

Bestimmung von Nisin A in Käse mit LC/MS und LC/MS/MS

Autor(en): **Berger, Thomas / Bütikofer, Ueli / Mural, Lorenz**

Objekttyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchungen und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **96 (2005)**

Heft 5

PDF erstellt am: **30.06.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-981959>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Bestimmung von Nisin A in Käse mit LC/MS und LC/MS/MS

Thomas Berger¹, Ueli Bütikofer¹, Lorenz Mural², Konrad Rieder², Peter Rhyn³, Christian Züst⁴

¹Agroscope Liebefeld-Posieux (ALP), 3003 Bern

²Kantonales Laboratorium Bern, 3012 Bern

³Bundesamt für Gesundheit (BAG), 3003 Bern

⁴Hochschule für Technik und Informatik (HTI), Fachbereich Chemie, 3400 Burgdorf

Eingegangen am 15. März 2005, akzeptiert am 2. September 2005

Einleitung

Nisin ist ein von Bakterien (z.B. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) gebildetes Peptid, das andere Mikroorganismen hemmt oder gar abtötet (1, 2, 3, 4).

Nisin wird deshalb bereits seit Jahrzehnten als natürliches Konservierungsmittel für diverse Lebensmittel wie Gemüse, Käse, Fleisch und Kakao verwendet (5, 6, 7). In den letzten Jahren sind viele neue Anwendungen für Nisin publiziert und oft auch patentiert worden. So wurden 2004 in den Chemical Abstracts nicht weniger als 141 Publikationen über Nisin ausgewertet, davon 32 Patente. Häufigste Anwendung bleibt die Nahrungsmittelkonservierung (8, 9, 10). Nisinbeschichtete Verpackungsmaterialien verhindern die Bildung von Mikroorganismen in vor- und vakuumverpackten Nahrungsmitteln (11, 12, 13). Grosses Potential wird Nisin in der Entwicklung neuer Medikamente und Kosmetika und für weitere medizinische Applikationen zuerkannt (14, 15, 16, 17, 18).

Es ist auch gegen einige bei der Käseherstellung unerwünschte Bakterien wirksam, z.B. solche, die Buttersäure bilden und damit Fehlgärungen und/oder Spätblähungen verursachen (19). Nisin ist in der EU und der Schweiz als Konservierungsmittel in Käse zugelassen, im Endprodukt dürfen aber nicht mehr als 10 bzw. 12,5 mg/kg nachweisbar sein (Höchstwerte für ungeriefen, bzw. geriefen Käse). Während in einigen EU-Ländern Nisin als Konservierungsmittel bei der Käseproduktion eingesetzt wird, hat die Branche in der Schweiz einen freiwilligen Verzicht beschlossen.

Nisin kommt in zwei Formen als Nisin A und Nisin Z vor, die sich in einer Aminosäure unterscheiden (2, 20). In der Literatur sind verschiedene Methoden für die analytische Bestimmung von Nisin publiziert worden (21, 22, 23, 24, 25), die sich aber für die Überwachung der Höchstmengenregelung durch die staatliche Lebensmittelkontrolle oder durch die Produktionsbetriebe im Rahmen der Selbstkontrolle nur mit Einschränkungen eignen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Methode zur Bestimmung von Nisin A (nachfolgend als Nisin bezeichnet) in Käse für die Überwachung der vorgeschriebenen Höchstmengen zu entwickeln. Die Bestimmungsgrenze der Methode sollte zwischen 1 bis 5 mg/kg liegen und Nisin mit MS und MS/MS detektiert werden.

Methode

Vorversuche

Die Extraktion von Käse mit verdünnter Ameisensäure bei 80°C ergab stark trübe Lösungen. Nach Zentrifugation bei 3000 g waren die Lösungen immer noch trüb. Mit Ultrazentrifugation (mindestens 20000 g) konnte aber der Extrakt geklärt werden.

Die direkte LC/MS/MS-Bestimmung von Nisin in den Extrakten ohne zusätzliche Reinigungsschritte scheiterte, weil die nisinspezifischen Signale mit störenden Matrixsignalen überlagerten.

Für die chromatografische Trennung von Peptiden werden meistens Eluenten mit einem Zusatz von Trifluoressigsäure verwendet. Erfahrungsgemäss verschlechtert sich aber die Ionisation von Peptiden vor dem MS-Detektor in Anwesenheit von Trifluoressigsäure. Bei der Bestimmung von Nisin mit LC/MS/MS muss auf die Zugabe von Trifluoressigsäure zum Eluenten verzichtet werden, da sonst der sehr selektive Übergang $m/z\ 672 > 811$ nicht beobachtet werden kann.

Für die Bestimmung von Nisin mit LC/MS wurde zuerst ebenfalls ein Eluent ohne Trifluoressigsäure erprobt. Das Signal auf der Masse $m/z\ 672.1$ [Nisin +5H]⁵⁺ war deutlich stärker als das Signal auf der Masse $m/z\ 839.6$ [Nisin +4H]⁴⁺. Erste Messungen mit Käsextrakten zeigten aber, dass das Signal auf der Masse $m/z\ 672.1$ im Gegensatz zum Signal auf der Masse $m/z\ 839.6$ stark durch unbekannte Signale aus der Matrix gestört wird (Abb. 1). Die Reproduzierbarkeit des Signals auf der Masse $m/z\ 839.6$ war unbefriedigend. Viel versprechender waren Versuche mit Eluenten, die kleine Mengen Trifluoressigsäure enthielten. In einer Versuchsreihe wurde für das Signal auf der Masse $m/z\ 839.6$ eine optimale Konzentration der Trifluoressigsäure im Eluenten von 0,01 % ermittelt (Abb. 2).

Standardlösungen mit Konzentrationen unter 0,5 mg Nisin/L (90 nM) waren nicht immer stabil. Vermutlich adsorbieren die Oberflächen von Gefässen je nach Vorbehandlung geringe Mengen Nisin. Durch Zugabe von Rinderalbumin (BSA) kann die Adsorption von Nisin an die Gefässwände weitgehend verhindert werden, so dass die Standardlösungen auch über mehrere Tage stabil sind.

