

1 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

菊田 千乃^{*1}, 長久保 眞平^{*2}, 若宮 洋市^{*3}

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

KIKUTA Yukino^{*1}, NAGAKUBO Shinpei^{*2} and WAKAMIYA Yoichi^{*3}

(^{*1} Fukuoka Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC)

(Current affiliation: Food Safety and Consumer Affairs Bureau, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan),

^{*2} Fukuoka Regional Center, FAMIC,

^{*3} Fukuoka Regional Center, FAMIC (Current affiliation: Nagoya Regional Center, FAMIC))

A quantitative determination method using a liquid chromatograph with an ultraviolet detector (LC-UV) was developed to determine the concentration of 3-nitrooxypropanol (3-NOP) in formula feed for cattle.

3-NOP in a sample was extracted with acetonitrile-water-formic acid (180:20:1). The extracted solution was centrifuged, and its supernatant was injected into an LC with a UV detector at 210 nm to determine the 3-NOP concentration. LC separation was carried out using 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.

A limit of quantification (LOQ) and a limit of detection (LOD) of 3-NOP in the present method were 30 mg/kg and 9 mg/kg, respectively.

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。飼料についても、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飼料の開発に取り組むこととしており、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⁾。

^{*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 農林水産省消費・安全局

^{*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

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た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おり⁴⁾、3-NOP の代謝物である 3-ニトロオキシプロピオン酸を規制対象物質として畜産物中の基準値も設定されている。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。

そこで、令和 6 年度に横田ら⁶⁾は、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。）による分析法⁷⁾（以下「DSM 法」という。）について、飼料分析基準への収載の可否を検討した。検討において、DSM 法を一部改良し、改良した分析法を用いて添加回収試験を実施したところ、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。）に定められた真度及び併行精度の目標値を満たす結果が得られた。令和 7 年度は、当該分析法の定量下限及び検出下限並びに測定波長について検討したので、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。

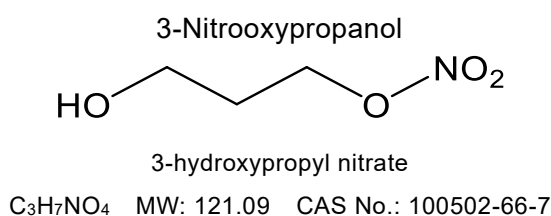


Fig. 1 Chemical structure of 3-nitrooxypropanol (3-NOP)

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の配合割合を 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 30 mg/kg（基準値上限の 1/5）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	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 growing and fattening beef 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

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) 粉砕機：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) マグネチックスターラー：RS-4AN アズワン製
- 4) LC：Prominence 島津製作所製
- 5) 紫外・可視分光光度計：UVmini-1240 島津製作所製

2.4 定量方法

- 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、16000×g で 3 分間遠心分離し、上澄み液を LC による測定に供する試料溶液とした。

2) 液体クロマトグラフィー

試料溶液及び 3-NOP 標準液各 5 μ L 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。

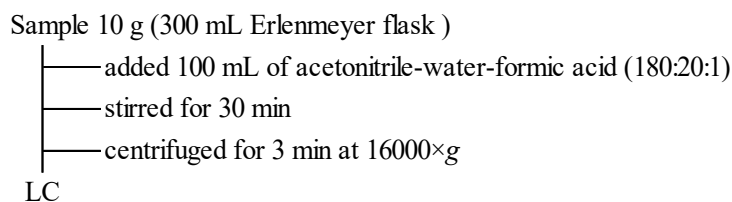
Table 2 Operating condition of LC

Detector	UV detector (Wavelength: 210 nm)
Column	InertSustain C18 (3 mm i.d. $\times$ 150 mm, 3 μ m), 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) $\rightarrow$ 0.1 min $\rightarrow$ (1:4) (hold for 6 min) $\rightarrow$ 0.1 min $\rightarrow$ (23:2) (hold for 5 min)
Flow rate	0.4 mL/min
Column temperature	40 $^{\circ}$ C

