

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 α 、 β 异构体和 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸

黄莹涓^{1,2}, 曾军¹, 白卫东^{2*}, 董浩^{2*}

(1. 广电计量检测集团股份有限公司, 广州 511450; 2. 仲恺农业工程学院轻工食品学院,
现代农业工程创新研究院, 广州 510225)

摘要: **目的** 建立固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定食品中烟酰胺单核苷酸(nicotinamide mononucleotide, NMN) α 、 β 异构体和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺)含量的方法。**方法** 样品经 5% 甲醇水溶液超声提取, HLB 固相萃取柱和混合型阴离子交换固相萃取柱分别净化, 采用 Waters ACQUITY UPLC®HSS T 色谱柱进行分离, 流动相为 5 mmol/L 乙酸铵含 0.1% (V/V) 甲酸水-甲醇, 梯度洗脱; 流速 0.2 mL/min; 柱温 30°C; 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式定量分析, 定量离子对 NMN 为 m/z 335.0/123.0、NAD⁺ 为 m/z 662.0/540.0。**结果** 在最优条件下, α -NMN 和 β -NMN 两种异构体的分离度为 5.56。该方法中 α -NMN、 β -NMN 和 NAD⁺ 均在 10~1000 ng/mL 范围内线性良好, 相关系数分别为 0.9999, 0.9998 和 0.9995。 α -NMN、 β -NMN 和 NAD⁺ 的检出限分别为 4.0、2.0 和 1.0 ng/mL, 定量限分别为 10.0、5.0 和 3.0 ng/mL, 回收率为 93.8%~103.8%, 相对标准偏差为 2.1%~6.5%。**结论** 该方法灵敏度高、选择性好、结果准确可靠, 可同时快速检测各种基质食品中 NMN α 、 β 异构体和 NAD⁺ 的含量。

关键词: α -烟酰胺单核苷酸; β -烟酰胺单核苷酸; 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸; 超高效液相色谱-串联质谱法; 异构体拆分; 固相萃取

Simultaneous determination of nicotinamide mononucleotide α , β isomers and nicotinamide adenine dinucleotide in foods by solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

HUANG Ying-Juan^{1,2}, ZENG Jun¹, BAI Wei-Dong^{2*}, DONG Hao^{2*}

(1. Radio and Television Metrology and Testing Co., Ltd., Guangzhou 511450, China; 2. College of Light Industry and Food Sciences, Academy of Contemporary Agricultural Engineering Innovations, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

基金项目: 广东省普通高校特色创新项目(2022KTSCX058)、广东省仲恺农业工程学院-广州质量监督检测研究院联合培养研究生示范基地项目(粤教研函〔2021〕2号)

Fund: Supported by Characteristic Innovation Project of Guangdong Universities, China (2022KTSCX058), and the Postgraduate training base of Zhongkai University of Agriculture and Engineering & Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute [Yuejiaoyanhan (2021) No.2]

*通信作者: 白卫东, 博士, 教授, 主要研究方向为食品风味化学。E-mail: weidong_bai2010@163.com

董浩, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品质量安全控制与营养健康。E-mail: donghao@zhku.edu.cn

*Corresponding author: BAI Wei-Dong, Ph.D, Professor, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, No.381, Zhongkai Road, Guangzhou 510225, China. E-mail: weidong_bai2010@163.com

DONG Hao, Ph.D, Associate Professor, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, No.381, Zhongkai Road, Guangzhou 510225, China. E-mail: donghao@zhku.edu.cn

