

# 高效液相色谱法同时测定烟酰胺 单核苷酸中5种有关物质

白玮丽<sup>1#</sup>, 陈俊辰<sup>2#</sup>, 林欣怡<sup>3</sup>, 张兰平<sup>3</sup>, 侍慧慧<sup>1\*</sup>, 罗穆潮<sup>3\*</sup>, 刘梦婷<sup>3</sup>

(1. 南京医科大学康达学院, 连云港 222000; 2. 江苏信佑生物有限公司, 连云港 222000;  
3. 连云港杰瑞药业有限公司, 连云港 222000)

**摘要:** **目的** 构建同时检测烟酰胺单核苷酸(nicotinamide mononucleotide, NMN)中5种有关物质[烟酰胺氧化物、三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)、二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)、一磷酸腺苷(adenosine monophosphate, AMP)及烟酰胺]含量的高效液相色谱法。**方法** 采用C<sub>18</sub>色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以50 mmol/L磷酸二氢钾缓冲盐溶液(用磷酸调节pH为4.5)-甲醇为流动相进行梯度洗脱, 流速为1 mL/min, 进样量为20 μL, 检测波长210 nm, 柱温20°C, 试样盘控温: 5°C, 并对方法的专属性、灵敏性、准确性、重复性、耐用性及适用性进行验证。**结果** 烟酰胺氧化物、ATP、ADP、AMP及烟酰胺分别在质量浓度0.4060~16.2402、0.4110~16.4403、0.4150~16.6010、0.4163~16.6507、0.4028~16.1206 μg/mL范围内, 质量浓度与峰面积呈现良好的线性关系, 线性系数 $r^2$ 值均大于0.998; 加标回收率范围分别为98.5%~102.6%、95.6%~104.1%、98.9%~104.6%、100.0%~102.8%、100.6%~101.3%; 3批样品中5种杂质含量检测结果分别为0.18%、0.20%、0.16%、0.14%、0.26%; 5种杂质的检出限范围为0.04028~0.04163 μg/mL, 定量限范围为0.4028~0.4163 μg/mL, 灵敏度高; 专属性、重复性和耐用性均良好。**结论** 该方法简便易行、适用性广, 适用于NMN中5种有关物质的检测, 为提升其质量标准奠定基础, 为食品安全提供保障。

**关键词:** 烟酰胺单核苷酸; 烟酰胺氧化物; 三磷酸腺苷; 二磷酸腺苷; 一磷酸腺苷; 烟酰胺; 高效液相色谱法

## Simultaneous determination of 5 kinds of related substances in nicotinamide mononucleotide by high performance liquid chromatography

BAI Wei-Li<sup>1#</sup>, CHEN Jun-Chen<sup>2#</sup>, LIN Xin-Yi<sup>3</sup>, ZHANG Lan-Ping<sup>3</sup>, SHI Hui-Hui<sup>1\*</sup>,  
LUO Mu-Chao<sup>3\*</sup>, LIU Meng-Ting<sup>3</sup>

(1. Kangda College of Nanjing Medical University, Lianyungang 222000, China; 2. Jiangsu Xinyou Biological Co., Ltd., Lianyungang 222000, China; 3. Lianyungang JARI Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222000, China)

**基金项目:** 江苏省高校基础科学(自然科学)面上项目(21KJD350004)、南京医科大学康达学院第二期“科研创新团队项目”(KD2023KYCXTD003)、南京医科大学康达学院2023年度科研发展基金项目(KD2023KYJJ020)

**Fund:** Supported by the Basic Science (Natural Science) Project of Universities in Jiangsu Province (21KJD350004), the Second Phase of the “Research and Innovation Team Project” of Kangda College of Nanjing Medical University (KD2023KYCXTD003), and the 2023 Research Development Fund of Kangda College of Nanjing Medical University (KD2023KYJJ020)

#白玮丽、陈俊辰为共同第一作者

#BAI Wei-Li and CHEN Jun-Chen are Co-first Authors

\*通信作者: 侍慧慧, 硕士, 讲师, 主要研究方向为新型药物制剂靶向递送。E-mail: shihuihui@njmu.edu.cn

罗穆潮, 硕士, 中级工程师, 主要研究方向为化学药品和保健食品的配方研究。E-mail: luosean@163.com

\*Corresponding author: SHI Hui-Hui, Master, Lecturer, Kangda College of Nanjing Medical University, 88 Chunhui Road, Lianyungang 222000, China. E-mail: shihuihui@njmu.edu.cn

LUO Mu-Chao, Master, Intermediate Engineer, Lianyungang JARI Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222000, China. E-mail: luosean@163.com

