMR 試料管にとったものを用いて qHNMR の測定に供した。

2-2) qHNMR スペクトルの測定

¹H-NMR を測定し、glucosamine の水素シグナルが δ 2.8~5.4 ppm に現れることを確認した。Fig. 5 にそのスペクトルを示した。qHNMR は myricitrin のときと同じもので、table 1 に示した条件で測定した。積算回数は 8 回とした。測定によって得られたスペクトルから、glucosamine の水素シグナルと 7.57 ppm 及び 7.72 ppm 付近の PHP のシグナル面積を比較して、式 3 に従って glucosamine の濃度を算出した。

$$C_{\text{GLA}} = \frac{I_{\text{GLA}}}{I_{\text{PHP}}} \times C_{\text{PHP}} \quad (3)$$

ただし、C_{PHP}、C_{GLA} はそれぞれ PHP 及び glucosamine のモル濃度 (mol/ml)、I_{PHP}、I_{GLA} はそれぞれ PHP 及び glucosamine の水素 1 個あたりのシグナル面積。

各試料とも 3 検体ずつ調製して測定を行った。

C. 研究結果

1) 「ヤマモモ抽出物」中の myricitrin

今回、2 ロットの試料についての測定を行った。測定の結果を table 2 に示した。Fig. 4B のスペクトルでの a~h のシグナルそれぞれについて定量値を示した。積分値をとったシグナルごとで多少のばらつきが見られ、また、2 試料で共通して大きめの値が算出される

シグナルと小さめの値が算出されるシグナルがあるという特徴も示唆された。YM 4 は 85% 程度、YM 7 は 87% 程度の純度であることがわかった。

2) 「グルコサミン」中の glucosamine

まず、「グルコサミン」は吸湿しやすく、特に湿度の高い夏は精密な秤量が難しかった。今回、1 試料についてのみの結果にとどまったが、この試料の glucosamine の純度は 1 位、2 位いずれでも 95% 程度と算出された。(table 3)

D. 考察

今回対象とした「ヤマモモ抽出物」、「グルコサミン」は、qHNMR 法を利用してそれぞれ myricitrin、glucosamine を定量することで品質管理をすることが可能であろうことがわかった。「ヤマモモ抽出物」においては、観測されたシグナルを精査すると、ベースライン上にも雑音が少なく、比較的シャープなシグナルとして観測される myricitrin の 6 位、8 位のシグナル (Fig. 5 の b、c のシグナル) の積分値を定量時の算出に用いるのが好適ではないかと考えられる。今後、今回の各シグナル間での定量値の違いが、常にこの傾向であるのか否か、それぞれのシグナルの積分値のばらつきを、同じ試料の繰り返し測定で見極めるとともに、多種の試料の測定でも確認する必要があると思われる。

また、「グルコサミン」においては、得られたスペクトルを精査すると、1 位の水素のシグナルのうち β アノマーの 1 位と帰属される水素 (δ 4.82 ppm) が D₂O の残留水素のシグナルの裾に若干重なっている可能性が観察された。このため、2 位の水素シグナル (δ 2.89 ppm と δ 3.18 ppm、Fig. 5 の a,b) の面積の和を純度算出に用いた方がよいと考えられ、その定量値は 95.62% となった。

「グルコサミン」では溶媒が D₂O であるという点で溶媒にかかるコストが NMR 測定としては小さい方となる。また、内部標準に用いる認証標準物質の PHP のシグナル近辺

に他のシグナルがないという好条件であるため、仲介物質を用いる必要がなく、人為的な誤差のでにくい測定となる。qHNMR 法にとっての好条件で定量・品質管理に好適である。一方で、試料そのものが吸湿性であるので、秤量時の環境に配慮が必要である。今後、他の種類の製品でもでも glucosamine の 2 位水素シグナル、PHP の水素シグナル近辺に他のシグナルがないものなのか確認するとともに、ばらつきの出ない秤量の条件などについても確認が必要と考える。

