

3 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同時分析法の検討

船木 紀夫^{*}，野村 哲也^{*}，仲谷 琢実^{*}

Study of Simultaneous Determination Method of Cystine, Lysine, Methionine and Threonine by Amino Acid Analysis System

FUNAKI Norio^{*}, NOMURA Tetsuya^{*} and NAKATANI Takumi^{*}

(* Kobe Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center)

We have studied a simultaneous quantitative determination method of the concentration of amino acids (cystine, lysine, methionine and threonine) in formula feed for pigs using an amino acid analysis system.

Cystine and methionine in a sample were oxidized to cysteic acid and methionine sulfone, respectively, with performic acid solution. The Amino acids were then hydrolyzed with hydrochloric acid. Then, the hydrolyzed solution was dried under reduced pressure, and dissolved in prepared eluent. The amino acids in the sample solution were quantified using an automated analysis system with post-column fluorescence detection. The columns used for separation and ammonia removal were Shim-pack Amino-Na (6.0 mm i.d. × 100 mm, 5 μm, Shimadzu Co. Inc.; Kyoto, Japan) and Shim-pack ISC-30/S0504Na (4.0 mm i.d. × 50 mm, Shimadzu Co. Inc.). The solutions used for mobile phase were AA-MC (Amino Acid Mobile Phase Kits (Na type), Shimadzu Co. Inc.) and prepared solution containing trisodium citrate, ethanol and perchloric acid. The solution used for post-column reaction was AA-RB (Amino Acid Reagent Kits, OPA Reagent, Shimadzu Co. Inc.).

In this study, a discrepancy between the retention times of the standard solution and the sample solution was observed. The reason for this was thought to be the presence of residual formic acid in the final sample solution. This residual formic acid might have resulted from omitting the drying step of the sample solution after hydrolysis during the study. Therefore, the hydrolyzed sample solution was dried, and then dissolved in the eluent that corresponded to the initial conditions of the gradient, and the measurement was performed. Consequently, the retention times were consistent, and we were able to quantify cystine and methionine. However, the lower limit of quantification did not reach the target level, and further studied were considered necessary.

Key words: amino acid; cystine; cysteic acid; lysine; methionine; methionine sulfone; threonine; amino acid analysis system; formula feed for pigs.

キーワード：アミノ酸；シスチン；システイン酸；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，地球温暖化ガスや悪臭の発生，湖沼等の富栄養化などの畜産環境問題の原因として問題となっている．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⁾．この知見に基づき，飼料の公定規

^{*} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

格²⁾には環境負荷低減型配合飼料（子豚育成用及び肉豚肥育用）の規格が設けられ、アミノ酸（シスチン、リジン、メチオニン及びトレオニン）の最小量が規定された³⁾。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⁴⁾、環境負荷低減型配合飼料の普及が期待されている。

現在、飼料中のシスチン、リジン、メチオニン及びトレオニンの分析法については、イオン交換樹脂カラム、ニンヒドリン試薬及び可視光検出器を用いる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。）が飼料分析基準⁵⁾に収載されている。同時分析法では、メチオニンが低回収であり、環境負荷低減型配合飼料普及のためには新たな分析法の開発が必要である。

令和4年度から5年度にかけて土井ら^{6),7)}は、過ギ酸処理を行うことにより、同時分析法に比べてメチオニンの定量値が増加し、またシスチン、リジン及びトレオニンとの同時定量が可能であることを確認した。しかし、メチオニン由来のピークについて、近傍のピークとの分離が不十分であった。今年度はアミノ酸自動分析装置のメーカー変更に伴い、メチオニンの前処理方法及び測定方法を見直し、その方法についてシスチン、リジン及びトレオニンの同時定量が可能かどうかについて検討したので、その概要を報告する。

参考にシスチン、システイン酸（シスチンの過ギ酸処理生成物）、リジン、メチオニン、メチオニンスルホン（メチオニンの過ギ酸処理生成物）及びトレオニンの構造式等を Fig. 1 に示した。