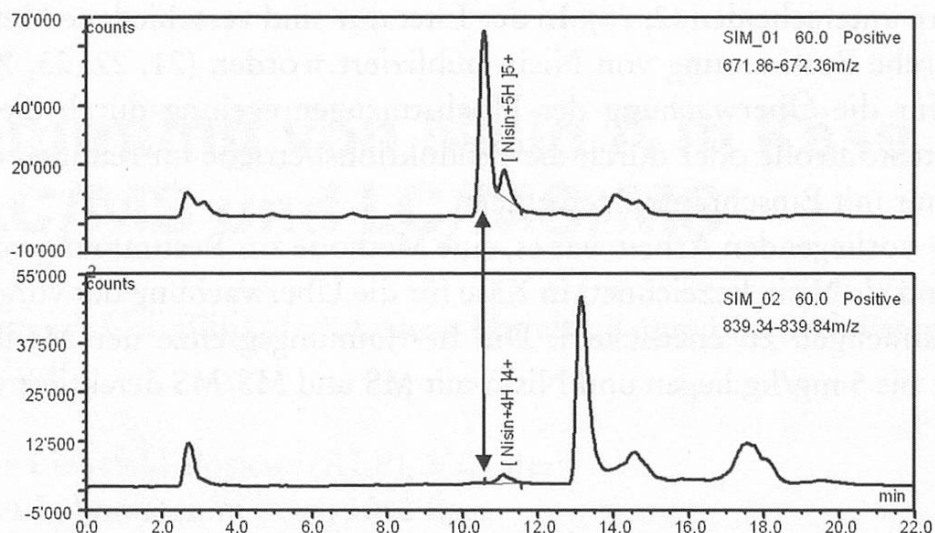


Abbildung 1 Matrixinterferenz auf dem Signal m/z 672 mit LC/MS

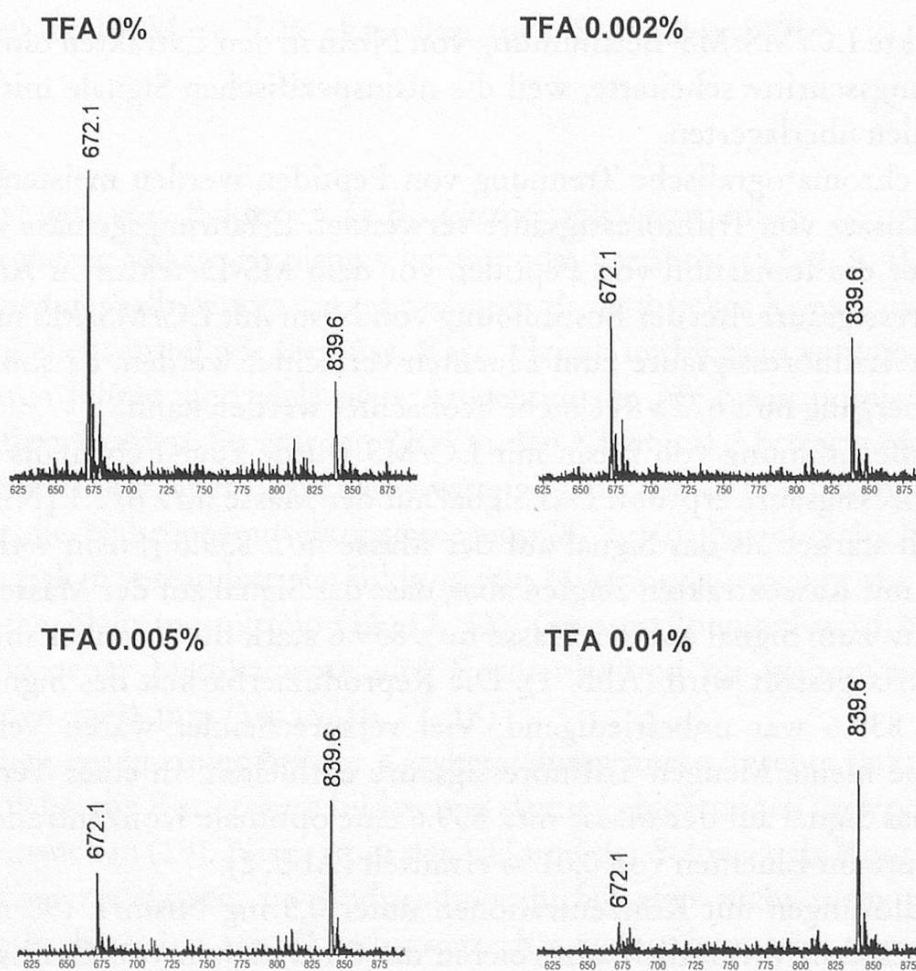


Abbildung 2 Einfluss der Trifluoressigsäure-Konzentration auf die Ladungsverteilung, LC/MS, Intensitätsskala (Ordinate) bei allen vier Massenspektren gleich

Prinzip

Die Probe wird zerkleinert und mit verdünnter Ameisensäure extrahiert. Nach Ultrazentrifugation werden störende Proteine mittels Filtration durch ein Molekularsieb oder Gelchromatographie (GFC) abgetrennt. Im gereinigten Extrakt wird Nisin an einer Polymer-Phase getrennt und mittels Massenspektrometrie detektiert.