ABSTRACT: Objective To establish a method for simultaneous determination of nicotinamide mononucleotide (NMN) α , β isomers and nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) in foods by solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods** The samples were extracted by 5% methanol aqueous solution, and purified by HLB solid-phase extraction column and mixed mode anion exchange solid phase extraction column. The Waters ACQUITY UPLC®HSS T3 chromatographic column was used for the chromatographic separation of target analytes at 30°C. The gradient elution method was used and the flow rate was 0.2 mL/min. The mobile phase composed of 5 mmol/L ammonium acetate aqueous solution containing 0.1% (V/V) formic acid and methanol. Quantitative determination was performed at the multi reaction monitoring mode of mass spectrometer. The quantitative ion pairs of NMN and NAD⁺ were m/z 335.0/123.0 and m/z 662.0/540.0, respectively. **Results** Under the above conditions, the separation degree of α -NMN and β -NMN isomers was 5.56. The method showed a good linear relationship between peak area and concentration over the range from 10 ng/mL to 1000 ng/mL and the correlation coefficients of α -NMN, β -NMN and NAD⁺ were 0.9999, 0.9998 and 0.9995, respectively. The limits of detection of α -NMN, β -NMN and NAD⁺ were 4.0, 2.0 and 1.0 ng/mL and the limits of quantitation were 10.0, 5.0 and 3.0 ng/mL. The recoveries of α -NMN, β -NMN and NAD⁺ ranged from 93.8%–103.8%, and the relative standard deviations of precision were 2.1%–6.5%. **Conclusion** This method has the advantages of high sensitivity, good selectivity, accurate and reliable results, which is suitable for the simultaneous quantitative analysis of NMN α , β isomers and NAD⁺ in various matrix foods.

KEY WORDS: α -nicotinamide mononucleotide; β -nicotinamide mononucleotide; nicotinamide adenine dinucleotide; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; separation of isomers; solid phase extraction

0 引言

烟酰胺单核苷酸(nicotinamide mononucleotide, NMN)是一种天然生物活性核苷酸, 自然存在于活细胞中, 维生素 B₃的衍生物, 分子式为 C₁₁H₁₅N₂O₈P, 其结构式如图 1A 所示^[1-5]。NMN 是生物体内烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺, 又叫氧化性辅酶 I)合成途径中的关键前体物质^[6-11], 其由烟酰胺在烟酰胺磷酸核糖转移酶的催化下生成, 而后在 NMN 腺苷转移酶的催化下生成 NAD⁺^[11]。NAD⁺分子结构式如图 1B 所示。NAD⁺存在细胞中参与上千项生物催化反应, 参与人体 95%能量的合成, 是人体内必不可少的辅酶^[12]。在多种细胞代谢反应中, NAD⁺分子都扮演着重要角色, 是细胞保持活力的重要支撑^[13-14]。

目前市场上通过跨境电商的方式有众多添加了 NMN 的产品进入国内市场销售, 同时, 国内也有大量厂商在生产研发这类以 NMN 为主要原料的食品^[15]。但 NMN 和 NAD⁺在我国尚未获得药品、保健食品、食品添加剂和新食品原料许可。即在我国境内, NMN 和 NAD⁺均不能作为食品进行生产和经营。自国家市场监督管理总局发布排查 NMN 的函后, 虽然市场上仍然有以 NMN 为卖点的食品, 但数量有所减少, 不过以 NAD⁺为卖点的食品迅猛增长, 呈现泛滥之势^[16-17]。而 2022 年 1 月 24 日国家药品监督管

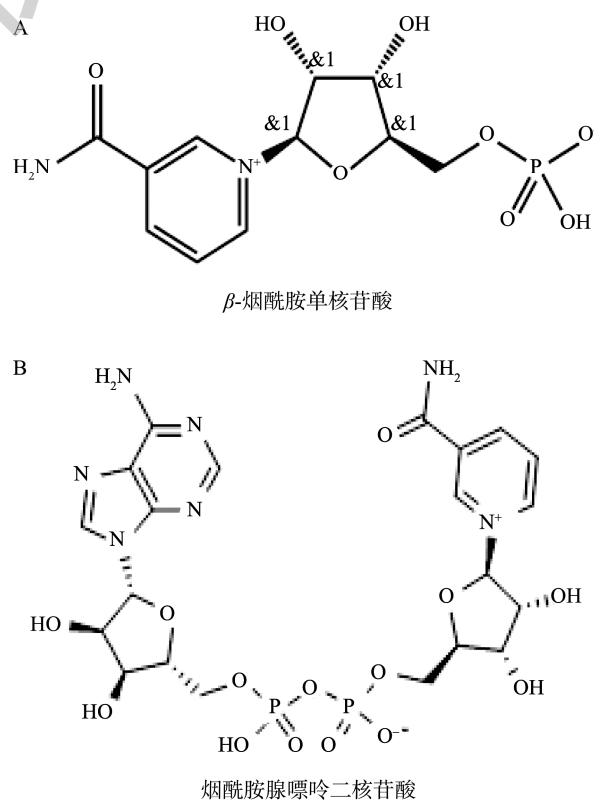


图 1 分子结构式

Fig.1 Molecular structures of β -NMN (A) and NAD⁺ (B).