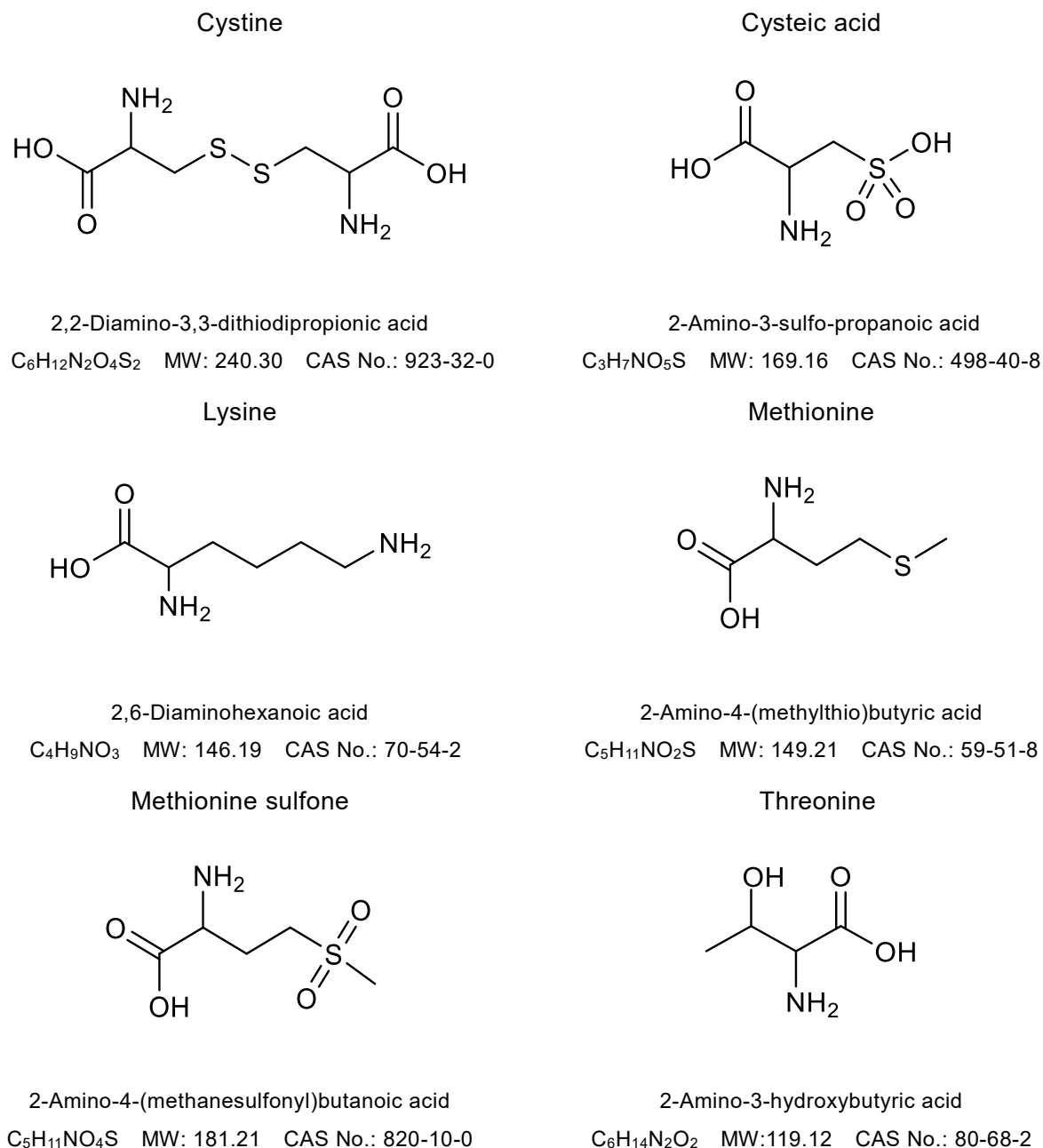


Fig. 1 Chemical structures of cysteine, cysteic acid, lysine, methionine, methionine sulfone and threonine