Geräte

LC/MS mit folgenden Komponenten:

- Autosampler ASI-100, Dionex AG
- Hochdruckgradientenpumpe P680, Dionex AG
- Säulenthermostat TCC-100, Dionex AG
- Säule PLRP-S 150·2 mm, 300 Å, 3 µm, Polymer Laboratories
- Massenspektrometer MSQ, Dionex AG
- Integrationssoftware Chromeleon mit Excalibur, Dionex AG

LC/MS/MS mit folgenden Komponenten:

- Hochdruckgradientenpumpe LC-10Advp, Shimadzu
- Kontroller SCL-10Avp, Shimadzu
- Autosampler Perkin Elmer Series 200 mit thermostatisierbarem Probenrack (Betriebstemperatur 10°C)
- Säule PLRP-S 150·2 mm, 300 Å, 3 µm, Polymer Laboratories
- Säulenofen Pelcooler, Portmann Instruments AG
- Massenspektrometer API 3000, Applied Biosystems

Weitere Geräte:

- Analysenwaage, Genauigkeit ±0,01 mg
- Laborwaage, Genauigkeit ±10 mg
- Ultrazentrifuge mind. 20 800 g
- Laborzentrifuge mind. 3000 g
- Membranfilter (z.B. Millex-GV PVDF 0,22 µm, Millipore Art. SLGV 013 NL)
- Molekularsieb (z.B. Centricon YM-30, Millipore Cat. No. 4208)
- GFC-Säule (z.B. Macherey Nagel Nucleogel GFC 300, 7,7 mm·300 mm)
- Ultraschallbad (Telsonic TPC-120)

Reagenzien

- Nisin, Reinheit >95 % (z.B. AMBICIN N, Nutrition 21, Inc. 4 Manhattanville Road, Purchase, New York 10577-2197)
- Nisin aus *Streptococcus lactis*, 2,5 % (z.B. Fluka 72535)
- Albumin, Bovine (BSA), Reinheit >96 % (z.B. Sigma)
- Ameisensäure, Reinheit >99 % (z.B. Merck pro analysi)
- Trifluoressigsäure, Reinheit >99,8 % (z.B. Uvasol, Merck)
- Acetonitril, Reinheit >99,8 % (z.B. LiChrosolv, Merck)
- Reinstwasser Reinheit >18,2 MΩ

Lösungen

Stammlösung BSA

10 mg BSA in 10 mL Reinstwasser lösen.

Puffer BSA

80 mL Reinstwasser mit 20 mL Acetonitril, 0,5 mL Ameisensäure 100 %, 0,01 mL Trifluoressigsäure 100 % und 1 mL Stammlösung BSA mischen.

Ameisensäure $\beta=5$ g/L

0,50 mL Ameisensäure 100 % in einen 100 mL Messkolben pipettieren und mit Reinstwasser zur Marke auffüllen.

Standardstammlösung Nisin=100 mg/L

10,00 mg Nisin (Gehalt > 95 %) in einen 100 mL Messkolben einwiegen und mit Ameisensäure $\beta=5$ g/L zur Marke auffüllen. Täglich neu herstellen.

Standardlösungen mit Standardstammlösung und Puffer BSA täglich neu herstellen:

Standardlösung 1: Nisin=0,10 mg/L

Standardlösung 2: Nisin=0,20 mg/L

Standardlösung 3: Nisin=0,30 mg/L

Eluenten für LC/MS

Eluent A: 2,5 mL Ameisensäure 100 % und 0,05 mL Trifluoressigsäure 100 % in 500 mL Reinstwasser pipettieren.

Eluent B: 350 mL Acetonitril mit 150 mL Reinstwasser, 2,5 mL Ameisensäure 100 % und 0,05 mL Trifluoressigsäure 100 % mischen.

Eluenten für LC/MS/MS

Eluent C: 50 mL Acetonitril mit 450 mL Reinstwasser und 2,5 mL Ameisensäure 100 % mischen.

Eluent D: 400 mL Acetonitril mit 100 mL Reinstwasser und 2,5 mL Ameisensäure 100 % mischen.

Herstellung von Käse mit und ohne Nisin

Für die Überprüfung der Richtigkeit der Methode wurden in der Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux 5 Käse mit und ohne Zusatz von Nisin (Applied Microbiology Inc, Tarrytown NY 10591, USA) in die Käsemilch hergestellt (siehe Tabelle 1). Zu 200 g Milchkonzentrat (5fach konzentriert) wurden 3 mL Nisinlösung (in 0,01 mol/L HCl) zugegeben und auf 35 °C erwärmt. Die Mischung wurde mit 4 g Starterkultur MK 401 und 2 g Oberflächenkultur OMK 701 (beide von ALP) versetzt und gut gemischt. Danach wurden 0,04 mL Labextrakt (Hansen Standard 225) zugegeben, gut gerührt und in die Formen abgefüllt. Die Proben wurden anschliessend bei -18 °C gelagert.

Probenlagerung

Die Käseproben werden nach Eingang im Laboratorium bei max. 6 °C gelagert.

Tabelle 1
Herstellung von Käse mit Nisinzusätzen

Probe	berechneter Zusatz Nisin (mg/kg)	Bemerkungen
1	0	
2	7,5	
3	15,0	
4	22,5	
5	7,5	ohne Zusatz von Starterkultur MK 401

Probenzerkleinerung

Für die Untersuchung wird eine repräsentative Teilprobe mit einer Käseraffel geraffelt (handelsübliche Käseraffel, Lochdurchmesser ca. 2 mm).

Arbeitsvorschrift mit Molekularsieb (=A1)

- 2,50 g Probematerial in einen 100 mL Messkolben einwiegen, mit 70 mL Reinstwasser und 0,5 mL Ameisensäure 100 % versetzen.
- Messkolben im Schüttelwasserbad während 30 Minuten bei 80°C schütteln.
- Nach dem Abkühlen mit Wasser zur Marke auffüllen, schütteln=Extrakt.
- Ca. 1,5 mL Extrakt in ein 1,5 mL Tube (z.B. Eppendorf) pipettieren und während 10 Minuten bei 20800 g zentrifugieren.
- Tara des Auffangbehälters für das Molekularsieb (Centricon 30) auf der Analysenwaage bestimmen.
- Auffangbehälter auf das Molekularsieb aufsetzen und Analysenwaage auf null tarieren.
- 0,6 mL–0,7 mL des Extraktes durch ein Membranfilter (z.B. Millex-GV PVDF 0,22 µm) in das tarierte Molekularsieb filtrieren.
Die Menge des Extraktes im Molekularsieb auf der Analysenwaage wägen.
- Molekularsieb während 45 min bei 2800 U/min zentrifugieren.
- Brutto des Filterbehälters bestimmen, Nettogewicht Filtrat mit Wasser auf die Menge der Einwaage ergänzen (Korrektur der Peptidverteilung im Centricon 30, in der Regel ist die Wasserzugabe ca. 15 % des zum Zentrifugieren eingesetzten Extraktes).
- Filtrat in ein HPLC-Vial transferieren und messen.

