

分担研究報告書

いわゆる健康食品の成分研究

－分析法調査－

研究協力者	望月 龍	国立医薬品食品衛生研究所	食品部	研究員
研究協力者	志田（齊藤） 静夏	国立医薬品食品衛生研究所	食品部第三室	室長
研究協力者	堤 智昭	国立医薬品食品衛生研究所	食品部	部長

研究要旨

いわゆる健康食品の摂取に起因する健康被害を未然に防止するため、注意を要する成分について分析法を開発することを目的とした。本年度はスルフォラファン含有食品（ブロッコリー等）、ユーグレナ及びモリンガを対象として、含有成分及び当該成分の分析法に関する情報を収集・整理した。スルフォラファンは、ブロッコリーをはじめとしたアブラナ科の野菜のほか、蜂製品からの検出事例があった。モリンガにおいては、中枢神経作用を有するアルカロイドであるカフェイン及びテオフィリン、抗コリン作用を有するトロパンアルカロイドであるアトロピンや血圧低下作用を示すとされるアルカロイドのゲルメリン、甲状腺ホルモン誘導体である 3,3',5-トリヨードチロ酢酸と推定される化合物の検出例が報告されており、これらについては詳細な検討が必要と考えられた。また、ユーグレナ及びモリンガで分析例のあるクロロフィルについては、その分解物であり、光過敏症を誘発することが知られているフェオホルバイドと識別されていない可能性が示唆された。これらのことから、次年度以降、カフェイン、テオフィリン、アトロピン、ゲルメリン、3,3',5-トリヨードチロ酢酸及びフェオホルバイドについて分析法を確立した上で、国内流通製品を対象としてこれらの成分の含有の有無を確認し、含有されている場合にはその含有量を把握するための調査が必要と考えられた。

A. 研究目的

いわゆる健康食品の摂取に起因する健康被害を未然に防止するため、注意を要する成分について分析法を確立することを目的とした。本年度は、研究対象として選定したスルフォラファン含有植物（ブロッコリー等）、ユーグレナ及びモリンガについて、これまでに報告されている含有成分及び当該成分の分析法に関する情報を収集・整理した。

B. 研究方法

研究対象として選定したブロッコリー等のスルフォラファン含有植物、ユーグレナ及びモリンガについて、植物（根、葉等）または藻体、並びにこれらを原材料とした粉末、カプセル、錠剤等を対象として含有成分及び当該成分の分析法に関する学術論文を調査し、整理した。

C. 研究結果及び考察

1. スルフォラファン含有植物（ブロッコリー等）

ブロッコリー等におけるスルフォラファン及びその類縁化合物に関する分析法をTable 1 にまとめた。定量分析には HPLC-UV 法が多く用いられており、一部の報告では LC-MS (SIM, MRM, QTOF) も用いられていた。一方、定性分析には GC-MS が用いられている例もあった。内在性スルフォラファンを分析する場合には、植物ホモジネート中のグルコラファニンを加水分解した後、ジクロロメタン又は酢酸エチルで抽出する手法が主流であった。また、加水分解条件によっては、スルフォラファンニトリルが副生成物として生成する場合があることも報告されていた。スルフォラファンは主にアブラナ科の植物においてみられるが、はちみつ等の蜂製品からの検出事例もあった。養蜂における餌由来であることが推測されている。

2. ユーグレナ

ユーグレナの含有成分に関する分析法をTable 2 にまとめた。機能性表示食品として販売されている製品を除くと、ユーグレナ由来製品を対象とした分析事例の報告は見当たらず、ユーグレナ代謝物の解析を主とする報告がほとんどであった。分析対象またはスクリーニング分析により検出された化合物としては、機能性表示食品において機能性関与成分とされているパラミロンのほか、クロロフィル、カロテノイド、トコフェロール、フェノール酸、フラボノイド、脂肪酸、糖、チオール化合物等であった。パラミロンの定量法としては、アルカリ溶解後フェノール及び硫酸により呈色させ、グルコース量として定量する方法（フェノール・硫酸法）、ろ過前後のろ紙重量差をパラミロン量とする方法、並びに定

量 NMR を用いる方法が報告されていた。クロロフィル、カロテノイド、マロンジアルデヒド及びトコフェロールについては、可視吸光光度法を用いた定量分析が行われていた。フェノール酸については可視吸光光度法を用いた総フェノール酸量の定量が行われていた。フラボノイドについては MS を用いたスクリーニング分析、あるいは可視吸光光度法を用いた総フラボノイド量の定量が行われていた。脂肪酸については、GC-MS を用いた定量分析や LC-MS を用いたスクリーニング分析が行われていた。糖については、GC-MS を用いた定量及び定性分析が行われていた。チオール化合物については、蛍光誘導体化を行った後、HPLC 及び LC-MS を用いた定性分析が行われていた。その他化合物については、LC-MS または GC-MS を用いたノンターゲット分析が行われている事例があった。

3. モリンガ

モリンガの含有成分に関する分析法をTable 3 にまとめた。分析対象またはスクリーニング分析により検出された化合物としては、機能性表示食品において機能性関与成分とされているグルコモリンギンのほか、グルコシノレート、クロロフィル、フラボノイド、フェノール酸、アルカロイド、トコフェロール等であった。グルコモリンギン等のグルコシノレートについては、HPLC-UV による定量分析や LC-MS による定性分析が行われていた。クロロフィルについては、可視吸光光度法を用いた定量分析が行われていた。フラボノイド及びフェノール酸については、HPLC-UV、LC-MS または TLC を用いた定量分析、並びに LC-MS によるスクリーニング分析が行わ

れていた。アルカロイドについては、HPLC-UVを用いた定量分析やLC-MSを用いたスクリーニング分析が実施されていた。トコフェロールについては、HPLC-UVによる定量分析が行われていた。また、GC-MSを用いたノンターゲット分析が実施されている事例もあった。

4. 注意を要する成分の検討

モリンガにおいて、中枢神経作用を有するアルカロイドであるカフェイン及びテオフィリン、抗コリン作用を有するトロパンアルカロイドであるアトロピン、血圧低下作用を示すとされているアルカロイドであるゲルメリン、並びに甲状腺ホルモン誘導体である3,3',5-トリヨードチロ酢酸と推定される化合物が検出されたとの報告がある (Table 3、Ref. 8)。これらの化合物は仮に製品中に含有されている場合、含有濃度によっては注意を要する成分であると考えられる。一方で、当該報告は LC-MS/MS を用いたメタボロミクス解析に基づく結果であり、標準品等による確認は行われていないことから、誤推定の可能性を否定できない。また、含有量に関する情報も示されていないため、今後、詳細な検討が必要と考えられた。

ユーグレナ及びモリンガにおいては、クロロフィルの分析例が報告されている。これらの分析法はいずれも、抽出液をそのまま用い、663 nm 付近の吸光度を測定することにより定量する方法であるため、クロロフィルのみならず、当該波長域に吸収を有するクロロフィル分解物のフェオホルバイドも含めて定量される可能性がある。クロロフィル含量が多い原材料を用いた錠剤、カプセル剤等食品においては、製造工

程や保管条件が適切でない場合、クロロフィルの分解によりフェオホルバイドが生成することが知られている。フェオホルバイドは光過敏症を誘発する物質であり、過去にはクロレラ製品において健康被害が発生した事例も報告されている¹⁾。このため、これらの原材料を用いる場合には、フェオホルバイドをクロロフィルと識別可能な選択性の高い分析法を用いて、その含量を把握することが必要と考えられた。

以上のことから、次年度以降は国内流通製品を対象として、カフェイン、テオフィリン、アトロピン、ゲルメリン、3,3',5-トリヨードチロ酢酸及びフェオホルバイドについて分析法を確立した上で、含有の有無を確認する調査を実施する必要があると考えられた。

参考資料

- 1) フェオホルバイド等クロロフィル分解物を含有するクロレラによる衛生上の危害防止について、昭和 56 年 5 月 8 日 (環食第九九号)

D. 結論

スルフォラファン含有植物 (ブロッコリー等)、ユーグレナ及びモリンガについて、これまでに報告されている含有成分並びに当該成分の分析法に関する情報を調査した結果、注意を要する成分の検出例が存在することが明らかとなった。中でもモリンガに関しては、カフェイン及びテオフィリン、抗コリン作用を有するトロパンアルカロイド、血圧低下作用を示すとされるアルカロイド、並びに甲状腺ホルモン誘導体と推定される化合物が検出されたとの報告があり、健康食品の安全性確保の観点か

ら留意すべき成分であると考えられた。一方、当該報告は LC-MS/MS を用いたメタボロミクス解析に基づく結果であり、標準品等による確認は行われていないことから、誤推定の可能性を否定できない。また、含有量に関する情報も示されていないため、これらの成分の含有実態については今後詳細な検討が必要と考えられた。

さらに、ユーグレナ及びモリンガにおけるクロロフィルの分析に関しては、クロロフィル分解物であり、光過敏症を誘発することが知られているフェオホルバイドとの識別が不十分である可能性が示唆された。フェオホルバイドについては、過去にクロレラ製品において健康被害が発生した事例も報告されていることから、クロロフィルと識別可能な選択性の高い分析法を用いてその含量を把握することが必要と考えられた。

以上のことから、次年度以降は国内流通製品を対象として、カフェイン、テオフィリン、アトロピン、ゲルメリン、3,3',5-トリヨードチロ酢酸及びフェオホルバイドについて分析法を確立した上で、これらの成分の含有の有無を確認し、含有されている場合にはその含有量を把握するための調査を実施する必要があると考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table 1. ブロッコリー等におけるスルフォラファンをはじめとした類縁化合物に関する分析法