理局公示了 NMN 作为化妆品新原料备案通过的信息, 意味着 NMN 原料可作为化妆品成分用于中国化妆品中, 这一信息再度引起了国内 NMN 市场热潮^[18-20]。

NMN 有两种异构体存在形式, 即 α -NMN(结构式见图 2)和 β -NMN, 而大部分药物分子因其异构特性具有不同的生物活性^[21]。为了减少药物异构特性带来的药效差异及不良反应, 对异构体进行拆分是现代药物研究的重大趋势^[22]。NMN 中 β 异构体具有生物活性, 而 α 异构体则不具备^[23], 但化学合成的 NMN 中可能含有一定的 α 异构体, 为了更好地评价其活性成分含量, 对 NMN 异构体的拆分研究显得尤为重要。

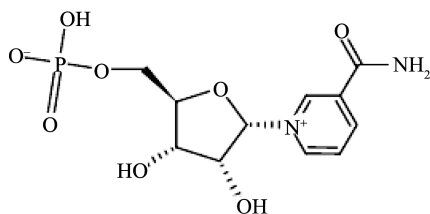


图 2 α -NMN 分子结构式

Fig.2 Molecular structure of α -NMN

目前国内尚无相关标准规定食品中 NMN 含量的检测方法。NMN 和 NAD^+ 极性大、不易挥发、易溶于水、难溶于有机溶剂, 目前对其定量分析检测的报道较少, 检测手段主要包括利用三重四极杆液相色谱-质谱联用仪、核磁共振仪、高效液相色谱仪等进行分析^[24-27]。其中核磁共振法检测由于仪器价格过高, 仪器运行环境要求也高导致无法广泛使用^[28], 而液相色谱法也由于灵敏度不够的原因导致方法使用限制太多。此外现有文献报道的检测方法中主要对象为 β -NMN, NAD^+ 也有文献略有提到^[29], 而 α -NMN 的检测则未见文献报道。因此为了满足国内市场对食品中 NMN 和 NAD^+ 监管的需要, 更好地保障食品安全, 有必要开发一种简单快速能同时检测食品中 α -NMN 和 β -NMN 以及 NAD^+ 的检测方法。因此, 本研究拟采用超高效液相色谱-串联质谱法, 建立一种同时测定食品中 NMN 的 α 、 β 异构体和 NAD^+ 含量的方法, 并优化前处理条件和检测条件, 以期对 NMN 和 NAD^+ 的研究提供一定的技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

番茄、某品牌铁皮石斛(经天然晾晒)、某品牌 NMN 胶囊(以下简称胶囊), 均来自广州市售。

α -NMN 标准品(纯度 99.9%, 阿尔塔科技有限公司); β -NMN 标准品(纯度 99.8%)、 NAD^+ 标准品(纯度 99.7%)(上海源叶生物科技有限公司); 甲醇、乙醇(色谱纯, 德国 CNW 公司); 甲酸、乙酸铵(色谱纯, 美国赛默飞科技世尔

有限公司)。

1.2 仪器与设备

AB 4500 超高效液相色谱-质谱/质谱联用仪(美国 SCIEX 公司); AS701KAT 超声波清洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司); XS205DU、ME204E 电子分析天平(精度 0.1 mg, 瑞士梅特勒-托利多公司); Milli-Q Advantage 超纯水机(美国密理博公司); Poly-Sery HLB 固相萃取小柱(60 mg, 3 mL)、Poly-Sery MAX 混合型阴离子交换固相萃取小柱(60 mg, 3 mL)(德国 CNW 公司); 有机系滤膜(尼龙 66, 13 mm, 0.22 μm , 天津市津腾实验设备有限公司); Waters ACQUITY UPLC®HSS T3 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm , 美国 Waters 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 提取方法

