

## 2 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

土井 雄悟<sup>\*1</sup>, 山上 陽平<sup>\*2,3</sup>, 塩津 萌々子<sup>\*2</sup>

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

DOI Yugo<sup>\*1</sup>, YAMAGAMI Yohei<sup>\*2,3</sup> and SHIOTU Momoko<sup>\*2</sup>

(\*1 Fertilizer and Feed Inspection Department, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC)  
(Now Sendai Regional Center, FAMIC),

<sup>\*2</sup> Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC,

<sup>\*3</sup> Institute of Food Research, National Agriculture and Food Research Organization)

We have developed a simultaneous quantitative determination method of the concentration of amino acids (cystine, lysine, methionine and threonine) in formula feed for pig using an automatic amino acid analyzer.

Amino acids in a sample were oxidized with a performic acid solution, and 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, amino acids in the sample solution was determined using an automatic amino acid analyzer. Amino acids separation was carried out on an AApak Na-LG separation column (6.0 mm i.d. × 50 mm, 4 μm, JASCO Co. Inc.; Tokyo, Japan) and an AECpak Na-LG ammonia removal column (4.6 mm i.d. × 35 mm, JASCO Co. Inc.) with a gradient of Amino Buffer Na-LG 1st, 2nd, 3rd and 4th. The amino acids were then colored by post-column reaction with Amino Reagent Na-LG (Hypo Reagent and OPA Reagent) (JASCO Co. Inc.).

Recovery tests were conducted on formula feed for piglets and fattening pigs. Formula feed for piglets was added with 0.448 % of cystine, 1.57 % of lysine, 0.448 % of methionine and 1.12 % of threonine. The resulting mean recoveries were 90.2 % for cystine, 105 % for lysine, 83.7 % for methionine and 102 % for threonine. The repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD<sub>r</sub>) was less than 1.2 % for cystine, less than 1.4 % for lysine, less than 1.0 % for methionine and less than 1.7 % for threonine. Formula feed for fattening pigs was added with 0.336 % of cystine, 1.12 % of lysine, 0.336 % of methionine and 0.672 % of threonine. The resulting mean recoveries were 98.9 % for cystine, 78.8 % for lysine, 105 % for methionine and 92.1 % for threonine. RSD<sub>r</sub> was less than 1.7 % for cystine, less than 1.9 % for lysine, less than 2.1 % for methionine and less than 1.5 % for threonine.

Key words: amino acid; cystine; lysine; methionine; cysteic acid; 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；システイン酸；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

<sup>\*1</sup> 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, 現 仙台センター

<sup>\*2</sup> 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

<sup>\*3</sup> 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構食品研究部門

## 1 緒 言

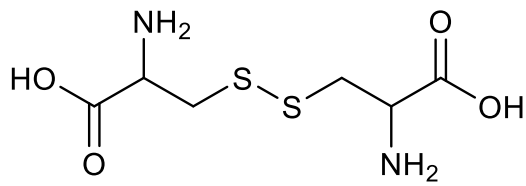
家畜排せつ物に含まれる窒素及びリンは，地球温暖化ガスや悪臭の発生，湖沼等の富栄養化などの畜産環境問題の原因として問題となっている．このうち排せつ物中の窒素については，アミノ酸バランスの適正化により低減できることが報告されている<sup>1)</sup>．これらの知見に基づき，飼料の公定規格<sup>2)</sup>には環境負荷低減型配合飼料（豚用）の規格が設けられ，アミノ酸（シスチン，リジン，メチオニン及びトレオニン）の最小量が規定されている．また，農林水産省が令和 3 年に策定した「みどりの食料システム戦略」<sup>3)</sup>に掲げている畜産分野における温室効果ガス排出量の削減に向けても，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<sup>4)</sup>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．

令和 4 年度，筆者ら<sup>5)</sup>は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について予備検討を行ったところ，同時分析法と比較しメチオニン測定量が増加する傾向が確認された．

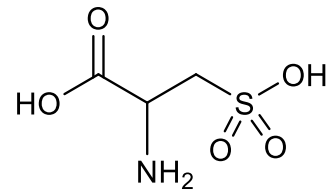
そこで今回，豚用配合飼料中のメチオニンについて，アミノ酸自動分析装置による定量法を開発し，更にシスチン（メチオニンと同様に過ギ酸処理によりシステイン酸として定量），リジン及びトレオニンの同時定量についても検討したので，その概要を報告する．

参考にシスチン，システイン酸，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構造式を Fig. 1 に示した．



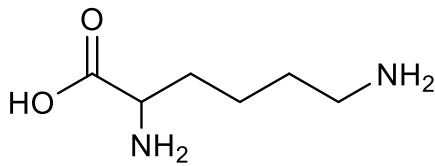
DL - Cystine

2,2-Diamino-3,3-dithiodipropionic acid

C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub> MW: 240.30 CAS No.: 923-32-0