**ABSTRACT: Objective** To construct a method for simultaneous detection of 5 kinds of related substances [nicotinamide oxide, adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP), adenosine monophosphate (AMP) and nicotinamide] in nicotinamide mononucleotide (NMN) by high performance liquid chromatography. **Method** A C<sub>18</sub> column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used for gradient elution with 50 mmol/L potassium dihydrogen phosphate buffered salt solution (pH 4.5 adjusted by phosphoric acid) and methanol as mobile phase. The flow rate was 1 mL/min, the sample size was 20 μL, the detection wavelength was 210 nm, the column temperature was 20°C, and the sample disk temperature was 5°C. The specificity, sensitivity, accuracy, repeatability, durability and applicability of the method were verified. **Results** Nicotinamide oxide, ATP, ADP, AMP and nicotinamide showed a good linear relationship with peak area in the mass concentration range of 0.4060–16.2402, 0.4110–16.4403, 0.4150–16.6010, 0.4163–16.6507, 0.4028–16.1206 μg/mL. The linear coefficients  $r^2 > 0.998$ . Standard addition recoveries were 98.5%–102.6%, 95.6%–104.1%, 98.9%–104.6%, 100.0%–102.8% and 100.6%–101.3%, respectively. The content of 5 kinds of impurities in 3 batches of samples were 0.18%, 0.20%, 0.16%, 0.14%, 0.26%, respectively. The limits of detection for the 5 kinds of impurities ranged from 0.04028 to 0.04163 μg/mL, and the limits of quantification ranged from 0.4028 to 0.4163 μg/mL, showing high sensitivity, good specificity, repeatability and durability. **Conclusion** The method is simple, convenient and widely applicable for the detection of 5 kinds of related substances in NMN, which lays a foundation for improving its quality standards and provides a guarantee for food safety.

**KEY WORDS:** nicotinamide mononucleotide; nicotinamide oxide; adenosine triphosphate; adenosine diphosphate; adenosine monophosphate; nicotinamide; high performance liquid chromatography

## 0 引 言

烟酰胺单核苷酸(nicotinamide mononucleotide, NMN)是一种天然存在于多种生物中的 NAD<sup>+</sup>生物合成的中间体,属于维生素 B 族衍生物<sup>[1]</sup>。NAD<sup>+</sup>在细胞死亡、衰老、基因表达、神经炎及 DNA 修复等多种生物过程中起着至关重要的作用。有研究表明, NAD<sup>+</sup>的缺乏可以通过 NMN 来弥补<sup>[2-3]</sup>。NMN 在治疗糖尿病<sup>[4-5]</sup>、心脏衰老<sup>[6-8]</sup>、肠道疾病<sup>[9]</sup>、光感受器退化的神经保护<sup>[10-11]</sup>、阿尔茨海默病<sup>[12-13]</sup>、肥胖<sup>[14]</sup>、帕金森病<sup>[15]</sup>、肾损伤<sup>[16]</sup>、延缓衰老<sup>[17-19]</sup>等多方面具有一定的功效。NMN 作为新一代的抗衰老因子,被称为“不老神药”,成为食品、药品、保健品和化妆品等领域的研究热点<sup>[20-22]</sup>。

目前, NMN 通过了国家药监局“化妆品”新原料备案,获食品添加剂新品种许可,但其安全性尚不明确,缺少食品安全国家标准,国际上尚无测定 NMN 有关物质的方法标准,无法准确测定其杂质含量,对 NMN 相关食品进行监管,导致 NMN 质量参差不齐,所以有必要针对 NMN 产品中有关物质建立检测方法,满足监管要求。我国作为 NMN 原料大国,在工业合成和产品开发过程中,对 NMN 的含量及杂质控制要求十分严格。目前检索到关于 NMN 含量的检测方法有紫外可见分光光度法<sup>[23]</sup>、定量核磁共振法<sup>[23]</sup>、液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)<sup>[25]</sup>等,这些检测方法灵敏度低,无法实现同时检测 NMN 中痕量杂质的需求。目前,虽已有研究采用高效液相色谱法(high performance liquid

chromatography, HPLC)检测 NMN 中有关物质<sup>[26]</sup>,但其所使用的色谱柱经过特殊处理,专门用于分离核苷类的色谱柱,价格高昂,且检测的杂质种类少,方法灵敏度低。

根据工艺合成路线分析, NMN 在生产过程中产生的杂质主要有 5 种: 烟酰胺氧化物、三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)、二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)、一磷酸腺苷(adenosine monophosphate, AMP)、烟酰胺。NMN 及部分杂质具有极性和溶解性差异大、不易挥发、分子内成盐、分子间易转化的性质, NMN 的理化性质限制了很多常规定量分析方法的应用<sup>[27]</sup>。有研究表明,使用 HPLC 测定 NMN 有关物质时, NMN 保留弱,主峰与杂质分离度差,难以准确测定杂质含量<sup>[27]</sup>。因此,急需开发一种高效快捷的 NMN 有关物质检测方法,以更好地控制 NMN 的品质,确保其有效性和安全性<sup>[28]</sup>。由于 NMN 及各杂质均具有紫外吸收,紫外吸收检测器是 HPLC 中应用最广泛的检测器之一,采用 HPLC 检测成本低,操作简便,对各杂质定量分析快速、准确、灵敏度高。基于此,本研究拟建立一种可同时检测 NMN 中 5 种有关物质的 HPLC 分析方法,可解决 NMN 保留弱,主峰与杂质分离度差等问题,为 NMN 的质量控制提供可靠准确的检测方法,从质量监测方面规范 NMN 领域的发展,为食品安全提供有力保障。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

磷酸二氢钾、磷酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司); 甲醇[色谱纯,月旭科技(上海)股份有限公司]; NMN

供试品、烟酰胺对照品(纯度 99.3%)、ATP 对照品(纯度 98.5%)、ADP 对照品(纯度 99.1%)、AMP 对照品(纯度 99.4%)、烟酰胺氧化物对照品(纯度 99.6%)、实验用水(纯化水)(连云港杰瑞药业有限公司)。