E. 結論

1 : 「ヤマモモ抽出物」では、methanol- d_4 中、認証標準物質として PHP を用い、仲介物質として HMD を介することで、myricitrin の 6 位または 8 位の水素シグナル面積から含有される myricitrin の定量が可能であることを示した。

2 : 「グルコサミン」では、 D_2O 中、認証標準物質の PHP を直接内部標準として用い、

glucosamine の 2 つのアノマーの 2 位の水素シグナル面積の和から、含有される glucosamine の定量が可能であることを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

現在のところなし

2. 学会発表

現在のところなし

G. 知的財産権の出願，登録状況

現在のところなし

H. 健康危機情報

特になし

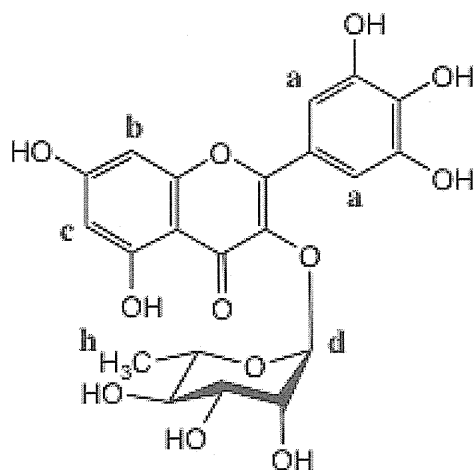


Fig. 1 myricitrin の構造

a、b、c、d、h は Fig. 4 の ^1H -NMR スペクトルの対応するシグナルの水素

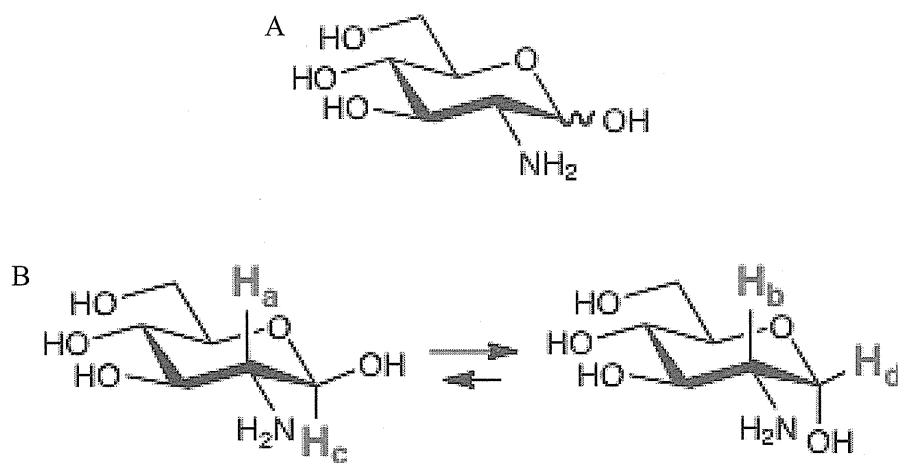
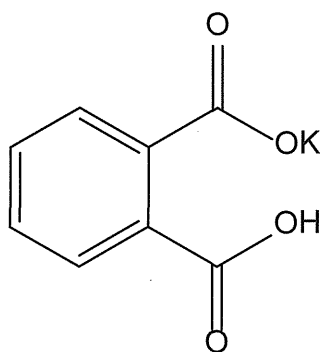


Fig. 2 glucosamine の構造

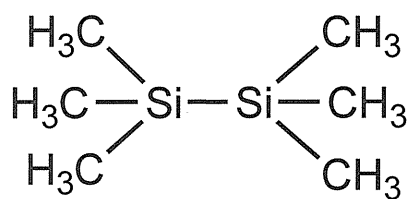
A: 一般式、

B: α アノマーと β アノマーの平衡。

Ha~Hd は Fig. 5 の ^1H -NMR スペクトルの対応するシグナルの水素



Potassium hydrogen phthalate (PHP)



