

4 豚用配合飼料中のシスチン，リジン，メチオニン及びトレオニンのアミノ酸自動分析装置による分析法の検討

土井 雄悟*，山上 陽平*

Study of Determination Method of Cystine, Lysine, Methionine and Threonine in Formula Feed for Pigs by Automatic Amino Acid Analyzer

DOI Yugo* and YAMAGAMI Yohei*

(* Fertilizer and Feed Inspection Department, Food and Agricultural Materials Inspection Center)

We have researched a determination method of amino acids (cystine, lysine, methionine and threonine) in formula feed generally used by feed-related companies. Based on the research results, we have further conducted preliminary study to develop a determination method of methionine in formula feed for pigs.

In the performic acid oxidation method, methionine sulfone was quantified as following: Methionine in a sample was oxidized to methionine sulfone with performic acid solution. The sample solution was hydrolyzed with hydrochloric acid. The sample solution was then concentrated under the reduced pressure, and diluted with sodium citrate buffer. Then, methionine sulfone in the sample solution was determined by an automatic amino acid analyzer. In the hydrobromic acid addition method, methionine sulfone was quantified as following: Methionine in a sample was oxidized to methionine sulfone with performic acid solution. The sample solution was added with hydrobromic acid to decompose performic acid. After that, methionine sulfone in the sample solution was determined by the same preparation as performic acid oxidation method. In the simultaneous analysis method, methionine in a sample was pretreated according to the simultaneous amino acid analysis method, listed in the Feed Analysis Standard of Japan.

Consequently, the performic acid oxidation method resulted in the higher measured value of methionine compared to the simultaneous analysis method. On the other hand, the hydrobromic acid addition method did not bring about the higher measured value of methionine compared to the performic acid oxidation method.

Key words: amino acid; cysteine; lysine; methionine; methionine sulfone; threonine; automatic amino acid analyzer; formula feed for pigs

キーワード：アミノ酸；シスチン；リジン；メチオニン；メチオニンスルホン；トレオニン；アミノ酸自動分析装置；豚用配合飼料

1 緒 言

家畜排せつ物に含まれる窒素及びリンは、地球温暖化や悪臭の発生などの畜産環境問題の原因として問題となっているが、このうち排せつ物中の窒素については、アミノ酸バランスの適正化により低減できることが報告されている¹⁾。これらの知見に基づき、飼料の公定規格²⁾には環境負荷低減型配合飼料（豚用）の規格が設けられ、アミノ酸（トレオニン，メチオニン及びシスチン並びにリジン）の最小量が規定されている。また、農林水産省が令和3年に策定した「みどりの食料シス

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

テム戦略」に掲げている畜産分野における温室効果ガス排出量の削減に向けても³⁾，環境負荷低減型配合飼料の普及が期待されている。

現在，飼料中のメチオニンの分析法について飼料分析基準⁴⁾ではアミノ酸分析計による同時分析法（以下「同時分析法」という．）が記載されているが，低回収の問題がある．また，シスチン，リジン及びトレオニンについても豚用配合飼料において妥当性を確認する必要がある．そこで，まず適切な分析法を決定するため，アミノ酸分析を行っている飼料関係業者等を対象に実態調査を行った結果，飼料関係業者の間では配合飼料中のメチオニンを過ギ酸処理によりメチオニンスルホンに酸化した後，塩酸加水分解を行い，アミノ酸自動分析装置で測定する方法（以下「過ギ酸酸化処理法」という．）が一般的に用いられていることが判明した．

また，日本標準飼料成分表⁵⁾では飼料中のシスチン及びメチオニン測定法として，過ギ酸処理後，臭化水素酸溶液を添加することで，未反応の過ギ酸を分解し過剰な酸化を防ぐ方法（以下「臭化水素酸添加法」という．）が記載されている．

そこで今回，飼料添加物としてメチオニンを含む豚用配合飼料について，同時分析法，過ギ酸酸化処理法及び臭化水素酸添加法でメチオニンを測定し，測定値を比較するための予備検討を行ったのでその概要を報告する．