試料	測定化合物	試料前処理法	測定法	種別	LOD, LOQ	Ref.
錠剤 (原料: ブロッコリーエキス末)	glucoraphanin	検体をミルで粉砕し, 約 0.4 g を正確に量る. 水 (30mL) を加えて 10 分間振とう抽出を行う. その後, 遠心分離 (2500 rpm/min, 5 分間) を行い, 上澄み液を得る. 再度水 (30 mL) を加えて同様の操作を 2 回繰り返す, 上澄み液を得る. 得られた上澄み液をすべて合わせ, 100mL に定容する. この液を水で 100 倍希釈した液を試験溶液とする.	HPLC-UV カラム: 野村化学 Develosil RPAQUEOUS-AR (5 μ m, 4.6 mm i.d. x 250 mm) 移動相: 0.1% ギ酸/アセトニトリル (99/1) 測定波長: 235 nm	定量	記載なし (検量線最下点が 0.2 μ g/mL)	1
カプセル (原料: ブロッコリースプラウトエキス粉末)	glucoraphanin	検体 10 粒を取り出し, 秤量後, カプセルのまま蒸留水 (80 mL 程度) 加え, 60°C の温浴中で超音波にかける. これを 15 分以上行い, カプセルの被膜が溶解していることを確認し, 蒸留水で 100 mL に定容する. 定容後の溶液から 4 mL を採取し, 蒸留水を加えて 10 mL に定容する. これをフィルターろ過して, 測定用試験溶液とする.	HPLC-DAD カラム: マスキング 移動相: (A) TFA 水, (B) TFA メタノール (濃度はマスキング) 測定波長: マスキング	定量	記載なし (検量線最下点が 0.2 nmol/ μ L)	2
粉末 (サプリメント, 原料: ブロッコリー)	sulforaphane	試料 0.5 g を 10x PBS (pH 7.4) (3.0 mL) 中で 37°C, 90 分間超音波処理後, ジクロロメタン (10 mL) を加え 10 分間振とうする. 15°C, 3500rpm で 10 分間遠心分離し, 水層を捨てる. この抽出操作を 3 回行い, 合わせたジクロロメタン層 1 mL について溶媒留去を行う. 残渣をアセトニトリル (0.5 mL) に再溶解し, 孔径 0.22 μ m のシリンジフィルターでろ過する.	LC-MS (SIM, positive) カラム: Waters ACQUITY UPLC BEH C18 (1.7 μ m, 2.1 mm i.d. x 100 mm) 移動相: (A) 0.1% ギ酸水 (B) 0.1% ギ酸アセトニトリル 検出 m/z : 178 ($[M+H]^+$)	定量	LOD: 1.3 ng/mL LOQ: 3.9 ng/mL	3
ブロッコリー, ブロッコリースプラウト, メキヤベツ, キャベ	sulforaphane	5 g の試料をジクロロメタン (50 mL) 中で 5 分間ホモジナイズし, 室温で 30 分間静置する. 無水硫酸ナトリウム (1.25 g) を加え混合したのち, 0.22 μ m	HPLC-UV カラム: 大阪ソーダ CAPCELL PAK C18 (5 μ m, 4.6 mm i.d. x 250 mm)	定量	LOD: 0.88 μ g/mL LOQ: 2.68 μ g/mL	4

ツ, ダイコン, カイワレダイコン, キャベツジュース, キャベツ粉末		のナイロンフィルターでろ過する. ろ液をジクロロメタンで 50 mL に希釈し, 35°C で窒素により溶媒留去する. 残渣をアセトニトリル (1 mL) に再溶解し, 孔径 0.22 µm のメンブランフィルターでろ過する.	移動相 : 60% アセトニトリル 測定波長 : 254 nm			
ブロッコリー (根, 葉, 茎, 花, 蕾)	グルコシノレート (progoitrin, glucoiberin, sinigrin, glucoraphanin, gluconapin, 4-hydroxyglucobrassicin, glucotropaeolin, glucoerucin, glucobrassicin, gluconasturtiin, 4-methoxyglucobrassicin, neoglucobrassicin)	乾燥させ粉碎した試料 0.5 g を 70% メタノール中で 1 分間攪拌したのち, 70°C の温浴中で 15 分間抽出する. その後室温で 30 分間超音波処理し, 13,000 x g で 5 分間遠心分離した上清を溶媒留去する. 残渣を水に溶解し, 孔径 0.22 µm のシリンジフィルターでろ過する.	(glucoraphanin, gluconapin) HPLC-UV カラム : Waters ACQUITY UPLC BEH C18 (1.7 µm, 2.1 mm i.d. x 100 mm) 移動相 : (A) 0.1% ギ酸水 (B) 0.1% ギ酸アセトニトリル 測定波長 : 290 nm (その他グルコシノレート) LC-QTOF-MS (positive and negative) カラム : Waters ACQUITY UPLC BEH C18 (1.7 µm, 2.1 mm i.d. x 100 mm) 移動相 : 同上	スクリーニング, 定量	glucoraphanin と gluconapin について LOD: 1.34 µg/mL LOQ: 4.05 µg/mL	5
ブロッコリー (花)	sulforaphane, indole-3-carbinol	試料 100 g を粉碎し 5 分間ホモジナイズする. 水 (50 mL) を加え, 45°C の湯浴中で 3 時間インキュベーションする. この水溶液を室温で 30 分静置して冷却し, ジクロロメタン (50 mL) で 3 回抽出し, フィルターろ過する. 集めたジクロロメタン層に無水硫酸ナトリウム (2 g) を加え, 脱水する. ろ過後, 溶媒留去し 5 mL にする. そのうち 5 µL を採り, メタノール (495 µL) を加える.	LC-QTOF-MS (positive) カラム : Merck Chromolith RP (4.6 mm i.d. x 100 mm) 移動相 : メタノール/水 (80/20) 測定イオン : (sulforaphane) 178.0355 (indole-3-carbinol) 170.0577	定量	(sulforaphane) LOD: 0.77 mg/L LOQ: 2.35 mg/L (indole-3-carbinol) LOD: 0.42 mg/L LOQ: 1.29 mg/L	6
ブロッコリー (花), キャベツ	sulforaphene, sulforaphane	試料 50 g に水 (50 mL) を加え 30 分間ホモジナイズし, 室温で 2 時間静置す	(定量) HPLC-UV	定量・定性	記載なし	7

(葉), ダイコン (根), カラシナ (葉), ハクサイ (葉) 等アブラ ナ科植物 11 種		る. ホモジネートにジクロロメタンを 加え液液抽出し, ジクロロメタン層を フィルターろ過する. ろ液を溶媒留去 する.	カラム : KYA Technology HiQsil C18 (5 µm, 4.6 mm i.d. x 250 mm) 移動相 : アセトニトリル/水 (30/70) 測定波長 : 254 nm (定性) GC-MS カラム : Agilent DB-5 (0.25 mm i.d. x 30 m)			
花粉, ロイヤル ゼリー	sulforaphane	試料は 45°Cで乾燥させ粉碎する. 花粉 については試料 0.5 g にメタノール (12 mL) を加え 10 分間振とうする. ローヤ ルゼリーについては試料 1.6 g にメタノ ール (5 mL) を加え 1 分間攪拌したの ち 5 分間超音波処理する. 抽出液を 10°C, 11,000rpm で 10 分間遠心分離し た上清について溶媒を留去し, 花粉に ついては 1 mL, ロイヤルゼリーについ ては 2 mL のメタノールに再溶解し, 孔 径 0.45 µm のナイロンフィルターでろ 過する.	LC-MS/MS (MRM, positive) カラム : Phenomenex Kinetex fused-core type column C18 (2.6 µm, 4.6 mm i.d. x 150 mm) 移動相 : (A) 0.02 M ギ酸アンモニウム (B) アセトニトリル トランジション : 178 > 114 (定量) 178 > 72 (定性)	定量	LOD: 3 µg/kg LOQ: 花粉 8 µg/kg ローヤルゼリー 10 µg/kg	8
はちみつ	sulforaphane	2.5 g のホモジナイズした試料を水 (5 mL) で希釈し, Strata X SPE カートリッ ジに負荷する. メタノール (2 mL) で溶 出し, 溶出液を孔径 0.45 µm のナイロン フィルターシリンジフィルターでろ過 する.	LC-MS/MS (MRM, positive) カラム : Phenomenex Synergi Hydro-RP C18 (4 µm, 4.6 mm i.d. x 150 mm) 移動相 : (A) 0.02 M ギ酸アンモニウム (B) アセトニトリル トランジション : 178 > 114 (定量) 178 > 72 (定性)	定量	(マルチフロー ラルハニー, ロー ズマリーハニー, オレンジプロッ サムハニー) LOD: 0.5 µg/kg LOQ: 1.8 µg/kg (ヘザーハニー) LOD: 0.8 µg/kg LOQ: 2.6 µg/kg	9
ブロッコリー,	sulforaphane,	(煮沸調理品)	HPLC-DAD	定量	(sulforaphane)	10

