

ICS 67.050

CCS X80

T/CNHFA

中国营养保健食品协会团体标准

T/CNHFA XXXX—XXXX

β -烟酰胺单核苷酸（NMN）的测定 核磁共振波谱法

Determination of β -nicotinamide mononucleotide (NMN)—nuclear magnetic resonance spectrometry

（征求意见稿）

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

中国营养保健食品协会 发布

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由***提出。

本文件由中国营养保健食品协会归口。

本文件起草单位：***。

本文件主要起草人：****、*****。

β-烟酰胺单核苷酸（NMN）的测定

核磁共振波谱法

1 范围

本文件规定了β-烟酰胺单核苷酸（NMN）的测定方法——核磁共振波谱法。

本文件适用于β-烟酰胺单核苷酸（NMN）的定量检测，适用的产品类别包括NMN原料，及以NMN为主要/标志性成分生产的片剂、粉剂、颗粒剂等。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

JY/T 0578-2020 超导脉冲傅里叶变换核磁共振波谱测试方法通则

JJF 1448-2014 超导脉冲傅里叶变换核磁共振波谱仪校准规范

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

4.1 NMN: nicotinamide mononucleotide, β-烟酰胺单核苷酸。

4.2 NMR: nuclear magnetic resonance, 核磁共振。

5 方法原理

化合物氢原子所处化学环境不同，其信号峰出峰位置和裂分情况会有所不同，在充分弛豫条件下，信号峰的峰面积与氢原子数量成正比。选择合适的特征信号峰和内标物，使用核磁共振波谱仪采集¹H NMR信号，采用外标法定量测定样品中NMN的含量。

6 仪器设备

6.1 核磁共振波谱仪：氢（¹H）共振频率不低于 400 MHz；可控温，温度精度不低于±0.1 °C。

6.2 核磁共振样品管：外径 5 mm，同心且均匀。

6.3 分析天平：感量为 0.01 mg。

6.4 涡旋振荡器。

6.5 低速离心机。

6.6 移液器：10 μL~100 μL，20 μL~200 μL，100 μL~1000 μL。

6.7 微孔滤膜：孔径 0.22 μm。

7 试剂和材料

除另有规定外，所有试剂均为分析纯。

7.1 重水 (D₂O)：氘代率不小于 99.8%。

7.2 3-三甲基硅烷基-2,2,3,3-氘代丙酸钠 (TSP-d₄, CAS 号：24493-21-8)。

7.3 β-烟酰胺单核苷酸 (NMN, C₁₁H₁₅N₂O₈P, CAS 号：1094-61-7) 标准品：纯度不小于 98%，或国家有证标准物质。

7.4 TSP-d₄ 溶液：4 mmol/L，称取 68.91 mg TSP-d₄ 至 100 mL 容量瓶，用重水定容，混匀。

7.5 NMN 标准储备液 (100 mmol/L)：称取 33.42 mg NMN 标准品至 1 mL 容量瓶，用 TSP-d₄ 溶液定容，混匀，临用现配。

7.6 NMN 系列标准工作液：准确吸取适量 NMN 标准储备液，用 TSP-d₄ 溶液逐级稀释，配制成 0.2 mmol/L、0.5 mmol/L、1 mmol/L、2 mmol/L、5 mmol/L、10 mmol/L、20 mmol/L、50 mmol/L、100 mmol/L NMN 系列标准工作液，临用现配。可根据样品中 NMN 含量适当调整标准工作液及储备液浓度。

8 检测步骤

8.1 样品前处理

产品样品：取 20 片 (颗、粒) 产品样品，充分研磨成粉末状 (胶囊类样品需去掉胶囊壳)，混匀，均分成三份，分别为测试样品、复检样品和保存样品，装入样品瓶，密封并标记，室温储存。

原料样品：无需特殊处理，可直接称取，装入样品瓶，密封并标记，室温储存。

8.2 样品制备

准确称取处理好的样品 10.00 mg 于 2 mL 离心管，加入 1000 μL TSP-d₄ 溶液，涡旋混匀并成分溶解，3500 rpm 离心 5 min 后，过 0.22 μm 微孔滤膜，吸取 450 μL 溶液于核磁共振样品管中待检测。

NMN 系列标准工作液直接吸取 450 μL 于核磁共振样品管中待检测。

8.3 NMR 测定参考条件

- 检测温度：(25.0 ± 0.1) °C。
- 一维氢谱序列。
- 脉冲角度：90°。
- 扫描次数：8 次。
- 谱宽：16 ppm。
- 采样点数：16384。
- 弛豫延迟时间：60 s。

8.4 NMR 测定

- 按照 JY/T 0578-2020 的规定对探头温度进行校正；按照 JJF 1448-2014 的规定对 ¹H 谱灵敏度、分辨率、线性、¹H 谱定量重复性进行校准。
- 将装有待测样品的核磁共振样品管置于核磁共振波谱仪检测腔内。
- 设置待测样品温度为 25 °C，测样前应等待样品温度稳定。
- 调用一维氢谱序列。
- 锁场并调谐。
- 匀场。
- 按 8.3 设定参数。
- 采集并保存数据。

9 数据处理

9.1 数据预处理

对原始数据进行傅里叶变换、相位校正和基线校正，并以 TSP-d₄ 中硅烷甲基的化学位移作为零点进行定标。

9.2 定性

对 NMM 标准品的 ¹H NMR 谱（见附录 A）信号峰进行归属，得到 NMM 的定性及定量相关参数（见附录 A），包括化学位移、耦合常数、氢原子数量及积分区域。应注意定量峰积分区域未受到干扰。

