

Application News

No. L450

高速液体クロマトグラフィー
High Performance Liquid Chromatography

ヨーグルト中オロト酸の分析

Analysis of Orotic Acid in Yogurt

オロト酸は、乳清から発見された複素芳香環化合物で、オロチン酸、オロット酸、ウラシル-6-カルボン酸とも呼ばれます。ビタミン B₁₃ と呼ばれることもありますが、生体内で合成されることから、正式にはビタミンではありません。このオロト酸は核酸（ピリミジン）の主要前駆体であり、その多様な生理作用から注目されています。これまで、第3類医薬品として一般医薬品や化粧品などに配合されてきました。平成24年1月23日付けで“医薬品の範囲に関する基準の一部改正について”，厚生労働省医薬食品局長より通達がありました（薬食発0123第3号）。通達にはオロト酸、オロト酸のカリウム塩、マグネシウム塩が「医薬品的効能効果を標榜しない限り医薬品と判断しない成分本質（原材料）リスト」に掲載されました。これにより、今後は健康食品などへの利用が期待されています。

ここでは、島津 Prominence システムを用いた逆相モードによるヨーグルト中のオロト酸の分析例をご紹介します。

A. Nomura M. Ogaito H. Yamamoto*
(*Shimadzu Techno-Research, Inc.)

■標準試料の分析

Analysis of Standard Solution

Fig. 1 にオロト酸の構造式を示します。オロト酸は非常に極性が高く、逆相クロマトグラフィーでは保持しにくい成分です。移動相に有機溶媒を含まない緩衝液を使用することで保持させることは可能ですが、一般的な逆相カラムでは、徐々に保持時間が早くなる傾向があります。そのため本分析では、カラムにシリカ表面を不活性化させ、かつ、固定相の親水性を高めることで水（緩衝液）100% 移動相条件下でも保持が安定するように設計されたワイエムシ社の Hydrosphere C18 を用いました。また、移動相に酸性緩衝液のみを使用しました。

Fig. 2 にオロト酸標準溶液（10 mg/L）のクロマトグラムを、Table 1 に分析条件を示します。

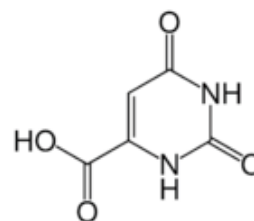


Fig. 1 オロト酸の構造式
Structure of Orotic Acid

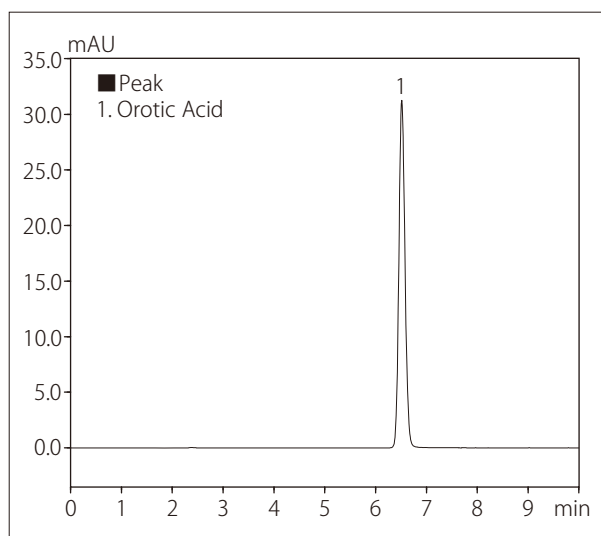


Fig. 2 オロト酸のクロマトグラム（10 mg/L, 10 μL 注入）
Chromatogram of Standard Solution of Orotic Acid
（10 mg/L, 10 μL injected）

Table 1 分析条件
Analytical Conditions

Column	: Hydrosphere C18 (150 mm L. × 4.6 mm I.D., 5 μm, 株式会社ワイエムシ)
Mobile Phase	: 10 mmol/L Phosphate (Sodium) Buffer (pH 2.6)
Flow Rate	: 1.0 mL/min
Column Temp.	: 40 °C
Injection Vol.	: 10 μL
Detection	: SPD-20A at 280 nm

■低濃度標準試料の分析

Analysis of Low Concentration Standard Solution

Fig. 3 にオロト酸 (0.1 mg/L) を 10 μ L 注入したクロマトグラムを示します。Table 2 に 6 回繰り返し分析した結果を示します。オートサンプリングには SIL-20AC を用いました。本装置の高い注入再現性により、低濃度試料においても良好な再現性が得られました。

Table 2 再現性 (n=6)
Repeatability (n=6)

