

# 编制说明

## 一、工作简况，包括任务来源、协作单位、主要工作过程、标准起草单位及人员；

### 1 任务来源

$\beta$ -烟酰胺单核苷酸（Nicotinamide Mononucleotide, NMN）是生命体合成烟酰胺腺嘌呤二核苷酸即辅酶 I（Nicotinamide Adenine Dinucleotide, NAD）的主要内源性前体物质，可以通过食物直接获取，也可以通过烟酸、烟酰胺或色氨酸在体内进行生物合成。NAD 是体内氧化还原反应的重要辅酶，是糖酵解、脂肪酸氧化、三羧酸循环和氧化磷酸化等能量代谢的核心，是脱乙酰化酶（Sirtuins）、多腺苷二磷酸核糖聚合酶（PARPs）、NAD 糖苷水解酶（Glycohydrolases 或 NADases，包括 CD38、CD157 和 SARM1）参与的非氧化还原反应的重要辅助因子和唯一底物，直接和间接影响包括代谢途径、DNA 修复、染色质重塑、细胞衰老和免疫在内的多种关键性细胞功能。科学研究证实，衰老和多种疾病导致 NAD 水平的降低，通过补充 NMN 恢复 NAD 水平，被认为是解决因衰老和疾病导致 NAD 匮乏的营养干预和治疗途径之一。

当前，NMN 在我国未获得药品、保健食品、食品添加剂和新食品原料许可，仅通过了化妆品新原料备案，境内消费者仅能够通过跨境电商零售进口的方式，购买和消费使用“限于个人自用”的含有 NMN 的保健食品和营养素补充剂。尽管人体膳食补充 NMN 的益处仍缺乏足够的研究数据支持，但是近 20 年含有 NMN 类产品在全球市场销售额逐年增长，境外媒体认为 2020 年全球 NMN 市场价值达到 2.53 亿美元，而艾媒咨询统计 2020 年仅中国 NMN 成分保健品市场规模已达 51.06 亿元。NMN 类保健食品，在我国通过海关监管方式代码为“1210”、“9610”的跨境电商零售进口方式准确的贸易总额，须向海关总署申请数据公开才可确定。

跨境电商零售进口商品，不执行有关商品首次进口许可批件、注册或备案要求，此类商品在虚假或夸大广告宣传、中文消费风险提示、贸易来源地真伪、产品质量安全和食品安全上，存在一定的监管难度。而含有 NMN 成分的保健食品，在销售定价上除了产地、NMN 原料工艺、品牌，以及是否含有其他复配成分这四类影响价格的因素外，核心的定价依据是最小销售独立包装中，NMN 的总毫克数。因此，建立一项技术先进、精确准确的保健食品和营养素补充剂中 NMN 的测定标准，对 NMN 跨境电商零售进口食品安全监管、消费者权益保护、市场秩序维护具有重要意义。本标准于 2023 年 1 月由中国营养保健食品协会立项，标准名称《 $\beta$ -烟酰胺单核苷酸（NMN）的测定 核磁共振波谱法》。

## 2 主要工作过程

2023年2月-7月，工作组查阅国内外核磁共振定量检测技术与标准，通过对各方法的原理及特点进行比对，选择外标法进行NMN含量的测定，对样品的处理方法、检测条件等进行了优化，对稳定性、准确性进行了研究，建立了核磁共振波谱法测定NMN原料，及以NMN为主要/标志性成分生产的片剂、粉剂、颗粒剂等的分析方法。

2023年8月-10月，本方法经过北京核磁共振中心、中国科学院生物物理研究所和秦皇岛海关技术中心3家实验室进行验证，结果符合要求。

2024年7月29日，参加中期评审会，会后根据专家提出的建议对文本及编制说明进行修改及完善。

本标准起草单位：\*\*\*

本标准参与单位：\*\*\*

本标准主要起草人：\*\*\*、\*\*\*。

本标准首次发布。

## 二、标准编制原则和确定标准主要内容

### 1 标准编制原则

本标准的制定主要依据国家有关法律、法规、国家标准管理办法以及GB/T 20004.1-2016 团体标准化 第1部分：良好行为指南、GB/T 20004.2-2016 团体标准化 第2部分：良好行为评价指南、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等，并结合在制定标准中检测的数据，确定了本标准的技术数据。

### 2 标准主要内容及适用范围

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。

### 3 方法原理

#### 3.1 方法定义

在外磁场的作用下，具有磁矩的原子核存在着不同能级，当用一定频率的射频照射分子时，可引起原子核自旋能级的跃迁，即产生核磁共振。以核磁共振信号强度对照射频率（磁场强度）作图，所得谱图即为核磁共振波谱。利用核磁共振波谱可对物质进行结构鉴定、定性和定量分析。

#### 3.2 检测原理

使用核磁共振波谱仪，采集 NMN 的  $^1\text{H}$  NMR 信号，分析其谱图，归纳信号峰对应氢原子，经对比选出特征信号峰。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。选取合适的内标物，以 NMN 摩尔浓度为横坐标，以 NMN 特征峰与内标物信号峰的峰面积之比为纵坐标，建立标准曲线。NMN 样品经溶解、充分提取后，检测核磁共振氢谱，根据 NMN 特征峰与内标物信号峰的峰面积之比，计算出实际样品中 NMN 的含量，从而实现定量检测。

