

2 牛用配合飼料中の 3-ニトロオキシプロパノールの液体クロマトグラフによる分析法の開発

横田 典明^{*1}, 長久保 眞平^{*2}, 山下 奈々^{*3}, 菊田 千乃^{*2}, 若宮 洋市^{*2}

Development of 3-Nitrooxypropanol Determination Method in Formula Feed for Cattle by LC

YOKOTA Tenmei^{*1}, NAGAKUBO Shinpei^{*2}, YAMASHITA Nana^{*3},

KIKUTA Yukino^{*2} and WAKAMIYA Yoichi^{*2}

(^{*1} Fukuoka Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC)
(Now Animal Quarantine Service, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan),

^{*2} Fukuoka Regional Center, FAMIC,

^{*3} Fukuoka Regional Center, FAMIC (Now Nagoya Regional Center, FAMIC))

We have developed a quantitative determination method for 3-nitrooxypropanol (3-NOP) concentration in formula feed for cattle using a liquid chromatograph with an ultraviolet detector (LC-UV).

3-NOP in a sample was extracted with acetonitrile-water-formic acid (180:20:1), and the extracted solution was centrifuged. The supernatant was injected into an LC with a UV detector at 210 nm to determine the 3-NOP concentration. LC separation was then carried out on an ODS column (InertSustain C18, 3 mm i.d. × 150 mm, 3 μm, GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan) with a gradient of 0.1 % (v/v) methanesulfonic acid aqueous solution and 0.1 % (v/v) methanesulfonic acid methanol solution as a mobile phase.

Recovery tests were conducted using three types of formula feed for cattle. Those materials were added with 75, 150 and 300 mg/kg of 3-NOP. The resulting mean recoveries ranged from 100 % to 105 %, and the repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD_r) was less than 1.2 %.

Key words: 3-nitrooxypropanol; feed additives; liquid chromatograph with ultraviolet detector (LC-UV); formula feed for cattle

キーワード：3-ニトロオキシプロパノール；飼料添加物；液体クロマトグラフ；牛用配合飼料

1 緒 言

温室効果ガスである二酸化炭素やメタンの排出削減が各国で求められている。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」¹⁾において、温室効果ガスの排出を削減する地球にやさしい飼料の開発・普及が期待されている。

3-ニトロオキシプロパノール（以下「3-NOP」という。）は、牛の曖気により排出されるメタンを削減することを目的として開発された。メタン生成経路の最終段階において、メチル補酵素 M は、メチル補酵素 M 還元酵素を触媒として補酵素 B と反応し、メタンを放出する。3-NOP は、メ

^{*1} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター，現 農林水産省動物検疫所

^{*2} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター

^{*3} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター，現 名古屋センター

チル補酵素 M に構造が類似していることから、メチル補酵素 M 還元酵素に結合し、その活性を阻害することによりメタンの生成を削減する²⁾。

3-NOP は、我が国において令和 6 年に「飼料の栄養成分その他の有効成分の補給」用途の飼料添加物に指定され³⁾、牛を対象とする飼料に 3-NOP として 0.015 % (150 mg/kg) 以下の添加が認められている⁴⁾。しかしながら、飼料分析基準⁵⁾に 3-NOP の分析法は収載されていないことから、畜産物中の基準値を超過した際の原因究明等のため、牛用配合飼料中の 3-NOP の分析法の確立が急務となっている。今回、3-NOP の定量法として、飼料添加物の指定のために申請業者である DSM 株式会社から提出された資料に掲載されている液体クロマトグラフ（以下「LC」という。）による定量法⁶⁾（以下「DSM 法」という。）を基に飼料分析基準への収載の可否を検討したので、その概要を報告する。

