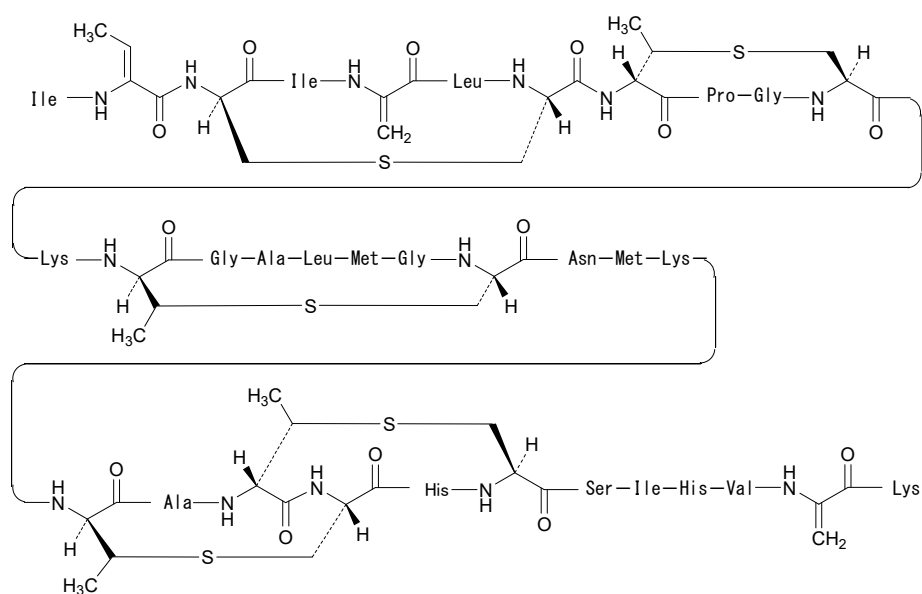


保存料

ナイシン

Nisin



$$C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7 : 3354.07$$

1. 分析法の概要

食品中のナイシン¹⁾は、メタノール/水/ギ酸混液（5：4：1）で抽出し、ポリマー固相抽出カラム、弱陽イオン交換固相抽出カラムで精製した後、液体クロマトグラフィー質量分析により定性し、定量する。

同時に多数の検体の試験を行う等スクリーニング法を併用した方が効率的と判断される場合には、ナイシンスクリーニング法（微生物学的定量法）を用いて陽性と判断されたものについてのみ本分析法による試験を実施しても差し支えない。（2009年設定、2019年改正）

2. 分析法（液体クロマトグラフィー質量分析）

(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) 試験溶液の調製

① 抽出

試料約 20 g を精密に量り、ヘキサン 20 mL 及びメタノール/水/ギ酸混液（5：4：1）20 mL を加え²⁾、室温で 3 分間ホモジナイズする。遠心（20 分間、10000 回転/分、5℃）

³⁾後、上清を分液漏斗に移し、下層を 50mL のメスフラスコに移す。沈殿物にヘキサン 20mL 及びメタノール／水／ギ酸混液（5：4：1）20mL を加え、同様にホモジナイズ及び遠心を行い、上清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、沈殿物にヘキサン 20mL 及びメタノール／水／ギ酸混液（5：4：1）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、メタノール／水／ギ酸混液（5：4：1）を加えて正確に 50mL とし、メンブランフィルター（0.45 μ m、ポリフッ化ビニリデン製）⁴⁾でろ過したものを抽出液とする。

② 精製

（a）ポリマー固相抽出カラム

ポリマー固相抽出カラムに、①で得られた抽出液 5 mL に水 15mL を加えて混和した液を負荷した後、容器を 0.1vol%ギ酸含有 12.5vol%メタノール溶液 15mL で洗い、カラムに注入し、洗液は捨てる。0.1vol%ギ酸含有メタノール溶液 10mL をカラムに注入し、溶出液に 50mmol/L リン酸緩衝液（pH5.6）10mL を加える。

（b）弱陽イオン交換固相抽出カラム⁵⁾

弱陽イオン交換固相抽出カラムに、a で得られた溶液を負荷した後、容器をメタノール／リン酸緩衝液混液（1：1）10mL で洗い、カラムに注入し、洗液は捨てる。次いでメタノール 5 mL を注入し、流出液は捨てる⁶⁾。次いで、アンモニア含有メタノール試液 4.5mL をカラムに注入する。溶出液は、あらかじめギ酸 200 μ L を入れた容器に受け⁷⁾、メタノールを加えて正確に 5 mL としたものを試験溶液とする。

（3）定性用標準溶液の調製

100000 単位に対応する⁸⁾ナイシン標準品⁹⁾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（濃度 10000 単位/mL）。標準原液 1 mL をとり、0.1vol%ギ酸に溶かして 10mL とし、定性用標準溶液とする（濃度 1000 単位/mL）。