Arbeitsvorschrift mit Gelchromatographie (=A2)

- 2,00 g Probematerial in ein 60 mL Zentrifugenglas mit Schraubverschluss einwiegen, mit 50 mL Reinstwasser und 0,5 mL Ameisensäure 100 % versetzen.
- Das Gemisch im verschlossenen Probegefäß während 10 Minuten bei 80°C im Ultraschallbad behandeln, anschliessend 30 Sekunden von Hand kräftig schütteln und weitere 10 Minuten bei 80°C im Ultraschallbad behandeln.
- Die milchige Emulsion im Kühlschrank auf ca. 30°C abkühlen und während 45 Minuten bei 15°C und 3000 g zentrifugieren.

- 2-mal 1,8 mL der trüben Lösung in ein 2 mL Tube (z.B. Eppendorf) pipettieren und 20 Minuten bei 20°C und 20 800 g zentrifugieren.
- Aus den zentrifugierten Tubes ca. 1 mL der klaren Lösung entnehmen und durch ein Membranfilter (z.B. Millex-GV PVDF 0,22 µm) filtrieren.
- Den filtrierten Extrakt wie folgt über eine GFC-Säule reinigen:
 Säule: GFC 300, 7,7 mm · 300 mm
 Eluent: Wasser/Methanol/Trifluoressigsäure (800:200:2 v:v)
 Fluss: 1 mL/min
 Detektion: 210 nm
 1,0 mL des filtrierten Extraktes auf die GFC-Säule geben, im Elutionsbereich (9,2 min. bis 12,2 min.) von Nisin die Fraktion während 3 Minuten auffangen. Die erhaltene Fraktion gut mischen und zirka 1 mL in ein HPLC-Vial transferieren und gemäss den Bedingungen in der Tabelle 2 messen.

Tabelle 2
Bedingungen LC/MS und LC/MS/MS

<i>Bedingungen</i>	<i>LC/MS (=B1)</i>			<i>LC/MS/MS (=B2)</i>		
Einspritzvolumen in µl	5			10		
Säule	PLRP-S 150 · 2 mm, 300 A, 3 µm, Polymer Laboratories					
Temperatur Säule in °C	40			30		
Massendetektor	Ion Mode ESI + Probe 500°C Needle 3,5 kV			Ion Mode ESI + Stickstoff 8 L/Min 350°C		
Detektion	Masse 839,6 Span 0,5 Dwell Time 1,0 Cone 60 V			Masse Q1/Masse Q3 672/672 672/811 (selektivster Übergang) 672/649 840/840		
Flussrate	0,25 ml/min			0,20 ml/min		
Retentionszeit Nisin	etwa 13 min			etwa 5,7 min		
Gradient	Min	%A	%B	Min	%C	%D
	0	70	30	0	85	15
	13	40	50	1	85	15
	13,1	0	100	4	65	35
	17	0	100	6	65	35
	17,1	70	30	9	10	90
	23	70	30	12	10	90
				12,1	85	15
				16	85	15

Berechnung

Aufarbeitung mit Molekularsieb

$$\text{mg Nisin pro kg} = \frac{\text{MW} \cdot 100}{\text{EW}}$$

MW = Messwert der Probelösung (mg/L)

EW = Einwaage (g)

Aufarbeitung mit GFC

$$\text{mg Nisin pro kg} = \frac{\text{MW} \cdot 157,5^{\text{a}}}{\text{EW}}$$

MW = Messwert der Probelösung (mg/L)

EW = Einwaage (g)

a: 50 ml Wasser plus 2 g Probenmaterial (ca. 2 ml) plus 0,5 ml Ameisensäure multipliziert mit einem Faktor von 3 (bedingt durch die GFC)

Ergebnisse und Diskussion

Kalibrierung LC/MS (B1)

Die Standardlösungen wurden je dreifach gemessen. Die prozentuale Standardabweichung lag im Bereich von 3 %–5 % und die Kalibrierkurve war im Messbereich linear ($R^2 > 0,99$).

Kalibrierung LC/MS/MS (B2)

Alle Glaswaren wurden unmittelbar vor Gebrauch mit Methanol und dem Lösungsmittelgemisch gespült. Die Standardlösungen wurden aus einer Stammlösung durch Verdünnen mit einem Lösungsmittelgemisch bestehend aus Wasser/Acetonitril/Trifluoressigsäure (500:500:1 v:v) hergestellt.

Die Kalibrierung mit vier Messpunkten ergab eine lineare Funktion ($R^2 > 0,99$). Die Bestimmungsgrenze in der Messlösung (Übergang 672 > 811) lag bei 0,01 mg pro L.

Vergleichsversuch und Wiederholpräzision

Eine Käseprobe mit Nisin wurde gemäss den Arbeitsvorschriften A1/B1 und A2/B2 mehrfach aufgearbeitet und gemessen. Die Übereinstimmung der Resultate und die Wiederholpräzision waren gut (Tabelle 3).