参考にメチオニン及びメチオニンスルホンの構造式を Fig. 1 に示した．

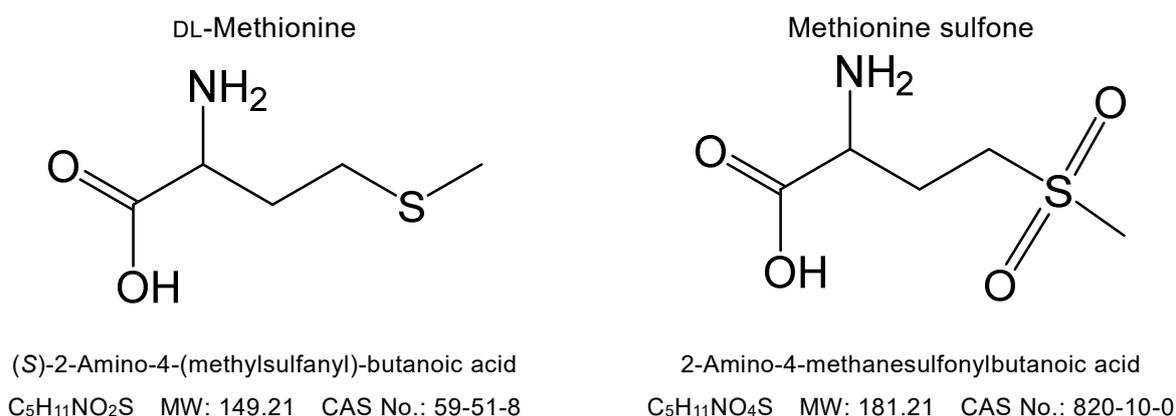


Fig. 1 Chemical structures of methionine and methionine sulfone

2 実験方法

2.1 試料

ほ乳期子豚育成用配合飼料，子豚育成用配合飼料及び肉豚肥育用配合飼料はそれぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉砕機で粉砕し，分析用試料とした．検討に用いた配合飼料の原材料については Table 1 に示した．

Table 1 Compositions of the formula feed

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For suckling pigs	Grains	58	Corn, heat-treated corn, heat-treated soybean
	Oil seed meal	18	Soybean meal, linseed meal
	Animal by-products	6	Dried whey, fish meal, skim milk, swine and poultry by-product meal
	Others	18	Confection, calcium carbonate, animal fat, calcium phosphate, salt, fructooligosaccharide, silic acid, cultured <i>paenibacillus</i> , yeast for feed, citric acid, tartaric acid, lactic acid, malic acid, sepiolite, feed additives
For growing pigs	Grains	75	Corn, wheat, rice, milo
	Oil seed meal	21	Soybean meal, rapeseed meal
	Brans	1	Wheat bran, distiller's dried grains with solubles
	Others	3	Animal fat, calcium carbonate, calcium phosphate, salt, licorice root extract, stevia, feed additives
For pork pigs	Grains	73	Milo, wheat, rice, cassava, barley, heat-treated milo
	Brans	7	Rice bran, corn gluten feed, wheat bran
	Oil seed meal	6	Soybean meal, rapeseed meal, wheat bran
	Others	14	Confection, calcium carbonate, molasses, calcium phosphate, salt, bakery yeast, feed additives

2.2 試薬

1) 水酸化ナトリウム、塩酸、ギ酸（質量分率 98 %）及び臭化水素酸は試薬特級を用いた。pH 2.2 クエン酸ナトリウム緩衝液は試料希釈用（富士フィルム和光純薬製）を用いた。過酸化水素水は Ultrapur（関東化学製、純度 30~32 %）を用いた。シリコン油は SRX 310（東レ・ダウコーニング製）を用いた。水は Milli-Q Integral 5（Merck Millipore 製）により精製した超純水（JIS K 0211 の 5218 に定義された超純水）を用いた。

2) 標準液

i 同時分析法

L-メチオニン標準品（富士フィルム和光純薬製、純度 99.0 %）30 mg を量って 100 mL の全量フラスコに入れ、pH 2.2 クエン酸ナトリウム緩衝液を加えて溶かし、更に標線まで pH 2.2 クエン酸ナトリウム緩衝液を加えてメチオニン標準原液を調製した（この液 1 mL は、メチオニンとして 0.3 mg を含有）。