（4）定量用標準試験溶液の調製

（3）の標準原液 20 μ L をとり、試験溶液を加えて 1.0mL とする（濃度 200 単位/mL）。この液 0.5mL をとり、試験溶液を加えて 1.0mL とする（濃度 100 単位/mL）。この操作を繰り返し、25、50、100、200 単位/mL の定量用標準試験溶液とする。

（5）測定法

① 測定条件^{10, 11)}

液体クロマトグラフ質量分析計（LC-MS）を用い、次の条件によって測定する。

カラム充填剤¹²⁾：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管：内径 2.0～4.6mm、長さ 150～250mm

カラム温度：40°C

移動相：A液 0.1vol%ギ酸¹³⁾

B液 0.1vol%ギ酸¹³⁾含有アセトニトリル¹⁴⁾

リニアグラジエントの条件¹⁵⁾

分	A (%)	B (%)
0	90	10
20	50	50

流速：0.5mL/分

イオン化モード：ESI (+)

検出法：スキャン (m/z 100 ~ 2000) 又は選択イオン検出 (SIM)

主なイオン： m/z 1119、839、672

注入量：30 μ L¹⁶⁾

② 定性¹⁷⁾

試験溶液及び定性用標準溶液をそれぞれLC-MSに注入し、クロマトグラム上に検出されたピークの保持時間が定性用標準溶液と一致すること及びマススペクトルの主要ピーク (m/z 1119、839、672) の強度比が定性用標準溶液と一致することを確認する。

③ 定量 (標準添加法)^{18,19)}

試験溶液及び定量用標準試験溶液をそれぞれLC-MSに注入し、モニターイオン (m/z 1119) より得られたクロマトグラムより試験溶液及び定量用標準試験溶液のナイシンAのピーク面積を求め、試験溶液及び各定量用標準試験溶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、試験溶液中のナイシン濃度 (単位/mL) を求め、次式²⁰⁾によって試料中のナイシン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：試験溶液中のナイシン濃度 (単位/mL)

W：試料の採取量 (g)

④ 定量限界 ナイシンAを含む抗菌性ポリペプチドとして0.002 g/kg

試薬・試液等

1. ナイシン標準品：[食品添加物公定書標準品]²¹⁾

2. ヘキサン：[特級]
3. メタノール：[高速液体クロマトグラフィー用]
4. ギ酸：[98%、特級]
5. ポリマー固相抽出カラム：ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体固相抽出カラム（1 g、20cc）。あらかじめメタノール 10mL 及び 0.1vol% ギ酸含有 12.5vol% メタノール溶液 10mL でコンディショニングしておく。
6. 12.5vol% メタノール：メタノール 125mL に水を加えて 1 L とする。
7. 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 1 L とする。
8. 0.1vol% ギ酸含有メタノール溶液：ギ酸 1 mL にメタノールを加えて 1 L とする。
9. リン酸二水素カリウム：[特級]
10. リン酸水素二カリウム：[特級]
11. 50mmol/L リン酸緩衝液（pH5.6）：50mmol/L リン酸二水素カリウム溶液に 50mmol/L リン酸水素二カリウム溶液を加えて pH5.6 に調整する。
12. 弱陽イオン交換固相抽出カラム：モノカルボキシシリル化ポリマー被覆シリカゲル固相抽出カラム（360mg）。あらかじめメタノール 3mL 及びメタノール/リン酸緩衝液（pH5.6）混液（1：1）3mL でコンディショニングしておく。
13. メタノール/リン酸緩衝液混液（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。
14. アンモニア水：[25.0~27.9%、特級]
15. 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 30mL とする。
16. 0.1vol% ギ酸：ギ酸 1mL に水を加えて 1 L とする。
17. アセトニトリル：[高速液体クロマトグラフィー用]
18. 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。

[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（ $C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$ ）である。ナイシン A は、34 アミノ酸残基からなり、分子量 3354Da である。活性型分子にランチオン、 β -メチルランチオン、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、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°C 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、0.1vol% ギ酸に溶解させたナイシン標準品を 100°C で 10 分間加熱しフォトダ

イオードアレイ検出器付液体クロマトグラフを用いて測定したところ、ナイシンAは安定であった。

- 3) 遠心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。ポリプロマー製のもの等が使用できる。
- 4) 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) 弱陽イオン交換固相抽出カラムにより、ナイシンAのピーク近傍に出現する（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）プロセスチーズ由来の大きな夾雑ピークが除去される。
- 6) カラムを乾燥させるため、空気を5 mL 注入する。
- 7) ナイシンは弱酸性（pH 3～4）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。
- 8) 標準品の表示力価に従い、採取量を計算する。1 mg 当たり 1000 単位の場合、採取量は0.1 g である。
- 9) ナイシンの力価1単位はナイシンA（C₁₄₃H₂₃₀N₄₂O₃₇S₇）を含む抗菌性ポリペプチド0.025μg に対応する。
- 10) 吸着を防ぐため、配管はピーク製を用いる。
- 11) 測定条件は例示である。用いるカラムによって流速及びグラジエント条件を調整する。また、コーン電圧は m/z 1119 が最大になる点を設定する。
- 12) 他の測定条件の例を以下に示す。

