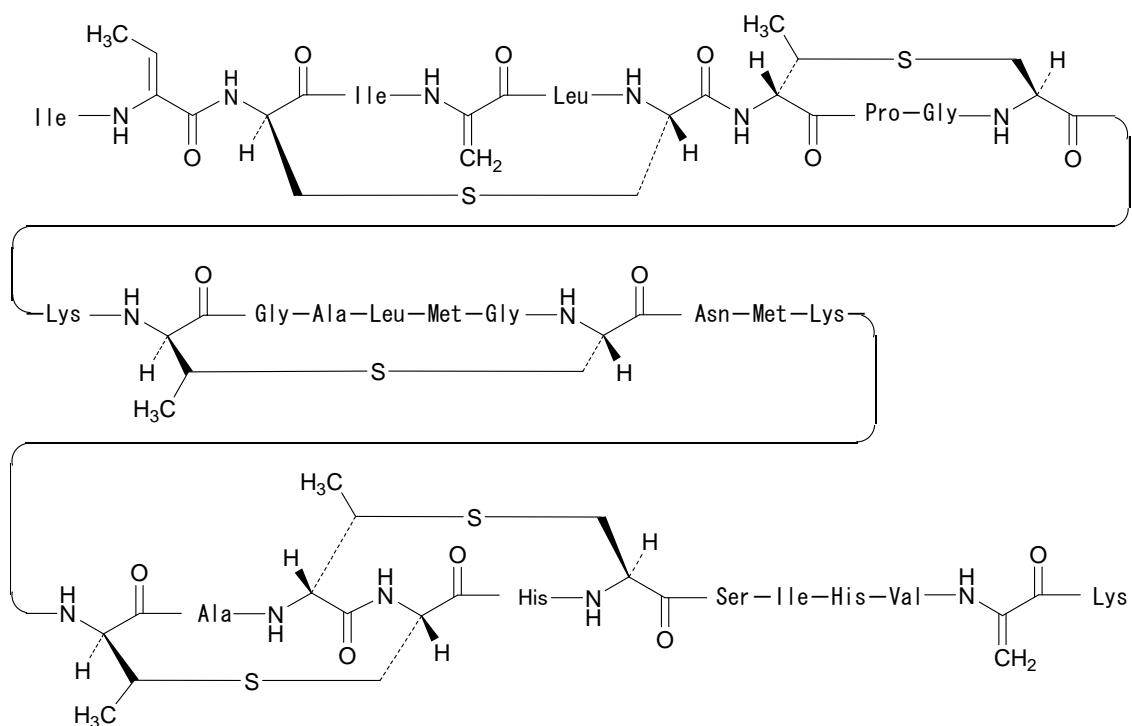


# ナイシン

Nisin



$C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$  : 3,354.07

## 1. 試験法の概要

食品中のナイシン<sup>1)</sup>は、メタノール・水・ギ酸混液 (5 : 4 : 1) 20mlで抽出し、ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム、弱酸性陽イオン交換樹脂ミニカラムでクリーンアップした後、液体クロマトグラフ・質量分析計 (LC/MS) により定性し、定量する。

同時に多数の検体の試験行う等スクリーニング試験法を併用した方が効率的と判断される場合には、別紙の試験法を用いて陽性と判断されたものについてのみ本試験による試験を実施しても差し支えない。

## 2. 試験法 (LC/MS)

### (1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

### (2) 試料液の調製

## ① 抽出

試料 20.0g を正確に量り、ヘキサン 20ml 及び混合溶媒 20ml を加え<sup>2)</sup>、室温で 3 分間ホモジナイズする。遠心分離 (10,000rpm, 20 分間, 5°C)<sup>3)</sup> 後、上澄液を分液漏斗に移し、下層を 50ml のメスフラスコに移す。遠心分離の残留物にヘキサン 20ml 及び混合溶媒 20ml を加え、同様にホモジナイズ及び遠心分離を行い、上澄液を分液漏斗に合わせ、下層を先のメスフラスコに移す。さらに、残留物にヘキサン 20ml 及び混合溶媒 20ml を加え、同様の操作を繰り返す。分液漏斗の下層を先のメスフラスコに移し、混合溶媒を加えて正確に 50ml とし、ポリフッ化ビニリデン製メンブレンフィルター (孔径 0.45 $\mu$ m)<sup>4)</sup> でろ過する。