参考に 3-NOP の構造式等を Fig. 1 に示した。

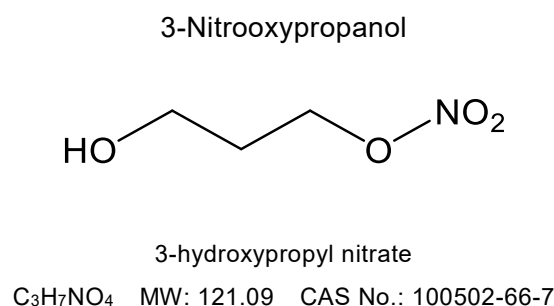


Fig. 1 Chemical structure of 3-nitrooxypropanol (3-NOP)

2 実験方法

2.1 試料

1) 牛用配合飼料

3-NOP を含まない牛用配合飼料をそれぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎した。なお、検討に用いた牛用配合飼料を Table 1 に示した。

2) 分析用試料

3-NOP 製剤（dsm-firmenich 製、3-NOP を 10 %含有）を、1)で調製した各牛用配合飼料（ただし、ほ乳期子牛育成用 1 を除く）と 10 倍希釈を目処に V 型混合機を用いて段階的に混合（30 rpm, 30 分間）し、3-NOP として 300 mg/kg（成分規格の上限値の 2 倍）を含有する分析用試料をそれぞれ調製した。更に、300 mg/kg を含有する分析用試料と各牛用配合飼料を混合し、3-NOP として 75 mg/kg（成分規格の上限値の 1/2）及び 150 mg/kg（成分規格の上限値）を含有する分析用試料をそれぞれ調製した。

Table 1 Compositions of the formula feed

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For suckling calves 1	Grains	60	Corn, wheat, roasted soybean flour
	Oil seed meal	35	Soybean meal
	Others	5	Molasses, calcium carbonate, salt, medium-chain fatty acid calcium, licorice extract, stevia, calcium phosphate, feed additives
For suckling calves 2	Grains	68	Corn, heat-treated corn, wheat, roasted soybean flour
	Oil seed meal	28	Soybean meal
	Others	4	Molasses, calcium carbonate, salt, calcium phosphate, medium-chain fatty acid calcium, licorice extract, stevia, feed additives
For dairy cattle and young cattle	Grains	57	Corn, heat-treated corn, heat-treated soybean
	Oil seed meal	26	Rapeseed meal, soybean meal
	Brans	16	Corn gluten feed
	Others	1	Calcium carbonate, molasses, salt, feed additives
For young beef cattle and beef cattle 1	Grains	75	Heat-treated corn, corn, heat-treated barley, barley
	Brans	24	Hominy feed, bran, corn gluten feed, barley bran
	Others	1	Calcium carbonate, salt
For young beef cattle and beef cattle 2	Grains	48	Corn, wheat
	Brans	30	Wheat bran, corn gluten feed
	Oil seed meal	19	Soybean meal, rapeseed meal, sweetened heat-treated soybean meal
	Others	3	Calcium carbonate, molasses, salt, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , feed additives
For beef cattle 1	Grains	65	Heat-treated barley, heat-treated corn, corn
	Brans	22	Wheat bran, barley bran, corn gluten feed
	Oil seed meal	11	Rapeseed meal, soybean meal
	Others	2	Molasses, calcium carbonate, salt, soybean curd residue, lactobacillus, bacillus, yeast, feed additives
For beef cattle 2	Grains	56	Heat-treated corn, corn, heat-treated barley, barley
	Brans	32	Wheat bran, rice bran, soybean hulls, hominy feed
	Oil seed meal	10	Soybean meal, rapeseed meal
	Others	2	Molasses, calcium carbonate, lactobacillus, butyrate-producing bacteria, glycolating bacteria, natural aluminum silicate, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , feed additives

2.2 試 薬

- 1) メタノール及びアセトニトリルは液体クロマトグラフ用（富士フイルム和光純薬製）を用いた。ギ酸は試薬特級（質量分率 98 %）を用いた。メタンスルホン酸は和光特級（富士フイルム和光純薬製）を用いた。水は純水製造装置ピュアライン WL220（ヤマト科学製）により精