### 三、主要试验（或验证）的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果；

#### 1 试验结果分析

##### 1.1 技术路线

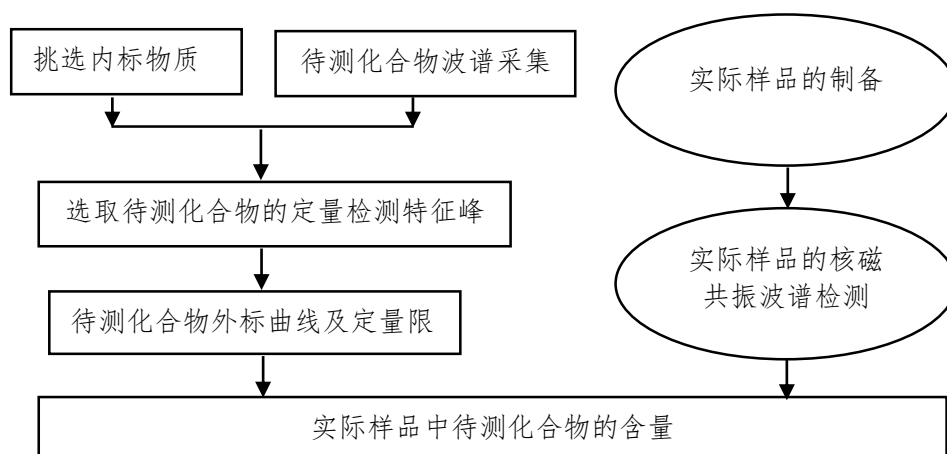


图 1 NMN 定量检测技术路线图

##### 1.2 内标物质的确定

选择的内标物，应具有稳定性好、信号简单、与待测化合物信号不产生干扰且不与待测化合物发生化学反应等特点，3-三甲基硅烷基-2,2,3,3-氘代丙酸钠（2,2,3,3-D<sub>4</sub> sodium-3-trimethylsilylpropionate, TSP-d<sub>4</sub>）、顺丁烯二酸（maleic acid, MLA）、叔丁醇（tert-Butanol, *t*-BuOH）等常见内标化合物均满足上述要求，其  $^1\text{H}$  NMR 谱图见图 2。TSP-d<sub>4</sub> 既可以用作定量内标，又可以用作化学位移内标，与之相比，*t*-BuOH 只能用作定量内标，而 MLA 的添加会改变溶液的 pH 值，导致特征峰信号发生偏移，造成定性、定量不准确，因此，本研究选择 TSP-d<sub>4</sub> 为内标物。

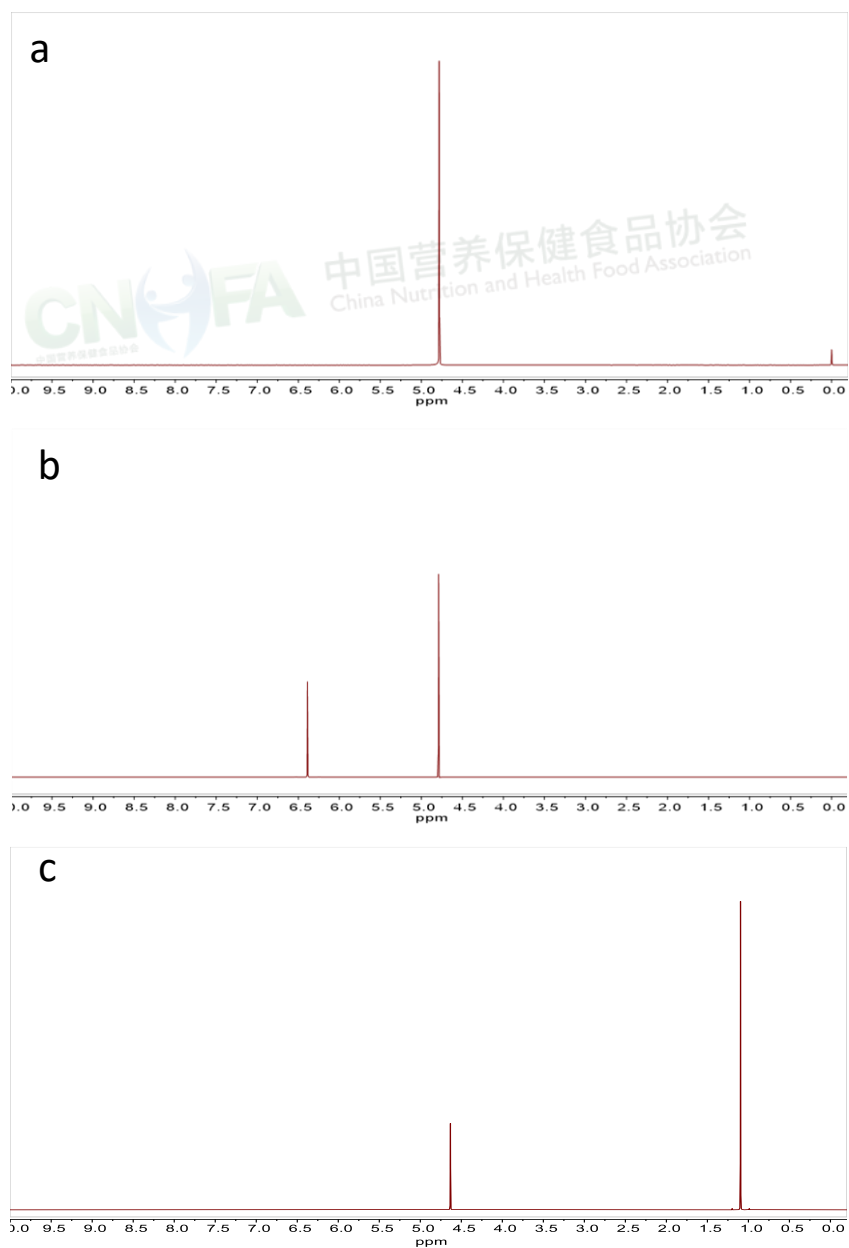


图 2 TSP (a)、MLA (b)、*t*-BuOH (c) 在重水中的 <sup>1</sup>H NMR 谱图

### 1.3 NMR 采集条件优化

以 10 mmol/L NMN 标准溶液为研究对象，对延迟时间、采集次数等 NMR 参数进行优化。

#### 1.3.1 延迟时间的优化

延迟时间 (d1) 应设置得足够长，以使原子核在最后一次脉冲激发后完全恢复到基态，一般应等于或大于纵向弛豫时间 ( $t_1$ ) 的 5 倍。较短的延迟时间可能会使目标化合物的峰面积比例失衡，影响积分结果并导致定量不准确。将延迟时间设置为 30 s、40 s、50 s、60 s 和 70 s，根据图 3 所示的结果，延迟时间在 60 s 及以上时，NMN 定量峰与 TSP-d<sub>4</sub> 中硅烷甲基信号峰的积分比值保持不变，因此本研究选择延迟时间为 60 s，此时 NMN 各峰的峰面积均与相应的氢原子数量精