2 実験方法

2.1 試料

配合飼料はそれぞれ目開き 0.5 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。

なお，検討に用いた配合飼料の配合割合を Table 1 に示した。

Table 1 Compositions of the formula feed

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For piglets	Grains	74	Corn, rice
	Oil seed meal	20	Rapeseed meal, soybean meal, corn germ meal
	Others	6	Confection, calcium carbonate, animal fat, salt, calcium phosphate, vegetable oil, feed additives
For fattening pigs	Grains	72	Corn, milo, wheat
	Oil seed meal	21	Rapeseed meal, soybean meal, corn germ meal
	Chaff and bran	4	Corn gluten feed, distiller's dried grains with solubles
	Others	3	Animal fat, calcium carbonate, salt, confection, vegetable oil, silicic acid, calcium phosphate, molasses, feed additives

2.2 試 薬

- 1) 水酸化ナトリウム、過酸化水素水及びエタノール（99.5）は試薬特級を用いた。ギ酸は試薬特級（質量分率 98 %）を用いた。二亜硫酸ナトリウムは和光特級（富士フイルム和光純薬製）を用いた。塩酸（質量分率 35 %）及び過塩素酸（質量分率 60 %）は精密分析用（富士フイルム和光純薬製）を用いた。フェノール及びクエン酸三ナトリウム二水和物はアミノ酸自動分析用（富士フイルム和光純薬製）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) 各アミノ酸標準品
 アスパラギン酸、シスチン、システイン酸、リジン、メチオニン、メチオニンスルホン及びトレオニンの各標準品は、Table 2 に示した供給業者、純度のものを用いた。

Table 2 Amino acid standards used in the present study

Amino acids	Manufacturer	Purity (%)
L-Aspartic acid	FUJIFILM Wako Pure Chemical	99.0
L-Cystine	FUJIFILM Wako Pure Chemical	99.4
L-Cysteic acid	FUJIFILM Wako Pure Chemical	99.8
L-Lysine monohydrochloride	FUJIFILM Wako Pure Chemical	99.8
L-Methionine	FUJIFILM Wako Pure Chemical	100.0
L-Methionine sulfone	Thermo Fisher Scientific	99.0
L-Threonine	FUJIFILM Wako Pure Chemical	99.9

3) アミノ酸標準原液

L-アスパラギン酸、L-システイン酸、L-メチオニン、L-メチオニンスルホン及び L-トレオニン標準品各 50 mg 並びに L-リシン塩酸塩標準品 62.5 mg を量ってそれぞれ 5 mL の全量フラスコに入れ、6)で調製した溶離液（以下「調製 A 液」という。）を加えて超音波処理して溶かし、更に標線まで調製 A 液を加えてアスパラギン酸、システイン酸、リジン、メチオニン、メチオニンスルホン及びトレオニン標準原液を調製した（これらの液各 1 mL は、各アミノ酸として 10 mg を含有）。

また、L-シスチン標準品 50 mg を量って 5 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シスチン標準原液を調製した（この液 1 mL は，シスチンとして 10 mg を含有）．

4) アスパラギン酸標準液

使用に際して，アスパラギン酸標準原液を調製 A 液で正確に希釈し，1 mL 中に各アミノ酸として 0.5 μ g を含有するアスパラギン酸標準液を調製した．

5) アミノ酸混合標準液

システイン酸，リジン，メチオニンスルホン及びトレオニンの標準原液各 1 mL を 100 mL の全量フラスコに正確に入れて混合し，更に標線まで調製 A 液を加えてアミノ酸混合標準原液を調製した（この液 1 mL は，各アミノ酸として 100 μ g を含有）．

使用に際して，アミノ酸混合標準原液を調製 A 液で正確に希釈し，1 mL 中に各アミノ酸として 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 及び 10 μ g を含有するアミノ酸混合標準液（以下「標準液」という．）を調製した．

6) 過酸化水素水ーギ酸溶液

過酸化水素水 10 mL にギ酸 90 mL を加え，密栓して 30 分間静置した後，30 分間冷所（0~4 $^{\circ}$ C）に静置して調製した．当該溶液は使用前に調製し，冷えた状態のまま分析試料に加えた．