## ② 精製

### a ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体カラムクロマトグラフィー

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム (1g)<sup>5)</sup> にメタノール及び 0.1vol% ギ酸含有 12.5vol% メタノール溶液各 10ml を順次注入し、流出液は捨てる。このカラムに、① で得られたろ液 5ml に水 15ml を加えて混和した液を注入した後、容器を 0.1vol% ギ酸含有 12.5vol% メタノール溶液 15ml で洗い、洗液をカラムに注入し、流出液は捨てる。0.1vol% ギ酸含有メタノール溶液 10ml を注入し、溶出液にリン酸緩衝液 10ml を加える。

### b 弱酸性陽イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィー

弱酸性陽イオン交換樹脂ミニカラム (360mg)<sup>6)</sup> にメタノール及びメタノール・リン酸緩衝液混液 (1:1) 各 3ml を順次注入し、流出液は捨てる。このカラムに a で得られた溶液を注入した後、容器をメタノール・リン酸緩衝液 (1:1) 10ml で洗い、洗液をカラムに注入し、流出液は捨てる。次いでメタノール 5ml を注入し、流出液は捨てる<sup>7)</sup>。次いで、アンモニア含有メタノール試液 4.5ml を注入する。溶出液は、あらかじめギ酸 200 $\mu$ l を入れた容器に受け<sup>8)</sup>、メタノールを加えて正確に 5ml としたものを試料液とする。

## (3) 定性用標準液及び定量用標準試料液の調製

100,000 単位に対応する<sup>9)</sup> ナイシン標準品<sup>10)</sup> を量り、0.1vol% ギ酸を加えて溶かして正確に 10ml とし、標準原液とする (この液 1ml は 10,000 単位を含む)。標準原液 1ml をとり、0.1vol% ギ酸に溶かして 10ml とし、定性用標準液とする (この液 1ml は 1,000 単位を含む)。また、標準原液 20 $\mu$ l をとり、試料液を加えて 1.0 ml とする (この液 1ml は、200 単位を含む)。この液 0.5ml をとり、試料液を加えて 1.0ml とする (この液 1ml は、100 単位を含む)。この操作を繰り返し、25, 50, 100, 200 単位/ml の標準試料液とする。

## (4) 測定法<sup>11)</sup>

### ① 測定条件<sup>12)</sup>

カラム: オクタデシルシリル化シリカゲル (粒子径 5 $\mu$ m, 細孔径 300 Å), 内径 2.0~4.6mm, 長さ 150~250mm)<sup>13)</sup>

カラム温度：40℃

移動相：A 0.1vol%ギ酸<sup>14)</sup>，B 0.1vol%ギ酸<sup>14)</sup>含有アセトニトリル<sup>15)</sup>

濃度勾配：A：B (90：10) から (50：50) までの直線濃度勾配を行う。

イオン化モード：ESI (+)

主なイオン(*m/z*)：1,119

保持時間の目安：15分<sup>16)</sup>

## ② 定性

試料液及び定性用標準液 30 $\mu$ l<sup>17)</sup>ずつを量り，LC/MSに注入し，定性用標準液との保持時間との一致，*m/z* 1,119, 839, 672 を確認する。

## ③ 定量（標準添加法）<sup>18)・19)</sup>

試料液及び標準試料液 30 $\mu$ l<sup>17)</sup>ずつを量り，LC/MSに注入し，試料液及び標準試料液のナイシンAのピーク面積を測定し，試料液及び各標準試料液中のナイシン添加濃度（単位/ml）を横軸に，ナイシンAのピーク面積を縦軸にとり，関係線を作成する。関係線の横軸との交点と原点との距離から，試料液中のナイシン濃度（単位/ml）を求め，次式によって検体中のナイシンAを含む抗菌性ポリペプチドの含量（g/kg）を計算する。

$$\text{ナイシン A を主とする抗菌性ポリペプチドの含量 (g/kg)} = \frac{C \times 50 \times 2.5 \times 10^{-5}}{W}$$