Tabelle 3

Bestimmung der Wiederholpräzision mittels LC/MS und LC/MS/MS

	A1/B1	A2/B2
Bestimmung 1	1,7 mg/kg	1,9 mg/kg
Bestimmung 2	1,8 mg/kg	1,9 mg/kg
Bestimmung 3	1,8 mg/kg	2,1 mg/kg
Bestimmung 4	1,9 mg/kg	2,0 mg/kg
Bestimmung 5	1,8 mg/kg	1,6 mg/kg
Bestimmung 6	1,8 mg/kg	2,4 mg/kg
Mittelwert	1,8 mg/kg	2,0 mg/kg
Standardabweichung	0,06	0,25
Variationskoeffizient	3,3 %	13 %

A1 Aufarbeitung Molekularsieb

A2 Aufarbeitung Gelchromatographie

B1 Messung LC/MS

B2 Messung LC/MS/MS

Wiederfindung von Nisin in Käse

Die in der Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux hergestellten Käseproben (siehe Abschnitt Herstellung von Käse mit und ohne Nisin) wurden gemäss der Arbeitsvorschrift A1/B1 aufgearbeitet und mit LC/MS (B1) gemessen. Die Wiederfindung lag im Bereich von 58 %–81 %. Sie war unabhängig von der Lagerzeit und der zugesetzten Menge Nisin (Tabelle 4). Für die Bestimmung der Wiederfindung wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

Tabelle 4

Wiederfindung von Nisin in Käse mit Zusätzen (N=2)

Probe	berechneter Zusatz Nisin (mg/kg)	Wiederfindung sofort	Wiederfindung nach 2 Monaten
1	0	n.n.	n.n.
2	7,5	63,2±1,9 %	71,7±7,9 %
3	15,0	65,5±2,1 %	63,9±1,7 %
4	22,5	58,8±0,3 %	60,8±5,8 %
5	7,5	67,7±3,8 %	81,1±2,3 %

n.n. nicht nachweisbar

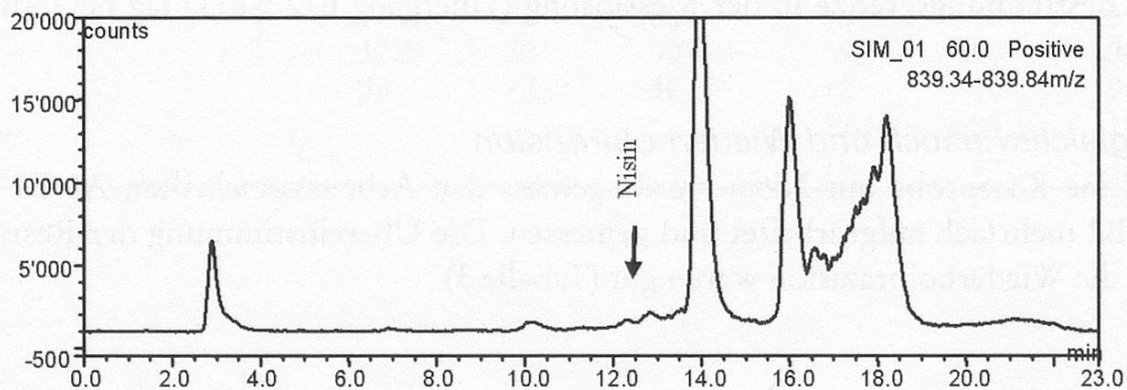


Abbildung 3 Nullprobe Grana Padano mit LC/MS

Käseproben ohne Nisin («Nullproben»)

Verschiedene Käsesorten wurden gemäss Arbeitsvorschriften A1 oder A2 aufgearbeitet. Die Chromatogramme der Probelösungen von Kuhmilchkäse wie Grana Padano, Mascarpone und Fol Epi wiesen im Bereich von Nisin keine störenden Matrixsignale auf (Abb. 3, Grana Padano, Nisin <0,5 mg/kg, nach A1, LC/MS und Abb. 4, Grana Padano, nach A2, LC/MS/MS). In den Chromatogrammen von Probelösungen aus Schafmilchkäse traten jedoch mit LC/MS – im Gegensatz zur Bestimmung mit LC/MS/MS (Abb. 5, Manchego ohne Nisin und mit Nisin dotiert, A2, LC/MS/MS) – störende Matrixsignale auf (Abb. 6, Manchego ohne Nisin und mit Nisin dotiert, A1, LC/MS).