ムラサキキャベツ	glucoraphain	ブロッコリー400 g を沸騰水中で 6 分間煮沸したのち、30 分間静置する。残り湯は直接凍結乾燥する。ブロッコリーは水中でブレンダーにより切り刻み、30 分間静置後にフィルターろ過してろ液を凍結乾燥する。 (オーブン調理品) ブロッコリー400 g をブレンダーで小さく切り刻み、30 分静置後に 135℃のオーブンで 45 分間加熱する。マグネチックスターラー上で 35℃、600 mL のジクロロメタンにより抽出を行い、フィルターろ過し、溶媒留去する。残ったブロッコリー部分は蒸留水 (500 mL) で抽出し、フィルターろ過後のろ液を凍結乾燥する。 (電子レンジ調理品) ブロッコリー400 g を蒸留水 (200 mL) 中でブレンダーにより細かく切り刻む。1 時間静置後、電子レンジで 45 分間加熱する。冷却後、マグネチックスターラー上で 35℃、ジクロロメタン (600 mL) により抽出し、フィルターろ過し、溶媒留去する。残ったブロッコリー部分は蒸留水 (500 mL) で抽出し、フィルターろ過後のろ液を凍結乾燥する。 (ミキサー調理品) ブロッコリー400 g をブレンダーにより細かく切り刻み液体部分を直接凍結乾燥する。固形部分はマグネチックスターラー上で 35℃、ジクロロメタン (600	(sulforaphane) カラム : Agilent ZORBAX Extend-C18 (5 µm, 4.6 mm i.d. x 250 mm) 移動相 : 30% アセトニトリル 検出波長 : 202 nm (glucoraphanin) カラム : Agilent ZORBAX Eclipse SB-aq (5 µm, 4.6 mm i.d. x 150 mm) 移動相 : アセトニトリル／水／ギ酸 (1/99/0.1) 測定波長 : 235 nm		LOD: 29.7 ng/mL LOQ: 90 ng/mL (glucoraphanin) LOD: 198 ng/mL LOQ: 600 ng/mL	
----------	--------------	--	---	--	---	--

		mL) により抽出を行い、フィルターろ過し、溶媒留去する。残ったブロッコリー部分は蒸留水 (500 mL) で抽出し、フィルターろ過後のろ液を凍結乾燥する。 (スチーマー調理品) ブロッコリー400 g をスチーム調理器で 30 分間加熱する。マグネチックスターラー上で 35°C, ジクロロメタン (600 mL) により抽出を行い、フィルターろ過し、溶媒留去する。残ったブロッコリー部分は蒸留水 (500 mL) で抽出し、フィルターろ過後のろ液を凍結乾燥する。 (ムラサキキャベツ) ムラサキキャベツ 400 g を切り刻み、マグネチックスターラー上で 35°C, ジクロロメタン (800 mL) により抽出を行い、フィルターろ過し、溶媒留去する。残ったブロッコリー部分は蒸留水 (500 mL) で抽出し、フィルターろ過後のろ液を凍結乾燥する。				
ブロッコリー (葉, 房, 茎)	sulforaphane	(葉) 40°Cのオーブンで乾燥させ粉碎した試料 0.50 g に酸性溶液 (4 mg/g 乾燥ブロッコリーとなるようにアスコルビン酸を含む。0.1 M 塩酸で pH 5.0 に調整) (7 mL) を加え, 1 分間攪拌したのち 35°C, 4 時間オーブンに入れて加水分解する。 (房・茎)	HPLC-DAD カラム : Phenomenex Synergi Hydro-RP C18 (4 µm, 4.6 mm i.d. x 150 mm) 移動相 : 20 mM ギ酸アンモニウム/アセトニトリル (55/45) 測定波長 : 196 nm	定量	LOD: 0.2 mg/L (0.8 mg/kg 相当) LOQ: 0.6 mg/L (2.5 mg/kg 相当)	11

		40°Cのオーブンで乾燥させ粉碎した試料 0.25 g に酸性溶液 (4 mg/g 乾燥ブロッコリーとなるようにアスコルビン酸を含む. 0.1 M 塩酸で pH 5.0 に調整) (5 mL) を加え, 1 分間攪拌したのち房は 45°C, 2 時間, 幹は 55°C, 1 時間オーブンに入れて加水分解する. 加水分解後の溶液にメチル <i>tert</i>-ブチルエーテル (25 mL) を加え 1 分間超音波処理し, さらに 7.0 g (葉), 5.5 g (房・幹) の無水硫酸ナトリウムを加えろ過する. ろ液を Strata SI-1 シリカカートリッジに負荷する. メタノール (2 mL) で溶出し, 溶媒留去後の残渣をエタノール (1 mL) に再溶解して, 孔径 0.45 µm のナイロンフィルターでろ過する.				
ブロッコリー (種)	sulforaphane	50 g の試料を粉碎し, ヘキサン (400 mL) を加えて 3 時間振とうしたのち, 乾燥させる. 乾燥試料に 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 5.8) (100 mL) と酢酸エチル (200 mL) を加え 4 時間激しく攪拌し, 塩化ナトリウム (20 g) を加える. 酢酸エチル層をフィルターろ過し, フィルター上の残渣を同量の酢酸エチル回収する. この操作をもう一度繰り返す. 酢酸エチル層を集め溶媒を留去し, 残渣に 0.01 M クエン酸・リン酸緩衝液 (pH 2.2, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0) に再溶解し, 孔径 0.45 µm のメンブランフィルターでろ過する.	HPLC-UV カラム : Agilent ZORBAX Eclipse XDV-C18 (5 µm, 4.6 mm i.d. x 250 mm) 移動相 : (A) 水, (B) メタノール 測定波長 : 241 nm	定量	記載なし	12
ブロッコリー (種)	sulforaphane, sulforaphane nitrile	50 mg の凍結乾燥及び粉碎した試料を秤量し, 10 mL/g の比で水を加え, 30 分間室温で静置し加水分解する. 酢酸エチル (3 mL) と硫酸マグネシウムを加	LC-MS/MS (MRM, positive) カラム : Waters ACQUITY BEH C8 (1.7 µm, 2.1 mm i.d. x 50 mm)	定量	(sulforaphane) LOD: 0.005 µM LOQ: 0.01 µM	13

		え, 2000rpm で 20 分間攪拌する. 8,603 x g で 5 分間遠心分離し, 酢酸エチル層を別の試験管に移す. 残った水層に対して酢酸エチルを加え同様の操作を 2 回繰り返す. 酢酸エチル層を集め溶媒留去し, 残渣を 10 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 4.5) / 0.1% ギ酸アセトニトリル (70/30) に再溶解し, 孔径 0.22 μ m の PVDF メンブランフィルターでろ過する.	移動相 : (A) 10 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 4.5) (B) 0.1% ギ酸アセトニトリル トランジション : (sulforaphane) 178.0 > 114.0 178.0 > 55.0 (sulforaphane nitrile) 146.1 > 55.0 146.1 > 81.9		(sulforaphane nitrile) LOD: 0.06 μ M LOQ: 0.16 μ M	
ブロッコリー (種, 花, 葉)	sulforaphane	試料を液体窒素により直ちに凍結させ, 凍結乾燥を行い乳鉢で粉碎する. 10 g の粉末にヘキサンを加え室温で一晩脱脂する. 20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.2) (100 mL) を加え室温で 8 時間振とうし加水分解する. 等量のジクロロメタンで 3 回抽出して溶液を集め, 溶媒留去する. 残渣を 5% アセトニトリル (50 mL) に再溶解し, 等量のヘキサンで 2 回洗浄する. アセトニトリル層を等量のジクロロメタンで 3 回洗浄し, フィルターろ過する. ろ液を溶媒留去し, 残渣をメタノール (3 mL) に再溶解して孔径 0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過する. ろ液 2 mL を, シリカゲル 60 (1 g) を詰めたガラスカラム (5 mm i.d. x 300 mm) に負荷する. メタノール (4 mL) で溶出し, 窒素により 2 mL に濃縮する. 最後に孔径 0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過する.	(定量) HPLC-UV カラム : Waters Spherisorb C8 (5 μ m, 4.6 mm i.d. x 250 mm) 移動相 : アセトニトリル/水 (35/65) 測定波長 : 254 nm (定性) GC-MS カラム : Agilent HP-5ms (0.25 μ m, 0.25 mm i.d. x 30 m)	定量・定性	記載なし (検量線最下点が 50 μ g/mL)	14
ブロッコリー (花, 葉, 茎)	sulforaphane	生鮮品 1 g 又は凍結乾燥品 150 mg を秤量し, 酢酸 (pH 6) (4 mL) を加え, 45°C の水浴中で 2.5 時間加水分解する. ジクロロメタン (20 mL) を加え 1 分間攪拌	HPLC-DAD カラム : Exmere SS Exsil ODS C18 (5 μ m, 4.6 mm i.d. x 250 mm)	定量	LOD: 0.58 μ g/mL LOQ: 記載なし (検量線最下点が 4 μ g/mL)	15

		したのち室温で1時間放置する。溶液を Bakerbond SPE Silica gel 3mL カラムに負荷し、メタノール（3 mL）で溶出する。溶媒留去し、残渣をアセトニトリル（2 mL）に溶解する。30 秒間攪拌し、孔径 0.45 μm のメンブランフィルターでろ過する。	移動相： アセトニトリル／水（30/70） 測定波長：202 nm			
--	--	--	---	--	--	--