确成正比。

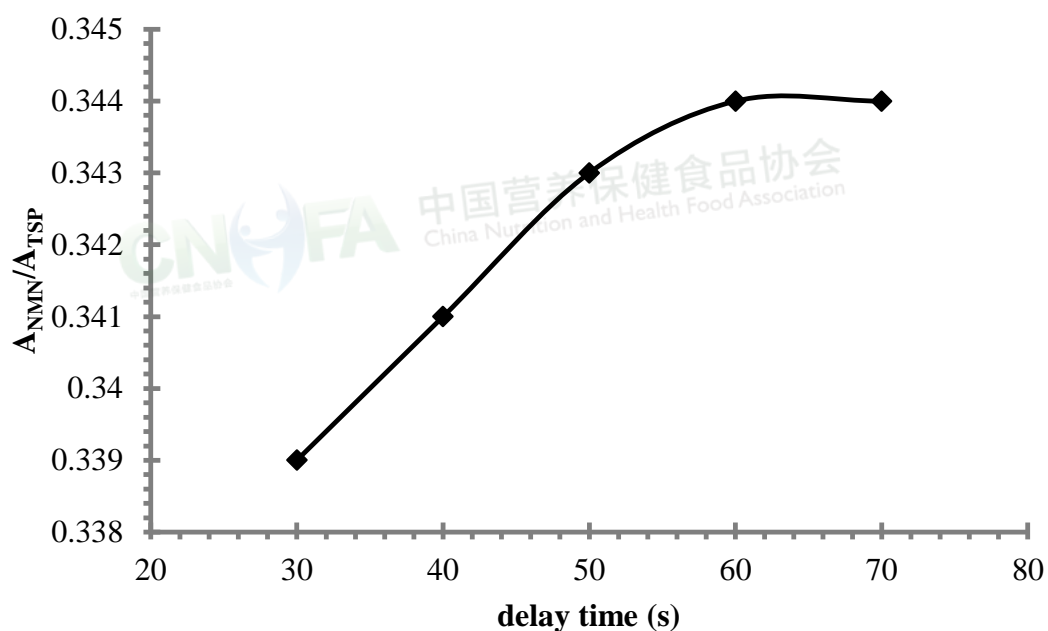


图 3 延迟时间的优化

### 1.3.2 采集次数的优化

采集次数应设置合理，以将目标化合物特征峰与背景噪声区分开来，便于鉴别和积分，理论上越大越好，但过多的采集次数会导致检测时间过长。将采集次数分别设置为 2、4、8、16 和 32，图 4 结果表明，当采集次数为 8 时，NMN 定量峰与 TSP-d<sub>4</sub> 中硅烷甲基信号峰的积分比值达到最大，随着采集次数的进一步增加，积分比值几乎保持不变。因此，采集次数选择为 8。

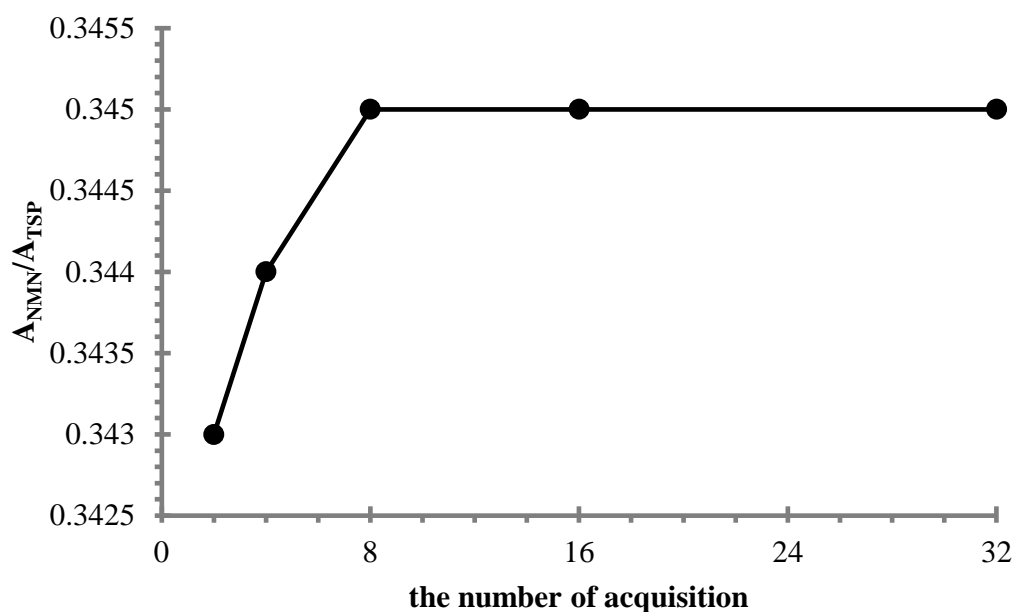


图 4 采集次数的优化

#### 1.4 NMN 定性及定量特征峰的选择

目标化合物的定量特征峰应不与其他峰重叠，不受其他化合物干扰，峰之间的化学位移差异应足够大，以避免积分引起的误差。NMN 的  $^1\text{H}$  NMR 谱图见图 5，NMN 为 NAD 的前体化合物，除 NMN 外，本研究还采集了还原型辅酶 I (NADH)、NAD 以及 NAD 的其他部分前体化合物——烟酰胺核糖(nicotinamide riboside, NR)、烟酸(nicotinic acid, NA)、烟酰胺(nicotinamide, NAM) 的  $^1\text{H}$  NMR 谱图(6 种化合物的重叠谱图见图 6)，并对 6 种化合物信号峰进行了归属，结果表明，NMN 信号峰在 9.47 ppm、6.23 ppm 和 4.65 ppm 化学位移处，可不受其他化合物干扰，9.47 ppm 处为单峰，6.23 ppm 处为双重峰，4.65 ppm 处为三重峰，根据定量特征峰选取原则，本研究选择 9.47 ppm 处信号峰为定量特征峰，选择 6.23 ppm 和 4.65 ppm 处信号峰为定性特征峰。