カラム：マクロポーラス型スチレンジビニルベンゼン充填カラム（2 mm×150mm、粒径3 μm）

カラム温度：40℃

移動相：A液 5 vol%ギ酸 0.1 vol% TFA 水溶液

B液 アセトニトリル

C液 水

リニアグラジエントの条件

分	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：0.2 mL/分

注入量：10 μL

イオン化モード：ESI (+)

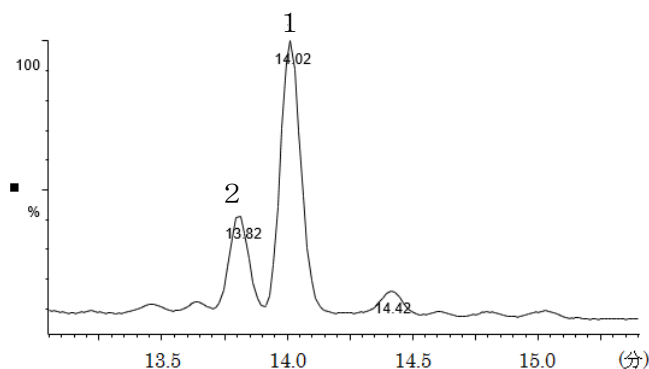
検出法：選択イオン検出法（S I M）
 モニターイオン： m/z 839 及び 1119
 ソース温度：150℃
 コーン電圧：40V
 コーン窒素流量：60 L/時
 デソルベーション窒素流量：600 L/時
 デソルベーション温度：400℃
 キャピラリー電圧：4.00kV

- 13) ギ酸濃度を上げると3価イオンが出やすくなる。
- 14) 代替溶媒としてメタノールを用いることができるが、ピークが広がり、高濃度のナイシンAの定量性が低下する場合がありますので注意して用いる。
- 15) 定量（検出法：S I M）には次のリニアグラジエントの条件を用いてもよい。

リニアグラジエントの条件

分	A (%)	B (%)
0	77.5	22.5
7.5	70	30
12.5	0	100

- 16) 装置の感度により注入量は変更してもよい。
- 17) 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。ナイシン標準原液（10000 単位/mL）のクロマトグラムを注図1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。

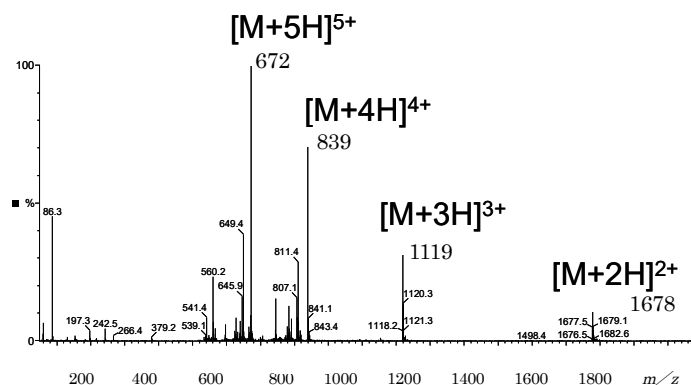


1. ナイシンA、2. ナイシンAに水が1分子付加したもの（分子量3372）

カラム：タンパク質分離用逆相カラム（4.6 mm×250 mm、粒径5 μm）、カラム温度：40℃、移動相：A液 0.1vol%ギ酸、B液 0.1vol%ギ酸含有アセトニトリル、リニアグラジエントの条件：B=22.5%からB=30%までのリニアグラジエント7.5分間、次いで、B=30%から100%までのリニアグラジエント5分間、流速：0.5mL/分、検出器：フォトダイオードアレイ検出器

注図1 ナイシン標準原液（10000 単位/mL）のクロマトグラム（測定波長210 nm）

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。



ESI (+) スキャン測定 (40V)

注図2 ナイシンAの多価イオンピークプロファイル

- 18) 0.1vol%ギ酸で検量線用標準溶液を調製した場合、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、液体クロマトグラフ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) 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。本分析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 ナイシンの各食品での回収率

食品	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

*3 試行の平均値±S.D

20)

$$\text{ナイシンAを主とする抗菌性ポリペプチドの含量 (g/kg)} = \frac{C \times 50 \times 0.025}{W \times 1000}$$

C : 試験溶液中のナイシン濃度 (単位/mL)

W : 試料の採取量 (g)