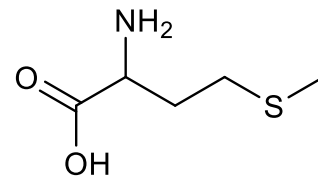
DL - Cysteic acid

2-amino-3-sulfo-propanoic acid

C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>5</sub>S MW: 169.16 CAS No.: 498-40-8

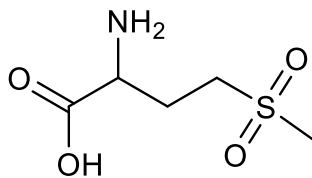
DL-Lysine

2,6-Diaminohexanoic acid

C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> MW: 146.19 CAS No.: 70-54-2

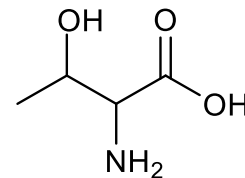
DL - Methionine

2-Amino-4-(methylthio)butyric acid

C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>S MW: 149.21 CAS No.: 59-51-8

DL - Methionine sulfone

2-Amino-4-(methanesulfonyl)butanoic acid

C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>4</sub>S MW: 181.21 CAS No.: 820-10-0

DL-Threonine

2-Amino-3-hydroxybutyric acid

C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>3</sub> MW: 119.12 CAS No.: 80-68-2

Fig. 1 Chemical structures of cystine, 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 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎し、分析用試料とした。なお、検討に用いた配合飼料を 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 piglets 1	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
For piglets 2	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 fattening pigs 1	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, corn germ meal
	Others	14	Confection, calcium carbonate, molasses, calcium phosphate, salt, bakery yeast, feed additives
For fattening pigs 2	Grains	80	Corn, rice, wheat, milo, barley
	Oil seed meal	15	Rapeseed meal, soybean meal
	Brans	2	Rice bran, corn gluten feed
	Others	3	Calcium carbonate, calcium phosphate, animal fat, salt, betaine, vegetable oil, yucca extract, quillaja extract, silicic acid anhydride, vermiculite
For fattening pigs 3	Grains	72	Corn, milo, wheat
	Oil seed meal	21	Rapeseed meal, soybean meal, corn germ meal
	Brans	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
For boar pigs	Grains	64	Corn, rice, wheat, milo
	Oil seed meal	19	Rapeseed meal, soybean meal
	Brans	12	Wheat bran, corn gluten feed, distiller's dried grains with solubles, rice bran
	Animal by-products	1	fish meal
	Others	4	Molasses, calcium carbonate, calcium phosphate, salt, lignocellulose, alfalfa meal, feed yeast, lactobacillus, dry yeast cell wall, bentonite, saccharomyces cerevisiae yeast, ascophyllumnodsum, diatomaceous earth, milk thistle extract, chicory extract, animal fat

## 2.2 試薬

- 1) 水酸化ナトリウム及び過酸化水素水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（富士フィルム和光純薬製）を用いた。20%塩酸は精密分析用（富士フィルム和光純薬製）を用いた。フェノールはアミノ酸自動分析用（富士フィルム和光純薬製）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。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

L-シスチン, L-システイン酸, L-リシンー塩酸塩, L-メチオニン, L-メチオニンスルホン及び L-トレオニンの標準品は, 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-Cystine	FUJIFILM Wako Pure Chemical	99.4
L-Cysteic acid	FUJIFILM Wako Pure Chemical	99.8
L-Lysine monohydrochloride	National Institute of Advanced Industrial Science and Technology	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-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 200 mg, L-リシンー塩酸塩標準品 250 mg を量ってそれぞれ 10 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各アミノ酸標準原液を調製した (この液 1 mL は, 各アミノ酸として 20 mg を含有)。

L-シスチン標準品 100 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 20 mg を含有)。

4) アミノ酸混合標準液

L-システイン酸, L-リシン, L-メチオニンスルホン及び L-トレオニン標準原液各 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 pH 2.2 クエン酸ナトリウム緩衝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 200 µg を含有)。

使用に際して, アミノ酸混合標準原液の一部を pH 2.2 クエン酸ナトリウム緩衝液で正確に希釈し, 1 mL 中に各アミノ酸としてそれぞれ 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5 及び 20 µg を含有するアミノ酸混合標準液を調製した。

5) 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 °C) に静置して調製した。

6) フェノール添加 6 mol/L 塩酸

20 %塩酸 350 mL にあらかじめ 60 °C の水浴で溶解したフェノール 350 µL を加え, よく混合して調製した。

7) 0.1 mol/L 塩酸

水 1180 mL に 20 %塩酸 20 mL を加え, よく混合して調製した。

8) 溶離液

Amino Buffer Na-LG 1st, 2nd, 3rd 及び 4th (日本分光製, 以下「1st」, 「2nd」, 「3rd」及び「4th」という。)を使用した。溶離液の組成については Table 3 に示した。