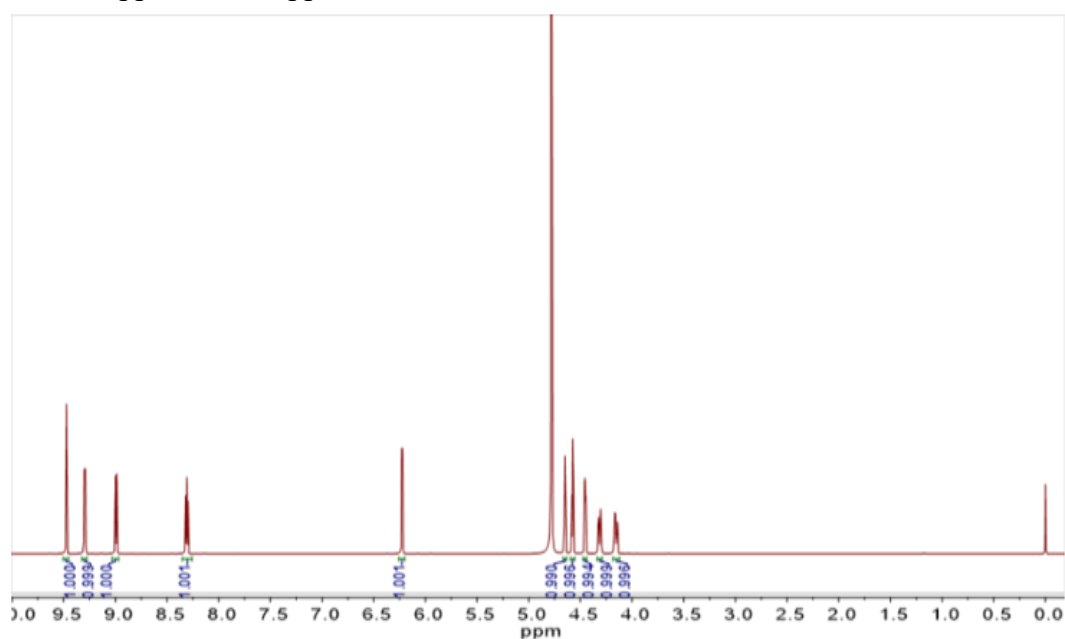


图 5 NMN 在 TSP-d<sub>4</sub> 溶液中的  $^1\text{H}$  NMR 谱图

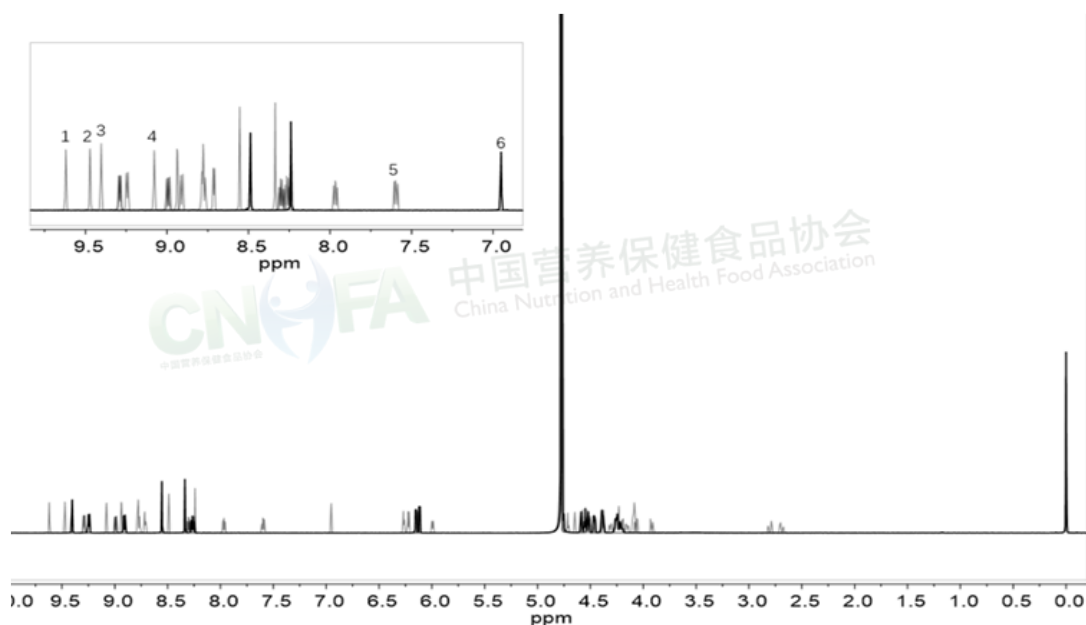


图 6 6 种化合物在 TSP-d<sub>4</sub> 溶液中的 <sup>1</sup>H NMR 重叠谱图以及 NR (1)、NMN (2)、NAD (3)、NA (4)、NAM (5)、NADH (6) 的特征峰

(1) NR:

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 9.61 (s, 1H), 9.28 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H), 8.99 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.29 (dd, *J* = 8.0, 6.3 Hz, 1H), 6.26 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 4.53 (t, *J* = 4.8 Hz, 1H), 4.49 (q, *J* = 3.6 Hz, 1H), 4.37 (t, *J* = 4.7 Hz, 1H), 4.06 (dd, *J* = 12.9, 2.9 Hz, 1H), 3.91 (dd, *J* = 12.9, 3.6 Hz, 1H).

(2) NMN:

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 9.47 (s, 1H), 9.30 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H), 8.99 (dt, *J* = 8.2, 1.5 Hz, 1H), 8.31 (dd, *J* = 8.1, 6.3 Hz, 1H), 6.23 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H), 4.65 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 4.57 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H), 4.45 (dd, *J* = 5.1, 2.6 Hz, 1H), 4.31 (ddd, *J* = 11.9, 4.4, 2.4 Hz, 1H), 4.16 (ddd, *J* = 11.9, 5.1, 2.1 Hz, 1H).

(3) NAD:

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 9.40 (s, 1H), 9.29 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H), 8.95 (dt, *J* = 7.9, 1.6 Hz, 1H), 8.59 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.31 (dd, *J* = 8.0, 6.3 Hz, 1H), 6.19 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H), 6.13 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H), 4.74 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H), 4.62 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 4.58 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H), 4.53 (t, *J* = 4.5 Hz, 1H), 4.49 (dd, *J* = 5.1, 2.7 Hz, 1H), 4.44-4.38 (m, 2H), 4.32-4.26 (m, 2H), 4.26-4.20 (m, 1H).

(4) NA:

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 9.12 (s, 1H), 8.90 (d, *J* = 8.1, 1H), 8.84 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H), 7.95 (dd, *J* = 8.1, 5.8 Hz, 1H)

(5) NAM:

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 8.91 (s, 1H), 8.70 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 8.23 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.58 (dd, *J* = 8.0, 5.1 Hz, 1H).