引用

- 機能性表示食品「肝値ダウン ALT」（届出番号 I764, 株式会社ディーエイチシー）分析方法を示す資料より
- 機能性表示食品「スルフォラファン」（届出番号 D355, カゴメ株式会社）分析方法を示す資料より
- Ali Redha, A., Hong, H.T., Torquati, L., Nash G.R., Gidley M.J. & Cozzolino D. (2024). Development of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS) Method for Quantification of Broccoli Sulforaphane. *Food Analytical Methods*, 17, 1-6.
- Park, S., Kim, K. R., Kim, K., Kim, H. W., Lee, C. J., & Sung, J. (2024). Method Validation for the Determination of Sulforaphane in Cruciferous Vegetables. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 53(4), 385-391.
- Li, Z., Zheng, S., Liu, Y., Fang, Z., Yang, L., Zhuang, M., ... & Xu, D. (2021). Characterization of glucosinolates in 80 broccoli genotypes and different organs using UHPLC-Triple-TOF-MS method. *Food Chemistry*, 334, 127519.
- Kokotou, M. G., Revelou, P. K., Pappas, C., & Constantinou-Kokotou, V. (2017). High resolution mass spectrometry studies of sulforaphane and indole-3-carbinol in broccoli. *Food chemistry*, 237, 566-573.
- Pocasap, P., & Weerapreeyakul, N. (2016). Sulforaphene and sulforaphane in commonly consumed cruciferous plants contributed to antiproliferation in HCT116 colon cancer cells. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(2), 119-124.
- Ares, A. M., Ayuso, I., Bernal, J. L., Nozal, M. J., & Bernal, J. (2016). Trace analysis of sulforaphane in bee pollen and royal jelly by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 1012, 130-136.
- Ares, A. M., Valverde, S., Bernal, J. L., Nozal, M. J., & Bernal, J. (2015). Development and validation of a LC–MS/MS method to determine sulforaphane in honey. *Food Chemistry*, 181, 263-269.
- Celik, H., Ariburnu, E., Baymak, M. S., & Yesilada, E. (2014). A rapid validated HPLC method for determination of sulforaphane and glucoraphanin in broccoli and red cabbage prepared by various cooking techniques. *Analytical Methods*, 6(13), 4559-4566.
- Ares, A. M., Bernal, J., Martín, M. T., Bernal, J. L., & Nozal, M. J. (2014). Optimized formation, extraction, and determination of sulforaphane in broccoli by liquid chromatography with diode array detection. *Food Analytical Methods*, 7(3), 730-740.
- Wu, Y., Mao, J., You, Y., & Liu, S. (2014). Study on degradation kinetics of sulforaphane in broccoli extract. *Food Chemistry*, 155, 235-239.
- Alvarez Jubete, L., Smyth, T. J., Valverde, J., Rai, D. K., & Barry-Ryan, C. (2013). An Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS) Method for the Rapid and Sensitive Determination of Sulforaphane and Sulforaphane Nitrile in Brassica Vegetables. *Phytochemical Analysis*, 25(2), 141-146.
- Azizi Naser, S., Amiri-Besheli, B., & Sharifi-Mehr, S. (2011). The isolation and determination of sulforaphane from broccoli tissues by reverse phase-High Performance Liquid Chromatography. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 58(7), 906-910.
- Campas-Baypoli, O. N., Sánchez-Machado, D. I., Bueno-Solano, C., Ramírez-Wong, B., & López-Cervantes, J. (2010). HPLC method validation for measurement of sulforaphane level in broccoli by-products. *Biomedical Chromatography*, 24(4), 387-392.

Table 2. ユーグレナ含有成分に関する分析法

試料	測定化合物	試料前処理法	測定法	種別	LOD, LOQ	Ref.
錠剤（ユーグレナを原材料を含む）	paramylon	試料 1 粒の質量を精密に量る。水（約 40 mL）を加えて超音波を検体が崩壊するまで照射した後、100℃で振とうし、可溶性成分を溶かす。3000rpm/min で 5 分間遠心分離し、上清を除く。得られた沈殿物に対し、核磁気共鳴スペクトル測定用重水（約 4 mL）を加えて十分に混合する。3000rpm/min で 5 分間遠心分離し、上清を除く。得られた沈殿物に対し、さらに核磁気共鳴スペクトル測定用重水（約 1 mL）を加え、同様の操作を行う。得られた沈殿に DMSO を加え 10 mL に定容し、密閉容器内において 100℃で 1 時間加温抽出を行う。この 0.1 mL を正確に分取し、内部基準溶液（1 mg/mL DSS）（1 mL）及び核磁気共鳴スペクトル用重水（0.22 mL）を合わせ、十分に混和したものを試験溶液とする。	¹ H NMR (500 MHz)	定性・定量	記載なし	1
ユーグレナ	ユーグレナ代謝物（フェノール酸、フラボノイド等 2562 化合物）	（総フェノール酸） 凍結乾燥させた細胞 1 g にメタノールを加え 25℃で 1 時間振とうし、10,000 x g で 1 分間遠心分離する。96 穴プレートに上清（25 µL）、脱イオン水（125 µL）、95% エタノール（25 µL）、50% Folin-Ciocalteu 試薬（12.5 µL）を加え、5 分間後に 5% 炭酸ナトリウム（25 µL）を加え暗所で 1 時間静置する。 （総フラボノイド） 凍結乾燥させた細胞 1 g にメタノールを加え 25℃で 1 時間振とうし、10,000 x g で 1 分間遠心分離する。96 穴プレートに	（総フェノール酸、フラボノイド定量） 可視吸光光度法 測定波長：725 nm（総フェノール酸） 415 nm（総フラボノイド） （メタボローム解析） LC-QTOF-MS (positive and negative) カラム： Agilent Poroshell 120 EC-C18 (2.7 µm, 2.1 mm i.d. x 100 mm) 移動相： (A) 0.1% ギ酸水 (B) 0.1% ギ酸アセトニトリル	スクリーニング・定量	記載なし	2

		上清 (20 μL), 10% 塩化アルミニウム (4 μL), メタノール (60 μL), 1 M 酢酸カリウム (4 μL), 蒸留水 (112 μL) を加え, 室温で 30 分間静置する. (メタボローム解析) 凍結乾燥させた細胞 10 mg に 70% エタノール (内標として 25 ng /mL のスルファジメトキシンを含む) (600 μL) を加え攪拌し, 14,000rpm で 10 分間遠心分離する.				
ユーグレナから精製したパラミロン	paramylon	培養液 1 mL から抽出したパラミロンに 1 M NaOH (1 mL) を加えパラミロンが溶解するまで最大 12 時間静置する. 水で希釈して 80% フェノール (25 μL) 加え攪拌し, 濃硫酸 (2.5 mL) を加える.	可視吸光光度法 (フェノール・硫酸法) 測定波長: 490 nm	定量	記載なし	3
ユーグレナ	ユーグレナ代謝物 1432 化合物 (TOFMS), 338 化合物 (NMR)	(TOFMS 分析用) 凍結乾燥させた細胞 25 mg に水/メタノール (50/50) (5 mL) とヘキサン (5 mL) を加え, 水層を採る. (NMR 分析用) 凍結乾燥させた細胞 25 mg に水/メタノール-d_4 (1/1) (630 μL) と 5 mM DSS-d_6 及びアジ化ナトリウムを含有する重水溶液 (内標; Chenomix IS-2) (70 μL) 加え, 10 分間遠心分離し, NMR 管に移す.	QTOF-MS (infusion), ^1H NMR (600 MHz)	スクリーニング	記載なし	4
ユーグレナ	paramylon, chlorophyll, carotenoid, malondialdehyde	(paramylon) 培養液を 5,000rpm で 10 分間遠心分離し, 沈殿を超純水で 2 回洗浄して 75°C で 12 時間乾燥させる. 乾燥品 5 mg にアセトン (4 mL) を加え, 1 時間静置する. 5,000rpm で 5 分間遠心分離し, 沈殿に 1% SDS (1 mL) を加え, 85°C で 30 分間感熱	(paramylon) 可視吸光光度法 (フェノール・硫酸法) 測定波長: 490 nm (chlorophyll, carotenoid) 可視吸光光度法 測定波長:	定量	記載なし	5

		する. 2,000rpm で 5 分間遠心分離し, 沈殿を 50°C で乾燥させる. うち 50 µg を採り 1 mL に定容し, 6% フェノール (0.5 mL) と濃硫酸 (5 mL) を加えて攪拌して冷却し, 室温で 20 分間静置する. (chlorophyll, carotenoid) 細胞にアセトンを加え, 30 分間超音波破碎し, 4°C で 24 時間静置する. (malondialdehyde) 細胞ペレットに 20% TCA (5 mL) を加え破碎する. 3,000rpm で 10 分間遠心分離し, 上清 3 mL に 0.6% 2-チオバルビツール酸 (3 mL) 加え, 100°C の水浴中で 30 分間静置したら速やかに冷却する.	646, 663, 750 nm (chlorophyll) 470, 750 nm (carotenoid) (malondialdehyde) 可視吸光度法 測定波長: 450, 532, 600 nm			
ユーグレナ	paramylon, その他ユーグレナ代謝物 2458 化合物 (positive ion mode), 1376 化合物 (negative ion mode)	(paramylon) 培養液を 5,000rpm で遠心分離し, 沈殿を超純水で洗浄して集め, 超低温冷凍庫で 24 時間冷凍した後, 凍結乾燥させる. 凍結乾燥品 200 mg に 95% エタノール (50 mL) を加え, 37°C の水浴中で 24 時間インキュベーションする. 5,000rpm で 5 分間遠心分離し, 上清を捨てる. 沈殿に 1% SDS (2 mL) を加え, 85°C で 1 時間静置する. 上清を 85°C で 12 時間加熱したガラスマイクロファイバーフィルターでろ過し, 85°C で 12 時間乾燥させる. (メタボローム解析) 細胞ペレットを液体窒素で凍結させ -80°C で 24 時間冷凍した後凍結乾燥する. 凍結乾燥品 200 mg にメタノール (1 mL) を加えて攪拌し, 氷水中で 30 分間静置し	(paramylon) ろ過前後のフィルターの重量差 (後-前) をパラミロン重量とする. (メタボローム解析) LC-Orbitrap-MS (positive and negative) カラム: Waters ACQUITY UPLC HSS T3 (1.8 µm, 2.1 mm i.d. x 150 mm) 移動相: (A) 0.1% ギ酸水 (B) アセトニトリル	スクリーニング・定量	記載なし	6