Table 3 Compositions of the mobile phase

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

## 9) 反応液

反応液 A として、Amino Reagent Na-LG (Hypo Reagent) (日本分光製) を、反応液 B として、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 を全量加えて調製したものを使用した。反応液に使用した試薬の組成については Table 4 に示した。

Table 4 Compositions of the reagent used in reaction solution

Reagent names	Substance names	Proportion (%)
Amino Reagent Na-LG (HYPO Reagent)	Ultrapure water	> 95
	Boric acid	< 2
	Sodium hydroxide	< 1
	Sodium hypochlorite	< 0.1
Amino Reagent Na-LG (OPA Reagent)	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) 超音波洗浄機 : US-02 エスエヌディ製

3) メンブランフィルター：Millex-LH（孔径 0.45  $\mu\text{m}$ ，直径 25mm，親水性 PTFE）Merck Millipore 製

4) アミノ酸自動分析装置：EXTREMA 日本分光製

## 2.4 定量方法

### 1) 過ギ酸酸化

分析試料の一定量（窒素として 10 mg 相当量）を量って 200 mL のなす形フラスコに入れ、過酸化水素水ーギ酸溶液 10 mL を加えて密栓し、超音波処理してよく混合後、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を 0.84 g 加え、5 分間手で振り混ぜた。

### 2) 加水分解

先のなす形フラスコにフェノール添加 6 mol/L 塩酸 50 mL を加え、冷却管を付け、115  $^{\circ}\text{C}$  のシリコン油浴中で 24 時間加熱して分解した後放冷した。分解液を 250 mL の全量フラスコに入れ、試料溶液が入っていた 200 mL のなす形フラスコを 0.1 mol/L 塩酸 30 mL で洗浄し、洗液を先の全量フラスコに入れ、更に標線まで 0.1 mol/L 塩酸を加え、ろ紙（5 種 A）でろ過した。これを正確に 2 mL 取って 50 mL のなす形フラスコに入れ、40  $^{\circ}\text{C}$  の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。pH 2.2 クエン酸ナトリウム緩衝液 2 mL を正確に加え、超音波処理し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混合標準液各 10  $\mu\text{L}$  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 5 に示した。

Table 5 Operating conditions of automatic amino acid analyzer

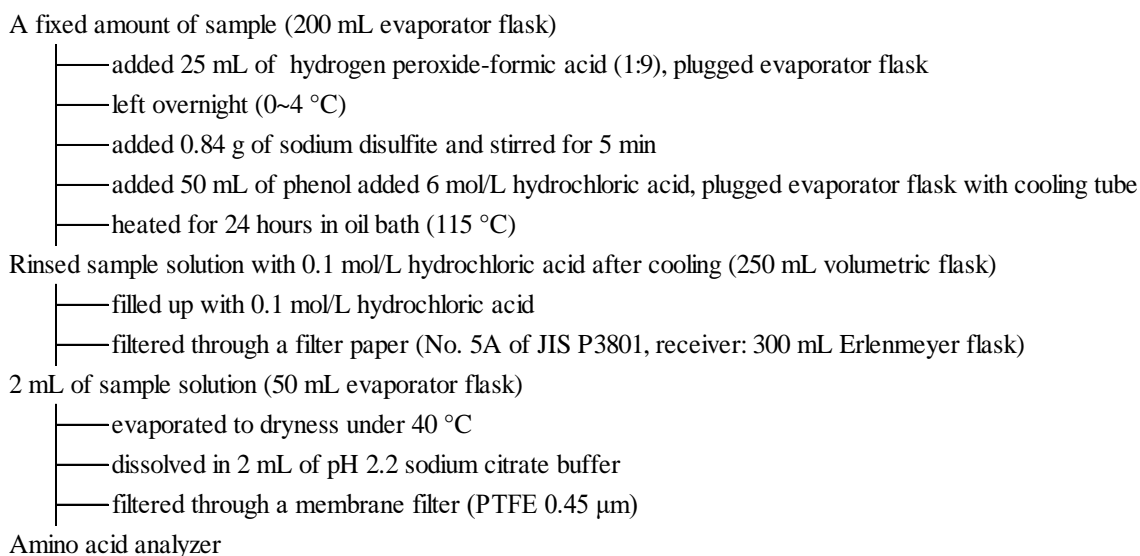
Detector	Fluorescent detector (excitation wavelength: 345 nm, fluorescent wavelength: 455 nm)
Separation column	AApak Na-LG (6.0 mm i.d. $\times$ 50 mm, 4 $\mu\text{m}$ ), JASCO
Ammonia removal column	AECpak Na-LG (4.6 mm i.d. $\times$ 35 mm), JASCO
Mobile phase	1st (hold for 1.5 min) $\rightarrow$ 0.5 min $\rightarrow$ 1st-2nd-3rd (44:5:1) $\rightarrow$ 1 min $\rightarrow$ 2nd-3rd (24:1) $\rightarrow$ 11 min $\rightarrow$ 2nd-3rd (41:9) (hold for 8 min) $\rightarrow$ 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) $\rightarrow$ 0.05 min $\rightarrow$ 1st (hold for 21.95 min)
Reaction solution	Solution A-solution B (1:1) Solution A: Hypo Reagent Solution B was prepared by adding 500 mg of ortho-phthalaldehyde dissolved in 10 mL of ethanol to 1000 mL of OPA Reagent.
Flow rate	Mobile phase: 0.5 mL/min, Reaction solution: 0.5 mL
Column temperature	60 $^{\circ}\text{C}$