保健品胶囊(A): 去除其囊壳后取其内容物 0.5 g 于 200 mL 棕色容量瓶中, 加入 150 mL 5% 甲醇水溶液, 涡旋, 混匀, 超声提取 30 min, 用 5% 甲醇水溶液定容至刻度。取 20 mL 试样溶液 8000 r/min 离心 5 min, 准确移取 100 μL 上清液至 50 mL 棕色容量瓶中, 用 5% 甲醇水溶液稀释定容至刻度。

新鲜市售番茄(B1)和干制铁皮石斛(B2): 将样品匀浆或粉碎后, 称取 5 g 于离心管中, 加入 30 mL 5% 甲醇水溶液, 涡旋, 混匀, 超声提取 30 min, 8000 r/min 离心 5 min, 上清液用 5% 甲醇水溶液定容至 50 mL。

1.3.2 净化方法

HLB 柱净化法(A): 将 HLB 固相萃取小柱依次用 3 mL 甲醇、3 mL 一级水活化平衡后, 取提取溶液各约 2 mL 分别过柱, 弃去前面 3 mL, 收集后面净化液过 0.22 μm 有机系滤膜后供液相色谱串联质谱仪测定。

MAX 柱净化法(B): 将 MAX 固相萃取小柱依次用 3 mL 甲醇、3 mL 一级水活化平衡后, 取上述提取溶液各 2 mL 分别过柱, 再用 2 mL 5% 甲醇水溶液淋洗, 用 2 mL pH=3 的 0.5 mol/L 磷酸二氢钾溶液洗脱。收集洗脱液并用 5% 甲醇水溶液定容至 4 mL, 过 0.22 μm 有机系滤膜后供液相色谱串联质谱仪测定。

1.3.3 液相色谱-串联质谱条件

色谱条件: 采用 Waters ACQUITY UPLC®HSS T3 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm); 进样量 5 μL ; 流速: 0.2 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 梯度洗脱: 流动相 A 为 5 mmol/L 乙酸铵含 0.1% (V/V) 甲酸水, 流动相 B 为甲醇; 梯度洗脱程序: 0~2.0 min, 98% A; 2.0~2.5 min, 98%~10% A; 2.5~4.5 min, 10% A; 4.5~4.6 min, 10%~98% A; 4.6~7.0 min, 98% A。

质谱条件: 气帘气流速: 30 L/min; 雾化气流速(GS1): 50 L/min; 辅助加热气流速(GS2): 50 L/min; 碰撞气: 中等强度(medium); 辅助加热温度: 500 $^{\circ}\text{C}$; 喷雾电压: 5000 V/

-4500 V; 扫描模式: 多反应监测(multiple response monitoring, MRM)模式。

1.4 数据处理

使用 Excel 2019 作图, 采用 SPSS 25.0 进行数据处理, 实验结果用平均值±标准偏差表示($n \geq 3$)。

2 结果与分析

2.1 色谱与质谱条件优化

2.1.1 质谱参数优化

在电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI)正离子模式下, 得到 NMN 的母离子为 $335.0[M+H]^+$, 且响应信号较好。进一步对其进行子离子扫描, 得到 NMN 的二级质谱碎片离子, 优化得到的离子对与文献报道一致^[29], 可以满足 NMN 的准确度和定量检测。而 NAD^+ 参照文献报道^[22]在 ESI+模式下只有一对离子 664/136 且响应很低, 本研究中改为 ESI-模式后找到其母离子 $662.0[M-H]^+$, 对其进行子离子扫描, 找到 3 个响应较好的二级质谱碎片离子。质谱具有正负离子切换监测功能, 可在同一次进样的样品运行中同时进行正负离子扫描, NMN 和 NAD^+ 的质谱检测参数见表 1。

2.1.2 色谱分离条件优化

本研究中, 为了获得良好的峰形和离子化效率, 对比 0.1% (V/V)甲酸水-甲醇、0.1% (V/V)甲酸水-乙腈、5 mmol/L

乙酸铵含 0.1% (V/V)甲酸水-甲醇、5 mmol/L 乙酸铵含 0.1% (V/V)甲酸水-乙腈, 结果发现: 在其他条件相同时以甲醇为流动相时 NMN 和 NAD^+ 的信号明显强于乙腈, 且保留时间更晚。而水相中加入乙酸铵不仅可以提高响应值, 还能改善峰形。综合考虑, 选取 5 mmol/L 乙酸铵含 0.1% (V/V)甲酸水-甲醇为测试的流动相。在 5 mmol/L 乙酸铵含 0.1% (V/V)甲酸水-甲醇流动相下, 对比 BEH C_{18} 色谱柱、HSS T3 色谱柱和 Hilic 色谱柱的峰型和分离度, C_{18} 及 Hilic 色谱柱较之 T3 色谱柱对目标物的保留能力更差, 同等色谱条件下, T3 保留时间更晚。且通过调整流动相梯度, 只有 T3 色谱柱能够将 NMN 的两种异构体完全分离。