21) 一般財団法人医薬品医療機器レギュレーターリーサイエンス財団より製造・頒布されている。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。

ナイシンスクリーニング法（微生物学的定量法）

1. 材料

（1）試験菌

Micrococcus luteus（ATCC 10240、NCIB 8166、NBRC 13867）¹⁾を使用する。

（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ほか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 10 g
肉エキス 3 g
塩化ナトリウム 3 g
酵母エキス 1.5 g
スクロース 1 g
寒天 15 g
水 1000mL

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 52 g²⁾
水 1000mL

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 9 mL 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℃³⁾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⁴⁾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）2 mL を 48～51℃に保った種層用寒天

培地 100mL に加え⁵⁾、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

滅菌した内径 90±1 mm、高さ 15~20mm のペトリ皿に約 20mL の種層寒天培地を入れ⁶⁾、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 25~28mm の円周上に、円筒⁷⁾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 20mL 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. ナイシン標準溶液の調製

100000 単位に対応する⁸⁾ナイシン標準品⁹⁾を量り、塩酸 (1→600) 80mL に懸濁する。2 時間室温におき、塩酸 (1→600) を加えて正確に 100mL とし、これを標準原液とする。さらに 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、標準溶液とする。

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。ナイシン標準溶液を濃度ごとに異なる穿孔寒天平板の 4 ヲ所の穴に 0.2mL ずつ入れる。標準溶液分注後、ふたをし、30℃³⁾で 18 時間¹⁰⁾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) の常用対数値 $\log x$ 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 α 及び β を求める。

8. 食品中のナイシンの定量

試料¹¹⁾ 5 g を 0.02mol/L 塩酸 25mL でホモジナイズ抽出する。遠心 (10 分間、3500 回転/分) 後、約 5℃に冷却して上層 (脂肪層) を固化して除き、得られた液を抽出液とする。抽出液 2mL を 0.02mol/L 塩酸 38mL で希釈後、2 つに分割し、一方は、1 mol/L 水酸化ナトリウムで pH11.0±0.1 に調整し、ナイシン確認用試験溶液とする。もう一方は、1 mol/L 塩酸で pH2.0±0.1 に調整し、ナイシン定量用試験溶液とする。pH 調整後、ナイシン確認用試験溶液及びナイシン定量用試験溶液を、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。ナイシン確認用試験溶液について、発育阻止円が認められないことを確認する¹²⁾。また、ナイシン定量用試験溶液について、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¹³⁾、次式により、試験溶液中のナイシン濃度 (単位/mL) を求め、試料中の抗菌性ペプチド含量 (g/kg) を計算する¹⁴⁾。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、0.00156 g/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 : 試験溶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. ナイシン標準品 : [食品添加物公定書標準品]¹⁵⁾
2. 水酸化ナトリウム : [特級]
3. 水酸化ナトリウム試液 : 水酸化ナトリウム 4.3 g を水に溶かし、100mL とする。ポリエチレン瓶に保存する。
4. 塩酸 : [特級]
5. トリプトン : 市販品を用いる。
6. 肉エキス : 市販品を用いる。
7. 塩化ナトリウム : [特級] 又は [日局]
8. 酵母エキス : 市販品を用いる。
9. スクロース : 日本薬局方精製白糖を用いる。
10. 寒天 : [特級]
11. 50%ポリソルベート 20 溶液 : ポリソルベート 20 と水を 1 : 1 の質量比で混合し、121°C、15 分間高圧蒸気滅菌する。
12. ポリソルベート 20 : 市販品を用いる。
13. ブレインハートインフュージョン寒天 : 市販品を用いる。
14. 生理食塩水 : 日本薬局方生理食塩液を用いる。

[注]

- 1) 試験菌 *Micrococcus luteus* (ATCC 10240、NCIB 8166、NBRC 13867) は、独立行政法人製品評価技術基盤機構で分与 (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 37.0 g 及び寒天 15 g を用いてもよい。
- 3) 菌の生育状態により、30~35°C 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) 標準溶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) 外径 8.0±1 mm、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。
- 8) 標準品の表示力価に従い、採取量を計算する。1 mg 当たり 1000 単位の場合、採取量は 0.1g である。
- 9) 主たる抗菌性ポリペプチドはナイシン A ($C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$) であり、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 μ g に対応する。
- 10) 菌の生育状態により、18～24 時間の一定時間としてもよい。
- 11) 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。
- 12) 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。
- 13) 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。
- 14)

$$\text{ナイシン A を含む抗菌性ポリペプチドの含量 (g/kg)} = \frac{C \times 40 \times 12.5 \times 0.025}{W \times 1000}$$

C : 試験溶液中のナイシン濃度 (単位/mL)

W : 試料の採取量 (g)

- 15) 一般財団法人医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団より製造・頒布されている。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。