## 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。なお、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、システイン酸及びメチオニンスルホン量にそれぞれ 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。



Scheme 1 Analytical procedure for methionine assay in feed (non-spiked sample)

## 2.5 添加回収試験

2.2 の 3)の L-シスチン，L-リジン，L-メチオニン及び L-トレオニン標準原液を添加に用いた。添加濃度は，子豚育成用及び肉豚肥育用配合飼料について，飼料の公定規格に定められた環境負荷低減型配合飼料の最小量の 2 倍程度の量とした。

子豚育成用配合飼料 1 にシスチン，リジン，メチオニン及びトレオニンとしてそれぞれ 0.448, 1.57, 0.448 及び 1.12 %相当量（最終試料溶液中で 2.4, 8.4, 2.4 及び 6.0 μg/mL），肉豚肥育用配合飼料 3 にシスチン，リジン，メチオニン及びトレオニンとしてそれぞれ 0.336, 1.12, 0.336 及び 0.672 %相当量（同 1.8, 6.0, 1.8 及び 3.6 μg/mL）を添加後よく混合し，一夜静置した後に 2.4 に従って定量し，平均回収率及び繰返し精度を求めた。また，回収率は試料ブランク値を差し引いて算出した。

なお，標準原液添加試料については試薬量の節約及び試料溶液の濃度を検量線の範囲内とするため，2.4 の 2)の操作の一部について以下の下線部のとおり全量フラスコの容量を変更し，波線部の操作を追加して実施した。

先のなす形フラスコにフェノール添加 6 mol/L 塩酸 50 mL を加え，冷却管を付け，115 °C のシリコン油浴中で 24 時間加熱して分解した後放冷した。分解液を 100 mL の全量フラスコに入れ，試料溶液が入っていた 200 mL のなす形フラスコを 0.1 mol/L 塩酸 30 mL で洗浄し，洗液を先の全量フラスコに入れ，更に標線まで 0.1 mol/L 塩酸を加え，ろ紙（5 種 A）でろ過した。これを正確に 3 mL 取って 25 mL の全量フラスコに入れ，更に標線まで 0.1 mol/L 塩酸を加えた。これを正確に 2 mL 取って 50 mL のなす形フラスコに入れ，40 °C の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後，窒素ガスを送って乾固した。pH 2.2 クエン酸ナトリウム緩衝液 2 mL を正確に加え超音波処理し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供する試料溶液とした。



### 3 結果及び考察

#### 3.1 検量線

2.2 の 4)により調製した各アミノ酸混合標準液各 10  $\mu\text{L}$  をアミノ酸自動分析装置に注入し、得られたクロマトグラムからピーク面積を用いて検量線を作成した。

得られた検量線は Fig. 2 のとおりであり、1~20  $\mu\text{g/mL}$  (注入量として 0.01~0.2  $\mu\text{g}$  相当量) の範囲で直線性を示した。なお、当該検量線の濃度範囲は、シスチン、リジン、メチオニン及びトレオニンをそれぞれ 0.0398~0.796, 0.0560~1.120, 0.0461~0.922 及び 0.0560~1.120 %含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の各アミノ酸濃度範囲に相当する。