使用に際して、メチオニン標準原液 1 mL 及び 2 mL をそれぞれ 25 mL の全量フラスコに正確に入れ、標線まで pH 2.2 クエン酸ナトリウム緩衝液を加えて、1 mL 中にメチオニンとして 12 µg 及び 24 µg を含有するメチオニン標準液 1 及び 2 を調製した。

ii 過ギ酸酸化処理法及び臭化水素酸添加法

L-メチオニン標準品 30 mg を量って 100 mL の全量フラスコに入れ、1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加えて溶かし、更に標線まで 1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加えてメチオニンスルホン用標準原液を調製した（この液 1 mL は、メチオニンとして 0.3 mg を含有）。

使用に際して、メチオニンスルホン用標準原液 1 mL 及び 2 mL をそれぞれ 50 mL なす形フラスコに正確に入れ、以降は 2.4 の 2)と同様の操作を行い、1 mL 中にメチオニンとして 12 µg 及び 24 µg を含有するメチオニンスルホン標準液 1 及び 2 を調製した。

3) 過酸化水素水・ギ酸溶液

過酸化水素水 50 mL にギ酸 450 mL を加えた後，1 時間静置して調製した。

4) 溶離液及び反応液

アミノ酸自動分析装置で使用する溶離液は Amino Buffer Na-LG 1st, 2nd, 3rd 及び 4th (日本分光製，以下「1st」，「2nd」，「3rd」及び「4th」とする。) を使用した。反応液は Amino Reagent Na-LG (Hypo Reagent) (日本分光製) 並びに Amino Reagent Na-LG (OPA Reagent) (日本分光製) 1000 mL に，エタノール (日本分光製，純度 99.5 %) 10 mL で溶かしたオルトフタルアルデヒド (日本分光製，純度 99.0 %) 500 mg を加えて調製した OPA 反応液を使用した。溶離液の組成については Table 2 に，反応液の組成については Table 3 に示した。

Table 2 Compositions of the mobile phase

Mobile phase name	Manufacturer	Substance name	Proportion (%)
Amino Buffer Na-LG 1st	JASCO Corporation	Ultrapure water	< 80
		Ethanol	15
		Citric acid monohydrate	< 5
		Trisodium citrate dihydrate	< 1
		Sodium perchlorate dihydrate	< 1
Amino Buffer Na-LG 2nd	JASCO Corporation	Ultrapure water	< 90
		Citric acid monohydrate	< 5
		Trisodium citrate dihydrate	< 1
		Sodium perchlorate dihydrate	< 1
Amino Buffer Na-LG 3rd	JASCO Corporation	Ultrapure water	< 95
		Citric acid monohydrate	< 1
		Trisodium citrate dihydrate	< 1
		Sodium perchlorate dihydrate	< 1
Amino Buffer Na-LG 4th	JASCO Corporation	Ultrapure water	> 98
		Sodium hydroxide	< 1

Table 3 Compositions of the reagent

Reagent name	Manufacturer	Substance name	Proportion (%)
Amino Reagent Na-LG (HYPO Reagent)	JASCO Corporation	Ultrapure water	> 95
		Boric acid	< 2
		Sodium hydroxide	< 1
		sodium hypochlorite	< 0.1
Amino Reagent Na-LG (OPA Reagent)	JASCO Corporation	Ultrapure water	> 95
		Boric acid	< 2
		Sodium hydroxide	< 1
		Brij-35, 30 % Solution	< 0.5
		3-mercaptopropionic acid	< 0.5

2.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機：ZM 200 Retsch 製（目開き 1 mm スクリーン，使用時回転数 14000 rpm）
- 2) アミノ酸自動分析装置：EXTREMA 日本分光製

2.4 定量方法

1) 同時分析法

i 加水分解

各分析試料を粗たん白質として 10 mg 相当量（ほ乳期子豚育成用配合飼料 57 mg，子豚育成用配合飼料 66 mg，肉豚肥育用配合飼料 83 mg）を量って加水分解管に入れ，6 mol/L 塩酸を 5 mL 加え，冷却しながら十分に脱気し，窒素ガスを充填した．加水分解管を密栓してヒートブロックに入れ，110 °C で 20 時間加熱して分解した後放冷した．