C：試料液中のナイシン濃度（単位/ml）

W：試料の採取量(g)

## 試薬・試液等

1. アセトニトリル：[高速液体クロマトグラフ用]
2. アンモニア水：[25.0～27.9%，特級]
3. アンモニア含有メタノール試液：アンモニア水 2.4ml にメタノールを加え 30 ml とする。
4. ギ酸：[98%，特級]
5. 0.1vol%ギ酸：ギ酸 1 ml に水を加えて 1L とする。
6. 0.1vol%ギ酸含有アセトニトリル：ギ酸 1 ml にアセトニトリルを加えて 1L とする。
7. 0.1vol%ギ酸含有メタノール：ギ酸 1 ml にメタノールを加えて 1L とする。
8. 0.1vol%ギ酸含有 12.5vol%メタノール溶液：ギ酸 1 ml に 12.5vol%メタノールを加えて

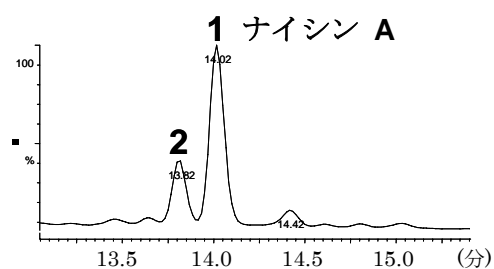
1L とする.

9. 混合溶媒：メタノール・水・ギ酸混液（5：4：1）
10. ヘキサン：[特級]
11. メタノール：[高速液体クロマトグラフ用]
12. 0.1vol%メタノール：メタノール 1ml に水を加えて 1L とする.
13. 12.5vol%メタノール：メタノール 125 ml に水を加えて 1L とする.
14. メタノール・リン酸緩衝液（1：1）：メタノールと 50mmol/L リン酸緩衝液（pH5.6）を 1：1 で混ぜ合わせる.
15. 50mmol/L リン酸緩衝液（pH5.6）：50mmol/L リン酸二水素カリウム溶液を調製し、50mmol/L リン酸水素二カリウム溶液を用いて pH5.6 に調整する.

[注]

- 1) ナイシンは、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* の培養液から得られた抗菌性ポリペプチドと塩化ナトリウムの混合物である。主たる抗菌性ポリペプチドはナイシン A である。ナイシン A は、34 アミノ酸残基からなり、分子量 3,354Da である。活性型分子にランチオニン、 $\beta$ -メチルランチオニン、デヒドロアラニン、デヒドロブチリンが含まれることが特徴である。ナイシン A の N 末端から 27 番目のヒスチジンがアスパラギンで置換されたものがナイシン Z である。なお、食品添加物として指定されているのはナイシン A である。
- 2) 液卵の場合は、混合溶媒（メタノール・水・ギ酸混液（5：4：1））による膨潤を防ぐために、溶媒を加える前に試料を 100℃で 10 分間加熱し液卵を凝固させる。ナイシンの安定性を検討するために、0.1%ギ酸に溶解させたナイシン標準品を 100℃で 10 分間加熱し HPLC-PDA で分析したところ、ナイシン A は安定であった。
- 3) 遠心分離用の遠沈管としてメタノール、ギ酸、ヘキサンに対して耐性のあるものを使用する。PA (polyallomer)製のもの（日立製 80PA ボトルクミ）などが使用できる。
- 4) ワットマンジャパン株式会社製、25 mm GD/X シリンジフィルター（PVDF 膜、孔径 0.45  $\mu$ m）等が使用できる。ナイシンの吸着を防ぐため、low protein binding と表記されているものを使用する。
- 5) 日本ウォーターズ株式会社製 Oasis HLB カートリッジ（1g, 20cc, Waters）等が使用できる。
- 6) Sep-Pak Accell Plus CM（Waters）等が使用できる。
- 7) カラムを乾燥させるため、空気を 5ml 注入する。
- 8) ナイシンは弱酸性（pH3～4）で最も安定であることから、溶出液はギ酸を入れた容器に受ける。
- 9) 標準品の表示力価に従い、採取量を計算する。1mg 当たり 1,000 単位の場合、採取量は 0.1g である。