Hexamethyldisilane

Fig. 3 認証標準物質と仲介物質の構造

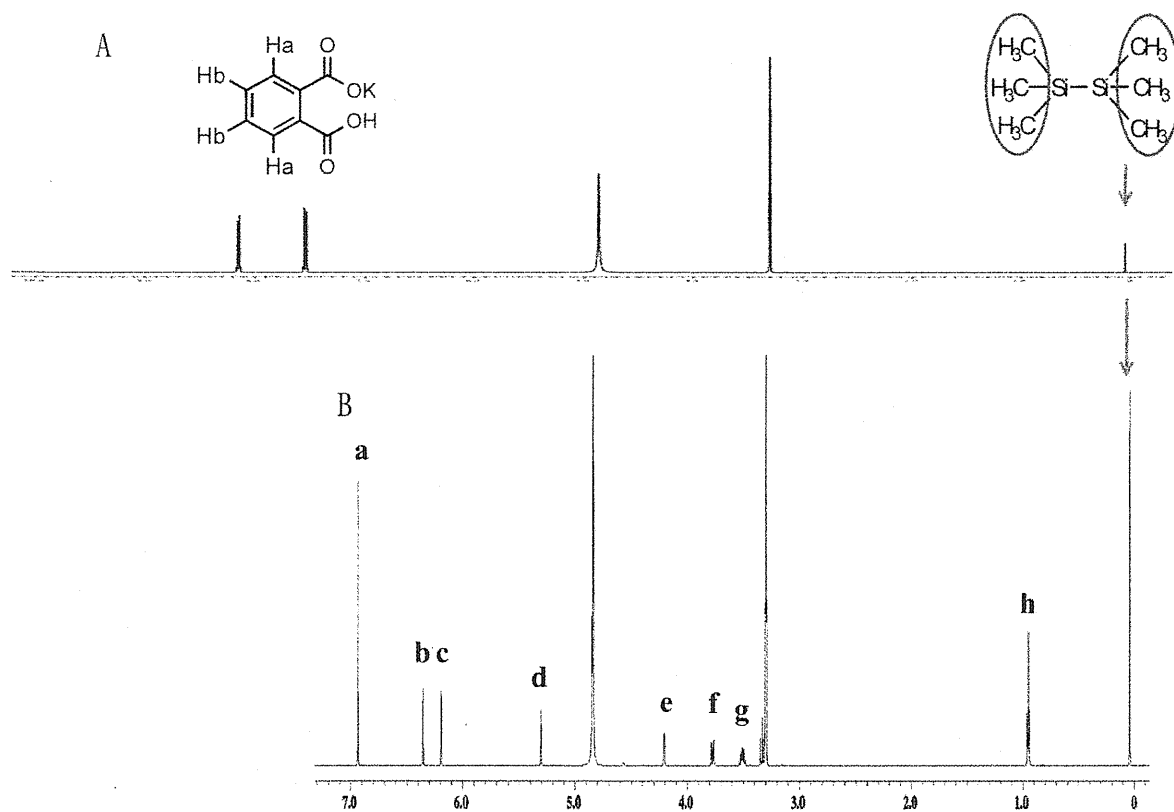


Fig. 4 「ヤマモモ抽出物」中の myricitrin 定量時に測定された ^1H -NMR スペクトル
 A: qHNMR 用標準液に溶解した PHP のスペクトル。
 B: qHNMR 用標準液に溶解した「ヤマモモ抽出物」のスペクトル。
 a~h は myricitrin 由来のシグナル。