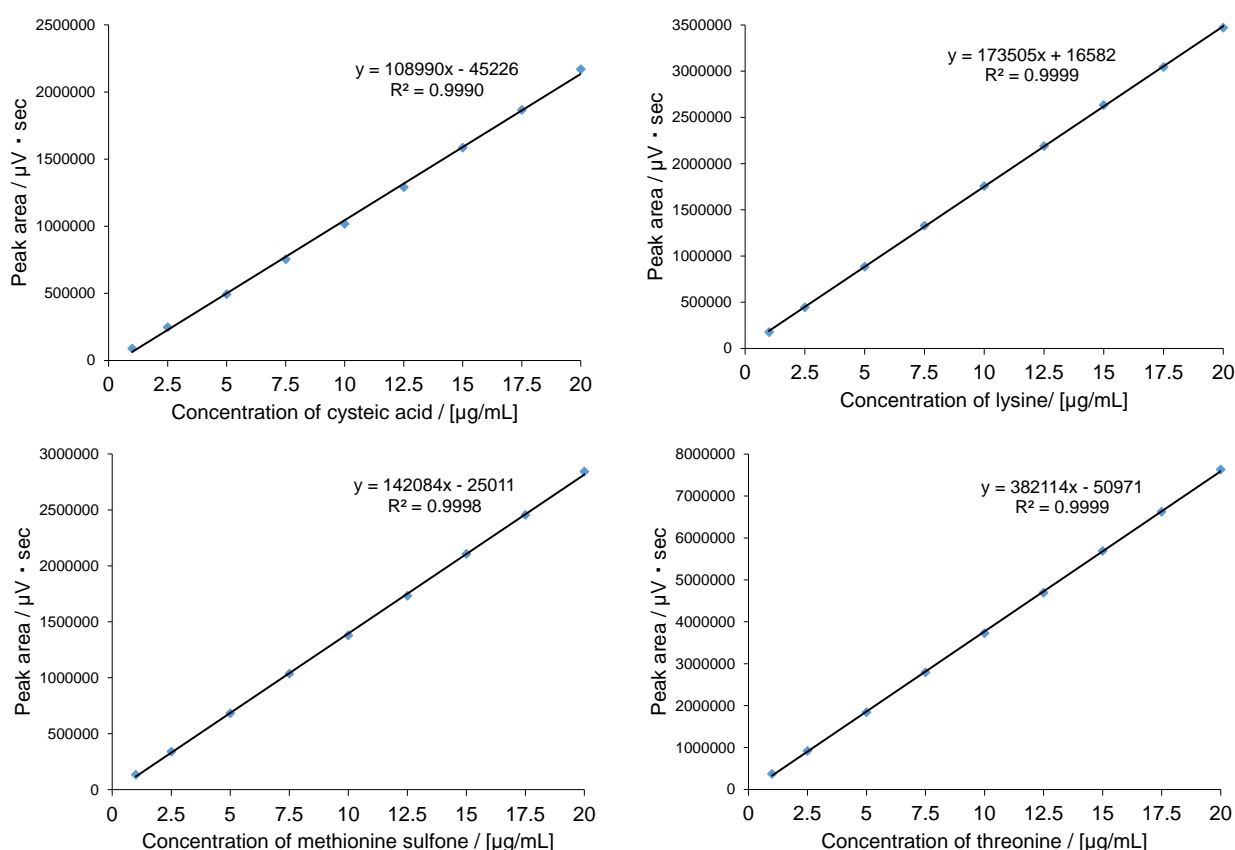


Fig. 2 Calibration curves of cysteic acid, lysine, methionine sulfone and threonine

#### 3.2 妨害物質の検討

豚用配合飼料 7 検体を用い、本法により調製した試料溶液をアミノ酸自動分析装置に注入し、得られたクロマトグラムを確認したところ、いずれの試料においてもメチオニンスルホンと重なるピークが確認されたため、ピークを垂直に分割し面積で定量することとした。システイン酸、リジン及びトレオニンについては定量を妨げるピークは認められなかった。