7) 溶離液及びポストカラムアミノ酸分析の反応液

アミノ酸自動分析装置で用いる溶離液はアミノ酸移動相キット Na 型 AA-MC（島津製作所製，以下「AA-MC」という．）及び調製 A 液を用いた．調製 A 液は，クエン酸三ナトリウム二水和物 5.0 g，60 %過塩素酸 4 mL 及びエタノール 17.5 mL を水 400 mL に溶かし，500 mL 全量フラスコに移して水で定容して調製した．反応液はアミノ酸分析キット OPA 試薬 AA-RB（OPA（オルトフタルアルデヒド）を含み，一級アミノ基と反応し蛍光を発する誘導体を生成させる反応液，島津製作所製）を用いた．溶離液の組成については Table 3 に，反応液の組成については Table 4 にそれぞれ示した．

Table 3 Compositions of the mobile phase

Mobile phase name	Substance name	Proportion (%)
AA-MC	Ultrapure water	> 99
	Sodium hydroxide	< 1
Prepared A-solution	Ultrapure water	> 91.5
	Trisodium citrate dihydrate	< 4
	Ethanol	< 3
	Perchloric acid (60 %)	< 1.5

Table 4 Compositions of the reaction reagent

Reaction reagent name	Substance name	Proportion (%)
AA-RB	AA-RA*	> 98
	Methanol	< 2
	N-Acethyl-L-cysteine	< 0.1
	o-Phthalaldehyde	< 0.1
*AA-RA	Ultrapure water	> 93
	Sodium hydroxide	< 4
	Potadium sulfoxide	< 2
	Boric acid	< 1.5

2.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機：ZM 200 Retsch 製（目開き 0.5 mm スクリーン，使用時回転数 14000 rpm）
- 2) 超音波洗浄機：W-212 本多電子製
- 3) ミニバキュームチューブ：RT-20（容量 20 mL）アズワン製
- 4) ヒートブロック：ドライブロックバス THB-2 アズワン製
- 5) 定容用チューブ：DigiTUBE® 50 mL ポリプロピレン AnalytiChem Canada 製
- 6) メンブランフィルター：Millex-LH（孔径 0.45 μm ，直径 25 mm，親水性 PTFE）Merck Millipore 製
- 7) アミノ酸自動分析装置：Nexera 島津製作所製

2.4 定量方法

1) 過ギ酸酸化

分析試料の一定量（粗たん白質として 5 mg 相当量）を 0.01 mg の桁まで量ってミニバキュームチューブに入れ，過酸化水素水ーギ酸溶液 2 mL を加えた．これを超音波処理により混合後，軽く蓋をして冷所（0~4 $^{\circ}\text{C}$ ）に一夜静置した．これに二亜硫酸ナトリウム 0.34 g を水 2.5 mL に溶解したものを氷冷しながら加え，5 分間軽く振り混ぜた．

2) 塩酸加水分解

先のミニバキュームチューブに 35 %塩酸 2.5 mL を加え，氷冷しながら水流ポンプで脱気を行った後密栓し，120 $^{\circ}\text{C}$ のヒートブロック中で 24 時間加熱して分解した後放冷した．分解液を 50 mL 定容用チューブに入れ，試料溶液が入っていたミニバキュームチューブを水 20 mL で洗浄し，洗液を先の定容用チューブに入れ，更に標線まで水を加え，ろ紙（5 種 A）でろ過した．このろ液 2 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ，50 $^{\circ}\text{C}$ の水浴で減圧濃縮後，50 $^{\circ}\text{C}$ の水浴下で窒素ガスを送って乾固した．調製 A 液 4 mL を正確に加えて残留物を溶かした後，メンブランフィルターでろ過し，アミノ酸自動分析装置による測定に供する試料溶液とした．

3) アミノ酸自動分析装置による測定

試料溶液及び各アミノ酸標準液各 2 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．測定条件を Table 5 に示した．

Table 5 Operating conditions of amino acid analysis system

Detector	Fluorescent detector (Excitation wavelength: 345 nm, fluorescent wavelength: 455 nm)
Separation column	Shim-pack Amino-Na (6.0 mm i.d. × 100 mm, 5 μm), Shimadzu
Ammonia removal column	Shim-pack ISC-30/S0504Na (4.0 mm i.d. × 50 mm), Shimadzu
Mobile phase	Prepared A-solution → (hold for 5 min) → AA-MC → (hold for 7 min) → prepared A-solution → (hold for 10 min)
Flow rate	Mobile phase: 0.6 mL/min, reagent: 0.2 mL/min
Column temperature	60 °C