## 1.2 仪器与设备

Thermo U3000 高效液相色谱仪(赛默飞世尔科技中国); Welch Ultimate AQ-C18 色谱柱[月旭科技(上海)股份有限公司]; FE28-Standard pH 计(瑞士梅特勒托利多公司); YX930D 电动吸引器(上海宝佳医疗器械有限公司); SECURA125-1CN 分析天平[精度 0.01 mg, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]; KH-600B 型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司); Inertsil ODS-SP-C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm, 日本 GL Sciences 公司); Super-C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm, 美国 ACE 公司); AQ-C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm 日本岛津公司)。

## 1.3 方法

### 1.3.1 溶液配制

取杂质对照品烟酰胺氧化物、烟酰胺、ATP、ADP、AMP 各约 16 mg, 精密称定, 分别置于同一 10 mL 容量瓶中, 加纯化水超声溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成含各杂质质量浓度约为 1.6 mg/mL 的混合标准储备液。准确吸取混合标准储备液 0.5 mL 置于 100 mL 容量瓶中, 用纯化水定容, 制成 5 种杂质质量浓度均约为 8 μg/mL 的标准溶液。取 NMN 样品约 20 mg, 精密称定, 置于 50 mL 量瓶中, 再准确吸取混合标准储备液 0.25 mL 置于此容量瓶中, 加纯化水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为系统适用性溶液。取 NMN 样品约 20 mg, 精密称定, 置于 50 mL 量瓶中, 加纯化水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成含 NMN 约为 0.4 mg/mL 的供试品溶液。

### 1.3.2 色谱条件

色谱柱: AQ-C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温: 20°C; 进样量: 20 μL; 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 210 nm; 样品盘控温: 5°C; 洗脱时间: 35 min; 以纯化水为稀释剂, 50 mmol/L 磷酸二氢钾缓冲盐溶液(用磷酸调节 pH 至 4.5)为流动相 A, 甲醇为流动相 B, 进行梯度洗脱。梯度洗脱程序如下: 0~10 min, 0% B; 10~20 min, 0%~50% B; 20~25 min, 50%~80% B; 25~30 min, 80% B; 30~30.1 min, 80%~0% B; 30.1~35 min, 0% B。

### 1.3.3 方法学验证

参照中国药典 2020 年版四部通则 9101 分析方法验证、ICHQ2(R1)分析方法验证、USP<1225>分析方法验证等指导原则<sup>[29-30]</sup>, 对拟定的分析方法进行专属性、准确度、精密密度(重复性)、灵敏度[定量限(limit of quantitation, LOQ)、检出限(limit of detection, LOD)]、线性与范围、耐用性等项目的验证, 确定拟定方法适用于 NMN 中烟酰胺氧化物、ATP、ADP、AMP、烟酰胺的检测。

## 1.4 数据处理

在方法学考察中, 重复性实验平行测定 6 份, 回收率测定 3 组 9 份, 线性测定 5 个点, 每个点测定 2 份, 适用性样品测定 2 份, 数据采集和分析软件分别为变色龙 7.0 版本和 Excel 2016, 结果以平均数表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 色谱条件优化

以前期研究方法作为分离的初始条件<sup>[31]</sup>, 采用 Thermo U3000 HPLC 仪器对色谱条件进行优化。初始色谱条件如下: Inertsil ODS-SP-C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温: 25°C; 进样量: 20 μL; 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 210 nm; 洗脱时间: 40 min。稀释剂为流动相 A, 以 20 mmol/L 磷酸二氢钾缓冲盐溶液(用 4 mol/L 氢氧化钾溶液调 pH 至 7.0)流动相 A, 以甲醇为流动相 B。梯度洗脱程序: 0~8 min, 0% B; 8~20 min, 0%~70% B; 20.0~30.0 min, 70% B; 30.0~30.1 min, 70%~0% B; 30.1~40.0 min, 0% B。在此基础上对检测波长、色谱柱、流动相体系等参数进行优化。

#### 2.1.1 检测波长的选择

在波长 190~400 nm 范围内对 NMN 及 5 种杂质的紫外光谱进行扫描, 如图 1 所示, ATP、ADP 和 AMP 的最大吸收波长分别为 205 nm 和 260 nm, 烟酰胺的最大吸收波长分别为 213 nm 和 262 nm。烟酰胺氧化物的最大吸收波长为 266 nm, 而主成分 NMN 的最大吸收波长则分别为 190 nm 和 265 nm, 综上, NMN 及 5 种杂质最大吸收波长主要集中在低波长和 260 nm 左右, 但烟酰胺、烟酰胺氧化物及 NMN 在 260 nm 波长下响应弱, 灵敏度低, 难以满足检测需求, 因此优选低波长, 但甲醇作为流动相在低波长下有紫外吸收, 其截止吸收波长为 205 nm, 会降低分析方法的灵敏度, 综合考虑, 最终选择 210 nm 为定量吸收波长。