なお、得られたクロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。

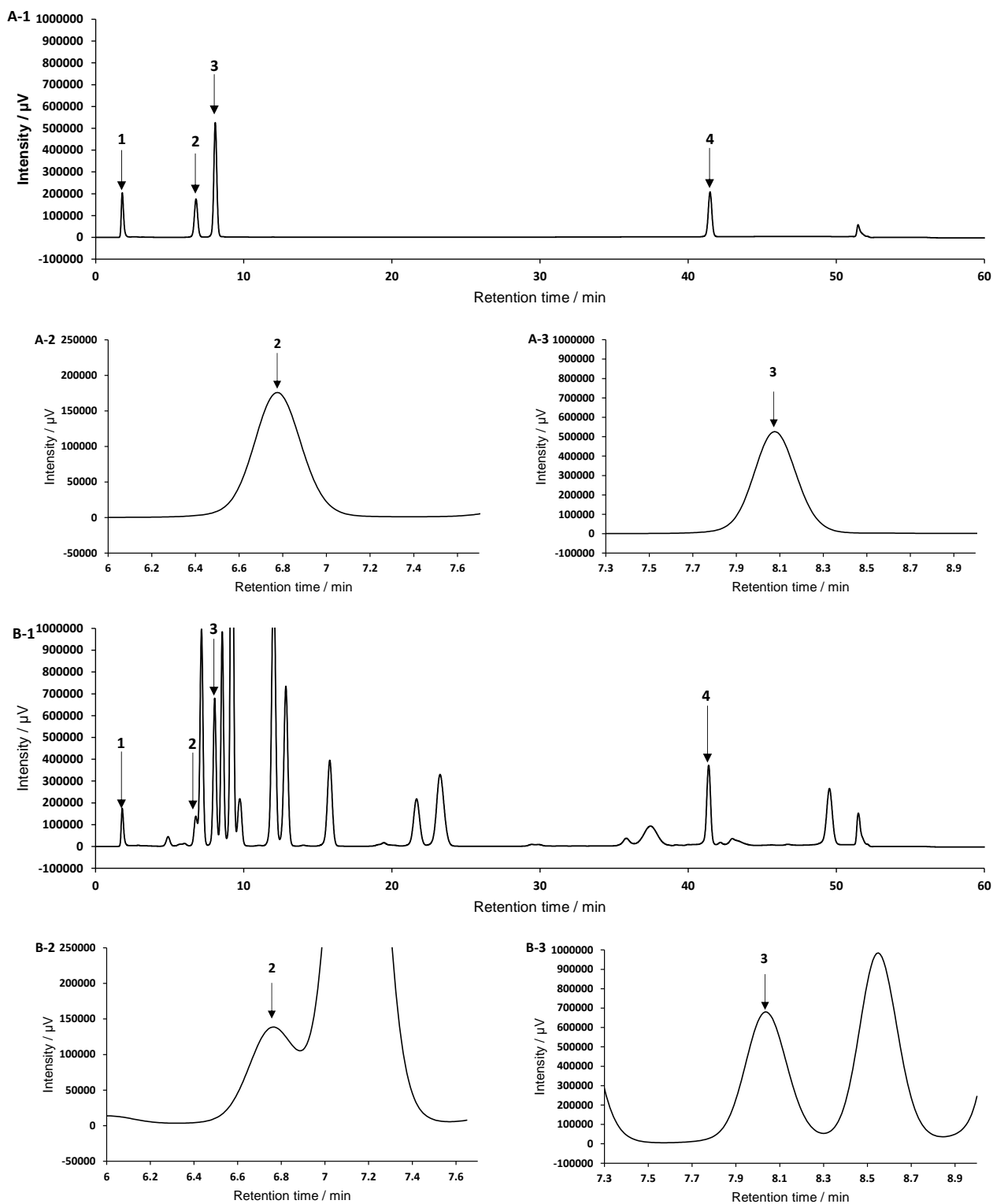


Fig. 3 Typical chromatograms of standard and sample solution

(Operating conditions of automatic amino acid analyzer are shown in Table 5. Arrows indicate the peaks of 1: cysteic acid, 2: methionine sulfone, 3: threonine and 4: lysine.)

A: Standard solution (20 µg/mL, A-2 and A-3 are enlarged views of portions of A-1.)

B: Sample solution of formula feed for piglets (B-2 and B-3 are enlarged views of portions of B-1.)

### 3.3 併行精度確認試験

子豚育成用配合飼料 1 及び肉豚肥育用配合飼料 3 を 2.4 に従って定量し、繰返し精度を求めた。その結果は Table 6 のとおり、子豚育成用配合飼料 1 では、シスチンについて繰返し精度は相対標準偏差 ( $RSD_r$ ) として 3.1 %, リジンについて  $RSD_r$  は 2.2 %, メチオニンについて  $RSD_r$  は 3.2 %, トレオニンについて  $RSD_r$  は 2.4 %, 肉豚肥育用配合飼料 3 では、シスチンについて  $RSD_r$  は 2.7 %, リジンについて  $RSD_r$  は 2.8 %, メチオニンについて  $RSD_r$  は 2.9 %, トレオニンについて  $RSD_r$  は 3.1 % の成績が得られた。これらは飼料分析基準別紙 2 の試験法の妥当性確認ガイドライン (以下「妥当性確認ガイドライン」という。) に定められた 1) 及び 2) の併行精度の目標値を満たす結果であった。

- 1) 精度 (子豚育成用配合飼料 1) : シスチン 4.8 % 以下, リジン 4.0 % 以下, メチオニン 4.9 % 以下, トレオニン 4.4 % 以下
- 2) 精度 (肉豚肥育用配合飼料 3) : シスチン 4.8 % 以下, リジン 4.3 % 以下, メチオニン 4.7 % 以下, トレオニン 4.4 % 以下