(6) NADH:

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 8.46 (s, 1H), 8.16 (s, 1H), 6.95 (s, 1H), 6.11 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H), 6.00 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.79-4.75 (m, 2H), 4.71 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H), 4.53 (t, *J* = 4.6 Hz, 1H), 4.40 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 4.32 - 4.26 (m, 1H), 4.25 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 4.23-4.18 (m, 1H), 4.13-4.08 (m, 3H), 2.78 (d, *J* = 18.0 Hz, 1H), 2.69 (dd, *J* = 18.1, 3.2 Hz, 1H).

## 1.5 方法的线性范围

用 TSP-d<sub>4</sub> 溶液逐级稀释 NMN 标准溶液，配制浓度分别为 100 mmol/L、20 mmol/L、10 mmol/L、2 mmol/L、1 mmol/L 和 0.2 mmol/L 的 NMN 系列标准工作溶液，吸取 450 μL 于 5 mm 核磁共振样品管中上机检测，采集 NMN 的 <sup>1</sup>H NMR 谱图。以 NMN 的摩尔浓度为横坐标，NMN 定量峰与 TSP-d<sub>4</sub> 中硅烷甲基信号峰的积分比值为纵坐标，建立标准曲线（图 7），线性方程为  $y=0.0358x$ ， $R^2=1$ 。结果表明，NMN 在 0.2 mmol/L~100 mmol/L 范围内，线性关系良好。

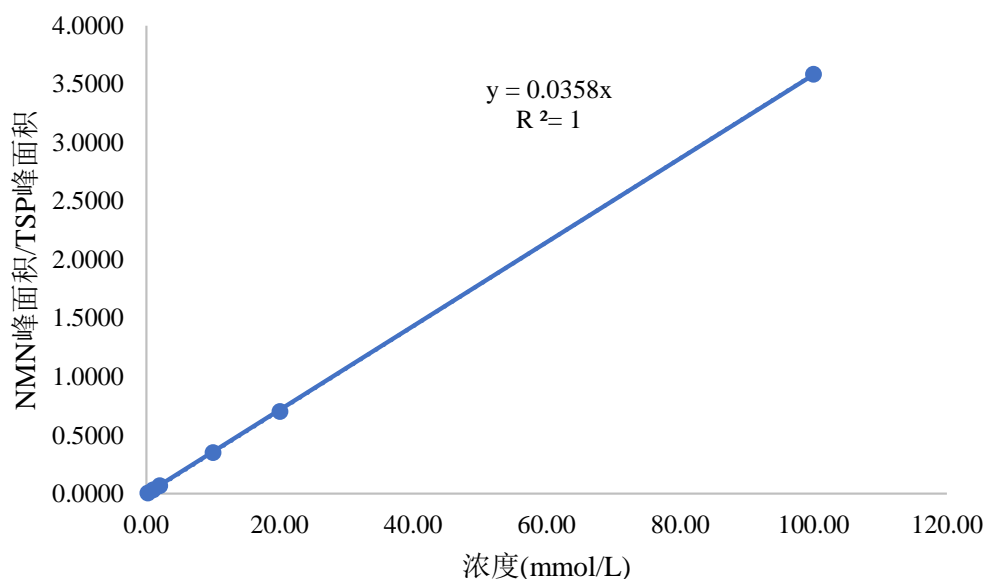


图 7 NMN 标准曲线

## 1.6 方法的检出限与定量限

检出限（Limit of detection, LOD）可分为仪器检出限（Instrument detection limit, IDL）和方法检出限（Method detection limit, MDL），定量限（Limit of quantitation, LOQ）可分为仪器定量限（Instrument quantitation limit, IQL）和方法定量限（Method quantitation limit, MQL），对于核磁共振波谱来说，增加采集次数，会使信噪比（S/N）提高，从而目标化合物的 <sup>1</sup>H NMR 信号增强，可更准确地检测低浓度的样品，因此，本方法所讨论的检出限和定量限实际为方法的检出限和定量限。实际应用过程中，需合理设置采样次数，采样次数偏少，检出限会偏高，而采集次数过多，会消耗大量的检测时间。本研究在上述优化的采集条件下，以信噪比高于 3 确定 NMN 的检出限，以信噪比高于 10 确定 NMN 的定量限，即得到 NMN 的检出限和定量限分别为 0.1 mmol/L 和 0.2 mmol/L。

## 1.7 样品中 NMN 含量计算

### 1.7.1 产品样品中 NMN 含量计算



采集样品的  $^1\text{H}$  NMR 谱图，将 NMN 定量峰与 TSP- $\text{d}_4$  中硅烷甲基信号峰的积分比值代入 NMN 线性方程，得到 NMN 的摩尔浓度，再代入下列公式中计算样品中 NMN 的含量。

$$W_i = \frac{x \times V \times M}{w \times 1000} \times W$$

其中，

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

$x$ ——NMN 的摩尔浓度，单位为毫摩尔每升（mmol/L）；

$V$ ——样品中加入 TSP- $\text{d}_4$  溶液的体积，单位为毫升（mL）；

$M$ ——NMN 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。

### 1.7.2 原料样品中 NMN 纯度计算

采集样品的  $^1\text{H}$  NMR 谱图，将 NMN 定量峰与 TSP- $\text{d}_4$  中硅烷甲基信号峰的积分比值代入 NMN 线性方程，得到 NMN 的摩尔浓度，再代入下列公式中计算样品中 NMN 的纯度。

$$P_i = \frac{x \times V \times M}{w \times 1000} \times 100\%$$

其中，

$P_i$ ——原料样品中 NMN 的纯度（%）；

$x$ ——NMN 的摩尔浓度，单位为毫摩尔每升（mmol/L）；

$V$ ——样品中加入 TSP- $\text{d}_4$  溶液的体积，单位为毫升（mL）；

$M$ ——NMN 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。

### 1.8 回收率实验

以不含 NMN 的维生素片为空白样品，准确称取处理好的样品 10.00 mg 于 2 mL 离心管，加入 TSP- $\text{d}_4$  溶液溶解后添加适量 NMN 标准溶液，配制加标浓度分别为 0.2 mmol/L（LOQ）、1.0 mmol/L（5 LOQ）和 2.0 mmol/L（10 LOQ）的样品溶液，涡旋混匀，静置半小时，充分提取后，3500 rpm 离心 5 min 后，过 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜，吸取 450  $\mu\text{L}$  于 5 mm 核磁共振样品管中上机检测，采集  $^1\text{H}$  NMR 谱图，计算加标回收率，具体见下表 1。结果表明，NMN 在各加标水平下的回收率在 94.16%~103.29%之间，RSD 在 1.08%~2.81%之间。