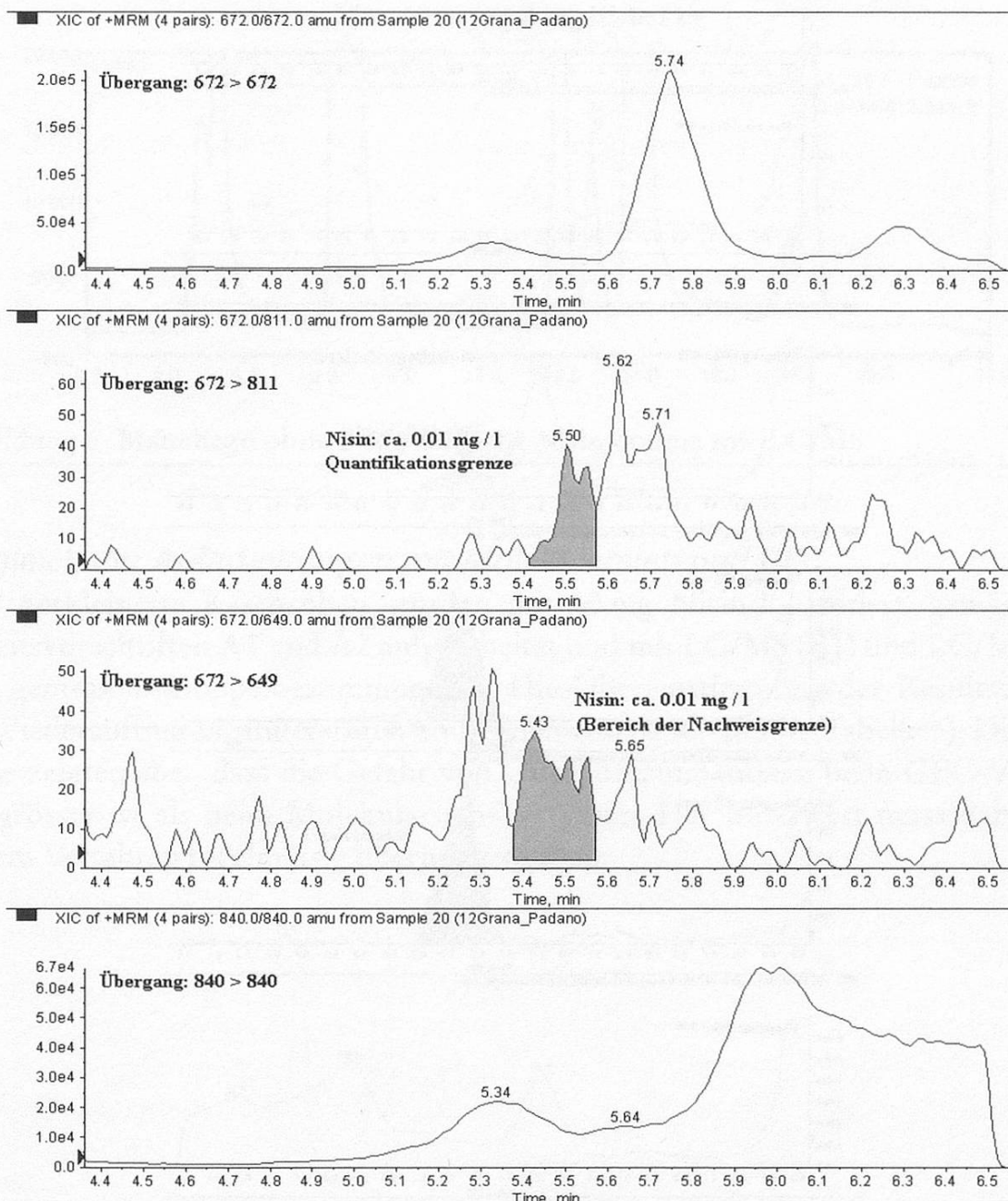


Abbildung 4 Nullprobe Grana Padano mit LC/MS/MS

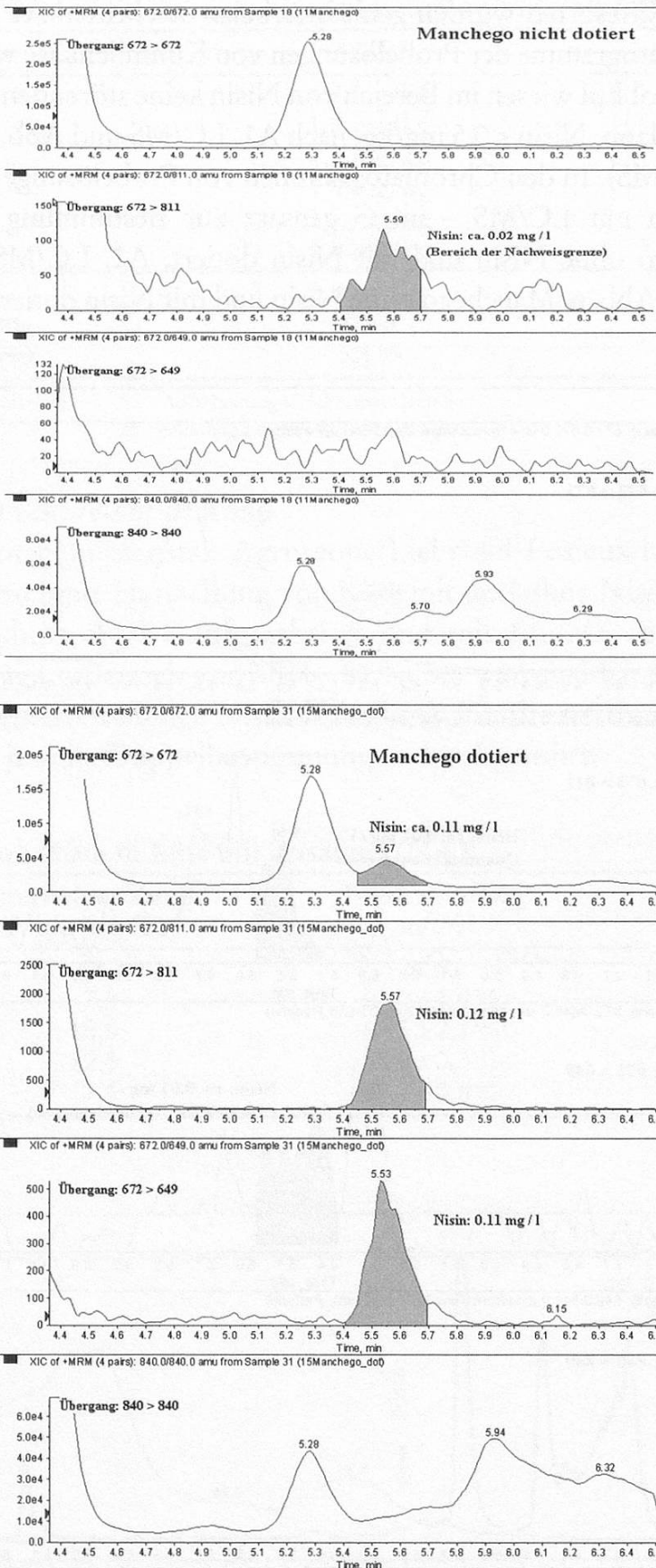


Abbildung 5 Manchego ohne Nisin und mit Nisin dotiert mit LC/MS/MS

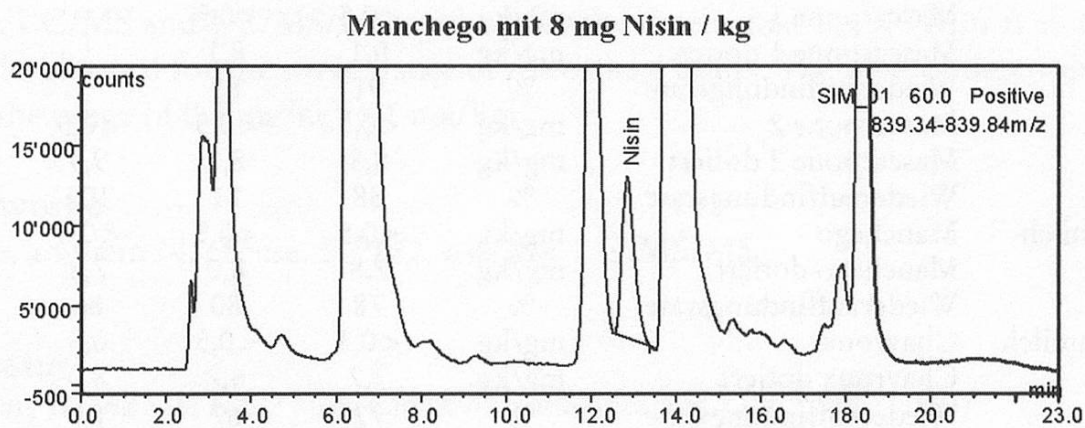
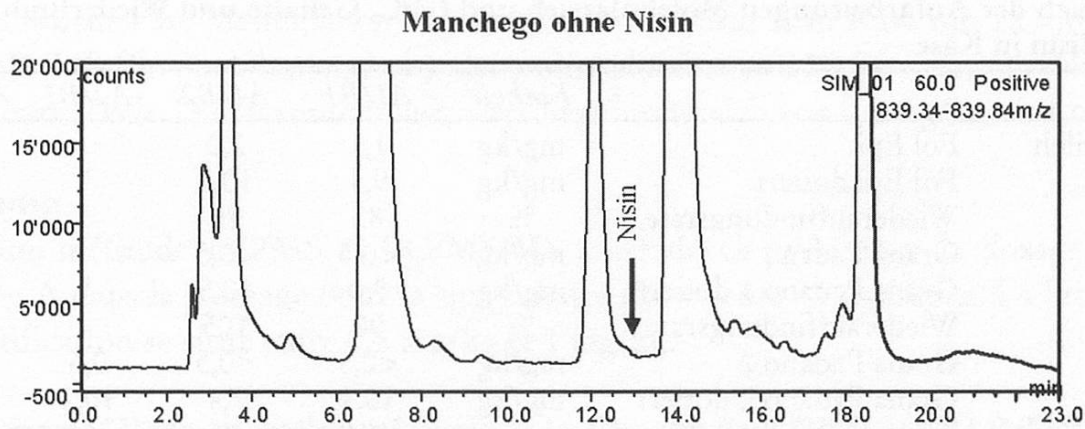


Abbildung 6 Manchego ohne Nisin und mit Nisin dotiert mit LC/MS

Vergleich der Aufarbeitungen mit Molekularsieb und GFC

7 zerkleinerte Käseproben wurden mit 10 mg Nisin/kg dotiert, gemäss den Arbeitsvorschriften A1 und A2 aufgearbeitet und mit LC/MS (B1) und LC/MS/MS (B2) gemessen (Doppelbestimmungen). Die Übereinstimmung der Resultate und die Wiederauffindungsraten lagen im Bereich von 61 %–105 % (Tabelle 5). Die Versuche zeigten aber, dass die Gefahr von Querkontaminationen beim GFC-Verfahren grösser ist als beim Molekularsieb-Verfahren. Der Blindwert muss daher bei diesem Verfahren regelmässig überprüft werden.

Tabelle 5

Vergleich der Aufarbeitungen Molekularsieb und GFC, Gehalte und Wiederfindungen von Nisin in Käse

		<i>Einheit</i>	<i>A1/B1</i>	<i>A1/B2</i>	<i>A2/B1</i>	<i>A2/B2</i>
Kuhmilch	Fol Epi	mg/kg	1,1	2,0		
	Fol Epi dotiert	mg/kg	9,4	10,5	1	1
	Wiederauffindungsrate	%	83	85		
	Grana Padano 1	mg/kg	<0,5	<0,5		
	Grana Padano 1 dotiert	mg/kg	9,0	10,5	1	1
	Wiederauffindungsrate	%	90	105		
	Grana Padano 2	mg/kg	<0,5	<0,5	0,6	0,9
	Grana Padano 2 dotiert	mg/kg	10,4	7,4	10,2	8,5
	Wiederauffindungsrate	%	104	74	105	84
	Mascarpone 1	mg/kg	<0,5	<0,5		