Table 6 Repeatability of cystine, lysine, methionine and threonine

Amino acids	For piglets 1		For fattening pigs 3	
	Content <sup>a)</sup> (%)	$RSD_r$ <sup>b)</sup> (%)	Content <sup>a)</sup> (%)	$RSD_r$ <sup>b)</sup> (%)
Cystine	0.278	3.1	0.305	2.7
Lysine	0.937	2.2	0.637	2.8
Methionine	0.255	3.2	0.344	2.9
Threonine	0.569	2.4	0.504	3.1

a) Mean ( $n = 5$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

### 3.4 添加回収試験

2.5 により添加回収試験を実施した。その結果は Table 7 のとおり、子豚育成用配合飼料 1 では平均回収率及び  $RSD_r$  はそれぞれ、シスチンが 90.2 % 及び 1.2 %, リジンが 105 % 及び 1.4 %, メチオニンが 83.7 % 及び 1.0 %, トレオニンが 102 % 及び 1.7 %, 肉豚肥育用配合飼料 3 では平均回収率及び  $RSD_r$  はそれぞれ、シスチンが 98.9 % 及び 1.7 %, リジンが 78.8 % 及び 1.9 %, メチオニンが 105 % 及び 2.1 %, トレオニンが 92.1 % 及び 1.5 % の成績が得られた。これらは妥当性確認ガイドラインに定められた 1)~3) の真度及び併行精度の目標値を満たす結果であった。

- 1) 真度 : 70 % 以上 120 % 以下
- 2) 精度 (子豚育成用配合飼料 1) : シスチン 4.2 % 以下 (定量値 0.681 %), リジン 3.5 % 以下 (同 2.57 %), メチオニン 4.3 % 以下 (同 0.646 %), トレオニン 3.7 % 以下 (同 1.72 %)
- 3) 精度 (肉豚肥育用配合飼料 3) : シスチン 4.3 % 以下 (定量値 0.646 %), リジン 3.7 % 以下 (同 1.57 %), メチオニン 4.2 % 以下 (同 0.714 %), トレオニン 3.9 % 以下 (同 1.15 %)

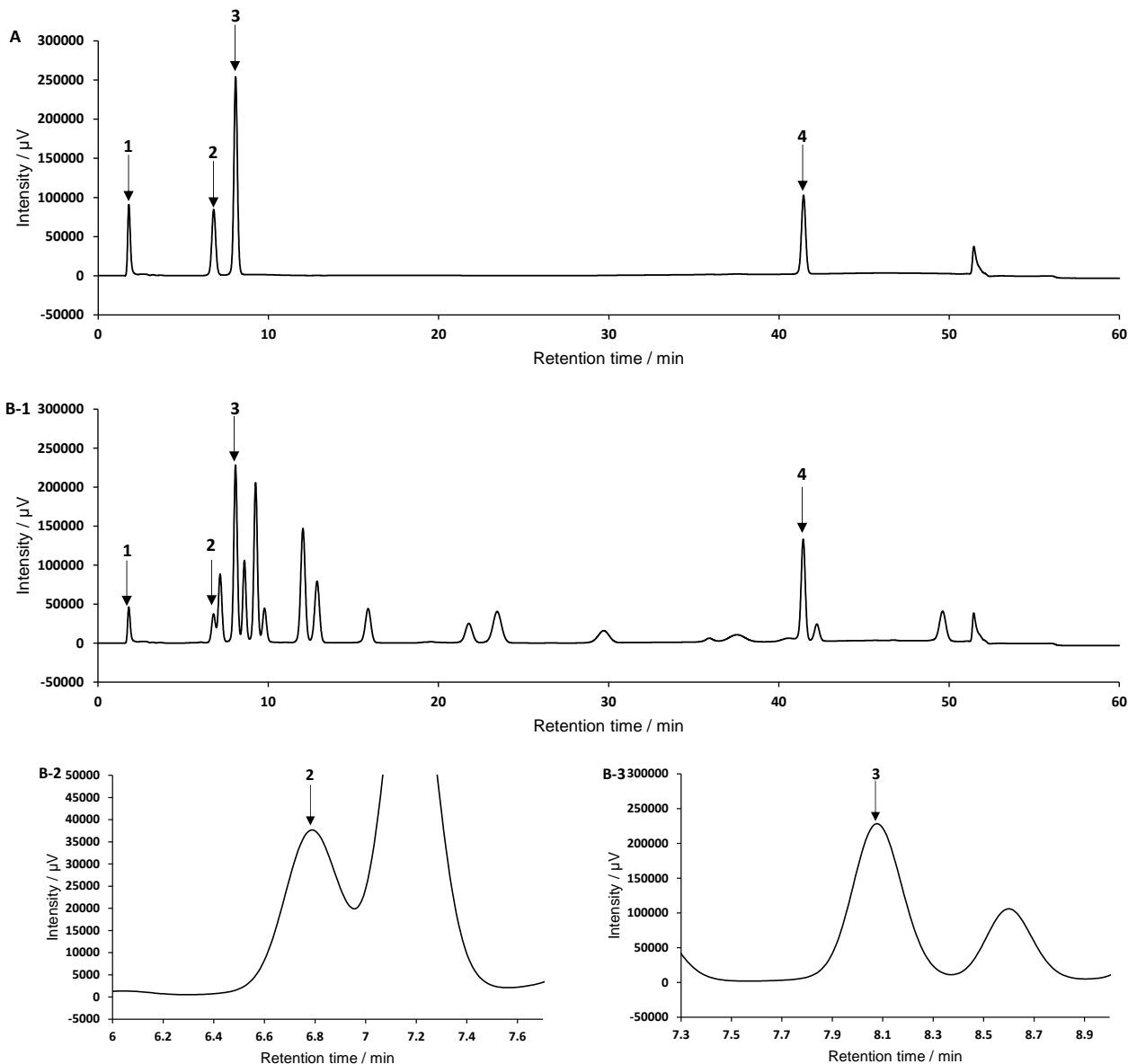
なお、得られたクロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した。