表 1 NMN 回收率及相对标准偏差 (n=6)

平行样	1 倍定量限		5 倍定量限		10 倍定量限	
	测定值 (mmol/L)	回收率 (%)	测定值 (mmol/L)	回收率 (%)	测定值 (mmol/L)	回收率 (%)
1	0.21	101.29	1.05	103.29	2.04	100.29
2	0.21	101.29	1.02	100.43	2.10	103.14
3	0.20	98.44	1.02	100.43	2.05	100.57
4	0.20	97.01	1.03	101.29	2.09	102.43
5	0.20	99.86	1.03	101.29	2.09	102.43
6	0.19	94.16	1.04	102.14	2.10	103.14
平均值	0.20	98.67	1.03	101.48	2.08	102.00
RSD (%)	2.81	2.81	1.08	1.08	1.24	1.24

### 1.9 日内精密度和日间精密度分析

研究了 NMN 的日内和日间重现性。将 5 mg 供试化合物溶于 1 mL TSP-d<sub>4</sub> 溶液中, 吸取 450  $\mu$ L 于 5 mm 核磁共振样品管中上机检测, 1 天内连续采集 6 次 <sup>1</sup>H NMR 谱图, 分析方法的日内精密度; 连续测定 6 天, 每天测定 6 次取平均值, 分析方法的日间精密度, 详细结果见表 2, NMN 的日内精密度和日间精密度分别为 0.21% 和 1.03%, 重现性良好, 结果可靠, 满足方法测定的要求。

表 2 NMN 日内精密度和日间精密度 (n=6)

日内精密度		日间精密度	
检测次数	NMN 峰面积/TSP 峰面积	检测天数	NMN 峰面积/TSP 峰面积
1	0.465	1	0.468
2	0.467	2	0.468
3	0.466	3	0.467
4	0.467	4	0.478
5	0.465	5	0.472
6	0.467	6	0.477
平均值	0.466	平均值	0.471
RSD (%)	0.21	RSD (%)	1.03

## 1.10 实际样品检测

取 20 片（颗、粒）样品，充分研磨成粉末状（胶囊类样品需去掉胶囊壳），混匀，应用建立的方法，对 3 个 NMN 膳食补充剂进行检测，每个样品测定 3 个平行，各样品的典型  $^1\text{H}$  NMR 谱图如图 8 所示，从谱图可以看出，NMN 定量峰（9.47 ppm 处）不受样品中其他化合物干扰。计算 NMN 含量，结果见表 3，除 A 样品测定结果略高于标签标记含量外，B、C 样品测定结果与标签标记含量基本一致，可初步认定 A 样品中 NMN 的实际含量高于标记值（后续验证实验结果与此一致）。

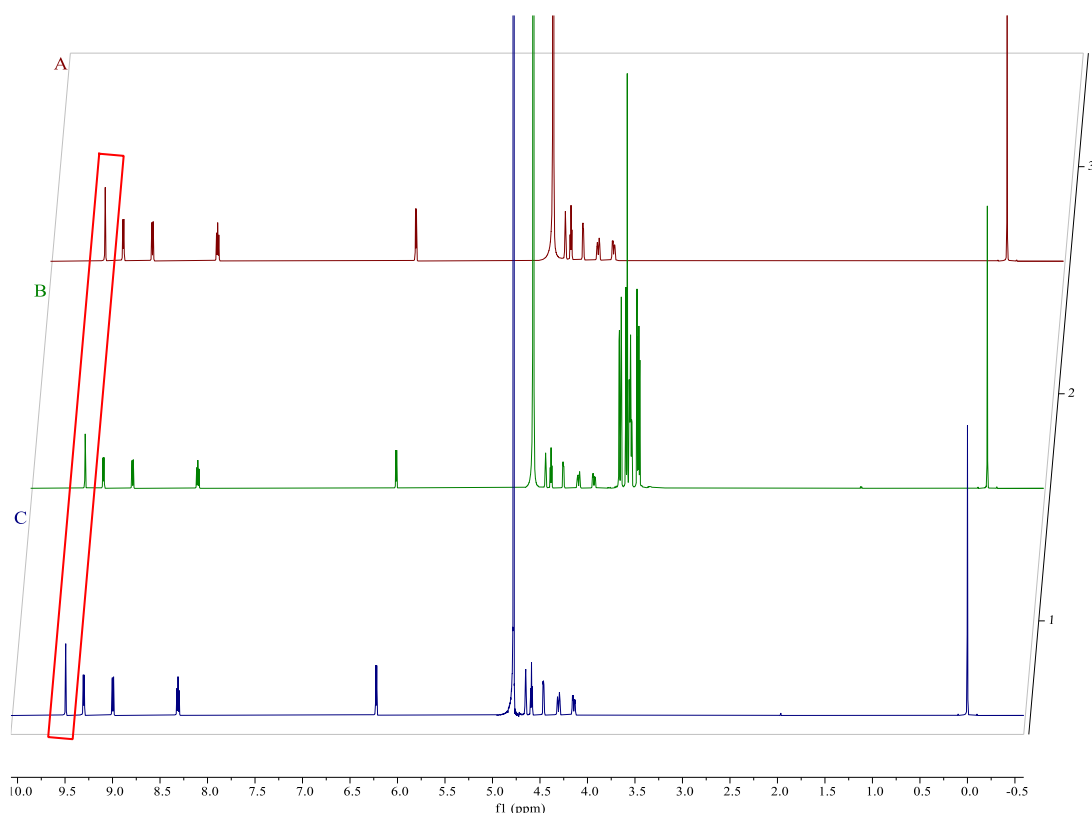


图 8 实际样品  $^1\text{H}$  NMR 谱图

表 3 实际样品中 NMN 含量 (n=3)

平行样	测定结果 (mg/粒)		
	A	B	C
1	132.19	123.60	153.41
2	130.23	125.47	160.25
3	140.31	128.45	160.90
平均值	134.24	125.84	158.18
RSD (%)	4.00	1.90	2.60
标签含量	125	125	160