#### 2.1.2 色谱柱的选择

C<sub>18</sub> 键合硅胶色谱柱适合分离中等极性、弱极性化合物, 本研究比较了 3 种不同极性填料的 C<sub>18</sub> 色谱柱: Inertsil ODS-SP-C<sub>18</sub> 色谱柱、Super-C<sub>18</sub> 色谱柱、AQ-C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 分别进样系统适用性溶液, 不同色谱柱对 NMN 及 5 种杂质的分离效果如图 2 所示, 上述 3 种色谱柱碳载量依次增大, 极性依次减小, 对化合物的保留能力依次增大, 且 NMN 及各杂质结构和疏水性不同, 综合色谱柱极性和 NMN 各杂质结构差异两方面的原因, 所选色谱柱中, ODS-SP-C<sub>18</sub> 色谱柱极性最小, 保留最弱, 共分离出 5 个峰, Super-C<sub>18</sub> 和 AQ-C<sub>18</sub> 色谱柱极性偏大, 保留较强, 均分离出 6 个峰, 但 AQ-C<sub>18</sub> 对 2、4 位置的杂质分离效果更优, 6 种化合物的峰均能显示, 因此选用 AQ-C<sub>18</sub> 色谱柱进行分析, 可在此色谱柱基础上优化流动相体系, 使所有杂质之间分离度满足要求。

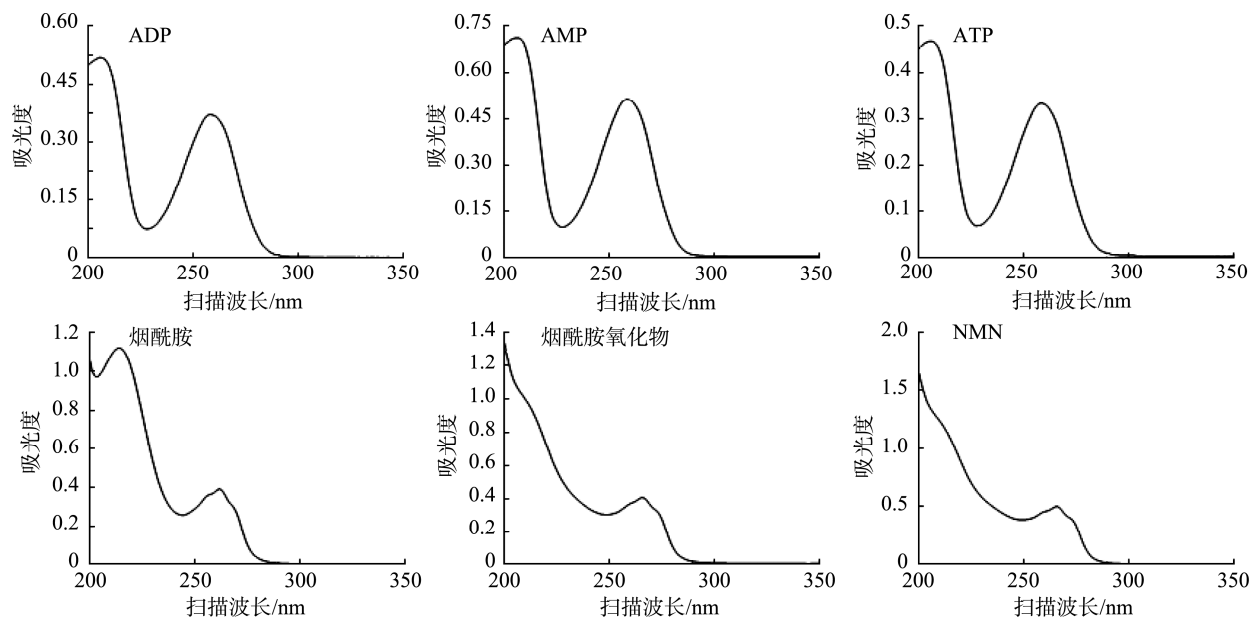
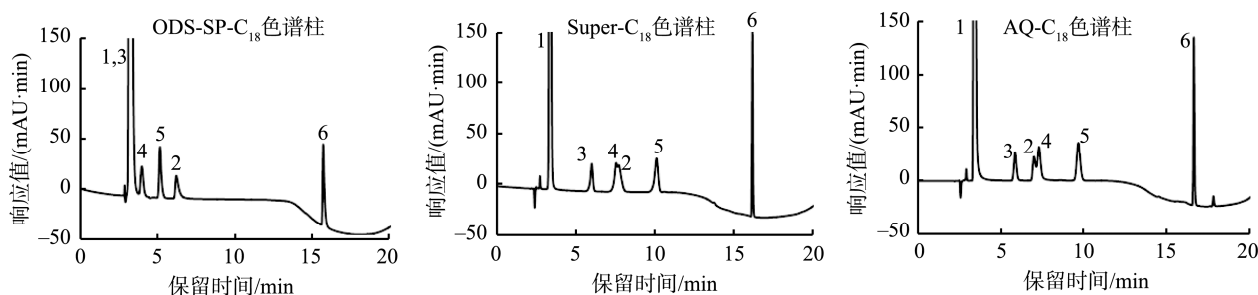


图 1 紫外光谱扫描图

Fig.1 Ultraviolet spectrum scan images



注: 1. NMN; 2. 烟酰胺氧化物; 3. ATP; 4. ADP; 5. AMP; 6. 烟酰胺, 图 3~4 相同。

图 2 不同色谱柱对 NMN 及 5 种杂质分离效果的影响

Fig.2 Separation efficiency of different chromatographic columns on NMN and 5 kinds of impurities

2.1.3 流动相体系的选择

为了增加各物质的保留, 本研究增大缓冲盐溶液的浓度(20 mmol/L→50 mmol/L), 考察在不同流动相 pH 条件下样品的分离情况。由于 NMN 及各杂质本身存在极性和酸碱性的差异, 且在不同流动相 pH 条件下各化合物的脂水分配系数(log*D*)不同, 疏水性不同, 导致流动相 pH 对各化合物的保留时间和分离度不同, 具体结