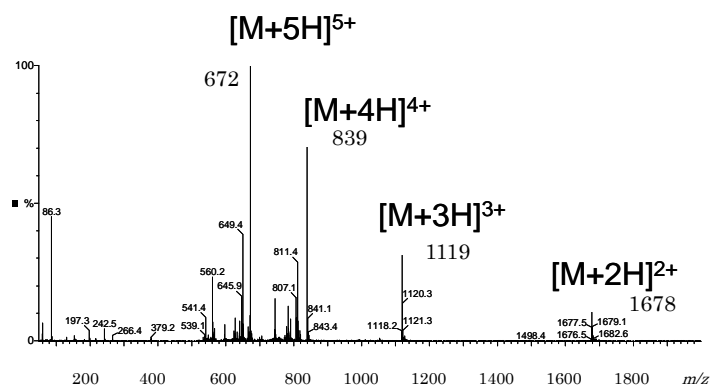
- 10) 日本公定書協会により頒布されるナイシン標準品を用いる。ナイシンの力価 1 単位はナイシン A ( $C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$ ) を含む抗菌性ポリペプチド  $0.025 \mu g$  に対応する。
- 11) ナイシンの主な抗菌性ペプチドはナイシン A であるが、ナイシン標準品中にはナイシン A から派生したと思われる類縁体が複数含まれている。ナイシン(10,000 単位/mL)の HPLC クロマトグラム (測定条件は、注 16) LC/MS 条件例(1)を参照のこと) を注図 1 a に示す。ナイシン A より分子量が 18 大きい類縁体がナイシン A より保持時間で 20 秒ほど前に観測される。



注図 1 ナイシン(10,000 単位/mL)の HPLC クロマトグラム(検出 210 nm).

1: ナイシン A, 2: ナイシン A に水が 1 分子付加したもの(分子量 3372),

ナイシン A について、ESI (+) でのスキャン測定の結果を注図 2 に示す。ナイシン A (分子量: 3354) は 3 価イオン ( $m/z$  1119) の他に、4 価 ( $m/z$  839) 及び 5 価イオン ( $m/z$  672) が観察される。



注図 2 ナイシン A の ESI (+) スキャン測定(40V)で得られた多価イオンピークプロファイル

- 12) 吸着を防ぐため、ラインは PEEK 製を用いる。
- 13) プロセスチーズの抽出液を SIM 測定した場合、ナイシン A のピーク近傍にプロセス

チーズ由来の大きな夾雑ピークが出現する。用いる C18 系カラムによってはナイシン A と重なる場合がある (Protein-R カラムでは分離ができた)。なお、この夾雑ピークは、試料液調製の際の陽イオン交換カートリッジ処理によって除去される。

- 14) ギ酸濃度を上げると 3 価イオンが出やすくなる。
- 15) 代替溶媒としてメタノールを用いることができるが、ピークが拡がり、高濃度のナイシン A の定量性が低下する場合があるので注意して用いる。
- 16) 保持時間が 15 分程度となるように、濃度勾配、流速を調整する。

LC/MS の条件例を以下に示す。

#### LC/MS 条件例(1)

(スキャン測定)

カラム：COSMOSIL Protein-R カラム (4.6 mm i.d. × 250 mm, ナカライテスク株式会社)

カラム温度：40℃

移動相：A 0.1vol%ギ酸, B 0.1vol%ギ酸含有アセトニトリル

濃度勾配：A : B (90 : 10) から (50 : 50) までの直線濃度勾配を 20 分間行う。

流速：0.5ml/分

(フォトダイオードアレイ検出器 測定波長：210~600nm)

イオン化法：ESI (+)