## 1.11 结论

建立了核磁共振波谱法定量测定 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, 选择 TSP-d<sub>4</sub> 作为内标化合物, 不与目标化合物峰重叠, 且可用来定化学位移; NMN 在 0.2 mmol/L~100 mmol/L 范围内, 线性关系良好; NMN 的检出限和定量限分别为 0.1 mmol/L 和 0.2 mmol/L; 在三个水平 (LOQ、5 LOQ、10 LOQ) 开展添加回收实验, 考察方法的准确度与精密度, 结果 NMN 在各加标水平下的回收率在 94.16%~103.29% 之间, RSD 在 1.08%~2.81% 之间; 应用建立的方法对实际样品进行检测, 结果与标签标记含量基本一致。

## 2 验证结果分析

为提高团体标准的科学性、严谨性和适用性, 进一步提升标准质量, 标准研制单位针对建立的方法, 分别组织 3 家具有相关仪器的单位进行验证比对, 针对方法的线性范围、准确度、精密度和市售样品检测开展实验, 并进行数据分析。

### 2.1 验证单位情况

参加本次验证的实验室共 3 家, 具体单位信息、验证人员及验证内容详见表 4。

表 4 验证信息表

方法	验证单位	验证人员	验证
核磁共振波谱法	北京核磁共振中心	李红卫	方法的线性范围、准确度、精密度和实际样品检测
	中国科学院生物物理研究所	刘雪辉	
	秦皇岛海关技术中心	李响	

### 2.2 验证方案

#### 2.2.1 设备

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

(2) 核磁共振样品管: 外径 5 mm, 同心且均匀。

(3) 分析天平: 感量为 0.01 mg。

(4) 涡旋振荡器。

(5) 低速离心机。

(6) 移液器: 10 μL~100 μL, 20 μL~200 μL, 100 μL~1000 μL。

(7) 微孔滤膜: 孔径 0.22 μm。

#### 2.2.2 样品与试剂

### 2.2.2.1 样品（由中国检验检疫科学研究院提供）

（1）不含 NMN 的维生素片样品：

分别用于 LOQ、5 LOQ 和 10 LOQ 3 个水平的添加回收试验，每份样品 10 mg，各添加水平做 6 个平行，共 18 份样品。

（2）3 种电商零售 NMN 膳食补充剂样品：每份样品 10 mg，每种样品 6 个平行，共 18 份样品。

### 2.2.2.2 试剂

重水、4 mmol/L TSP-d<sub>4</sub> 溶液及 100 mmol/L NMN 标准储备液由中国检验检疫科学研究院提供，NMN 标准工作液由验证单位稀释配制。

### 2.2.3 方法

参照标准文本方法进行样品制备和核磁共振波谱法检测。

### 2.2.4 验证内容

#### 2.2.4.1 线性范围

用 TSP-d<sub>4</sub> 溶液逐级稀释 NMN 标准溶液，配制浓度分别为 100 mmol/L、20 mmol/L、10 mmol/L、2 mmol/L、1 mmol/L 和 0.2 mmol/L 的 NMN 系列标准工作溶液，吸取 450 μL 于 5 mm 核磁共振样品管中上机检测，采集 NMN 的 <sup>1</sup>H NMR 谱图。以 NMN 的摩尔浓度为横坐标，NMN 定量峰与 TSP-d<sub>4</sub> 中硅烷甲基信号峰的积分比值为纵坐标，建立标准曲线，根据线性关系确定线性范围。

#### 2.2.4.2 准确度及精密度

用 TSP-d<sub>4</sub> 溶液溶解不含 NMN 的维生素片样品，添加适量 NMN 标准溶液，配制加标浓度分别为 0.2 mmol/L（LOQ）、1.0 mmol/L（5 LOQ）和 2.0 mmol/L（10 LOQ）的样品溶液，涡旋混匀，静置半小时，充分提取后，3500 rpm 离心 5 min 后，过 0.22 μm 微孔滤膜，吸取 450 μL 于 5 mm 核磁共振样品管中上机检测，采集 <sup>1</sup>H NMR 谱图，根据加标回收率及 RSD 确定方法的准确度及精密度。

#### 2.2.4.3 实际样品检测

将电商零售 NMN 膳食补充剂样品用 1000 μL TSP-d<sub>4</sub> 溶液溶解后，涡旋混匀，充分提取后，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上机检测，采集 <sup>1</sup>H NMR 谱图，按照文本方法进行数据处理及 NMN 含量计算，分析结果。

## 2.3 验证结果

详见附件验证报告。

## 2.4 验证结论

### 2.4.1 北京核磁共振中心

通过对线性范围、定量限、回收率、准确度、精密度等验证分析，结果表明，

建立的核磁共振波谱法线性范围广、准确度高，检测实际 NMN 膳食补充剂样品时，目标物特征峰无干扰，该方法可用于 NMN 原料，及以 NMN 为主要/标志性成分生产的片剂、粉剂、颗粒剂等定量测定。

#### 2.4.2 中国科学院生物物理研究所

验证结果表明建立的核磁共振波谱法测定 NMN 的含量，线性范围在 0.2 mmol/L~100 mmol/L，定量限为 0.2 mmol/L，应用于实际样品检测，准确度高，重复性好，适用于 NMN 原料，及以 NMN 为主要/标志性成分生产的片剂、粉剂、颗粒剂等定量测定。

#### 2.4.3 秦皇岛海关技术中心

验证结果表明建立的 NMN 核磁共振波谱法定量限为 0.2 mmol/L，在 0.2 mmol/L~100 mmol/L 范围内线性关系良好，在 LOQ、5 LOQ 和 10 LOQ 三个水平的添加回收率均接近 100%，RSD 均在 5%以下，应用于实际样品检测中，准确度高，结果可靠。

#### 2.4.4 检科院及 3 家验证单位检测结果对比

检科院及 3 家验证单位的结果对比详见表 5，结果表明 4 家单位应用本方法检测 NMN 的定量限均为 0.2 mmol/L，线性范围为 0.2 mmol/L~100 mmol/L，回收率均接近 100%，RSD 均在 5%以下，对于实际样品的检测，除 A 样品测定结果略高于标签标记含量外，B、C 样品测定结果与标签标记含量基本一致。以上数据说明该方法准确度高、稳定性好，满足 NMN 的定量检测要求。