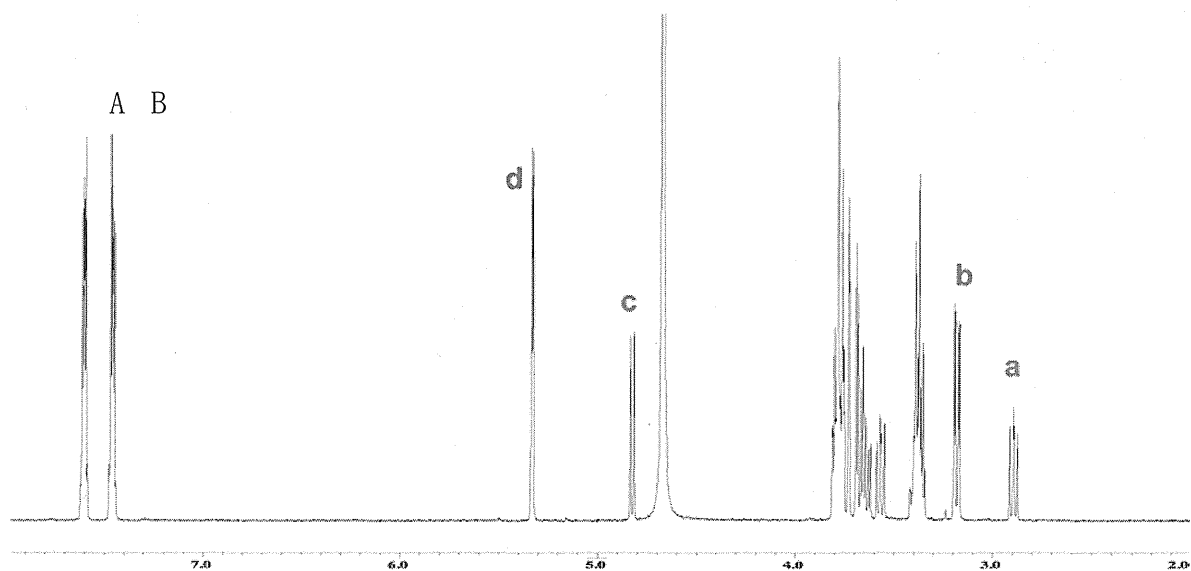


Fig. 5 「グルコサミン」中の glucosamine 定量時に測定された ^1H -NMR スペクトル
a~d はそれぞれ glucosamine 由来のシグナルで、Fig. 2 に示された位置のもの。
A,B は PHP 由来のシグナル。

Table 1 qHNMR 法における装置と測定条件

分光計	日本電子 ECA500
観測範囲	-5 ~ 15 ppm
データポイント数	32000
フリップアングル	90°
パルス待ち時間	60 秒
積算回数	8 回
スピン	なし
プローブ温度	25 °C
溶媒	methanol- <i>d</i> ₄ (myricitrin) D ₂ O (glucosamine)

Table 2 qHNMR 法で各シグナルから算出される「ヤマモモ抽出物」中の
myricitrin の純度 (平均±S.E., n = 3)

シグナル δ (ppm)	純度(%)	
	YM7	YM4
a 6.94	86.61±0.57	82.09±5.18
b 6.35	88.05±3.27	84.05±4.38
c 6.19	86.83±2.45	85.96±2.90
d 5.31	88.92±3.34	86.38±4.50
e 4.21	88.97±1.49	85.99±4.10
f 3.77	88.29±1.24	84.60±4.02
g 3.50	83.09±3.39	81.05±3.65
h 0.95	87.28±1.11	82.24±3.39

Table 3 qHNMR 法で各シグナルから算出される「グルコサミン」中の
glucosamine の純度 (平均±S.E., n = 3)

シグナル	純度(%)
	KO-13
a+b	95.62±1.43
c+d	93.87±1.09

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nakamura K, Kondo K, Kobayashi T, Noguchi A, Ohmori K, Takabatake R, Kita K, Akiyama H, Teshima R, Nishimaki-Mogami T	Identification and detection of genetically modified papaya resistant to papaya ringspot virus strains in Thailand	<i>Biol Pharm Bull</i>	37	1-5	2014
Koizumi D, Shirota K, Akita R, Oda H, Akiyama H	Development and validation of a lateral flow assay for the detection of crustacean protein in processed foods	<i>Food Chemistry</i>	150	348-352	2014
Tatebe C, Xiong Z, Takashi O, Kubota H, Sato K, Akiyama H	A simple and rapid chromatographic method to determine unauthorized basic colorants (rhodamine B, auramine O, and pararosaniline) in processed foods	<i>Food Sci. Nutr</i>	2	547-556	2014
Sato K, Suzuki I, Kubota H, Furusho N, Inoue T, Yasukouchi Y, Akiyama H	Estimation of Daily Aluminum Intake in Japan Based on Food Consumption Inspection Results: Impact of Food Additives	<i>Food Sci. Nutr</i>	2	389-397	2014