在优化的色谱及质谱条件下, α -NMN、 β -NMN (A)和 NAD^+ (B)混合标准品总离子流色谱图见图 3。图 3A 中 α -NMN 保留时间为 1.43 min, 半峰宽为 0.06 min; β -NMN 保留时间为 1.95 min, 半峰宽为 0.05 min。中国药典中分离度(R)计算如公式(1)^[30]:

$$R = \frac{2 \times (t_{R2} - t_{R1})}{1.70 \times (W_{1,h/2} + W_{2,h/2})} \quad (1)$$

式中: t_{R2} 为相邻两色谱峰中后一峰的保留时间; t_{R1} 为相邻两色谱峰中前一峰的保留时间; $W_{1,h/2}$ 、 $W_{2,h/2}$ 分别为此相邻两色谱峰的半峰宽。

由此可得 α -NMN 和 β -NMN 的分离度为 $5.56 > 1.5$, 满足基质分离的要求, 达到异构体的完全拆分, 可对 NMN 的 α 、 β 两种异构体分别进行准确定量。

表 1 目标化合物的质谱检测参数

Table 1 Mass spectrum detection parameters of target compounds

序号	项目	母离子(m/z)	子离子(m/z)	去簇电压/V	射入电压/V	碰撞电压/V	射出电压/V
1	NMN	335.0	123.0*	40	10	18	8
		335.0	96.9	40	10	18	8
		662.0	540.0*	-65	-10	-23	-10
2	NAD^+	662.0	426.0	-60	-10	-38	-10
		662.0	408.0	-68	-10	-35	-10

注: *为定量离子。

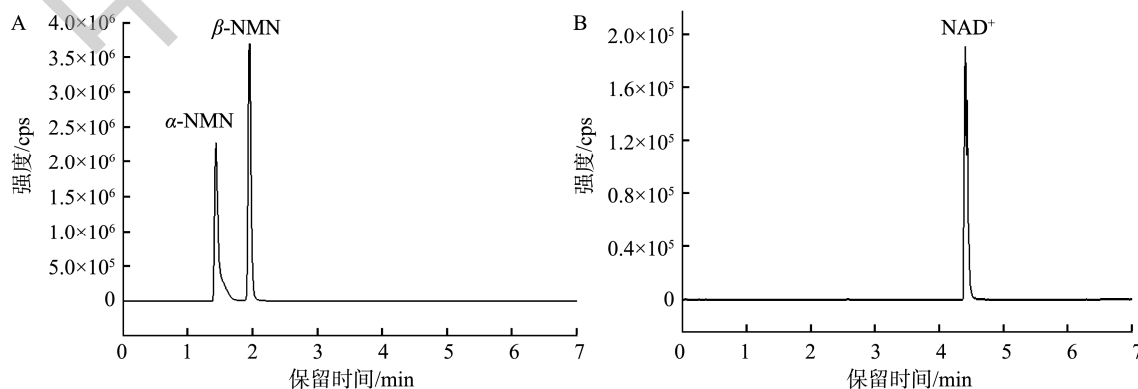


图 3 α -NMN、 β -NMN (A, ESI+)和 NAD^+ (B, ESI-)混合标准品总离子流色谱图

Fig.3 Total ion chromatograms of mixed standard solution of α -NMN, β -NMN (A, ESI+) and NAD^+ (B, ESI-)