果如图 3 所示, 其中 pH 2.5 条件下保留最弱, 且 3、4 和 2、6 位置杂质均未分开, pH 4.5 条件下主峰保留能力强于 pH 7.0, 且各杂质分离效果优于 pH 7.0, 6 种化合物在 20 min 内均能得到完全分离, 且峰型对称, 灵敏度满足要求, 因此选用流动相 pH 4.5 进行分析, 在此基础上进一步优化梯度洗脱程序, 最终确定色谱条件(参见 1.3.2 色谱条件)。

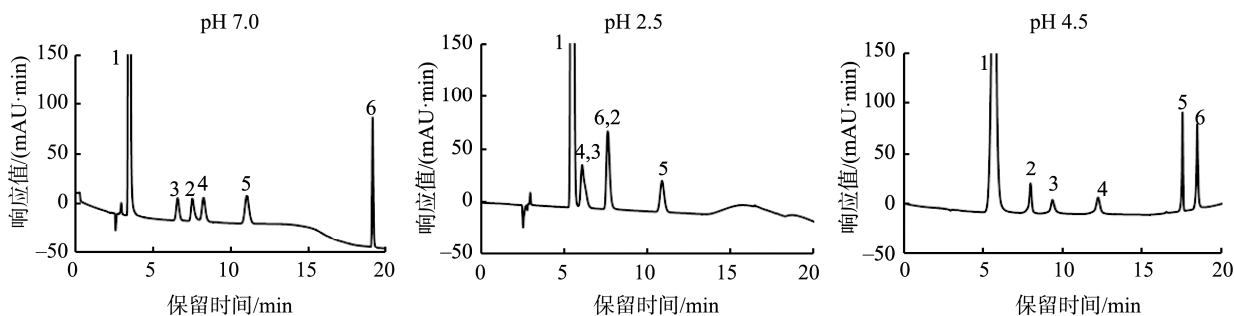


图 3 不同流动相体系对 NMN 中 5 种杂质分离效果的影响

Fig.3 Effects of different mobile phase systems on the separation efficiency of 5 kinds of impurities in NMN

## 2.2 方法学验证

### 2.2.1 专属性

在最佳色谱条件下,分别取空白溶液、各杂质专属性定位溶液及系统适用性溶液进样,记录色谱图,空白溶液在主峰及杂质位置均不出峰。系统适用性溶液典型色谱图如图 4 所示, NMN、烟酰胺氧化物、ATP、ADP、AMP、烟酰胺依次出峰,达到基线分离,主峰及各杂质之间分离度均大于 3.0,专属性符合试验要求。

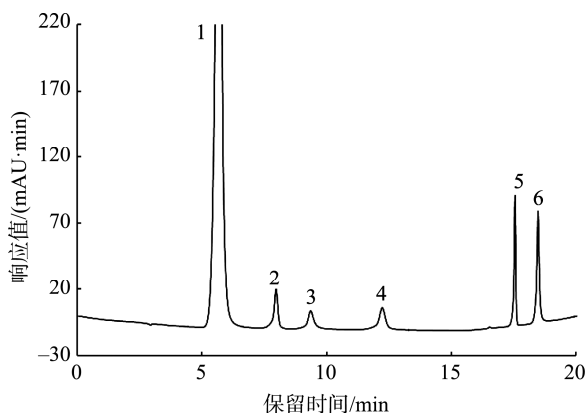


图 4 系统适用性溶液的典型高效液相色谱图

Fig.4 A typical high performance liquid chromatogram of a system suitable solution

### 2.2.2 线性范围、定量限、检出限

在最佳色谱条件下分别对 5 种杂质的系列线性浓度标准溶液进行测定,以浓度和峰面积绘制系列标准曲线。将标准溶液稀释至信噪比(signal to noise,  $S/N$ )分别为 3 和 10,计算本方法各杂质的检出限及定量限。其线性范围、相关系数如表 1 所示。从表 1 可以看出,这 5 种杂质在各

自的线性范围内线性关系良好,线性系数  $r^2$  均不小于 0.998。5 种杂质的 LODs 为 0.04028~0.04163  $\mu\text{g/mL}$ ,检测灵敏度高,能够满足定量分析的要求。

### 2.2.3 精密度

#### (1)系统精密度

精密量取标准溶液(8  $\mu\text{g/mL}$ ) 20  $\mu\text{L}$ ,连续进样 6 次,并考察连续 6 针峰面积的精密度。各杂质连续 6 针峰面积的相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)在 0.45%~1.11%之间,表明该方法的系统精密度良好,能够满足检测要求。

#### (2)重复性

在相同的仪器色谱条件下,取 6 份 NMN 供试品,分别添加杂质标准储备液至供试品溶液中(参见 1.3.1 溶液配制),每份进样一次,测定样品中烟酰胺氧化物、ATP、ADP、AMP、烟酰胺 5 种杂质的峰面积,6 次重复性试验的峰面积 RSDs 在 0.08%~0.90%之间,均小于 1%,说明该方法的重复性较好。