		た後、超音波処理を2回行う。-20℃で1時間静置した後13,000rpmで20分間遠心してタンパク質を沈殿させる。上清を凍結乾燥し、0.1% ギ酸水(1 mL)に再溶解する。				
ユーグレナ	ユーグレナ代謝物 4860化合物(positive ion mode), 2505化合物(negative ion mode) phaseic acid, hydroxy abscisate, sedoheptulose 7-phosphate, quercetin 3-sulfate, indosine triphosphate 等	細胞を Milli-Q 水で3回洗浄し、4,000rpmで6分間遠心分離する。上清を凍結乾燥しホモジナイズする。うち20 mgに水/メタノール(50/50)(5 mL)とヘキサン(5 mL)を加え、水層100 µLをSECにより精製する。 SEC 条件 カラム : Agilent PL-Aquagel-OH Mixed-M (4.6 mm i.d. x 250 mm) x 2 本 移動相 : 10 mM 炭酸アンモニウム in 水/メタノール(50/50) 検出 : DAD (220 nm, 254 nm)	QTOF-MS (infusion, positive and negative)	スクリーニング	記載なし	7
ユーグレナ	ユーグレナ代謝物 137化合物(脂肪酸, 有機酸, アミノ酸, 核酸, 糖, テルペノイド, 配糖体, 脂質アルカロイド, ペプチド)	30 mL の培養液を4℃, 10,000 x g で10分間遠心分離する。沈殿した細胞を8.5%塩化ナトリウムで3回洗浄し、液体窒素で細胞を破砕する。	LC-QTOF-MS (QTOF, positive and negative) カラム : Waters ACQUITY UPLC BEH Amide (1.7 µm, 2.1 mm i.d. x 100 mm) 移動相 : (A) 25 mM 酢酸アンモニウム+25 mM 水酸化アンモニウム (B) アセトニトリル	スクリーニング	記載なし	8
ユーグレナ	糖 (ribose, fucose, mannose, galactose, glucose, β-glucan)	乾燥品10 gに80% エタノール(400 mL)を加えて16時間静置した後、4,000rpmで10分間遠心分離する。この操作を上清が無色になるまで繰り返す(通常4回)。ペレットに水(300 mL)を加え100℃で40分間攪拌する。冷却後4,500rpmで15分間遠心分離し、上清を採る。この操作を	GC-MS カラム : Phenomenex ZB-5 Zebron (0.25 µm, 0.25 mm i.d. x 30 m)	定量・定性	記載なし	9

		2 回繰り返す。上清集めて PVPP (ポリビニルポリピロリドン) を加えて攪拌した後 3,000rpm で 5 分間遠心分離する。2% 臭化セチルピリジニウムを加え、氷上に置く。4,500rpm で 10 分間遠心分離し、沈殿に 4 M NaCl を加え 60°C で 30 分間攪拌する。96% エタノールを加え、4,500rpm で 10 分間遠心分離する。沈殿を 4°C, 0.5 M NaCl 中で一晩透析する。膜内の溶液を集め、96% エタノールを加えて 4°C に置き、多糖類を沈殿させる。室温, 3,000rpm で 2 分間遠心分離し、凍結乾燥させる。うち 2 mg にメタノール/3 M HCl 混合液 (2 mL) を加え 80°C で 24 時間反応させる。メタノールで洗浄し、窒素で乾燥させる。Tri-Sil HTP (200 µL) を加え 80°C で 1 時間反応させ、トリメチルシリル化する。室温まで冷却後、窒素で乾燥させる。残渣にヘキサン (2 mL) を加え、遠心分離する。ヘキサン層を濃縮し、ヘキサンを加えて 200 µL にする。				
ユーグレナ	maramylon	(paramylon) 培養液を 4°C, 5,000 x g で 5 分間遠心分離する。沈殿を 0.5 M NaOH (2 mL) に溶解し、うち 50 µL を 0.5% フェノール (0.5 mL) と混合する。濃硫酸 (5 mL) を加え激しく攪拌し、30 分静置する。	(paramylon) 可視吸光度法 (フェノール・硫酸法) 測定波長: 480 nm	スクリーニング・定量	記載なし	10
ユーグレナ	paramylon, 脂肪酸 (ALA, EPA, DHA 等), α-tocopherol, phytol	(paramylon) 凍結乾燥させた細胞約 5 mg を秤量し、10% TCA (250 µL) に懸濁し、15 分間超音波処理した後 65°C の水浴中に 30 分間静置する。室温まで冷却後、15,000 x g で 20 分間遠心分離し、沈殿にアルカリ溶液 (20 g/L 炭酸ナトリウムと 4 g/L NaOH)	(paramylon) 可視吸光度法 (フェノール・硫酸法) 測定波長: 490 nm (脂肪酸) GC-MS カラム: Agilent FFAP (0.3 µm, 0.2 mm i.d. x 25 m)	定量	記載なし	11

		(0.5 mL)を加え、遠心分離する。沈殿をエタノール (3 mL) で洗浄した後, 2 g/L SDS (3 mL) を加えて 37°Cで 24 時間静置する。遠心分離し, SDS を再度加えて遠心分離する。沈殿をの蒸留水 (3 mL) で 2 回洗浄し, 1 M NaOH (2 mL) に溶解する。5% フェノール (1 mL), 濃硫酸 (5 mL) を順に入れて直ちに攪拌し, 10 分間静置する。30 秒間攪拌した後, 室温の水浴中で 20 分間静置する。 (脂肪酸等) 凍結乾燥させた細胞 2~25 mg をホモジナイズし, クロロホルム/メタノール (2/1) (1 mL) を加える。この操作を繰り返す, 溶液を合わせる。うち 300 µL に C17:0 トリグリセロール (30.45 µg) と C17:0 (15.0 µg) を加え, 窒素により溶媒を留去する。残渣を石油エーテル (1 mL) に再溶解し, 0.5 N ナトリウムメトキシド in MeOH (500 µL) と沸騰石 2 個を加え, 45°Cで 5 分間加熱する。石油エーテルと 15% 硫酸水素ナトリウム (1 mL) を加え, 石油エーテル層について溶媒を留去し, 残渣をヘキサン (150 µL) に再溶解する。	(その他化合物) GC-MS カラム : Agilent DB-5 (0.25 µm, 0.25 mm i.d. x 30 m)			
ユーグレナ	paramylon, chlorophyll	(paramylon) 培養液 25 mL を 30 秒間攪拌し, 24°C, 3,000 x g で 5 分間遠心分離して上清を捨てる。蒸留水 (25 mL) に懸濁して同様に遠心分離して上清を捨てる洗浄操作を 3 回行う。エタノール (10 mL) を加えて約 24°Cで 30 分間静置し, 24°C, 8,000 x g で 5 分間遠心分離する。ペレットに SDS-	(paramylon) 可視吸光度法 (フェノール・硫酸法) 測定波長 : 480 nm (chlorophyll) 可視吸光度法 測定波長 : 650, 665 nm	定量	記載なし	12

		EDTA 試薬 (1% SDS, 5% EDTA-2Na) (10 mL) を加え, 90°Cの水浴中で 30 分間静置する. 24°C, 8,000 x g で 5 分間遠心分離し, 上清を捨てる. 沈殿にの SDS-EDTA 試薬 (1 mL) と蒸留水 (9 mL) を加えて攪拌し, 24°C, 8,000 x g で 5 分間遠心分離する. 沈殿に蒸留水 (20 mL) を加えて攪拌し, 24°C, 8,000 x g で 5 分間遠心分離する. 沈殿に 5 mL の 1 M NaOH を加えて攪拌し, 24°Cで 12 時間静置する. うち 0.5 mL に 0.5 mL の 5% フェノールと 2.5 mL の硫酸を加え穏やかに混ぜて 24°Cで 30 分間静置する. (chlorophyll) 細胞にメタノールを加え 30 分間静置する.				
ユーグレナ	paramylon, 脂肪酸, その他ユーグレナ代謝物 86 化合物 (アミノ酸, 有機酸, 糖等)	(paramylon) 凍結させた細胞 5 mg にアセトンと SDS を加える. 乾燥させたのち, 0.5 M NaOH に再溶解し, 0.5% フェノールと混合する. 濃硫酸 (5 mL) を加え激しく攪拌し, 30 分静置する. (脂肪酸) 凍結させた細胞 20 mg にクロロホルム (0.75 mL) と超純水 (0.3 mL) にを加えて攪拌し, 室温で 1 時間静置する. 脂質抽出バッファー (LEB: クロロホルム/メタノール (2/1) + 0.1 w/v%ブチルヒドロキシトルエン) (2 mL) を加え室温で 30 分間攪拌する. クロロホルム層を採り, 残りに再度 LEB (2 mL) を加えて攪拌する. この操作をもう 3 度繰り返す, 合計	(paramylon) 可視吸光度法 (フェノール・硫酸法) 測定波長: 480 nm (脂肪酸) GC-MS カラム: Agilent DB-5 (0.25 µm, 0.25 mm i.d. x 30 m) (メタボローム解析) GC-MS カラム: Agilent HP-5ms (0.25 mm i.d. x 30 m)	スクリーニング・定量	記載なし	13