製した水（JIS K 0557 に定義された A3 相当）を用いた。

2) アセトニトリル-水-ギ酸（180+20+1）

900 mL のアセトニトリルに、100 mL の水と 5 mL のギ酸を加えた。

3) 3-NOP 標準液

3-NOP 標準品（dsm-firmenich 製、純度 98.3 %）50 mg を量って 100 mL の全量フラスコに入れ、アセトニトリル-水-ギ酸（180+20+1）を加えて溶かし、更に標線までアセトニトリル-水-ギ酸（180+20+1）を加えて 3-NOP 標準原液を調製した（この液 1 mL は、3-NOP として 0.5 mg を含有）。

使用に際して、3-NOP 標準原液の一部をアセトニトリル-水-ギ酸（180+20+1）で正確に希釈し、1 mL 中に 3-NOP として 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40 及び 50 µg を含有する標準液を調製した。

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) V 型混合機：III 形 筒井理化学器械製（缶体容量 2 L、使用時回転数 30 rpm）
- 3) 超音波洗浄機：MCD-2 アズワン製（周波数（仕様）40 kHz）
- 4) マグネチックスターラー：RS-4AN アズワン製
- 5) LC：Prominence 島津製作所製

2.4 定量方法（本法）

1) 抽 出

分析試料 10 g を量って 300 mL の共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリル-水-ギ酸（180+20+1）100 mL を加え、30 分間スターラーでかき混ぜて抽出した。抽出した液をプラスチック製遠心沈殿管に入れ、16200×g で 3 分間遠心分離し、上澄み液を液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とした。

3) 液体クロマトグラフィー

試料溶液及び各標準液 5 µL を LC に注入し、クロマトグラムを得た。測定条件を Table 2 に示した。

Table 2 Operating conditions of LC

Detector	UV detector (Wavelength: 210 nm)
Column	InertSustain C18 (3 mm i.d. × 150 mm, 3 µm), GL Sciences
Mobile phase	0.1 % (v/v) methanesulfonic acid aqueous solution – 0.1 % (v/v) methanesulfonic acid methanol solution (23:2) (hold for 9 min) → 0.1 min → (1:4) (hold for 6 min) → 0.1 min → (23:2) (hold for 5 min)
Flow rate	0.4 mL/min
Column temperature	40 °C

4) 計 算

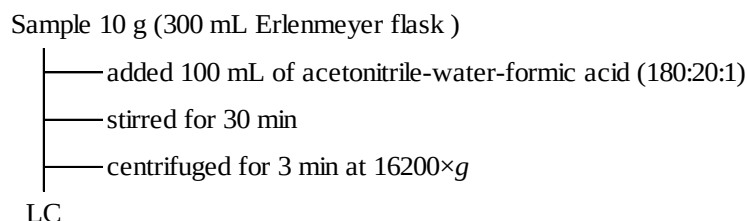
得られたクロマトグラムからピーク面積及び高さを求めて検量線を作成し、試料中の 3-NOP 量を算出した。なお、3.2 以降はピーク面積での結果を記載した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。

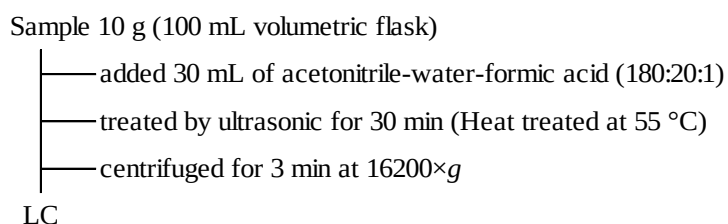
2.5 DSM 法

分析試料 10 g を量って 100 mL の全量フラスコに入れ，アセトニトリル-水-ギ酸（180+20+1）30 mL を加え，55 °C の水浴中で 30 分間超音波抽出した．なお，超音波抽出時には 10 分間隔で水平方向に穏やかに数回全量フラスコを振り混ぜた．抽出した液をプラスチック製遠心沈殿管に入れ，16200×*g* で 3 分間遠心分離し，上澄み液を液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とし，本法と同様の方法で測定した．