装置：Waters 2695 alliance, Waters Quattro micro

ソース温度：120℃

コーン電圧：40V(コーン電圧を上げると 3 価イオンが出やすくなる。)

コーン窒素流量：50L/h

デソルベーション窒素流量：500L/h

デソルベーション温度：400℃

キャピラリー電圧：4.25kV

スキャン範囲：100 ~ 2,000 Da

(SIM 測定)

移動相：A 0.1vol%ギ酸, B 0.1vol%ギ酸含有アセトニトリル

濃度勾配：A : B (77.5 : 22.5) から (70 : 30) までの直線濃度勾配を 7.5 分間行い、

(70:30) から (0 : 100) までの直線濃度勾配を 5 分間行う。

ターゲット MS： $m/z$  1,119 (ナイシン A の 3 価イオン)

コーン電圧： $m/z$  1,119 が最大になる点を設定。実験では 50V で最大値に達した。

その他の条件：スキャン測定に同じ。

#### LC/MS 条件例(2)

カラム：PLRP-S カラム (2mm i.d. × 150mm, 細孔径 300 Å 粒子径 3µm, ポリマー・

ラボラトリー社)

カラム温度：40℃

移動相：A 5vol%ギ酸 0.1vol%TFA 水溶液 B アセトニトリル C 水

濃度勾配：時間	A	B	C
0	5	20	75
13	5	35	60
14	5	95	0
18	5	95	0
19	5	20	75
30	5	20	75

流速：0.2ml/min

注入量：10µl

装置：Waters2695 alliance, Waters Quattro micro

イオン化法：ESI (+)

ターゲット MS：*m/z* 839 及び 1,119

ソース温度：150℃

コーン電圧：40V

コーン室素流量：60L/h

デソルベーション室素流量：600L/h

デソルベーション温度：400℃

キャピラリー電圧：4.00kV

- 17) 装置の感度により注入量は変更してもよい。
- 18) 0.1vol%ギ酸で検量線用標準液を調製した場合、低濃度（25～200 単位/ml）の範囲では累乗曲線に近似し直線性を示さない。これはタンパク質であるナイシンが、HPLCの流路等に非特異的に吸着するためと推察される。また、食品由来成分によりナイシンAのイオン強度が影響を受けるため、標準添加法により定量を行う。
- 19) 本試験法の定量限界は、ナイシンAを含む抗菌性ポリペプチドとして0.002g/kgとする。種々の食品についてのナイシンの添加回収率を注表1に示す。本試験法における回収率は、標準品のみを使った際に50%、食品からの添加回収では30～50%である。これは抗菌性ポリペプチドの器具等への非選択的な吸着によるためと考えられる。

注表1 ナイシンの各種食品での添加回収率

試料	添加量(g/kg)	回収率(%)*
ナチュラルチーズ	0.01250	34.0±5.6
ソーセージ	0.01250	44.9±4.1
ハム	0.01250	47.7±3.7

ホイップクリーム	0.01250	39.2±1.6
ケチャップ	0.01000	30.6±3.6
マヨネーズ	0.01000	59.4±9.4
プロセスチーズ	0.00625	28.9±6.7
クリームパン	0.00625	49.4±7.2
液卵	0.00500	43.9±3.4
味噌	0.00500	40.7±4.2
タピオカプティング	0.00300	60.5±0.9

\* LC/MS 移動相 : A 0.1vol%ギ酸, B 0.1vol%ギ酸含有アセトニトリル

\*\*3 試行の平均値±S.D



## 食品中のナイシンのスクリーニング法 (微生物学的定量法)

### 1. 材料

#### (1) 試験菌

*Micrococcus luteus* (ATCC 10240, NCIB 8166, NBRC 13867)<sup>1)</sup>

#### (2) 培地

培地の液性は水酸化ナトリウム試液又は塩酸 (1→10) を用いて調整する。なお、規定の培地と類似の成分を有し、同等又はより優れた菌の発育を示す他の培地を用いることができる。滅菌は高圧蒸気法で行う。