### 2.2.4 加标回收率

为了验证该方法的准确性,本研究对 NMN 进行了加标回收率试验。准确称取 12 份 NMN 样品各 20 mg(精确到 0.01 mg),分别置于 50 mL 容量瓶中,编号为 1~12。其中 1~3 号作为本底,用于测定供试品中 5 种杂质的本底值,剩余 9 份进行 3 个标准添加水平的回收率试验。将配制好的 12 份溶液,按优化后的色谱条件进样分析,并根据峰面积分别计算 5 种杂质的加标回收率,回收率和精密度列于表 2 中。在 3 个加标水平下,平均回收率在 95.6%~104.6%之间,RSDs 均小于 2.0%。回收率和精密度良好,能够满足 NMN 中 5 种杂质的检测要求。

表 1 混合标准曲线的线性参数

Table 1 Linear parameters of mixed standard curves

杂质名称	线性范围/ $(\mu\text{g/mL})$	线性方程	相关系数( $r^2$ )	LODs/ $(\mu\text{g/mL})$	LOQs/ $(\mu\text{g/mL})$
烟酰胺氧化物	0.4060~16.2402	$Y=0.703X+0.0066$	0.9998	0.04060	0.4060
ATP	0.4110~16.4403	$Y=0.6197X-0.2277$	0.9985	0.04110	0.4110
ADP	0.4150~16.6010	$Y=0.7517X-0.1674$	0.9995	0.04150	0.4150
AMP	0.4163~16.6507	$Y=1.0332X-0.0493$	0.9999	0.04163	0.4163
烟酰胺	0.4028~16.1206	$Y=1.3282X-0.0165$	1.0000	0.04028	0.4028

表 2 不同水平下加标回收试验结果

Table 2 Recovery test results of spiking at different levels

杂质名称	加标水平(4 $\mu\text{g/mL}$ )		加标水平(8 $\mu\text{g/mL}$ )		加标水平(16 $\mu\text{g/mL}$ )	
	回收率/%	RSDs/%	回收率/%	RSDs/%	回收率/%	RSDs/%
烟酰胺氧化物	102.6	0.57	101.8	0.67	98.5	0.07
ATP	95.6	0.93	104.1	0.67	104.0	0.67
ADP	98.9	0.24	103.9	1.28	104.6	0.23
AMP	100.0	0.36	100.6	0.46	102.8	0.13
烟酰胺	100.9	0.03	101.3	0.09	100.6	0.06

### 2.2.5 耐用性考察

为了验证方法的耐用性, 本研究选择在 3 种不同柱温 (15°C、20°C、25°C)、不同流速 (0.8、1.0、1.2 mL/min) 下, 统计不同条件下各杂质的保留时间、峰面积及分离度。从表 3 可以看出, 当仅改变柱温时, 随着柱温的升高, 各杂质的

保留时间逐渐缩短, 分离度变小, 峰面积几乎无变化; 当仅改变流速时, 如表 4 所示, 随着流速的增加, 主峰与各杂质的保留时间逐渐缩短, 峰面积减小。综上所述, 当改变柱温、流速时, 主峰与各杂质的保留时间、峰面积、分离度均无较大变化, 证明该方法的耐用性很好。

表 3 不同柱温下各杂质参数  
Table 3 Impurity parameters at different column temperatures

杂质名称	保留时间/min			峰面积/(mAU·min)			分离度		
	15°C	20°C	25°C	15°C	20°C	25°C	15°C	20°C	25°C
NMN	6.207	5.793	5.503	260.8692	260.6130	260.9983	9.53	9.14	8.21
烟酰胺氧化物	8.877	8.090	7.453	5.9403	5.8503	6.1076	4.01	3.54	2.74
ATP	10.750	9.510	8.453	4.7349	4.9545	4.9131	5.91	5.84	5.56
ADP	14.130	12.390	10.900	6.1417	6.2951	6.2090	11.65	17.92	23.10
AMP	17.893	17.593	17.267	8.5321	8.6170	8.5210	6.36	6.37	5.81
烟酰胺	18.807	18.520	18.240	10.8096	10.8502	10.9172	N/A	N/A	N/A

表 4 不同流速各杂质参数  
Table 4 Impurity parameters at different flow rates

杂质名称	保留时间/min			峰面积/(mAU·min)			分离度		
	0.8 mL/min	1.0 mL/min	1.2 mL/min	0.8 mL/min	1.0 mL/min	1.2 mL/min	0.8 mL/min	1.0 mL/min	1.2 mL/min
NMN	7.257	5.793	4.853	326.3017	260.6130	217.5959	9.27	9.14	8.49
烟酰胺氧化物	10.213	8.090	6.743	7.5442	5.8503	5.1226	3.94	3.54	3.13
ATP	12.140	9.510	7.877	6.0369	4.9545	4.0502	6.18	5.84	5.47
ADP	15.837	12.390	10.263	7.4787	6.2951	5.1072	9.43	17.92	24.02
AMP	19.207	17.593	16.450	10.7119	8.6170	7.1055	6.73	6.37	5.44
烟酰胺	20.307	18.520	17.253	13.6377	10.8502	9.0184	N/A	N/A	N/A

### 2.3 样品测定

在优化色谱条件下对 3 批 NMN 中有关物质含量进行检测, 按外标法计算 NMN 中 5 种有关物质含量, 测得烟酰胺氧化物、ATP、ADP、AMP、烟酰胺的平均含量分别为 0.18%、0.20%、0.16%、0.14%、0.26%, RSDs 分别为 3.33%、2.99%、3.77%、0.00%、2.28%, 表明该方法适用于 NMN 中有关物质的检测。