4) 計 算

得られたクロマトグラムからピーク面積を求めて検量線を作成し，試料中の各アミノ酸量を算出した．本法では，シスチン及びメチオニンはそれぞれ操作中にシステイン酸及びメチオニンスルホンに変換されるためシステイン酸及びメチオニンスルホンとして定量し，それぞれ 0.7103, 0.8234 を乗じてシスチン及びメチオニン量に換算した．

なお，定量法の概要を Scheme 1 に示した．

Sample (Equivalent to 5 mg of crude protein, 20 mL hydrolysis tube)

- added 2 mL of hydrogen peroxide-formic acid (1:9), plugged 20 mL hydrolysis tube
- stirred by using ultrasonic generator and left overnight (0~4 °C) in refrigerator
- while cooling on ice, added 0.34 g of sodium disulfite dissolved in 2.5 mL of water, and stirred for 5 min
- added 2.5 mL of 35 % hydrochloric acid, while cooling on ice and degassing by water flow pump, and plugged air-tightly
- heated for 24 hours in drying incubator (120 °C)

50 mL volumetric tube

- transferred sample solution to 50 mL volumetric tube after cooling
- washed the 20 mL hydrolysis tube with 20 mL of water and transferred the solution to 50 mL volumetric tube
- filled up with water
- filtrated through a filter paper (No.5A of JIS P 3801)

50 mL evaporator flask

- transferred 2 mL of sample solution to 50 mL evaporator flask
- evaporated to dryness under 50 °C
- dried using nitrogen gas in water bath (50 °C)
- dissolved in 4 mL of prepared A-solution (mobile phase with initial conditions)
- filtrated through a membrane filter (PTFE 0.45 μm)

Amino acid analysis system

Scheme 1 Analytical procedure for amino acid analysis system

3 結果及び考察

3.1 分析法の変更点

土井ら^{6,7)}が検討した方法から以下の点を変更した．

- 1) 土井らの検討とアミノ酸自動分析装置のメーカーが異なることから，測定条件を検討し，Table 5 に示した測定条件とした．当該条件で標準液を測定した結果は Fig. 2 のとおりであり，

リジンを妨害ピークと分離することができなかったため、この後の検討ではリジンを除外することとし、土井らの検討では近傍のピークと十分に分離できなかったメチオニンについて良好な分離を得ることを目指す方向で検討した。

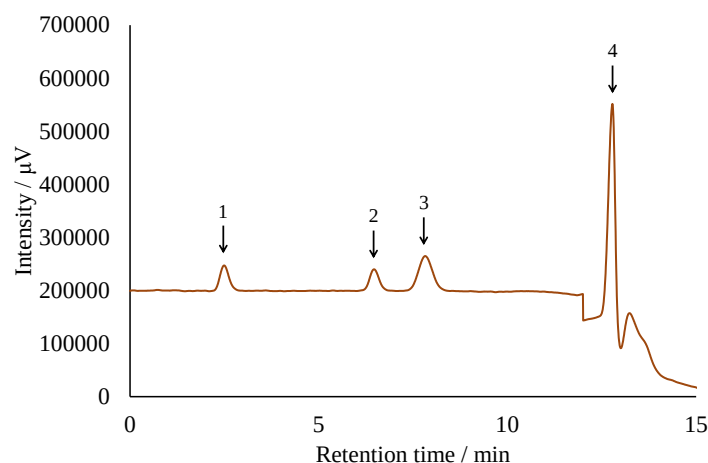


Fig. 2 Typical chromatogram of amino acids in standard solutions

(Conditions of amino acid analysis system are shown in Table 5. Arrows indicate the peak of 1: cysteic acid, 2: methionine sulfone, 3: threonine and 4: lysine and so forth.)