Wakita K, Kuwabara H, Furusho N, Tatebe C, Sato K, Akiyama H	A Comparative Study of the Hydroxyl and Saponification Values of Poly sorbate 60 in International Food Additive Specifications	American Journal of Analytical Chemistry	5	199-204	2014
大月典子, 杉本理恵, 佐藤恭子, 杉本直樹, 秋山卓美, 豊田正武, 穂山浩	化粧品・医薬部外品中の乳アレルギータンパク質の分析	日食化誌	21	155-162	2014
田中秀典, 北崎康生, 中村公亮, 穂山浩, 明石良	遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) の簡易検出法の確立	育種学研究	16	158-161	2014
山崎太一, 大槻崇, 三浦亨, 末松孝子, 堀之内嵩暁, 村上雅代, 齋藤剛, 井原俊英, 多田敦子, 田原麻衣子, 合田幸広, 穂山浩, 中尾慎治, 山田裕子, 小池亮, 杉本直樹	¹ H NMRによる精確な定量分析のための内標準液を用いる試料調製法の検討	分析化学	63	323-329	2014
田原麻衣子, 杉本直樹, 大槻崇, 多田敦子, 穂山浩, 合田幸広, 五十嵐良明: 定量NMRによる多環芳香族炭化水素市販試薬の純度決定	定量NMRによる多環芳香族炭化水素市販試薬の純度決定	環境科学会誌	27	142-150	2014

Shimamura T, Sumikura Y, Yamazaki T, Tada A, Kashiwagi T, Ishikawa H, Matsui T, Sugimoto N, Akiyama H, Ukeda H	Applicability of DPPH Assay for Evaluation of Antioxidant Capacity of Food Additives -Inter-laboratory Evaluation Study	<i>Analytical Sciences</i>	30	717-721	2014
Tada A, Ishizuki K, Yamazaki T, Sugimoto N, Akiyama H	Method for the Determination of Natural Ester-Type Gum Bases Used as Food Additives via Direct Analysis of their Constituent Wax Esters Using High-Temperature GC/MS	<i>Food Science & Nutrition</i>	2	417-425	2014
Inoue K, Tanada C, Nishikawa H, Matsuda S, Tada A, Ito Y, Min JZ, Todoroki K, Sugimoto N, Toyo'oka T, Akiyama H	Evaluation of Gardenia Yellow using crocetin from alkaline hydrolysis based on ultra high-performance liquid chromatography and high-speed counter-current chromatography	<i>J. Sep Sci</i>	37	3619-3624	2014
原田晋, 穂山浩, 杉本直樹, 山川有子	ドイツ製ブラッドオレンジジュースに含まれていたコチニール色素によるアナフィラキシーの1例	皮膚臨床	56	1247-1251	2014
山川有子, 山野朋子, 穂山浩, 池澤善郎	フランス製赤色マカロンに含まれるコチニール色素が原因と思われるアナフィラキシーの1例ー最近のコチニールアレルギーについてー	皮膚臨床	56	1241-1245	2014
Kraingkrai Ponghong, Tomoko Shimamura, Keiro Higuchi, Takehiro Kashiwagi, Kate Grudpan, Shoji Motomizu and Hiroyuki Ukeda	Spectrophotometric Sequential Injection Analysis System for Estimating the Concentration of Lipid Hydroperoxides in Edible Oils	<i>Journal of Flow Injection Analysis</i>	31(1)	33-37	2014