		4 回分のクロロホルム層を合わせ、1 M KCl (0.5 mL)、水 (0.5 mL) の順で洗浄する。クロロホルムを留去し、残渣に 14% トリフルオロホウ素 (50% メタノール溶液から希釈して調製) (600 μL) を加えて 100°C で 30 分間誘導体化する。内標としてヘプタデカン酸 (20 μg) を加えておく。室温まで冷却後、ヘキサン (500 μL) を加え 30 秒間振り、400 x g で 2 分間遠心分離し、ヘキサン層を採る。 (その他代謝物) 約 10⁸ 個の細胞をメタノール／クロロホルム／水 (10/3/1) (1 mL) に懸濁し、液体窒素による凍結と融解を 5 回繰り返す。4°C、14,000 x g で 3 分間遠心分離し、上清 100 μL に内標 (100 μg/mL U-13C-ソルビトール) (10 μL) を加え、溶媒を留去する。残渣にメトキシアミン塩酸塩 (10 μL) を加え 30°C で 90 分間振とうし、<i>N</i>-メチル-<i>N</i>-(トリメチルシリル)TFA (90 μL) を加え、37°C で 30 分間誘導体化する、				
ユーグレナ	succinate, lactate	凍結乾燥した細胞に 3 mM 過塩素酸 (100 μ L) を加える。	HPLC-DAD カラム：レゾナック RSpak KC-811 移動相：3 mM 過塩素酸 ポストカラム誘導体化試薬： 0.2 mM プロモチモールブルーを含む 15 mM リン酸ナトリウム緩衝液 測定波長：445 nm	定量	記載なし	14
ユーグレナ	cysteine, glutathionyl spermidine, glutathionyl <i>nor</i> -spermidine, ovothiol,	凍結した細胞 20 mg に 50% アセトニトリルを加え 60°C で抽出する。チオールをモノプロモビマンで標識する。	HPLC-FLD カラム： トムシク ACE AR C18 (5 μm, 4.6 mm i.d. x 250 mm)	スクリーニング	記載なし	15

	glutathione, trypanothione, <i>nor</i> - trypanothione		移動相 : (A) 0.225% 酢酸 (B) 90% アセトニトリル 励起波長 : 385 nm, 蛍光波長 : 460 nm LC-UV-ion trap-MS (ion trap, positive) カラム : Phenomenex Kinetex XB-C18 (2.6 µm, 2.1 mm i.d. x 50 mm) 移動相 : (A) 0.1% ギ酸水 (B) アセトニトリル 測定波長 : 390 nm			
--	--	--	---	--	--	--

引用

- 機能性表示食品「からだにユーグレナ 睡眠・疲労感・ストレス 機能性表示食品」(届出番号 J563, 株式会社ユーグレナ) 分析方法を示す資料より
- Inwongwan, S., Sriwari, S., & Pumas, C. (2025). Metabolomic Insights into the Adaptations and Biotechnological Potential of *Euglena gracilis* Under Different Trophic Conditions. *Plants*, 14(11), 1580.
- Fukuda, M., Kinkawa, M., & Hayashi, M. (2024). Fed-batch cultivation of *Euglena gracilis* for the high-yield production and GPC-assisted molecular weight determination of paramylon. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 88(2), 206-211.
- Farjallah, A., Roy, A., & Guéguen, C. (2024). NMR-and HRMS-based untargeted metabolomic study of metal-stressed *Euglena gracilis* cells. *Algal Research*, 78, 103383.
- Yuan, A., Sui, F., Li, S., Liu, Y., Lu, X., Lu, Y., & Fan, Y. (2024). Transcriptome analysis of the effects of different carbon dioxide concentrations on paramylon accumulation in *Euglena gracilis* Z. *Bioresource Technology*, 393, 130114.
- Huang, Y., Wan, X., Zhao, Z., Liu, H., Wen, Y., Wu, W., ... & Zhao, C. (2023). Metabolomic analysis and pathway profiling of paramylon production in *Euglena gracilis* grown on different carbon sources. *International Journal of Biological Macromolecules*, 246, 125661.
- Farjallah, A., & Guéguen, C. (2023). Untargeted metabolomic analysis of heterotrophic *Euglena gracilis* cells in response to the organic carbon source. *Algal Research*, 76, 103305.
- Gu, G., Ou, D., Chen, Z., Gao, S., Sun, S., Zhao, Y., ... & Liang, X. (2022). Metabolomics revealed the photosynthetic performance and metabolomic characteristics of *Euglena gracilis* under autotrophic and mixotrophic conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38(9), 160.
- Casas-Arrojo, V., Arrojo Agudo, M. D. L. Á., Cárdenas García, C., Carrillo, P., Pérez Manríquez, C., Martínez-Manzanares, E., & Abdala Díaz, R. T. (2022). Antioxidant, immunomodulatory and potential anticancer capacity of polysaccharides (glucans) from *Euglena gracilis* GA klebs. *Pharmaceuticals*, 15(11), 1379.
- Ouyang, Y., Chen, S., Zhao, L., Song, Y., Lei, A., He, J., & Wang, J. (2021). Global metabolomics reveals that *Vibrio natriegens* enhances the growth and paramylon synthesis of *Euglena gracilis*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 652021.
- Wang, Y., Seppänen-Laakso, T., Rischer, H., & Wiebe, M. G. (2018). *Euglena gracilis* growth and cell composition under different temperature, light and trophic conditions. *PLoS One*, 13(4), e0195329.

12. Matsui, T., Mori, K., & Toyama, T. (2021). Paramylon production by *Euglena gracilis* via mixotrophic cultivation using sewage effluent and waste organic compounds. *Bioresource Technology Reports*, 15, 100735.
13. Zeng, M., Hao, W., Zou, Y., Shi, M., Jiang, Y., Xiao, P., ... & Wang, J. (2016). Fatty acid and metabolomic profiling approaches differentiate heterotrophic and mixotrophic culture conditions in a microalgal food supplement 'Euglena'. *BMC biotechnology*, 16(1), 49.
14. Tomita, Y., Yoshioka, K., Iijima, H., Nakashima, A., Iwata, O., Suzuki, K., ... & Osanai, T. (2016). Succinate and lactate production from *Euglena gracilis* during dark, anaerobic conditions. *Frontiers in Microbiology*, 7, 2050.
15. O'Neill, E. C., Trick, M., Hill, L., Rejzek, M., Dusi, R. G., Hamilton, C. J., ... & Field, R. A. (2015). The transcriptome of *Euglena gracilis* reveals unexpected metabolic capabilities for carbohydrate and natural product biochemistry. *Molecular BioSystems*, 11(10), 2808-2820.

Table 3. モリンガ含有成分に関する分析法

試料	測定化合物	試料前処理法の概要	測定法	種別	LOD, LOQ	Ref.
錠剤 (モリンガ種子を原材料に含む)	glucomoringin	試料 0.50 g を正確に量る. 水 (20 mL) を正確に加え, 超音波処理を 5 分間行う. 抽出液から正確に 2 mL を分取して, 水/アセトニトリル (1/3) で 50 mL に定容し, 5 分間放置する. 孔径 0.2 μ m の PTFE フィルターでろ過する.	HPLC-UV カラム : GL サイエンス Inertsil HILIC (5 μ m, 4.6 mm i.d. x 250 mm) 移動相 : アセトニトリル/10 mM ギ酸アンモニウム (93/7) 測定波長 : 220 nm	定量	記載なし	1
清涼飲料水 (モリンガ種子を原材料に含む)	glucomoringin	試料 5 mL を正確に量り, 水で 20 mL に定容する. 定容液 5 mL を Oasis WAX に負荷し, 28%アンモニア水/メタノール (2/8) (5 mL) で溶出する. 溶媒留去し, 残渣をメタノール (5 mL) に再溶解して, 孔径 0.2 μ m の PTFE フィルターでろ過する.	HPLC-UV カラム : Merck ZIC-pHILIC (5 μ m, 4.6 mm i.d. x 150 mm) 移動相 : アセトニトリル/10 mM ギ酸アンモニウム (pH 3.0) (75/25) 測定波長 : 230 nm	定量	記載なし	2
モリンガ (葉)	フラボノイド, フェノール酸, アルカロイド, glucomoringin 等 43 化合物	粉碎した試料 1 g に超純水 (10 mL) を加え, 100°C で 2 回還流抽出する. 抽出液に水 (100 mL) を加え, 12,000 x g で 10 分間遠心分離し 10 倍に希釈して孔径 0.22 μ m のフィルターでろ過する.	LC-Orbitrap-MS カラム : Waters ACQUITY UPLC HSS T3 (1.7 μ m, 2.1 mm i.d. x 100 mm) 移動相 : (A) 0.1% ギ酸水 (B) アセトニトリル	スクリーニング	記載なし	3
モリンガ (種子)	glucomoringin, moringin, thiourea, フェノール酸 (gallic acid, chlorogenic acid, p-coumaric acid, trigonelline, caffeic acid, ferulic acid), アルカロイド (caffeine, theobromine, theophylline)	(glucomoringin, moringin, thiourea) 粉末化した試料に 5 mL/g の比でジエチルエーテルを加え脱脂する. 脱脂した粉末に 5 mL/g の比で水を加え 30 分間振とうし, 4°C, 17,400 x g で 30 分間遠心分離する. (その他化合物) 脱脂した粉末試料に 10 mL/g の比で	(glucomoringin, moringin, thiourea) LC-DAD カラム : Agilent ZORBAX Eclipse C18 (5 μ m, 4.6 mm i.d. x 150 mm) 移動相 : (A) 0.1% ギ酸水 (B) 0.1% ギ酸アセトニトリル 測定波長 :	定量	LOD: 記載なし LOQ: (glucomoringin, moringin, thiourea) 記載なし	4