なお，定量法の概要を Scheme 2 に示した．



Scheme 1 Analytical procedure for 3-NOP (this method)



Scheme 2 Analytical procedure for 3-NOP (DSM method)

3 結果及び考察

3.1 検量線

LC の測定条件は，DSM から提出された資料を参考に設定した．2.2 の 3)により調製した各 3-NOP 標準液各 5 µL を LC に注入し，得られたクロマトグラムからピーク面積及び高さを用いて検量線を作成した．得られた検量線の一例は Fig. 2 のとおりであり，2~50 µg/mL（注入量として 10~250 ng 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，3-NOP を 20~500 mg/kg 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濃度範囲に相当する．

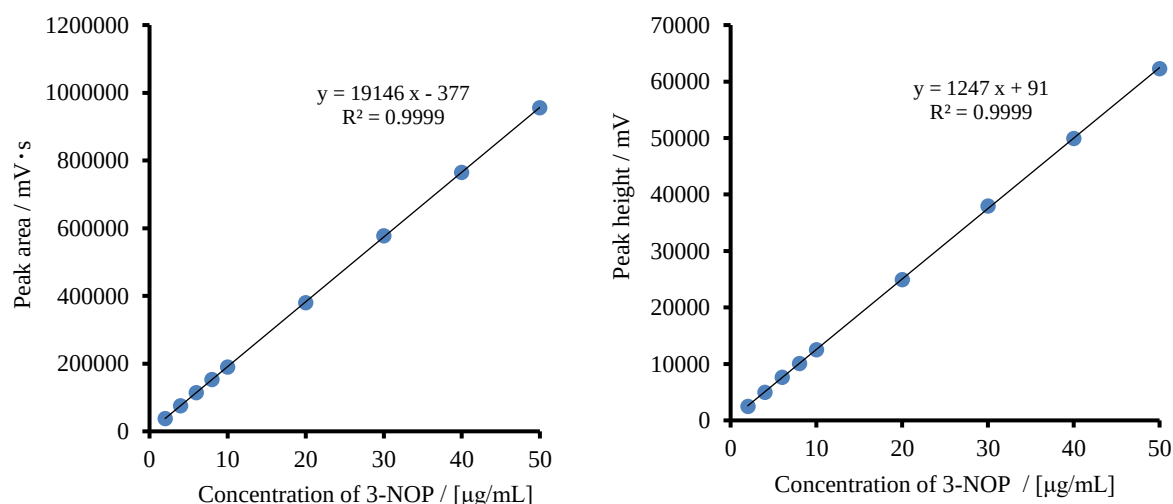


Fig. 2 Calibration curves of 3-NOP by peak area (left) and peak height (right)

3.2 抽出法の検討

飼料分析基準に記載されている飼料添加物の抽出方法の多くが、共栓三角フラスコを用いたかき混ぜ抽出である。また、DSM法で用いる100 mL全量フラスコは開口部が小さく、試料を容器に入れる作業が繁雑であった。そこで本法では、試料採取量に合わせて抽出容器を300 mLの共栓三角フラスコとし、抽出容器の容量に合わせて抽出液量も100 mLに変更した。更に、抽出方法も加温しないかき混ぜ抽出とした。

本法とDSM法の定量値を比較するため、2.1の2)により調製した3-NOPとして150 mg/kgを含有する試料5種類（ほ乳期子牛育成用2，幼令肉用牛育成用・肉用牛肥育用1，同2，肉用牛肥育用1及び同2）を用いて、2.4及び2.5に従って添加回収率を求めた。結果はTable 3のとおりであり、本法の回収率は94.3~106%，DSM法の回収率は86.1~104%となり、本法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。）に定められた真度の目標値（90%以上110%以下）をすべて満たしていたが、DSM法では一部の試料において目標値を満たしていなかった。