##### ① 種層用寒天培地

トリプトン 10g

肉エキス 3g

塩化ナトリウム 3g

酵母エキス 1.5g

ショ糖 1g

寒天 15g

水 1,000ml

全成分を混和し、121℃、15 分間滅菌する。滅菌後の pH は 7.4~7.6 とする。滅菌後、培地と同温度の 50%ポリソルベート 20 溶液を 2 ml 添加する。

##### ② 試験菌移植用斜面寒天培地

ブレインハートインフュージョン寒天 52g<sup>2)</sup>

水 1,000ml

全成分を混和し、121℃、15 分間滅菌する。滅菌後の pH は 7.2~7.6 とする。この寒天培地 9ml を内径約 16mm の試験管に分注して斜面培地とする。

### 2. 試験菌の継代保存

試験菌移植用斜面寒天培地により試験菌を 30℃<sup>3)</sup> で培養する。継代移植は1ヶ月から1ヶ月半の間隔で行う。

### 3. 試験菌液の調製

試験菌を試験菌移植用斜面寒天培地を用いて 30℃で 48 時間培養する。この菌<sup>4)</sup>を滅菌した生理食塩水 7mlに懸濁させ、試験菌液とする。

### 4. 種層寒天培地の調製

試験菌液を滅菌した生理食塩水で希釈した液 (1→10) 2mlを 48~51℃に保った種層用寒

天培地 100mlに加え<sup>5)</sup>、十分に混合し、種層寒天培地とする。

#### 5. 穿孔寒天平板の調製

内径 90±1mm、高さ 15~20mmのペトリ皿に約 20mlの種層寒天培地を入れ<sup>6)</sup>、寒天が水平になるように広げて固化させたものを種層寒天平板とする。種層寒天平板上の半径約 25~28 mmの円周上に、円筒をその中心間の距離が 30mm以上となるように一定間隔で 4 個並べる。円筒を置いた状態で種層寒天培地 20 mlを分注し、固化させた後、4℃にて 30~60 分保持し、滅菌したピンセット等を用いて培地より円筒を静かに抜き、穿孔寒天平板とする。

#### 6. ナイシン標準液の調製

ナイシン標準品<sup>7)</sup>約 0.1 gを精密に量り、塩酸 (1→600) 80mlに懸濁する。2 時間室温に置き、塩酸 (1→600) を加えて 100mlとし、これを標準原液とする。更に 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 (単位/ml) となるよう、標準原液を塩酸 (1→600) を用いて希釈し、標準液とする。

#### 7. ナイシン標準曲線の作成

穿孔寒天平板 5 枚を 1 組として用いる。ナイシン標準液を濃度ごとに異なる穿孔寒天平板の 4 箇所穴に 0.2mlずつ入れる。標準液分注後、蓋をし、30℃<sup>3)</sup>で 18 時間<sup>8)</sup>培養する。培養後、形成された阻止円の直径をノギスを用いて 0.1mm単位で測定する。ナイシン濃度  $x$  (単位/ml) の常用対数值  $\log x$  を横軸に、阻止円の直径  $y$  (mm) を縦軸にとり、ナイシン標準曲線 ( $y = \alpha \log x + \beta$ ) を作成し、定数  $\alpha$  及び  $\beta$  を求める。

#### 8. 食品中のナイシンの定量<sup>9)</sup>

試料<sup>10)</sup>5gを 0.02 mol/L塩酸 25mlでホモジナイズ抽出する。抽出液を遠心分離 (3,500 rpm, 10 分間) 後、約 5℃に冷却して上層の脂肪層を固化して分離する。脂肪層を分離した抽出液 2mlを 0.02 mol/L塩酸 38mlで希釈後、2 つに分割し、一方は、1mol/L水酸化ナトリウムで pH 11.0±0.1 に調整し、ナイシン確認用試料液とする。もう一方は、1mol/L塩酸で 2.0±0.1 に調整し、ナイシン定量用試料液とする。pH調整後、ナイシン確認用試料液及びナイシン定量用試料液を、それぞれ 10mlの試験管に 5ml分注し、沸騰水中で 10 分間加熱する。室温に冷却した後、ナイシン標準曲線の手法に従い、培養を行う。ナイシン確認用試料液について、発育阻止円が認められないことを確認する<sup>11)</sup>。また、ナイシン定量用試料液について、穿孔寒天平板を用いて得られる試験菌の発育阻止円の直径を測定し<sup>12)</sup>、以下の式により、試料液中のナイシン濃度 (単位/ml) を求め、検体中の抗菌性ペプチド含量 (g/kg) を計算する。試料中のナイシン A を含む抗菌性ポリペプチドの含量が、0.00156g/kg以上となったものを陽性と判定する。