分解液を水で 50 mL のなす形フラスコに移し，50 °C の水浴で減圧濃縮し，水 10 mL を加え，同様に減圧濃縮して塩酸を揮散させた．この液を pH 2.2 クエン酸ナトリウム緩衝液で 25 mL の全量フラスコに移し，更に標線まで pH 2.2 クエン酸ナトリウム緩衝液を加え，ろ紙（5 種 A）でろ過し，アミノ酸自動分析装置に供する試料溶液とした．

ii アミノ酸自動分析装置による測定

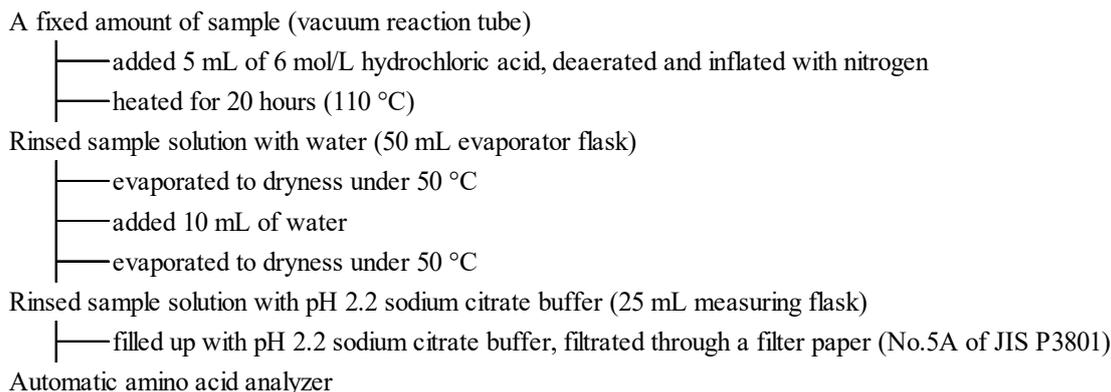
試料溶液，メチオニン標準液 1 及び 2 各 10 μ L をアミノ酸自動分析装置に注入し，クロマトグラムを得た．測定条件を Table 4 に示した．

Table 4 Operation conditions of automatic amino acid analyzer

Detector	Fluorescent detector (excitation wavelength: 345 nm, fluorescent wavelength: 455 nm)
Separation column	AApak Na-LG (6.0 mm i.d. \times 50 mm, 4 μ m), JASCO
Ammonia removal column	AECpak Na-LG (4.6 mm i.d. \times 35 mm), JASCO
Mobile phase	1st (hold for 1.5 min) \rightarrow 0.5 min \rightarrow 1st-2nd-3rd (44+5+1) \rightarrow 1 min \rightarrow 2nd-3rd (24+1) \rightarrow 4 min \rightarrow 2nd-3rd (22+3) \rightarrow 8 min \rightarrow 2nd-3rd (41+9) \rightarrow 10 min \rightarrow 2nd-3rd (1+1) \rightarrow 5 min \rightarrow 2nd-3rd (1+4) \rightarrow 5 min \rightarrow 3rd (hold for 5 min) \rightarrow 0.1 min \rightarrow 4th (hold for 0.9 min) \rightarrow 0.5 min \rightarrow 1st (hold for 18.5 min)
Flow rate	Mobile phase: 0.5 mL/min, Reagent: 0.5 mL
Column temperature	60 °C

iii 計算

得られたクロマトグラムからピーク高さを求め，試料中のメチオニン量を算出した．なお，定量法の概要を Scheme 1 に示した．



Scheme 1 Analytical procedure for methionine assay in feed
(simultaneous analysis method)

2) 過ギ酸酸化処理法

i 過ギ酸酸化

各分析試料を粗たん白質として 10 mg 相当量（ほ乳期子豚育成用配合飼料 57 mg，子豚育成用配合飼料 66 mg，肉豚肥育用配合飼料 83 mg）となるように量って 50 mL のなす形フラスコに入れ，過酸化水素水—ギ酸溶液（1+9）10 mL を加えて密栓し，冷所（0~4 °C）に一夜静置した．これに消泡剤としてシリコン油 1~2 滴を加え，ほとんど乾固するまで 50 °C の水浴で減圧濃縮した後放冷した．

ii 加水分解

先のなす形フラスコに 6 mol/L 塩酸 25 mL を加え，冷却管を付けた栓をし，135 °C のシリコン油浴中で 20 時間加熱して分解した後放冷した．分解液を 50 °C の水浴で減圧濃縮し，水 10 mL を加え，同様に減圧濃縮して塩酸を揮散させた．この液を pH 2.2 クエン酸ナトリウム緩衝液で 25 mL の全量フラスコに移し，更に標線まで pH 2.2 クエン酸ナトリウム緩衝液を加え，ろ紙（5 種 A）でろ過し，アミノ酸自動分析装置に供する試料溶液とした．