- 2) 飼料関係業者の要望を受け、前処理の容器を 200 mL のなす形フラスコから 20 mL のミニバキュームチューブに変更し、併せて試料採取量及び塩酸量を変更した。
- 3) 過ギ酸酸化後に添加されていた二亜硫酸ナトリウムについて、粉末の場合は突沸の危険があったことから、水に溶解したものを添加することとした。
- 4) 塩酸に添加されていたフェノールはチロシンの分析時に必要なものであり、本法では添加しないこととした。
- 5) 加水分解後の乾固に多くの時間を要したことから、今年度の検討では当初、乾固させずに検討を進めた。
- 6) アミノ酸自動分析装置への注入量は 10 μ L であったが、2 μ L まで減らすことでメチオニンスルホンのピークと、試料由来のアスパラギン酸と考えられた妨害ピークを分離できたことから、本法では 2 μ L とした。なお、当該妨害ピークについて、念のためアスパラギン酸標準液を用いて定性確認を行った。その結果、Fig. 3 のとおりメチオニンスルホンの前に分離されたピークは、アスパラギン酸標準液のピークと保持時間が同じであったため、アスパラギン酸であると考えられた。

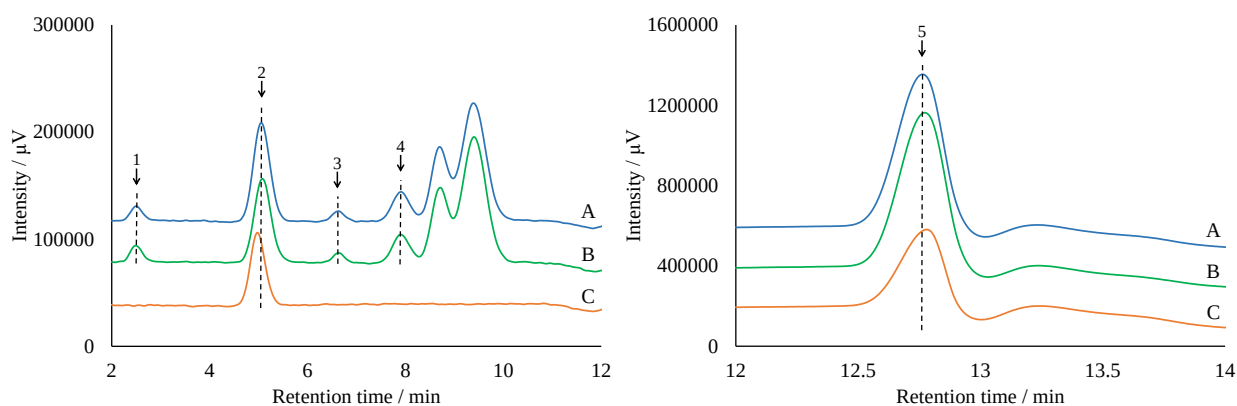


Fig. 3 Typical chromatograms of amino acid in samples and standard solution of aspartic acid (Conditions of automated amino acid analysis system are shown in Table 5. Arrows indicate the peak of 1: cysteic acid, 2: aspartic acid, 3: methionine sulfone, 4: threonine and 5: lysine and so forth. The baselines are shifted for display.)

A: Sample solution of formula feed of piglets

B: Sample solution of formula feed of fattening pigs

C: Standard solution of aspartic acid (0.5 $\mu\text{g/mL}$)

3.2 保持時間に影響を及ぼす物質の検討

3.1 を変更した上で分析を行ったところ、標準液と試料溶液の保持時間が一致しない現象が見られた。そこで、標準液の希釈溶媒及び最終試料溶液の溶媒を、クエン酸緩衝液から調製 A 液に変更したが改善されなかった。更に検討したところ、pH の影響ではなく、最終試料溶液へのギ酸の残留の影響が疑われた。土井らの検討^{6), 7)}では加水分解後に乾固していたが、3.1 の 4) のとおり乾固を省略したことがその原因と考えられた。

そこで、加水分解後の試料溶液を乾固させてから調製 A 液で溶解したところ、Fig. 4 のとおり、標準液と試料溶液の保持時間が一致した。トレオニンについては、同様に保持時間は一致したものの、試料由来のピークと分離できなかったため、定量はできなかった。