このことから、本法を採用することに問題はないと考えられた。

Table 3 Comparison of recovery between this method and DSM method

Extraction method Formula feed types	Recovery (%)	
	This method	DSM method
	Stirring extraction	Ultrasonic extraction
For suckling calves	104	95.4
For young beef cattle and beef cattle 1	94.3	86.1
For young beef cattle and beef cattle 2	106	104
For beef cattle 1	97.1	87.8
For beef cattle 2	101	92.5

$n = 1$

3.3 妨害物質の検討

2.1 の 1)の牛用配合飼料各 1 検体を用い、本法により調製した試料溶液を LC 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 3-NOP の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。

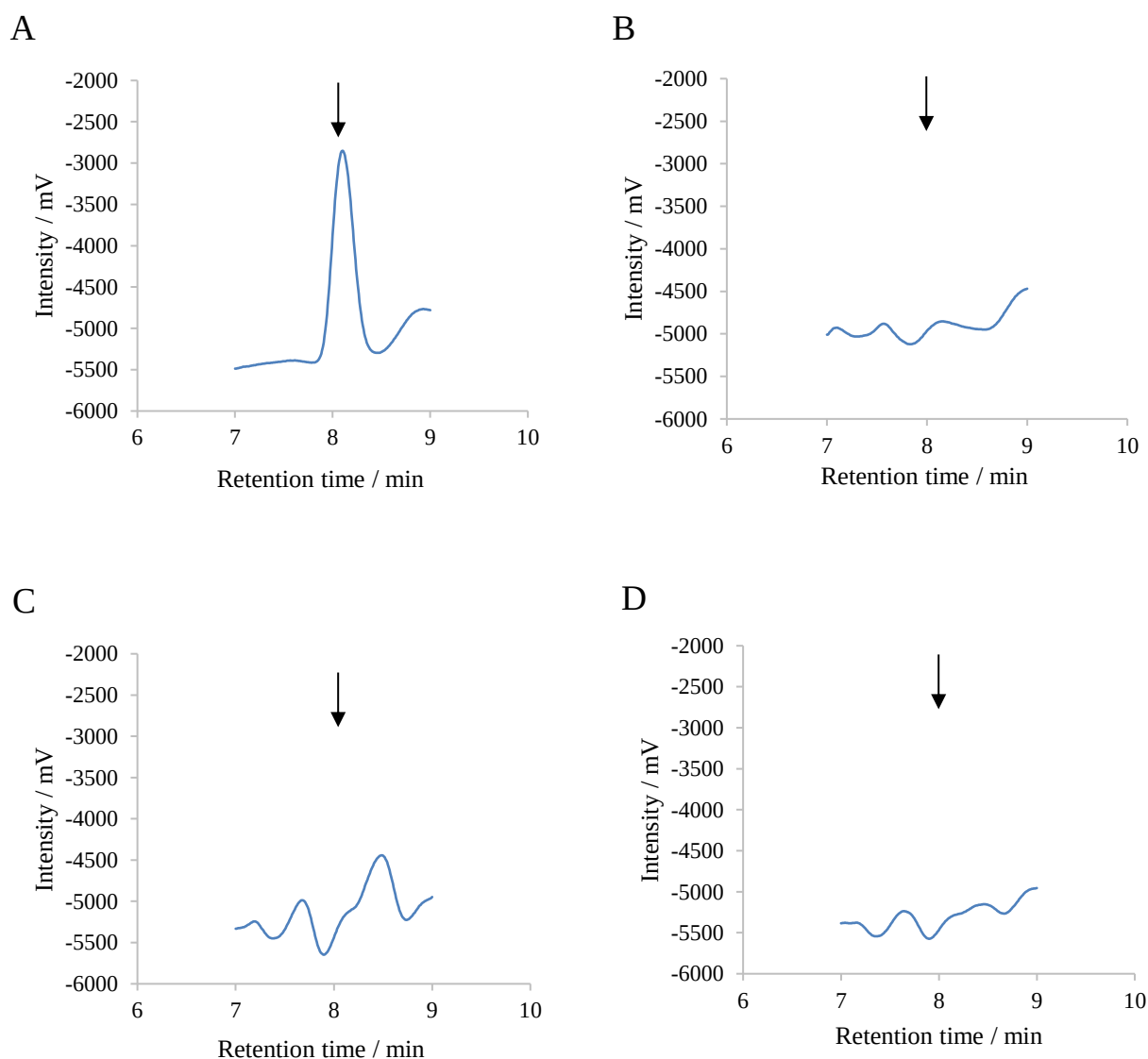


Fig. 3 Typical chromatograms of 3-NOP in standard and blank sample solutions (Arrows indicate the retention time of 3-NOP.)

A: Standard solution (2 $\mu\text{g/mL}$: 10 ng as 3-NOP)

B~D: Blank sample solution (B: formula feed for suckling calves 2, C: formula feed for dairy cattle and beef cattle 2, D: formula feed for young beef cattle and beef cattle 2)

3.4 添加回収試験

2.1 の 2)により調製した 3-NOP として 75, 150 及び 300 mg/kg (最終試料溶液として 7.5, 15 及

び 30 µg/mL) を含有する試料 3 種類 (ほ乳期子牛育成用 2, 乳用牛飼育用・若令牛育成用及び幼令肉用牛育成用・肉用牛肥育用 2) について, 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. その結果は Table 4 のとおり, 3-NOP の平均回収率は 100~105 %, その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 1.2 %以下の成績が得られ, 妥当性確認ガイドラインに定められた目標値 (真度: 90 %以上 110 %以下, 精度: 75 mg/kg では 8.3 %以下, 150 mg/kg では 7.5 %以下, 300 mg/kg では 6.7 %以下) を満たす結果であった. なお, 得られたクロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した.

Table 4 Recoveries for 3-NOP

Spiked level (mg/kg)	For suckling calves 2		For dairy cattle and young beef cattle		For young beef cattle and beef cattle 2	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD_r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD_r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD_r ^{b)} (%)
75	102	0.7	103	1.0	103	0.8
150	100	0.4	105	0.7	102	0.2
300	101	1.2	104	0.3	101	0.3