iii アミノ酸自動分析装置による測定

試料溶液，メチオニンスルホン標準液 1 及び 2 各 10 µL をアミノ酸自動分析装置に注入し，クロマトグラムを得た．測定条件は 2.4 の 1) の ii のとおり．

iv 計 算

得られたクロマトグラムからピーク高さを求め，メチオニンスルホン標準液のピーク高さを基準に試料中のメチオニン量を算出した．

3) 臭化水素酸添加法

各分析試料を粗たん白質として 10 mg 相当量（ほ乳期子豚育成用配合飼料 57 mg，子豚育成用配合飼料 66 mg，肉豚肥育用配合飼料 83 mg）を量って 50 mL のなす形フラスコに入れ，過酸化水素水—ギ酸溶液（1+9）10 mL を加えて密栓し，冷所（0~4 °C）に一夜静置した．その後臭化水素酸溶液 1.6 mL を加え，30 分間氷上で静置した．これに消泡剤としてシリコン油 1~2 滴を加え，ほとんど乾固するまで 50 °C の水浴で減圧濃縮した後放冷した．以下，2.4 の 2) の ii から iv に従った．

なお，定量法の概要を Scheme 2 に示した．

- A fixed amount of sample (50 mL evaporator flask)
- added 10 mL of hydrogen peroxide-formic acid (1:9), plugged evaporator flask
 - left overnight (0~4 °C)
 - added 1.6 mL hydrobromic acid, left in ice bath for 30 min (only hydrobromic acid addition method)
 - added a few drops of silicone oil, evaporated to dryness under 50 °C
 - added 25 mL of 6 mol/L hydrochloric acid, plugged evaporator flask with cooling tube
 - heated for 20 hours in oil bath (135 °C)
 - evaporated to dryness under 50 °C
 - added 10 mL of water
 - evaporated to dryness under 50 °C
- Rinsed sample solution with pH 2.2 sodium citrate buffer (25 mL measuring flask)
- filled up with pH 2.2 sodium citrate buffer, filtered through a filter paper (No.5A of JIS P3801)
- Automatic amino acid analyzer

Scheme 2 Analytical procedure for methionine assay in feed
(performic acid oxidation method and hydrobromic acid addition method)

3 結果及び考察

3.1 配合飼料中のアミノ酸分析についての実態調査結果

アミノ酸分析を行っている飼料関係業者等を対象に実態調査を行った。その結果、飼料関係業者 14 試験室及び登録検定機関 2 試験室の計 16 試験室から、配合飼料中のアミノ酸の分析（もしくは委託による品質管理）を行っているという回答があった。当該 16 試験室に対して試料の前処理の方法を確認したところ、11 試験室がリジン及びトレオニンについては塩酸加水分解のみを行い、シスチン及びメチオニンについては過ギ酸酸化後に塩酸加水分解を行っていた。また、測定機器についてはアミノ酸自動分析装置を使用する試験室が 12 試験室であった。以上の結果から、飼料関係業者の間では配合飼料中のメチオニンを過ギ酸処理によりメチオニンスルホンに酸化した後、塩酸加水分解を行い、アミノ酸自動分析装置で測定する方法が一般的に用いられていることが判明した。

3.2 各分析法による測定値

2.4 に従って、各配合飼料について同時分析法によりメチオニン、過ギ酸酸化処理法と臭化水素酸添加法によりメチオニンスルホンを測定したところ、Fig. 2 及び Fig. 3 に示したクロマトグラムが得られ、ピークの高さからメチオニン量を算出したところ、Table 5 の結果が得られた。メチオニンスルホンのピークについては、妨害ピークと重なっており、分離度は 0.8 程度であったため、定量が困難であった。そこでピークが正規分布していると仮定し、推定される妨害ピークの割合を求めたところ、7~10 %程度の割合で重なっていた。なお、分離度は以下の式により算出した。

$$R = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{(W_1 + W_2)/2} = \frac{1.18(t_{R2} - t_{R1})}{W_{1/2, 1} + W_{1/2, 2}}$$

t_{R1} : 前のピークの保持時間

t_{R2} : 後ろのピークの保持時間

W_1 : 前のピークのピーク幅

W_2 : 後ろのピークのピーク幅

$W_{1/2,1}$: 前のピークの半値幅 $W_{1/2,2}$: 後ろのピークの半値幅

重なっているピークの高さを差し引いても，同時分析法と比較して過ギ酸酸化処理法の方がメチオニンの測定値が 1.4~1.7 倍程度高かった．一方，今回の結果において過ギ酸処理後の臭化水素酸の添加によりメチオニンの測定値が増加する傾向は特に確認できなかった．