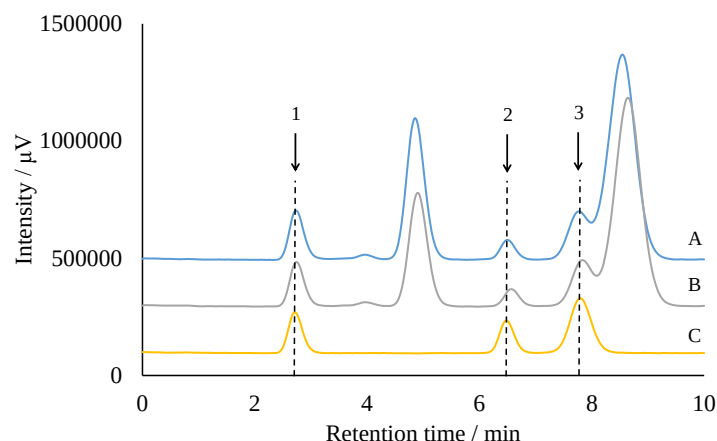


Fig. 4 Chromatograms of standard solution and sample solutions prepared by drying formic acid with nitrogen
(Conditions of automated amino acid analyzer are shown in Table 5. Arrows indicate the peak of 1: cysteic acid, 2: methionine sulfone and 3: threonine. The baselines are shifted for display.)
A: Sample solution of formula feed of growing pigs
B: Sample solution of formula feed of pork pigs
C: Standard solution (2 $\mu\text{g/mL}$)

3.4 定量下限の検討

2.4 により調製した子豚育成用配合飼料 1 点及び肉豚肥育用配合飼料 1 点の試料溶液を測定して得られたクロマトグラムから、メチオニンスルホンのピークの SN 比が 10 となる濃度（定量下限）を算出し、飼料中のメチオニン含有率に換算したところ、それぞれ 0.14 % 及び 0.10 % であった。環境負荷低減型配合飼料の公定規格は、メチオニンについて、子豚育成用配合飼料で 0.22 %、肉豚肥育用配合飼料で 0.17 % であり、飼料分析基準別紙 2 の試験法の妥当性確認ガイドラインに定められた目標値（基準値 0.1 mg/kg 以上：1/5 以下）は子豚育成用配合飼料で 0.044 % 以下、肉豚肥育用配合飼料で 0.034 % 以下であることから、本法はそれを満たさない結果であり、更なる分析法の検討が必要であると考えられた。

4 まとめ

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について、アミノ酸自動分析装置を用いた同時定量法の飼料分析基準への収載の可否について検討したところ、以下の結果が得られた。

- 1) 土井らが検討した方法から、前処理容器、試料採取量、塩酸の添加量、フェノールの使用の有無、二亜硫酸ナトリウムの添加方法、加水分解後の試料溶液の乾固の有無及び測定条件を変更したところ、標準液と試料溶液の保持時間が一致しない現象がみられた。その原因として、試料溶液の乾固をしなかったことによるギ酸残留の影響が疑われたため、加水分解後の試料溶液を乾固してから調製 A 液で溶解して測定したことで、各々の保持時間が一致し、メチオニンの定量が可能となった。

- 2) 今回検討した測定方法では，対象 4 成分のうちシスチン及びメチオニンの定量が可能であった．
- 3) メチオニンの定量下限は，子豚育成用配合飼料で 0.14 % 及び肉豚育成用配合飼料で 0.10 % となり，妥当性確認ガイドラインに定められた目標値を満たさなかったことから，更なる分析法の検討が必要であると考えられた．

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) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律施行規則の一部を改正する省令等の施行について，平成 25 年 6 月 20 日，25 消安第 1583 号 (2013).
- 4) 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>, cited 8 May 2025.
- 5) 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，令和 5 年 12 月 1 日，5 消安第 4714 号 (2023).
- 6) 土井 雄悟，山上 陽平：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，飼料研究報告，48，40-49 (2023).
- 7) 土井 雄悟，山上 陽平，塩津 萌々子：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液体クロマトグラフによる同時分析法の開発，飼料研究報告，49，14-27 (2024).