	Retention time	Area
%RSD	0.01	0.86

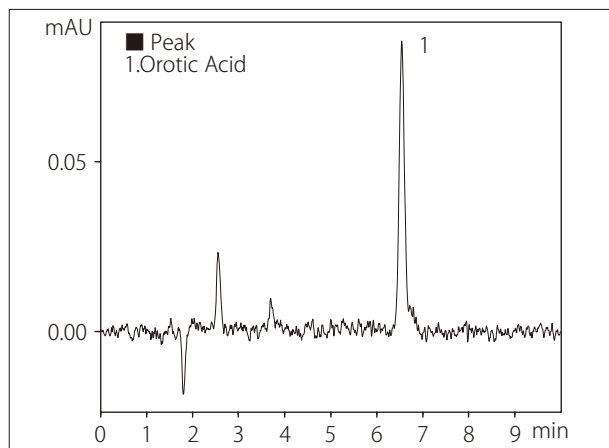


Fig. 3 低濃度標準試料のクロマトグラム (0.1 mg/L, 10 μ L 注入)
Chromatogram of Low Concentration Standard Solution (0.1 mg/L, 10 μ L injected)

■直線性

Linearity

Fig. 4 に 0.1 ~ 10 mg/L における検量線を示します。検量線の相関係数 (R) は 0.9999 以上であり、良好な直線性が得られました。

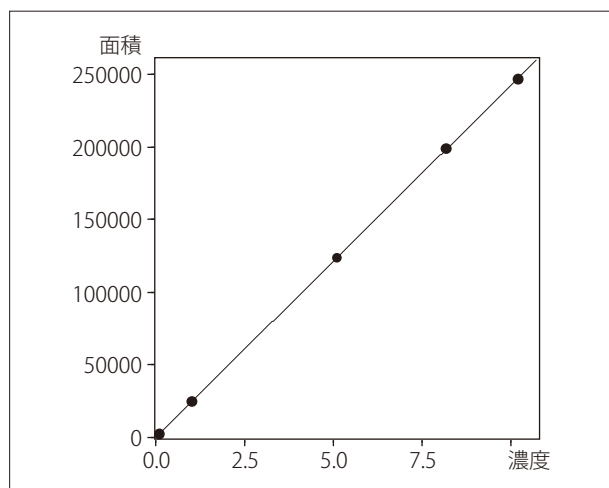


Fig. 4 直線性 (0.1-10 mg/L, 10 μ L 注入)
Linearity (0.1-10 mg/L, 10 μ L injected)

■ヨーグルトの分析

Analysis of Yogurt

Fig. 5 にヨーグルトの、Fig. 6 にドリンクヨーグルトのクロマトグラムを示します。各サンプルは限外ろ過膜でろ過した後、水で 10 倍に希釈してから、10 μ L 注入しました。ヨーグルト中には約 75 mg/L、ドリンクヨーグルト中には約 35 mg/L オロト酸が含まれていることがわかりました。

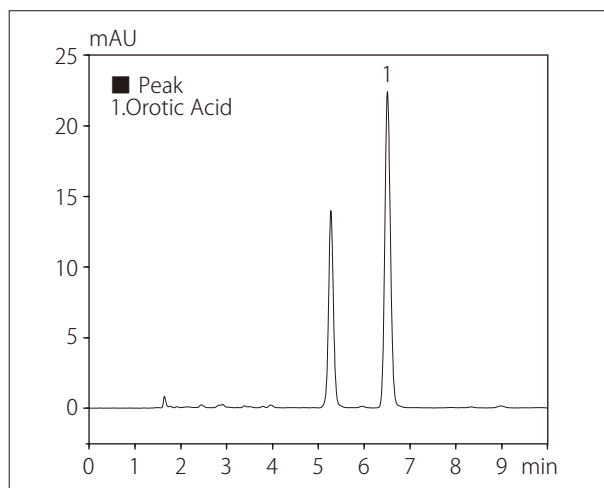


Fig. 5 ヨーグルトのクロマトグラム (10 μ L 注入)
Chromatogram of Yogurt (10 μ L injected)

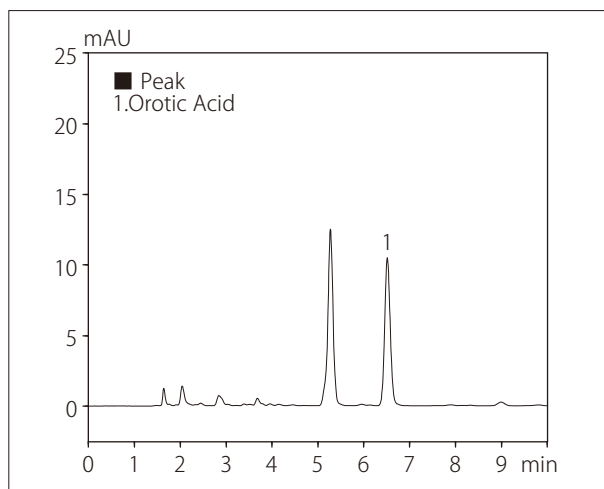


Fig. 6 ドリンクヨーグルトのクロマトグラム (10 μ L 注入)
Chromatogram of Drink Yogurt (10 μ L injected)