Table 5 Measurement result of methionine

Formula feed types	Methionine (%)		
	Simultaneous analysis method	Performic acid oxidation method	Hydrobromic acid addition method
For suckling pigs	-	0.512	0.529
For growing pigs	0.203	0.325	0.308
For pork pigs	0.188	0.352	0.323

$n = 1$

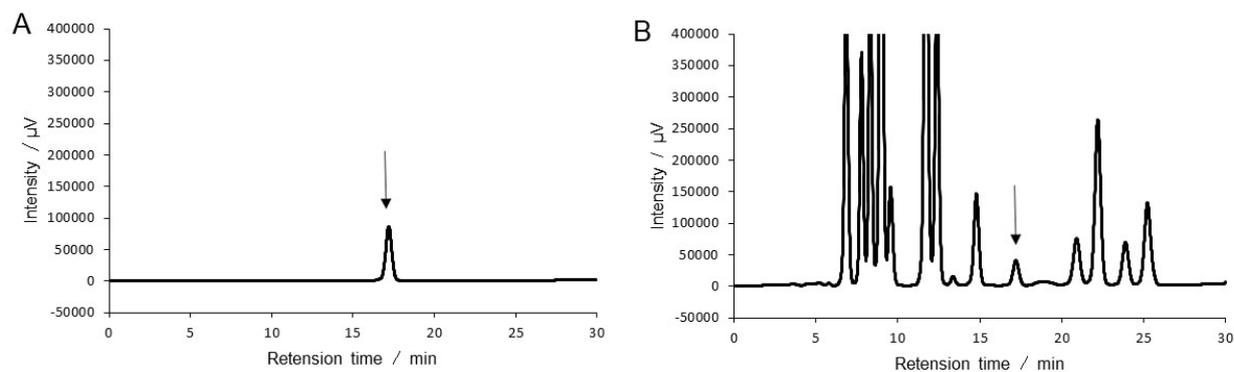


Fig. 2 Typical chromatograms of methionine in standard and sample solution (Operating conditions of automatic amino acid analyzer are shown in Table 4. Arrows indicate the peaks of methionine.)

A: Standard solution 1 (12 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 120 ng as methionine)

B: Sample solution of formula feed for growing pigs (Simultaneous analysis method)