9.3 定量峰积分

根据定性分析得到的积分区域进行积分，得到 NMM 标准品定量峰积分面积。

10 结果计算和报告

10.1 绘制标准曲线

以 NMM 的摩尔浓度为横坐标，NMM 定量峰与 TSP-d₄ 中硅烷甲基信号峰的积分比值为纵坐标，建立标准曲线，得到线性回归方程（1）：

$$y = a \times x + b \dots\dots\dots(1)$$

式中：

y—— NMM 定量峰与 TSP-d₄ 信号峰的积分比值；

a——标准曲线的斜率，单位为升每毫摩尔（L/mmol）；

x—— NMM 的摩尔浓度，单位为毫摩尔每升（mmol/L）；

b——标准曲线的截距。

10.2 样品中 NMM 含量计算

产品样品中 NMM 的含量按照公式（2）计算：

$$W_i = \frac{x \times V \times M}{w \times 1000} \times W \dots\dots\dots(2)$$

式中：

W_i——每片（颗、粒）样品中 NMM 的含量，单位为毫克每片（颗、粒）（mg/片或mg/颗或mg/粒）；

x—— NMM 的摩尔浓度，单位为毫摩尔每升（mmol/L）；

V——样品中加入 TSP-d₄ 溶液的体积，单位为毫升（mL）；

M—— NMM 分子量，单位为克每摩尔（g/mol）；

w——称取的样品质量，单位为毫克（mg）；

W——每片（颗、粒）样品质量，单位为毫克每片（颗、粒）（mg/片或mg/颗或mg/粒）。

计算结果以重复条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，小数点后保留2位数字。

原料样品中 NMM 的纯度按公式（3）计算：

$$P_i = \frac{x \times V \times M}{w \times 1000} \times 100\% \quad (3)$$

式中：

P_i——原料样品中 NMM 的纯度（%）；

x—— NMM 的摩尔浓度，单位为毫摩尔每升（mmol/L）；

V——样品中加入 TSP-d₄ 溶液的体积，单位为毫升（mL）；

M—— NMM 分子量，单位为克每摩尔（g/mol）；

w——称取的样品质量，单位为毫克（mg）。

计算结果以重复条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，小数点后保留2位数字。

10.3 报告结果

产品品结果以毫克每片（颗、粒）的平均值进行报告。

原料结果以纯度的平均值进行报告。

11 精密度

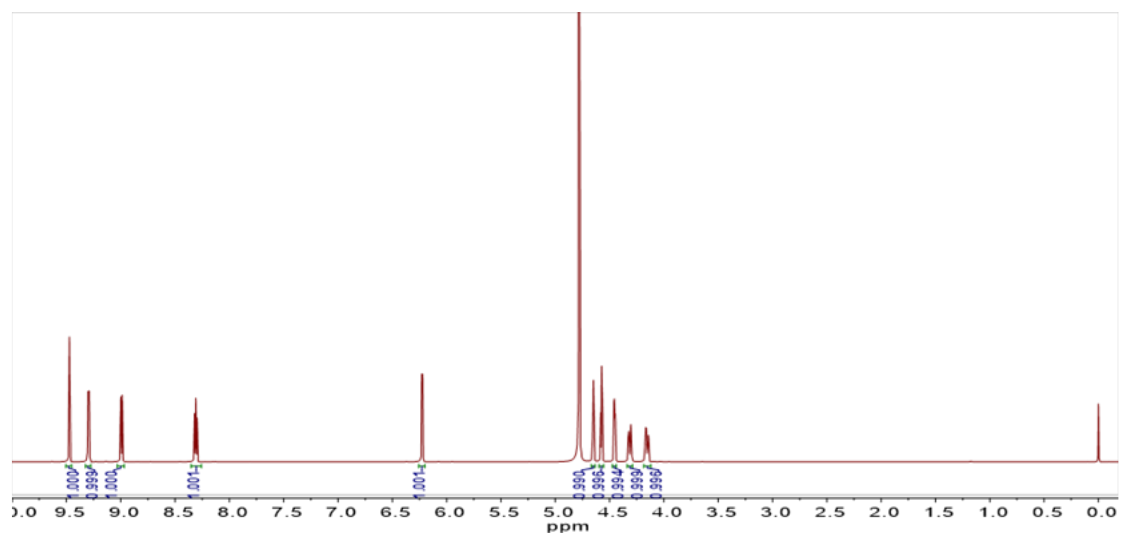
重复性测定条件下，两次独立测定结果绝对差值不超过其算术平均值的5%。

12 检出限及定量限

NMN的检出限为0.1 mmol/L，定量限为0.2 mmol/L。

附录 A

(资料性)

β-烟酰胺单核苷酸¹H NMR谱及定量相关参数图A.1 β-烟酰胺单核苷酸¹H NMR谱

表A.1 定性及定量相关参数

| 化合物 | 摩尔质量 (g/mol) | δ_{H} (峰形, 耦合常数) | 氢原子数量 | 积分区域 ($\Delta\delta$) | 检测温度 (°C) |
|--------------------|-----------------|-----------------------------------|-------|-------------------------|--------------|
| β-烟酰胺单核苷酸 (NMN) | 334.2 | 9.47* (s) | 1 | 9.51~9.44 | 25 |
| | | 6.23 (d, $J=5.4$ Hz) | 1 | 6.25~6.19 | 25 |
| | | 4.65 (t, $J=2.6$ Hz) | 1 | 4.68~4.62 | 25 |

注: *表示定量峰