		80% メタノールを加え 30 分間振とうし, 4°C, 17,400 x g で 10 分間遠心分離する. 上清を除いた残渣について同様の操作を 2 回繰り返す. 上清を集め溶媒留去し, 残渣を 80%メタノール (2 mL) に再溶解して, 孔径 0.22 µm の再生セルロースメンブランフィルターでろ過する.	227 nm (glucomoringin), 280 nm (moringin, thiourea) (その他化合物) LC-DAD カラム : Zorbax Eclipse C18 (5 µm, 4.6 mm i.d. x 150 mm) 移動相 : (A) 0.1% 酢酸水 (B) メタノール 測定波長 : 270 nm (trigonelline, theobromine, theophylline, caffeine, gallic acid), 320 nm (chlorogenic acid, caffeic acid, <i>p</i> -coumaric acid, ferulic acid)		(trigonelline) 1 µg/mL (gallic acid) 5 µg/mL (theobromine) 0.9 µg/mL (theophylline) 0.2 µg/mL (chlorogenic acid) 0.7 µg/mL (caffeine) 1 µg/mL (caffeic acid) 0.28 µg/mL (<i>p</i> -coumaric acid) 0.28 µg/mL (ferulic acid) 0.28 µg/mL	
モリンガ (葉)	クロロフィル	粉末化した試料 0.5 g に有機溶媒 (エタノール, メタノール, アセトン又は DMF, 50 mL) を加え, 5 分間攪拌する. その後, 4, 25 又は 45°C で 10, 30 又は 60 分間抽出し, 2000rpm で 5 分間遠心分離する.	可視吸光度法 測定波長 : 645, 663 nm	定量	記載なし	5
モリンガ (葉)	グルコシノレート, フラボノイド, フェノール酸等 77 化合物	粉末化した試料 1 g にエタノール (10 mL) を加え, 4°C で 10 分間の超音波処理を 2 回行う. 4°C, 2,000 x g で 10 分間遠心分離する.	LC-QTOF-MS (negative) カラム : Phenomenex Luna Omega Polar C18 (3 µm, 4.6 mm i.d. x 150 mm) 移動相 : (A) 0.1% ギ酸水 (B) 0.1% ギ酸アセトニトリル	スクリーニング	記載なし	6
モリンガ (葉)	グルコシノレート (progoitrin,	粉末化した試料 50 mg に 70°C の 80%	LC-UV	定量	(progoitrin)	7

	glucomoringin, chlorogenic acid, caffeic acid, rutin)	メタノール (1 mL) を加え 10 秒間攪拌し, 30 分間振とうする. 冷却後, 上清を除いた残渣について同様の操作を 2 回繰り返す. 上清を集め, 孔径 0.45 μm の PTFE フィルターでろ過する.	カラム : Phenomenex Luna C18 (5 μm , 4.6 mm i.d. x 150 mm) 移動相 : (A) 0.1%ギ酸水 (B) 0.1%ギ酸アセトニトリル 測定波長 : 230 nm		LOD: 0.45 $\mu\text{g/mL}$ LOQ: 1.3 $\mu\text{g/mL}$ (glucomoringin) LOD: 1.5 $\mu\text{g/mL}$ LOQ: 5.0 $\mu\text{g/mL}$ (chlorogenic acid) LOD: 1.0 $\mu\text{g/mL}$ LOQ: 2.5 $\mu\text{g/mL}$ (caffeic acid) LOD: 0.8 $\mu\text{g/mL}$ LOQ: 2.5 $\mu\text{g/mL}$ (rutin) LOD: 1.0 $\mu\text{g/mL}$ LOQ: 2.5 $\mu\text{g/mL}$	
モリンガ (葉)	germerine, piperazine-1,4-diyl diethane-2, hexanedioic acid, quercetin 3,3',4',7-tetrasulfate, triolein, phosphatidylcholine, hexabromodiphenyl oxide, phosphatidylinositol, ferric-adenosine triphosphate complex, atropine, palmitate, 3,3',5-triiodothyroacetic acid, n-tetratetracontan 等	乾燥させ粉碎した試料 25 g をメタノール/水 (80/30) 中に 7 日間室温で浸漬する. 抽出液をフィルターろ過し, エバポレーターで濃縮して凍結乾燥する. 凍結乾燥物 20 mg にメタノール (500 μL) を加え 20°C で 10 分間超音波処理する. 11,356 x g で 10 分間遠心分離し, 上清を 0.22 μm のポリプロピレンメンブランフィルターでろ過する.	LC-ion trap-MS カラム : ThermoFisher C18 Hypersil gold (1.9 μm , 2.1 mm i.d. x 50 mm) 移動相 : (A) 0.1% ギ酸水 (B) 0.1% ギ酸メタノール	スクリーニング	記載なし	8
モリンガ (種, 根, 幹, 葉)	gallic acid, chlorogenic acid, vanillin, ferulic acid, gallogen, rutin, isoquercetin, quercitrin, baicalin, quercetin, kaempferide	粉末化した試料 1 g を正確に秤量し, メタノールを加えて 20°C で 40 分間超音波処理する. 孔径 0.22 μm のフィルターでろ過する.	LC-MS/MS (MRM, negative) カラム : Waters ACQUITY UPLC BEH C18 (1.7 μm , 2.1 mm i.d. x 100 mm) 移動相 : (A) 0.1% ギ酸アセトニトリル (B) 0.1% ギ酸水 トランジション :	定量	(gallic acid) LOD: 15.29 ng/mL LOQ: 50.98 ng/mL (chlorogenic acid) LOD: 15.21 ng/mL LOQ: 50.69 ng/mL (vanillin) LOD: 103.13 ng/mL LOQ: 343.77 ng/mL (ferulic acid) LOD: 0.87 ng/mL LOQ: 2.90 ng/mL (gallogen)	9

			gallic acid: 168.96 > 125.04 (定量), 79.07 (定性) chlorogenic acid: 353.09 > 191.11 (定量), 85.12 (定性) vanillin: 150.99 > 106.99 (定量), 83.06 (定性) ferulic acid: 193.03 > 134.09 (定量), 178.12 (定性) gallogen: 301.06 > 151.11 (定量), 179.07 (定性) rutin: 609.10 > 300.24 (定量), 271.11 (定性) isoquercetin: 463.03 > 300.24 (定量), 271.12 (定性) quercitrin: 447.03 > 300.42 (定量), 271.11 (定性) baicalin: 445.08 > 269.10 (定量), 275.00 (定性) quercetin: 301.00 > 151.05 (定量), 179.08 (定性) kaempferide: 298.97 > 284.13 (定量), 151.04 (定性)		LOD: 0.84 ng/mL LOQ: 2.81 ng/mL (rutin) LOD: 0.65 ng/mL LOQ: 2.18 ng/mL (isoquercetin) LOD: 0.86 ng/mL LOQ: 2.86 ng/mL (quercitrin) LOD: 0.61 ng/mL LOQ: 2.05 ng/mL (baicalin) LOD: 3.00 ng/mL LOQ: 9.99 ng/mL (quercetin) LOD: 5.21 ng/mL LOQ: 17.36 ng/mL (kaempferide) LOD: 6.78 ng/mL LOQ: 22.59 ng/mL	
モリンガ (葉)	1,3,5-cycloheptatriene, <i>p</i> -xylene, pyrimidin-2-one, 4-[<i>N</i> -methylureido]-1-[4-methylaminocarbonyloxymethyl, octadecadiynoic acid methyl ester, vitamin A aldehyde, androst-5,7-dien-3-ol-17-one, ethyl iso-allocholate, 6,9,12,15-docosatetraenoic acid methyl ester, oleic acid 3-(octadecyloxy) propyl ester	粉末化した試料 1000 g をエタノール中に 48 時間浸漬する。エタノール抽出液をモスリン布でろ過しガラスウールを充填したカラムに通す。ろ液をエバポレーターで濃縮する。	GC-MS カラム : ThermoFisher TG-5MS (0.25 μ m, 0.25 mm i.d. x 30 m)	スクリーニング	記載なし	10
モリンガ (葉, 種子, 茎, 葉腺分泌物)	グルコシノレート (glucomoringin 及び側鎖違い 6 種)	乾燥させた組織試料には冷却したアセトニトリル・DMSO・DMF 等量混合液を, 新鮮な葉試料には沸騰した	LC-MS/MS (QQQ と QTOF の併用, positive and negative) カラム 1 :	スクリーニング	記載なし	11

		80% メタノールを加え 3 分間ホモジナイズする。ホモジネートを 25℃, 5,600 x g で 3 分間遠心分離する。	Poly LC Polyhydroxyethylaspartamide (3 µm, 4.6 mm i.d. x 200 mm) 移動相 1 : 30 mM ギ酸アンモニウム (pH 5.4–8.0) in 82.5–87% アセトニトリル / 水 (82.5/15) カラム 2 : Merck ZIC-HILIC (5 µm, 4.6 mm i.d. x 150 mm) 移動相 2 : 15 mM ギ酸アンモニウム (pH 4.5) in 70% アセトニトリル			
モリンガ (葉, 種, さや, 葉柄)	total isothiocyanates, astragalin	(水抽出) 粉末化した試料に 60～70℃の水を加え, 45 分間振とうする。抽出液をフィルターろ過し, 凍結乾燥する。メタノールに溶解する。 (50% エタノール抽出) 粉末化した試料を 50% エタノールに揺らしながら 48 時間浸漬し, 抽出液をフィルターろ過する。エタノールをエバポレーターで除去し, 残留した水は凍結乾燥で除去する。メタノールに溶解する。 (95% エタノール抽出) 粉末化した試料を 95% エタノールに揺らしながら 48 時間浸漬し, フィルターろ過し, 溶媒留去する。メタノールに溶解する。	HPLC-UV/VIS (total isothiocyanates) 誘導体化 : 0.25 mL の試料溶液に 0.25 mL の 100 mM リン酸三カリウム緩衝液 (pH 8.5) 及び 0.5 mL の 10 mM 1,2-benzenedithiol を加え, 65℃で 2 時間反応させる。室温まで冷却後, 0.45 µm のナイロンフィルターでろ過する。 カラム : Phenomenex Gemini C18 (粒子径 5 µm) 移動相 : 水 / メタノール (4/1) 測定波長 : 365 nm (astragalin) カラム : Phenomenex Luna C18 (粒子径 5 µm) 移動相 : 0.1% 酢酸 (pH 4.5) / アセトニトリル (3/1) 測定波長 : 267 nm	定量	(total isothiocyanates) LOD: 0.13 µg/mL LOQ: 0.5 µg/mL (astragalin) LOD: 0.10 µg/mL LOQ: 0.5 µg/mL	12
モリンガ (葉)	crypto-chlorogenic acid, isoquercetin, astragalin	粉末化した試料 5.0 g を正確に秤量し, 20 mL/g の比で 70% エタノール中に室温で時々揺らしながら 72 時間浸漬する。抽出液を溶媒留去し, 残渣 100 mg を正確に秤量し, 50% メタノ	HPLC-UV カラム : ThermoFisher Hypersil BDS C18 (5 µm, 4.6 mm i.d. x 150 mm) 移動相 :	定量	(crypto-chlorogenic acid) LOD: 0.008 µg/mL	13