## 3 结论

本研究通过优化检测波长、色谱柱、流动相体系等参数, 建立了一种同时能同时测定 NMN 中 5 种有关物质的 HPLC 检测方法。在以往的研究中, MEHL 等<sup>[26]</sup>所建立的检测方法中使用的色谱柱 Supelcosil LC-18-T 是经过特殊处理, 为专门用于分离核苷类的色谱柱, 价格高昂, 且灵敏度低。本研究建立的方法可同时检测 NMN 中 5 种有关物质, 最小分离度高达 3.5, 5 种杂质的定量限为 0.4028~0.4163 μg/mL, 回收率范围为 95.6%~104.6%。综上, 本研究采用普通的 C<sub>18</sub> 色谱柱即可同时检测多种有关物质, 且检测成本低, 专属性强, 灵敏度、分离度及回收率更优, 该研究成果填补了 NMN 中多种有关物质检测方法的空白, 已申请发明专利并获得授权。该方法不仅为企业提供了有效的品控手段, 也为监管部门的有效监管提供技术支撑。同时, 多批样品检测

结果可为 NMN 质量标准的制定提供参考。

### 参考文献

- [1] 黄莹涓, 曾军, 白卫东, 等. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法同时检测食品中的烟酰胺单核苷酸  $\alpha$ 、 $\beta$  异构体和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14 (15): 206-213.  
HUANG YJ, ZENG J, BAI WD, *et al.* Simultaneous determination of  $\alpha$ ,  $\beta$  isomers and nicotinamide adenine dinucleotides in food by solid phase extraction-ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2023, 14 (15): 206-213.
- [2] HONG WQ, MO F, ZHANG ZQ, *et al.* Nicotinamide mononucleotide: A promising molecule for therapy of diverse diseases by targeting NAD<sup>+</sup> metabolism [J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8(1): 1-27.
- [3] 陈宇娟, 周楚然, 黄建忠, 等.  $\beta$ -烟酰胺单核苷酸的生理活性与合成研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(2): 516-536.  
CHEN YX, ZHOU CR, HUANG JZ, *et al.* Research progress on physiological activity and synthesis of  $\beta$ -nicotinamide mononucleotides [J]. Chin J Biotechnol, 2023, 39(2): 516-536.
- [4] AKASAKA H, NAKAGAMI H, SUGIMOTO K, *et al.* Effects of nicotinamide mononucleotide on older patients with diabetes and impaired physical performance: A prospective, placebo-controlled, double-blind study [J]. Geriatr Gerontol Int, 2023, 23(1): 38-43.
- [5] YAMANE T, IMAI M, BAMBATA T, *et al.* Nicotinamide mononucleotide (NMN) intake increases plasma NMN and insulin levels in healthy subjects [J]. Clin Nutr Espen, 2023, 56: 83-86.
- [6] WEI ZS, CHAI H, CHEN Y, *et al.* Nicotinamide mononucleotide: An emerging nutraceutical against cardiac aging [J]. Curr Opin Pharmacol,