表 5 检科院及 3 家验证单位检测结果对比

单位名称	定量限 (mmol/L)	线性范围 (mmol/L)	线性方程	添加回收率 (%)			实际样品检测		
				LOQ	5 LOQ	10 LOQ	A	B	C
中国检验检疫科学研究院	0.2	0.2 ~ 100	$y = 0.0358 x$	98.67	101.48	102.00	134.24	125.84	158.18
北京核磁共振中心	0.2	0.2 ~ 100	$y = 0.0346 x$	90.33	99.34	101.97	128.93	125.69	151.85
中国科学院生物物理研究所	0.2	0.2 ~ 100	$y = 0.0353 x$	94.60	94.70	93.68	129.65	121.15	151.12
秦皇岛海关技术中心	0.2	0.2 ~ 100	$y = 0.0344 x$	93.20	92.82	94.68	130.19	122.35	154.54

### 3 技术经济论证

NMN 易溶于水、难溶于有机溶剂，且不易挥发、分子内易成盐，这些性质制约了很多常规定量分析方法的应用，因此，目前对于 NMN 定量分析检测的报道较少，主要的检测方法包括高效液相色谱法、液相色谱串联质谱法、毛细管电泳法、核磁共振波谱法等。

本方法即采用核磁共振波谱法，利用核磁共振波谱仪，采集 NMN 的  $^1\text{H}$  NMR 信号，分析其谱图，归纳信号峰对应氢原子，经对比选出特征信号峰。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，且信号峰的峰面积与氢原子数量成正比。选取合适的内标物，以 NMN 摩尔浓度为横坐标，以 NMN 特征峰与内标物信号峰的峰面积之比为纵坐标，建立标准曲线。NMN 样品经溶解、充分提取后，检测核磁共振氢谱，根据 NMN 特征峰与内标物信号峰的峰面积之比，计算出实际样品中 NMN 的含量，从而实现定量检测。

本方法准确度高、稳定性好，具有推广性，可为 NMN 跨境电商零售进口食品安全监管提供良好的技术支撑。

#### 4 预期经济效果

根据《中华人民共和国食品安全法》和《中华人民共和国药品管理法》，NMN 在我国尚未获得新食品原料、食品添加剂、保健食品和药品许可，不能作为食品和药品进行生产经营。目前，NMN 类保健食品只能通过跨境电商渠道进口。电商平台，如京东国际、天猫国际等，因疫情后激增保健食品需求，引入大量 NMN 类保健食品在平台销售。品牌售价差异巨大，宣传局面混乱，存在侵害消费者权益风险，易出现品牌方在电商平台上进行“二选一”局面。据美国的市场研究公司（GlobeNewswire）的数据显示，2022 年全球 NMN 的原料市场销售额预估为 2.8 亿美金，而到 2028 年，这一数字预计将攀升至 4.96 亿美金，年复合增长率高达 10.0%。主要的供应商包括基因港（GeneHarbor）、霍伯麦（Herbalmax）、日本新和制药（Shinkowa）和音芙医药（EffePharm），四家原料合计占比达到了 83% 的市场占有率。在中国，NMN 市场的发展势头亦是迅猛，根据艾媒咨询的相关数据，2020 年中国 NMN 成分保健品市场规模达 51.06 亿元，同比增长 34.87%，预计到 2023 年将接近 70.25%，市场规模将增长到 270.13 亿元。市场容量不断增加，需技术手段保护消费者权益。以 NMN 保健食品为突破口，建立权威、先进的检测和追溯技术，对督促跨境电商平台落实监管要求规定，加强质量安全风险防控，促进行业规范健康持续发展具有重要的社会和经济效益。

#### 四、采用国际标准和国外先进标准的程度，以及与国际同类标准水平的对比情况

作为近年内保健食品市场的热点，目前对于 NMN 的检测暂无相关的国家标准、行业标准、地方标准和技术规范，与其相关的有 5 项团体标准（见表 6），

其中与含量测定相关的 2 项，其中一项为高效液相色谱法测定 NMN 的纯度和含量，适用于以生物法生产而成的原料和成品中 NMN 纯度和含量的测定方法，另一项为高效液相色谱法测定食品中 NMN 的含量，并无应用核磁共振波谱技术对 NMN 原料，及以 NMN 为主要/标志性成分生产的片剂、粉剂、颗粒剂等进行测定的标准方法。

核磁共振波谱法具有结果稳定、重复性好，信号峰成组出现、相互印证，前处理操作简单，检测时间较短等优点，适用于宏量物质的检测。中国药典、美国药典、欧洲药典中均允许使用核磁共振波谱技术进行药品的定量检测。药品、膳食补充剂等有效成分含量较高的情况下，采用核磁共振波谱技术进行定量检测具有较大优势，后续可探讨 NMR 检测结果与 HPLC 结果对比验证。

表 6 与 NMN 相关的团体标准

序号	团体名称	标准编号	标准名称	公布日期	状态
1	中国认证认可协会	T/CCAA 65-2023	食品中 $\beta$ -烟酰胺单核苷酸 (NMN) 含量测定 高效液相色谱法	2023-06-07	现行
2	中国中小企业协会	T/CASME 73-2022	化妆品用原料 $\beta$ -烟酰胺单核苷酸	2022-11-24	现行
3	中国食品药品企业质量安全促进会	T/FDSA 029-2022	$\beta$ -烟酰胺单核苷酸产品要求和测试方法	2022-07-13	现行
4	中国中小企业协会	T/CASME 012-2021	$\beta$ -烟酰胺单核苷酸纯度和含量的测定 高效液相色谱法	2021-11-10	现行
5	中国中小企业协会	T/CASME 011-2021	进出口用原料质量标准 $\beta$ -烟酰胺单核苷酸 (生物法)	2021-11-10	现行

## 五、与有关的现行法律、法规和强制性标准的关系；

本标准与现行法律、法规、规章和政策以及有关基础和强制性标准不矛盾。

## 六、重大分歧意见的处理经过和依据；

本标准未产生重大分歧意见。

## 七、作为强制性标准或推荐性标准的建议；

本标准可作为推荐性行业标准。

## 八、贯彻标准的要求和措施建议（包括组织措施、技术措施、过渡办法、实施日期等内容）；



本标准为首次发布。

## 九、其他需要说明的事项。

无其他需要说明的事项。