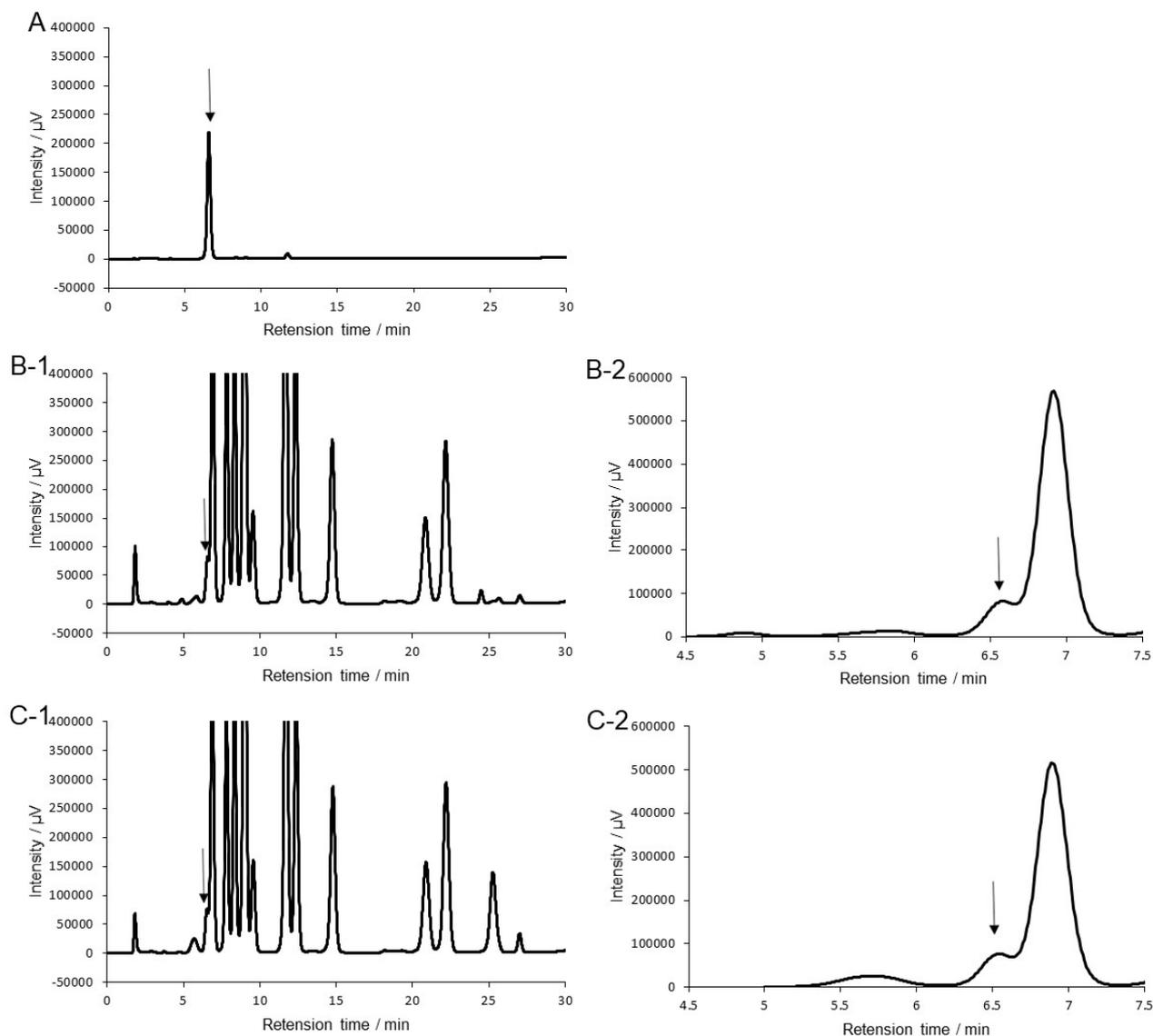


Fig. 3 Typical chromatograms of methionine sulfone in standard and sample solution (Operating conditions of automatic amino acid analyzer are shown in Table 4. Arrows indicate the peaks of methionine sulfone.)

A: Standard solution 2 (24 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 240 ng as methionine)

B-1, 2: Sample solution of formula feed for growing pigs (performic acid oxidation method, B-2 is an enlarged view of a portion of B-1 along the horizontal axis.)

C-1, 2: Sample solution of formula feed for growing pigs (hydrobromic acid addition method, C-2 is an enlarged view of a portion of C-1 along the horizontal axis.)

4 まとめ

豚用配合飼料中のメチオニン分析として、飼料関係業者等の間で一般的に用いられている過ギ酸処理によりメチオニンスルホンに酸化した後、塩酸加水分解を行う分析法について予備検討を行った。その結果、メチオニンスルホンのピークが妨害ピークと重なったものの、妨害ピークを差し引いても豚用配合飼料の種類や含有メチオニン量に関わらず、飼料分析基準収載の同時分析法と比較しメチオニン測定値が増加する傾向が確認され、当該方法により低回収率の改善が期待された。一

方，過ギ酸酸化後の臭化水素酸添加については，メチオニン測定値が増加する傾向は確認できず，臭化水素酸の添加による更なる回収率の増加は期待できないという結果となった。

文 献

- 1) 独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構：日本飼養標準 豚 (2013).
- 2) 農林省令：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令，昭和 51 年 7 月 24 日，農林省令第 35 号 (1976).
- 3) みどりの食料システム戦略：<https://www.maff.go.jp/j/kanbo/kankyo/seisaku/midori/attach/pdf/index-10.pdf>
- 4) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 5) 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構：日本標準飼料成分表 (2009 年版) (2009).