	Mascarpone 1 dotiert	mg/kg	9,1	8,1	1	1
	Wiederauffindungsrate	%	91	81		
	Mascarpone 2	mg/kg	<0,5	<0,5	<0,5	<0,8
	Mascarpone 2 dotiert	mg/kg	8,8	8,1	9,4	8,1
	Wiederauffindungsrate	%	88	81	103	89
Schafmilch	Manchego	mg/kg	<0,5	<0,5	<0,5	1,5
	Manchego dotiert	mg/kg	7,8	8,0	7,8	8,9
	Wiederauffindungsrate	%	78	80	86	81
Ziegenmilch	Chavroux	mg/kg	<0,5	<0,5	0,6	<0,8
	Chavroux dotiert	mg/kg	7,2	6,7	8,0	8,9
	Wiederauffindungsrate	%	72	67	81	98

¹ Nicht untersucht

A1 Aufarbeitung Molekularsieb Dotierung=10,0 mg Nisin/kg

A2 Aufarbeitung Gelchromatographie Dotierung=9,1 mg Nisin/kg

B1 Messung LC/MS

B2 Messung LC/MS/MS

Vergleich der Bestimmungsmethoden LC/MS und LC/MS/MS

Verschiedene Probelösungen (Aufarbeitungen A1 und A2) wurden mit den beiden Bestimmungsmethoden B1 und B2 untersucht. Die Resultate stimmten gut überein (Tabelle 5).

Abschätzung der Bestimmungsgrenzen

Die abgeschätzte Bestimmungsgrenze für Nisin in Käse liegt bei beiden Verfahren (A1/B1 und A2/B2) im Bereich 0,5 bis 1 mg/kg.

Dank

Die Autoren danken dem BAG, vertreten durch Herrn Urs Stalder (Vollzug Lebensmittelrecht), für das Interesse und die Bereitschaft eine Expertengruppe einzusetzen und die Arbeiten finanziell zu unterstützen.

Zusammenfassung

Es wurde eine Methode zur Bestimmung von Nisin A in Käse mit LC/MS und LC/MS/MS für die Überwachung der vorgeschriebenen Höchstwerte für Nisin in Käse entwickelt. Die Bestimmungsgrenze liegt im Bereich von 0,5 mg/kg bis 1 mg/kg.