- 2021, 60: 291–297.
- [7] WHITSON JA, BITTO A, ZHANG HL, *et al.* SS-31 and NMN: Two paths to improve metabolism and function in aged hearts [J]. *Aging Cell*, 2020, 19(10): e13213.
- [8] NADTOCHIY SM, WANG YT, NEHRKE K, *et al.* Cardioprotection by nicotinamide mononucleotide (NMN): Involvement of glycolysis and acidic pH [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, 121: 155–162.
- [9] HUANG P, WANG XX, WANG SY, *et al.* Treatment of inflammatory bowel disease: Potential effect of NMN on intestinal barrier and gut microbiota [J]. *Curr Res Food Sci*, 2022, 5: 1403–1411.
- [10] CHEN XH, AMORIM JA, MOUSTAFA GA, *et al.* Neuroprotective effects and mechanisms of action of nicotinamide mononucleotide (NMN) in a photoreceptor degenerative model of retinal detachment [J]. *Aging*, 2020, 12(24): 24504–24521.
- [11] LI ZY, LIU H, HAN WN, *et al.* NMN alleviates NP-Induced learning and memory impairment through SIRT1 pathway in PC-12 cell [J]. *Mol Neurobiol*, 2023, 60(5): 2871–2883.
- [12] YAO ZW, YANG WH, GAO ZQ, *et al.* Nicotinamide mononucleotide inhibits JNK activation to reverse Alzheimer disease [J]. *Neurosci Lett*, 2017, 647: 133–140.
- [13] ZHAO XD, KONG MM, WANG YL, *et al.* Nicotinamide mononucleotide improves the Alzheimer's disease by regulating intestinal microbiota [J]. *Biochem Bioph Res Commun*, 2023, 670: 27–35.
- [14] REMIE CME, ROUMANS KHM, MOONEN MPB, *et al.* Nicotinamide riboside supplementation alters body composition and skeletal muscle acetylcarnitine concentrations in healthy obese humans [J]. *Am J Clin Nutr*, 2020, 11(2): 413–426.
- [15] LU L, TANG LE, WEI WS, *et al.* Nicotinamide mononucleotide improves energy activity and survival rate in an *in vitro* model of Parkinson's disease [J]. *Exp Ther Med*, 2014, 8(3): 943–950.
- [16] GUAN Y, WANG SR, HUANG XZ, *et al.* Nicotinamide mononucleotide, an NAD<sup>+</sup> precursor, rescues age-associated susceptibility to AKI in a siRNA 1-dependent manner [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28(8): 2337–2352.
- [17] 张立实, 李晓蒙, 李静.  $\beta$ -烟酰胺单核苷酸: 基础与应用研究进展[J]. *营养学报*, 2023, 45(4): 320–325.  
ZHANG LS, LI XM, LI J. Advances in basic and applied research of  $\beta$ -nicotinamide mononucleotides [J]. *Acta Nutr Sin*, 2023, 45(4): 320–325.
- [18] YOSHINO J, BAUR JA, IMAI SI. NAD<sup>+</sup> intermediates: The biology and therapeutic potential of NMN and NR [J]. *Cell Metab*, 2018, 27(3): 513–528.
- [19] YI L, MAIER AB, TAO RS, *et al.* The efficacy and safety of  $\beta$ -nicotinamide mononucleotide (NMN) supplementation in healthy middle-aged adults: A randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled, parallel-group, dose-dependent clinical trial [J]. *Gero Sci*, 2022, 45(1): 29–43.
- [20] 景占煜, 袁若珂, 李益民, 等.  $\beta$ -烟酰胺单核苷酸合成研究进展[J]. *微生物学杂志*, 2022, 42(5): 88–96.  
JING ZY, YUAN RK, LI YM, *et al.* Advances in the synthesis of  $\beta$ -nicotinamide mononucleotides [J]. *J Microbiol*, 2022, 42(5): 88–96.
- [21] 任丽梅, 王晓茹, 祁永浩, 等.  $\beta$ -烟酰胺单核苷酸功能与合成研究进展[J]. *生物资源*, 2021, 43(2): 127–132.  
REN LM, WANG XR, QI YH, *et al.* Advances in the function and synthesis of  $\beta$ -nicotinamide mononucleotides [J]. *Biotic Resour*, 2021, 43(2): 127–132.
- [22] FU RZ, ZHANG Q. Nicotinamide mononucleotide-containing anti-aging beauty and skin care product composition: European, WO2016145912 A1 [P]. 2016-09-22.
- [23] 冯婷婷, 李想, 邓乾华, 等. NMN 肠溶胶囊的制备及质量标准研究[J]. *广东化工*, 2021, 48(5): 24–25.  
FENG TT, LI X, DENG QH, *et al.* Study on preparation and quality standard of NMN enteric-coated capsules [J]. *Guangdong Chem Ind*, 2021, 48(5): 24–25.
- [24] 孟辰笑凝, 郭中原, 李春, 等. 定量核磁共振法测定  $\beta$ -烟酰胺单核苷酸的含量[J]. *中国药学杂志*, 2021, 56(2): 135–139.  
MENG CXN, GUO ZY, LI C, *et al.* Determination of  $\beta$ -nicotinamide mononucleotide by quantitative nuclear magnetic resonance [J]. *Chin Pharm J*, 2021, 56(2): 135–139.
- [25] ZOU YT, MA XL, TANG YM, *et al.* A robust LC-MS/MS method to measure 8-oxoGuo, 8-oxodG, and NMN in human serum and urine [J]. *Anal Biochem*, 2022, 660: 114970.
- [26] MEHL RA, KINSLAND C, BEGLEY TP. Identification of the *Escherichia coli* nicotinic acid mononucleotide adenyltransferase gene [J]. *J Bacteriol*, 2000, 182(15): 4372–4374.
- [27] FORMENTINI L, MORONI F, CHIARUGI A. Detection and pharmacological modulation of nicotinamide mononucleotide (NMN) *in vitro* and *in vivo* [J]. *Biochem Pharmacol*, 2009, 77(10): 1612–1620.
- [28] NADESHANI H, LI JY, YING TL, *et al.* Nicotinamide mononucleotide (NMN) as an anti-aging health product-promises and safety concerns [J]. *J Adv Res*, 2022, 37: 267–278.
- [29] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2020 年版四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.  
National Pharmacopoeia Committee. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China (2020 Edition IV)* [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020.
- [30] The United States Pharmacopeia. Validation of compendial procedures (USP-NF 2023, Issue 2) [EB/OL]. [2023-08-01]. <https://www.uspnf.com>. [2023-08-12].
- [31] 张文宇, 兰韬, 赵溪, 等.  $\beta$ -烟酰胺单核苷酸跨境产品中 NMN 含量的测定[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(10): 1–7.  
ZHANG WY, LAN T, ZHAO X, *et al.*  $\beta$ -determination of NMN content in nicotinamide mononucleotide cross-border products [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2022, 43(10): 1–7.

(责任编辑: 郑丽 张晓寒)

## 作者简介



白玮丽, 硕士, 中级工程师, 主要研究方向为化学药品和保健食品的质量研究。  
E-mail: bw10707@126.com



陈俊辰, 中级工程师, 主要研究方向为化学药品和保健食品的质量研究。  
E-mail: 331398516@qq.com



侍慧慧, 硕士, 讲师, 主要研究方向为基于肿瘤等重大疾病的新型纳米药物递送体系的开发及应用。  
E-mail: shihuihui@njmu.edu.cn



罗穆潮, 硕士, 中级工程师, 主要研究方向为化学药品和保健食品的配方研究。  
E-mail: luosean@163.com