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

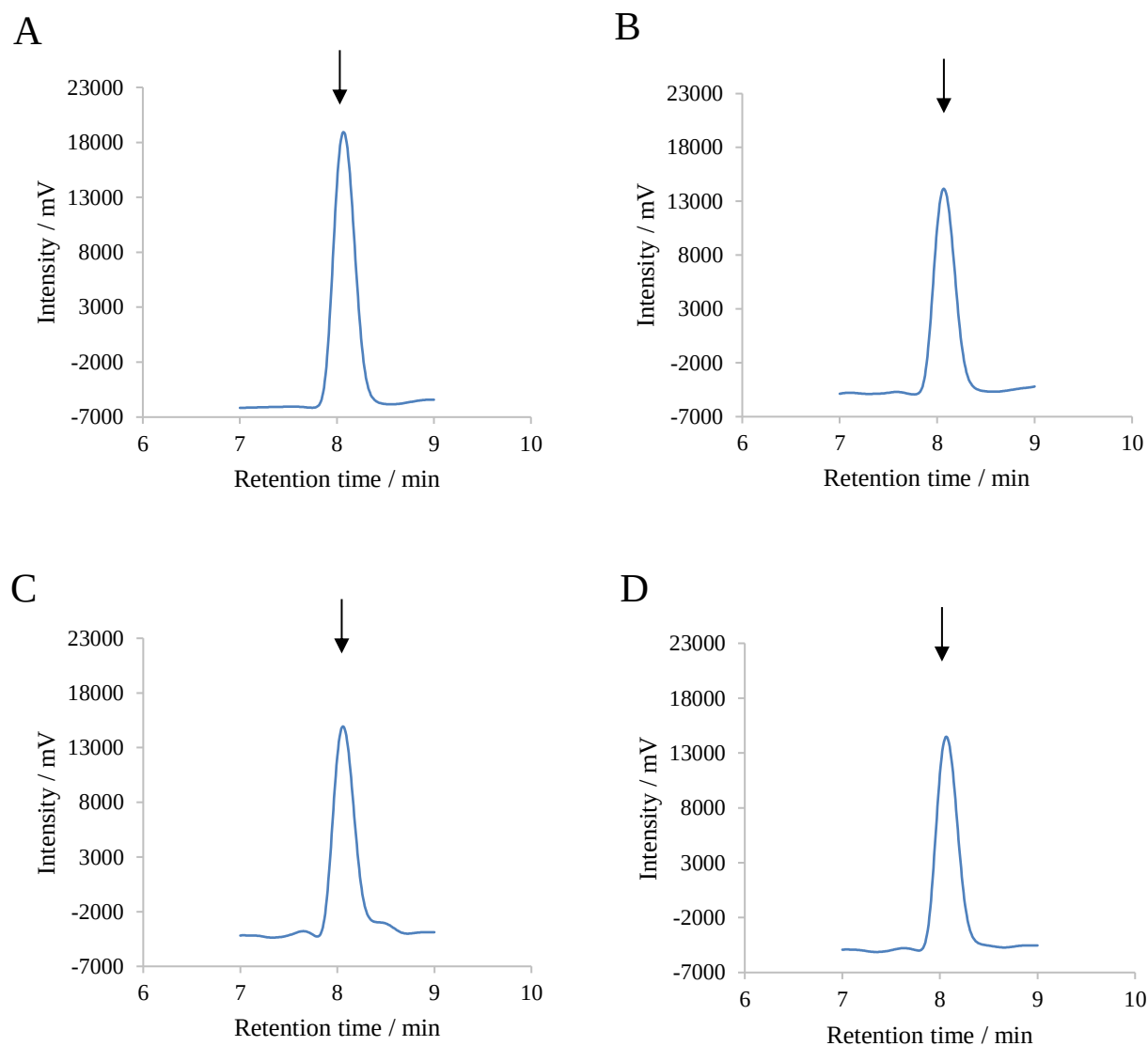


Fig. 4 Typical chromatograms of 3-NOP in standard and spiked sample solutions (Arrows indicate the retention time of 3-NOP.)

A: Standard solution (20 $\mu\text{g/mL}$ of 3-NOP (100 ng as injection amount))

B~D: Spiked sample solution (B: formula feed for suckling calves 2, C: formula feed for dairy cattle and young beef cattle, D: formula feed for young beef cattle and beef cattle 2, each spiked at 150 mg/kg of 3-NOP (75 ng as injection amount))

4 まとめ

牛用配合飼料中の 3-NOP について、DSM 法を基に、LC を用いた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、抽出容器、抽出液量及び抽出方法を変更することで以下の結果が得られた。

1) 検量線は 2~50 $\mu\text{g/mL}$ 相当量（注入量として 10~250 ng 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、3-NOP を 20~500 mg/kg 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濃度範囲に相当する。

- 2) 牛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，定量を妨げるピークは認められなかった。
- 3) 3-NOP として 75, 150 及び 300 mg/kg となるように調製した試料について，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) 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)。
- 2) 農林水産省農業資材審議会（第 63 回）：飼料添加物の新規指定等（案）（3-ニトロオキシプロパノール）に関する資料，令和 6 年 3 月 12 日 (2024)。
- 3) 農林省告示：飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律の規定に基づく飼料添加物を定める件，昭和 51 年 7 月 24 日，告示第 750 号 (1976)。
- 4) 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，省令第 35 号 (1976)。
- 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) DSM 株式会社：DSM 社社内資料（非公表）：飼料中の 3-ニトロオキシプロパノール定量法，令和 5 年 11 月 9 日 (2023)。