Table 7 Recoveries for cystine, lysine, methionine and threonine

Amino acids	For piglets 1				For fattening pigs 3			
	Spiked level (%)	Blank level <sup>a)</sup> (%)	Recovery <sup>b)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>c)</sup> (%)	Spiked level (%)	Blank level <sup>a)</sup> (%)	Recovery <sup>b)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>c)</sup> (%)
Cystine	0.448	0.279	90.2	1.2	0.336	0.317	98.9	1.7
Lysine	1.57	0.914	105	1.4	1.12	0.680	78.8	1.9
Methionine	0.448	0.272	83.7	1.0	0.336	0.364	105	2.1
Threonine	1.12	0.583	102	1.7	0.672	0.528	92.1	1.5

a)  $n = 1$ b)  $(\text{mean of five samples} - \text{blank level}) / \text{spiked level} \times 100$ 

c) Relative standard deviation of repeatability



**Fig. 4** Typical chromatograms of standard and spiked sample solution  
 (Operating conditions of automatic amino acid analyzer are shown in Table 5. Arrows indicate the peaks of 1: cysteic acid, 2: methionine sulfone, 3: threonine and 4: lysine.)  
 A: Standard solution (10  $\mu\text{g/mL}$ )  
 B: Sample solution of formula feed for piglets (spiked at 0.44 % cystin and methionine (as 2.4  $\mu\text{g/mL}$  in sample solution), 1.44 % lysine (as 8.4  $\mu\text{g/mL}$  in sample solution), and 0.94 % threonine (as 6.0  $\mu\text{g/mL}$  in sample solution). B-2 and B-3 are enlarged views of portions of B-1.)

#### 4 まとめ

豚用配合飼料中のメチオニンについて、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の飼料分析基準への収載の可否について検討するとともに、シスチン、リジン及びトレオニンとの同時定量法としての適用を併行して検討したところ、以下の結果が得られた。

- 1) 検量線はシステイン酸，リジン，メチオニンスルホン及びトレオニンとしてそれぞれ 1~20  $\mu\text{g/mL}$  相当量（注入量として 0.01~0.2  $\mu\text{g}$  相当量）の範囲で直線性を示した。  
なお，当該検量線の濃度範囲は，シスチンを 0.0398~0.796 %，リジンを 0.0560~1.120 %，メチオニンを 0.0461~0.922 %，トレオニンを 0.0560~1.120 % 含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の各アミノ酸濃度範囲に相当する。
- 2) 豚用配合飼料について，本法に従って得られたクロマトグラムにはメチオニンスルホンと重なるピークが確認されたため，ピークを垂直に分割し面積で定量することとした．システイン酸，リジン及びトレオニンについては選択性を妨げるピークは認められなかった。
- 3) 子豚育成用配合飼料及び肉豚肥育用配合飼料を本法に従って 5 点併行分析し，繰返し精度を求めたところ，妥当性確認ガイドラインに定められた併行精度の目標値を満たす結果が得られた。
- 4) 子豚育成用及び肉豚肥育用配合飼料について，飼料の公定規格に定められた環境負荷低減型配合飼料の最小量の 2 倍程度のシスチン，リジン，メチオニン及びトレオニンを添加し，本法に従って 5 点併行分析を実施し，回収率及び繰返し精度を求めたところ，妥当性確認ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たす結果が得られた。

## 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：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>，令和 3 年 5 月 12 日 (2021).
- 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，令和 5 年 12 月 1 日，5 消安第 4714 号 (2023).
- 5) 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).