		ール (10 mL) に溶解する. 孔径 0.2 μm のナイロンメンブランフィルターでろ過する.	(A) 1% 氷酢酸水 (B) アセトニトリル 測定波長: 334 nm		LOQ: 0.024 $\mu\text{g/mL}$ (isoquercetin) LOD: 0.015 $\mu\text{g/mL}$ LOQ: 0.044 $\mu\text{g/mL}$ (astragalin) LOD: 0.011 $\mu\text{g/mL}$ LOQ: 0.032 $\mu\text{g/mL}$	
モリンガ (葉)	フラボノイド類 (quercetin, kaempferol)	(スクリーニング) 乾燥粉末状にした試料 (~100 mg) に 0.1% 酢酸 in 70% メタノール (25 mL) を加え 25 分間抽出し, 2 時間室温で静置する. そのうち約 1 mL を孔径 0.45 μm のフィルターでろ過する. (定量) 試料約 100 mg にメタノール (15 mL) を加え, 15 分間超音波処理する. 濃塩酸 (1.5 mL) を加え, 2 時間還流する. 室温まで冷却後, 25 mL に定容する. そのうち約 1 mL を孔径 0.45 μm のフィルターでろ過する.	(スクリーニング) LC-DAD-MS/MS (positive) カラム: Phenomenex Prodigy ODS3 (5 μm , 3.2 mm i.d. x 150 mm) 移動相: (A) 0.1% ギ酸水 (B) 0.1% ギ酸アセトニトリル 測定波長: 254, 289, 370 nm (定量) LC-DAD-MS (positive) カラム: 同上 移動相: 同上 測定波長: 370 nm	スクリーニング・定量	(quercetin) 記載なし (検量線最下点 が 3.75 $\mu\text{g/mL}$) (kaempferol) 記載なし (検量線最下点 が 3.19 $\mu\text{g/mL}$)	14
モリンガ (葉)	crypto-chlorogenic acid, isoquercetin, astragalin	粉末化した試料 5.0 g を正確に秤量し, 20 mL/g の比で 70% エタノール中に室温で時々揺らしながら 72 時間浸漬する. この操作を 5 回繰り返す. 抽出液を集めて溶媒留去し, 残渣に 50% メタノールを加えて 10 mL に定容する. 孔径 0.45 μm のナイロンメ	TLC プレート: 未修飾シリカゲルプレート 展開溶媒: 酢酸エチル/ギ酸/酢酸/水 (34/3.5/1.5/7) 検出波長: 340 nm	定量	(crypto-chlorogenic acid) LOD: 14.93 ng/mL LOQ: 48.93 ng/mL	15

		ンブランフィルターでろ過する.			(isoquercetin) LOD: 13.80 ng/mL LOQ: 45.99 ng/mL (astragalin) LOD: 10.84 μg/mL LOQ: 36.13 μg/mL	
モリンガ (葉, 花, 実)	α-tocopherol, γ-tocopherol	乾燥試料 0.40 g にピロカテコール (200 μL) と 0.5 M 水酸化カリウムメタノール溶液 (5 mL) を加え, 20 秒間攪拌し, 80°Cの水浴中に 15 分間静置する (5 分おきに 15 秒間攪拌する). 氷水で冷却後, 蒸留水 (1 mL) とヘキサン (5 mL) を加え, 1 分間攪拌する. 425 x g で 2 分間遠心分離し, 上清 3 mL を採り窒素により溶媒留去する. 残渣をメタノール/アセトニトリル (10/80) (3 mL) に再溶解し, 孔径 0.50 μm のメンブランフィルターでろ過する.	HPLC-DAD カラム : Exmere SS Exil ODS (5 μm, 4 mm i.d. x 250 mm) 移動相 : メタノール/アセトニトリル (20/80) 測定波長 : 208 nm	定量	(α-tocopherol) LOD: 140 ng/mL LOQ: 記載なし (検量線最下点 が 7 μg/mL) (γ-tocopherol) LOD: 160 ng/mL LOQ: 記載なし (検量線最下 点が 0.4 μg/mL)	16

引用

- 機能性表示食品「ひざ腰習慣」(届出番号 J218, アリナミン製薬株式会社) 分析方法を示す資料より
- 機能性表示食品「おいしい疲労感軽減」(届出番号 H1006, 森永乳業株式会社) 分析方法を示す資料より
- Wang, J., Du, Y., Jiang, L., Li, J., Yu, B., Ren, C., ... & He, B. (2024). LC-MS/MS-based chemical profiling of water extracts of *Moringa oleifera* leaves and pharmacokinetics of their major constituents in rat plasma. *Food Chemistry: X*, 23, 101585.
- Liu, Y., Chin, F. W. L., Huang, D., Liu, S. Q., & Lu, Y. (2024). The thermal degradation of glucomoringin and changes of phenolic compounds in moringa seed kernels during different degrees of roasting. *Food Chemistry*, 454, 139782.
- Ngcobo, S., Bada, S. O., Ukpong, A. M., & Risenga, I. (2024). Optimal chlorophyll extraction conditions and postharvest stability in *Moringa* (*M. Oleifera*) leaves. *Journal of Food*

Measurement and Characterization, 18(3), 1611-1626.

6. Ceci, R., Maldini, M., La Rosa, P., Sgrò, P., Sharma, G., Dimauro, I., ... & Duranti, G. (2024). Comparative metabolomic analysis of *Moringa oleifera* leaves of different geographical origins and their antioxidant effects on C2C12 myotubes. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(15), 8109.
7. Sibhat, G., Kahsay, G., Van Schepdael, A., & Adams, E. (2023). Fast RP-HPLC method for analysis of glucosinolates and phenolics in *Moringa stenopetala* leaf powder preparations. *Chromatographia*, 86(6), 425-435.
8. Manzano-Gómez, L. A., Guzmán-Albores, J. M., Rincón-Rosales, R., Winkler, R., Rincón-Molina, C. I., Castañón-González, J. H., ... & Ruíz-Valdiviezo, V. M. (2021). Evaluation of metabolomic profile and growth of *Moringa oleifera* L. cultivated with vermicompost under different soil types. *Agronomy*, 11(10), 2061.
9. Zhu, Y., Yin, Q., & Yang, Y. (2020). Comprehensive investigation of *Moringa oleifera* from different regions by simultaneous determination of 11 polyphenols using UPLC-ESI-MS/MS. *Molecules*, 25(3), 676.
10. Hamed, H. S., & El-Sayed, Y. S. (2019). Antioxidant activities of *Moringa oleifera* leaf extract against pendimethalin-induced oxidative stress and genotoxicity in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Fish Physiology and Biochemistry*, 45(1), 71-82.
11. Fahey, J. W., Olson, M. E., Stephenson, K. K., Wade, K. L., Chodur, G. M., Odee, D., ... & Hubbard, W. C. (2018). The diversity of chemoprotective glucosinolates in Moringaceae (*Moringa* spp.). *Scientific Reports*, 8(1), 7994.
12. Engsuwan, J., Waranuch, N., Limpeanchob, N., & Ingkaninan, K. (2017). HPLC methods for quality control of *Moringa oleifera* extract using isothiocyanates and astragalin as bioactive markers. *ScienceAsia*, 43(3).
13. Vongsak, B., Sithisarn, P., & Gritsanapan, W. (2014). Simultaneous HPLC quantitative analysis of active compounds in leaves of *Moringa oleifera* Lam. *Journal of Chromatographic Science*, 52(7), 641-645.
14. Coppin, J. P., Xu, Y., Chen, H., Pan, M. H., Ho, C. T., Juliani, R., ... & Wu, Q. (2013). Determination of flavonoids by LC/MS and anti-inflammatory activity in *Moringa oleifera*. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1892-1899.
15. Vongsak, B., Sithisarn, P., & Gritsanapan, W. (2013). Simultaneous Determination of Crypto-Chlorogenic Acid, Isoquercetin, and Astragalin Contents in *Moringa oleifera* Leaf Extracts by TLC-Densitometric Method. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013(1), 917609.
16. Sánchez-Machado, D. I., Lopez-Cervantes, J., & Vázquez, N. R. (2006). High-performance liquid chromatography method to measure α - and γ -tocopherol in leaves, flowers and fresh beans from *Moringa oleifera*. *Journal of Chromatography A*, 1105(1-2), 111-114.