3) 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 3-NOP 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 3-NOP

3 結果及び考察

3.1 定量下限及び検出下限

3-NOP 検量線が直線性を示した範囲, 2~50 μ g/mL の下端付近となる濃度 (最終試料溶液中濃度 3 μ g/mL 相当量) の添加回収試験の結果は Table 3 のとおり良好であり, 得られたピークの SN 比が 10 以上であったため, 3-NOP の定量下限は 30 mg/kg とした。この濃度は, 3-NOP の基準値 (150 mg/kg 以下) に対して 1/5 であり, 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 : 基準値に対して 1/5 以下) を満たしていた。

本法の検出下限を確認するため, 添加回収試験により得られたピークの SN 比が 3 となる濃度を求めた。その結果, 検出下限は 9 mg/kg であり, 同様に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 : 基準値に対して 1/10 以下) を満たしていた。なお, 得られたクロマトグラムの一例を Fig. 2 に示した。

Table 3 Recoveries for 3-NOP

Spiked level (mg/kg)	For suckling calves		For growing and fattening beef cattle	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
30	103	0.8	99.2	2.0

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

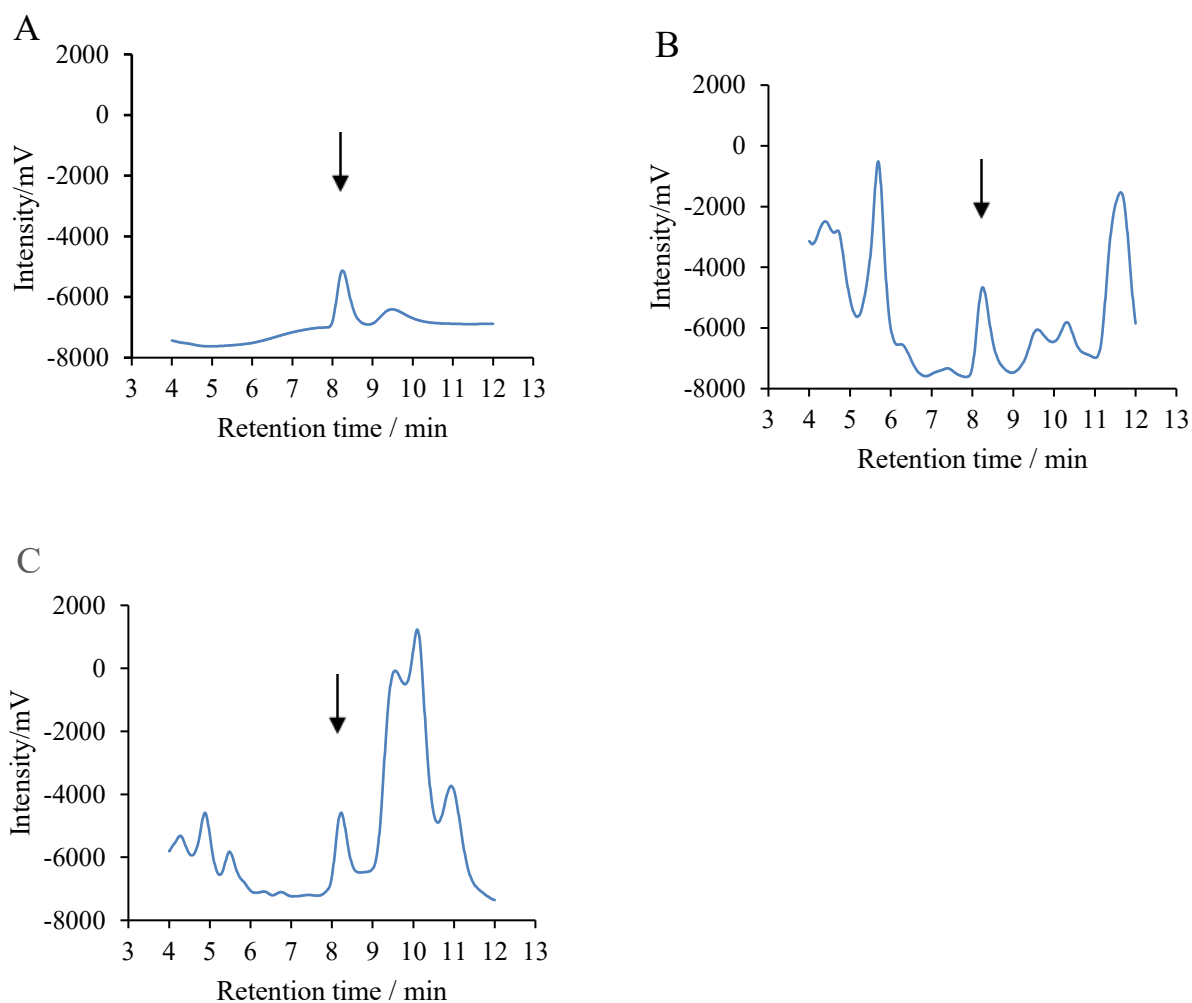


Fig. 2 Chromatograms on recovery test

(Arrows indicate the retention times of 3-NOP.)

A: Standard solution (2 µg/mL of 3-NOP; 10 ng as injection amount)