$$I = \frac{\text{阻止円の直径(mm)} - \beta}{\alpha}$$

試料液のナイシン濃度 =  $10^I$ (単位/ml)

$$\text{ナイシン A を含む抗菌性ポリペプチドの含量 (g/kg)} = \frac{C \times 1.25 \times 10^{-2}}{W}$$

C : 試料液中のナイシン濃度 (単位/ml)

W : 試料の採取量 (g)

#### 試薬・試液等

1. 塩酸 : [特級]
2. 塩化ナトリウム : [特級]
3. 寒天 : [特級]
4. 酵母エキス : 市販品を用いる.
5. ショ糖 : 日本薬局方精製白糖を用いる.
6. 水酸化ナトリウム : [特級]
7. 生理食塩水 : 日本薬局方生理食塩液を用いる.
8. トリプトン : 市販品を用いる.
9. 肉エキス : 市販品を用いる.
10. ブレインハートインフュージョン寒天 : 市販品を用いる.
11. ポリソルベート 20 : 市販品を用いる.
12. 50%ポリソルベート 20 溶液の調製 : ポリソルベート 20 と水を 1 : 1 の重量比で混合し, 121°C, 15 分間高圧蒸気滅菌する.
13. 円筒 : 外径 8.0±1mm, 内径 6.0±0.1mm, 高さ 10.0±0.1mm のステンレス製のもの (ペニシリンカップ) を用いる.

#### [注]

- 1) 試験菌 *Micrococcus luteus* (ATCC 10240, NCIB 8166, NBRC 13867) は, (独)製品評価技術基盤機構(NITE)で分与(有料)している. また, Micro BioLogics 社でも取り扱っている.

- 2) ブレインハートインフュージョン 37.0g 及び寒天 15g を用いてもよい。
- 3) 菌の生育状態により、30～35℃の一定温度としてもよい。
- 4) 18～24 時間の培養を 3 代継代し、斜面培地上に生えた 3 代目の菌を用いてもよい。
- 5) 標準液により明瞭でかつ適当な大きさの阻止円を形成する量の試験菌液を加える。希釈液の濃度は適宜調節してもよい。
- 6) 厚さが 2～3 mm となるようにする。
- 7) 日本公定書協会により頒布されるナイシン標準品を用いる。ナイシン標準品は *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* の培養液から得られた抗菌性ポリペプチドの塩化ナトリウムとの混合物である。糖培地由来の成分を含む。主たる抗菌性ポリペプチドはナイシン A (C<sub>143</sub>H<sub>230</sub>N<sub>42</sub>O<sub>37</sub>S<sub>7</sub>) である。ナイシンの力価 1 単位は、ナイシン A (C<sub>143</sub>H<sub>230</sub>N<sub>42</sub>O<sub>37</sub>S<sub>7</sub>) を含む抗菌性ポリペプチド 0.025 μg に対応する。
- 8) 菌の生育状態により、18～24 時間の一定時間としてもよい。
- 9) 本試験法の定量限界は、ナイシン A を含む抗菌性ポリペプチドとして 0.00156g/kg とする。
- 10) 液卵は、鶏卵由来成分により阻止円が観測される場合がある。
- 11) ナイシンは、酸性では熱に強いが、アルカリ性では加熱により失活する。
- 12) 試料成分の影響により阻止円が大きく観測され、添加回収率が 200%以上となる場合がある。この様な場合は、試験抽出液を用いて検量線を作成する必要がある。