Résumé

Une méthode LC/MS et LC/MS/MS a été développée pour la dosage de la Nisine A dans le fromage pour la surveillance des valeurs de tolérance. La limite de quantification se situe entre 0,5 mg/kg et 1 mg/kg.

Summary "Determination of Nisin A in Cheese by LC/MS and LC/MS/MS"

A LC/MS and LC/MS/MS method for the determination of Nisin A in cheese was developed for the surveillance of the official limits. The limit of determination is in the range of 0.5 mg/kg to 1 mg/kg.

Key words

Nisin, ambicin N, cheese, HPLC, LC/MS, LC/MS/MS

Literatur

- 1 Jung G. and Sahl H.G.: Nisin and novel antibiotics. ESCOM, Leiden (1991)
- 2 Tiemann U.: Untersuchung zur Struktur und Aktivität von Nisin. Dissertation, Technische Universität. München (1970)
- 3 Dalton L.: Antibiotic action revealed by NMR. C & EN, 20, 12, (2004)
- 4 Arques J.L., Nunez M., Medina M. and Rodriguez E.: Synergistic effect of reuterin in combination with nisin on *Staphylococcus aureus* in milk. *Milchwissenschaft*, 59, 7/8, 373–375 (2004)
- 5 Sallami L., Kheadr E.E., Fliss I. and Vuilleumard J.C.: Impact of autolytic, proteolytic, and nisin-producing adjunct cultures on biochemical and textural properties of cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 87, 1585–1594 (2004)
- 6 Henning S.: Untersuchung zur Wirkungsweise von Nisin und dessen Anwendung in der Lebensmitteltechnologie. Dissertation, Univ. Stuttgart-Hohenheim (1984)
- 7 Tramer J. and Fowler G.G.: Estimation of nisin in foods. *J. Sci. Food Agric.*, 15, 522–528 (1964)
- 8 Pasch John H., Allen Charlotte L., Gerulis Susan M., Brooks Scott D., Jackson Linda K., Roman Michael G., Wisler John R., Zheng Zuoxing, Brose Cecily E. and Begg Peter.: Stabilization of cooked and fully hydrated potato compositions by nisin-containing antibacterial additives U.S. Pat. Appl. US2004228949 (2004)
- 9 Nauth K.R. and Zheng Z.: Anti-listeria compositions for use in food products, U.S. Pat. Appl. US2004175473 (2004)
- 10 Kargel C.B. and Griebel J.M.: Dough compositions comprising encapsulated organic acid and natural antimicrobial agent PCT Int. Appl. (2004) WO 2004068967 A1 20040819
- 11 Luchansky J.B. and Call J.E.: Evaluation of nisin-coated cellulose casings for the control of *Listeria monocytogenes* inoculated onto the surface of commercially prepared frankfurters, *J. Food Protection* 67 (5), 1017–1021 (2004)
- 12 Marek M., Kralova E., Stastnikova V., Dobias J., Voldoich M., Dobian J. and Voldoich M.: Food packaging materials with preservative coating, PCT Int. Appl. (2004) WO 2004056214
- 13 Kuethe D., Forest K. and Vernon D.: Method for controlling microbial contamination of a vacuum-sealed food product, U.S. Pat. Appl. Publ. (2004), US 2004018284 A1 20040129

- 14 *Finegold S.M.*: Method of treating diseases associated with abnormal gastrointestinal flora U.S. Pat. Appl. Publ. (2004) US 2004170617 A1 20040902
- 15 *Turner S.R., Love R.M. and Lyons K.M.*: An in-vitro investigation of the antibacterial effect of nisin in root canals and canal wall radicular dentine. *International endodontic journal* **37**(10), 664–71 (2004)
- 16 *Thorel J.N.*: Use of nisine in topical cosmetic and/or pharmaceutical formulations. Fr. Demande (2004), FR 2847165 A1 20040521
- 17 *Aranha C., Gupta S. and Reddy K.V.R.*: Contraceptive efficacy of antimicrobial peptide Nisin: in vitro and in vivo studies. *Contraception* **69** (4), 333–8 (2004)
- 18 *Zanini D.*: Biomedical devices with peptide-containing coatings. U.S. Pat. Appl. Publ. (2004), US 2004121939 A1 20040624
- 19 *Lipinski E., Gudkow A.W. und Karlinkova S.N.*: Verwendung von Nisin bei der Käseherstellung. VEB Fachbuchverlag, Leipzig (1976)
- 20 *Kuze N. and Takashi M.*: Analysis of nisin in processed cheese using mass spectrometry coupled with liquid chromatography. *Foods Food Ingredients J. Jpn.*, **208**, 12, 1032–1036 (2003)
- 21 *Reunanen J. and Saris P.E.J.*: Microplate bioassay for nisin in foods, based on nisin induced green fluorescent protein fluorescence. *Appl. Env. Microbiol.*, **69**, 7, 4214–4218 (2003)
- 22 *Bouksamin M., Fliss I., Meghrouj J., Simard R. and Lacroix C.*: Immunodot detection of nisin Z in milk and whey using enhanced chemiluminescence. *J. Appl. Microbiol.*, **84**, 176–184 (2003)
- 23 *Pfeiffer P. und Orben C.*: Bestimmung von Nisin in Wein nach Festphasenextraktion und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie. *Dt. Lebensm. Rundsch.*, **93**, 47–49 (1997)
- 24 *Suarez A.M., Rodriguez J.M., Hernandez P.E. and Azcona-Olivera J.I.*: Generation of polyclonal antibodies against nisin: immunization strategies and immunoassay development. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 2117–2121 (1996)
- 25 *Falakee M.B., Adams M.R., Dale J.W. and Morris B.A.*: An enzyme immunoassay for nisin. *Int. J. Food Sci. Tech.*, **25**, 590–595 (1990)

Korrespondenzadresse:

Dr. Konrad Rieder, Kantonales Laboratorium, Muesmattstrasse 19, CH-3012 Bern,
 Telefon: +41 31 633 11 11, E-Mail: konrad.rieder@gef.be.ch