B, C: Spiked sample solution (B: formula feed for suckling calves, C: formula feed for growing and fattening beef cattle, each spiked at 30 mg/kg of 3-NOP (15 ng as injection amount))

3.2 測定波長の検討

測定波長の 210 nm 付近は多くの有機物が吸収を持ち、夾雑物による妨害が大きい波長とされているため、他に適した波長領域がないか検討を行った。LC による 3-NOP 測定時の移動相組成

と条件を一致させるため、水-メタノール (92+8) に 3-NOP 標準品を 1 mmol/L の濃度で溶解して試料溶液を調製し、紫外・可視分光光度計で UV スペクトルを測定した。UV 検出器の検出範囲である 190 nm~380 nm を測定範囲として、水-メタノール (92+8) でブランク補正をして得られた結果は Fig. 3 のとおりであり、210 nm 付近以外で測定に適した吸収ピークは確認できなかったため測定波長は 210 nm を採用した。

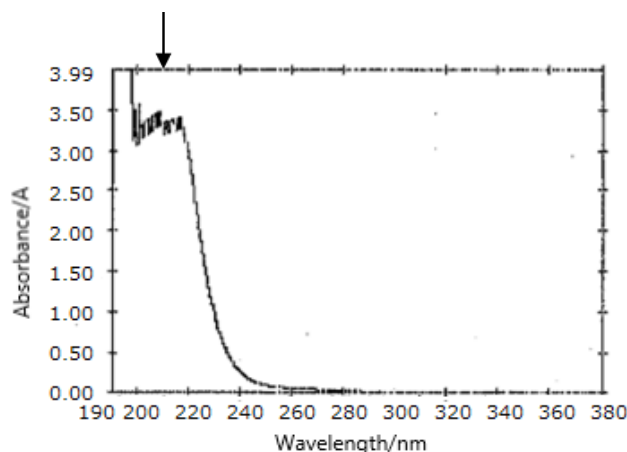


Fig. 3 UV spectrum of 3-NOP
(The arrow indicates a wavelength of 210 nm.)

4 まとめ

牛用配合飼料中の 3-NOP について、DSM 法を基に、LC を用いた分析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) 本法の 3-NOP の定量下限は 30 mg/kg、検出下限は 9 mg/kg であった。設定した定量下限及び検出下限は、妥当性確認ガイドラインに定められた目標を満たしていた。

文 献

- 1) 農林水産省：みどりの食料システム戦略，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），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) 横田 典明，長久保 眞平，山下 奈々，菊田 千乃，若宮 洋市：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，飼料研究報告，50，11-20 (2025).
- 7) 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).