2.2 前处理优化

2.2.1 提取条件优化

针对 NMN、NAD⁺易溶于水不易溶于有机溶剂的物理特性,本研究比较了分别以纯水、5%甲醇、10%甲醇、50%甲醇、75%甲醇、100%甲醇、5%乙醇、10%乙醇、50%乙醇、75%乙醇、100%乙醇为提取剂,超声提取 30 min 的提取效果,取 NMN 胶囊保健品为样品。结果表明,采用 5% 甲醇水溶液为提取溶剂时, NMN 的提取率最高。此外,为选择最优的提取时间和提取效率,以 5% 甲醇水溶液为提取溶剂在(200 W、40 kHz)下对比 10、20、30、40、50、60 min 超声提取时间的提取效率。在 0~30 min 内 NMN 含量随着超声时间增加逐渐升高,30~40 min 后 NMN 含量有所下降至基本保持稳定。综上,选用以 5% 甲醇水溶液为提取溶剂超声萃取 30 min 作为本研究的提取方法。

2.2.2 净化方法优化

考虑到不同种类食品其基质不同,而基质效应对液相色谱串联质谱法测定结果准确性的影响不容忽视,因此需对样品进行净化处理。为达到最佳净化效果,选取固相萃取小柱对样品进行净化。根据 NMN 和 NAD⁺的分子结构和其弱酸性的理化性质,本研究分别选用 HLB 固相萃取小柱(反相极性吸附)和 MAX 固相萃取小柱(混合型阴离子交换吸附)为净化小柱,实验比较净化效果。配制质量浓度分别约为 500 ng/mL 的 α -NMN、 β -NMN 和 NAD⁺标准混合溶液,净化结果见表 2。由结果可知,HLB 柱对 α -NMN、 β -NMN 和 NAD⁺ 3 种目标物基本无保留,回收率均在 90%~110%之间,因此可用于去除样品溶液中的弱极性杂质;而 MAX 柱由于其对弱酸性化合物选择性高、保留能力强,可将 3 种目标物完全保留在固体小柱上。

根据化合物等电点优化的最佳 pH 以及 NMN 和 NAD⁺ 分子结构上带有磷酸基团,选择以 0.5 mol/L pH=3.0 的 KH₂PO₄ 溶液为洗脱液对 MAX 小柱进行洗脱。如表 2 所示, α -NMN、 β -NMN 和 NAD⁺ 3 种目标物回收率均在 90%~110%之间,基本被完全洗脱。综上,选用 HLB 固相萃取小柱直通净化和 MAX 固相萃取小柱+0.5 mol/L pH=3 KH₂PO₄ 溶液洗脱净化两种净化方法。其中 HLB 小柱直接净化可用于基质相对简单的样品,去除样品中可能对分离分析

造成干扰的弱极性杂质;而 MAX 固相萃取小柱+0.5 mol/L pH=3 KH₂PO₄ 溶液洗脱净化则可用于基质复杂样品中 NMN 和 NAD⁺的高选择性净化。

2.3 线性范围、方法检出限和定量限

以混合标准系列工作液的浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,得到 α -NMN 的线性回归方程为 $Y = 4256.1X + 2855.9$, 相关系数 r^2 为 0.9999; β -NMN 的线性回归方程为 $Y = 3941.3X - 5887.0$, 相关系数 r^2 为 0.9998; NAD⁺ 的线性回归方程为 $Y = 565.0X - 782.4$, 相关系数 r^2 为 0.9995。表明以该方法测试 α -NMN、 β -NMN 和 NAD⁺ 含量,在 10~1000 ng/mL 范围内,方法线性关系良好。

将标准溶液连续稀释后上机分析,以得到方法检出限和定量限分别为 α -NMN: 4.0、10.0 ng/mL; β -NMN: 2.0、5.0 ng/mL; NAD⁺: 1.0、3.0 ng/mL。其中,采用 HLB 固相萃取小柱直通净化比 MAX 固相萃取小柱+0.5 mol/L pH=3 KH₂PO₄ 溶液洗脱净化具有更低的检出限,适用于样品中 3 种目标物含量较低时的检测。

2.4 方法精密度

选用番茄样品,进行 α -NMN、 β -NMN 和 NAD⁺ 含量精密度实验。按照上述样品前处理方法平行配制 12 份试样溶液进行测试(HLB 柱净化和 MAX 柱净化各 6 份),12 份样品中 α -NMN 和 NAD⁺ 均未检出,6 份经 HLB 柱净化的样品中 β -NMN 测试结果的平均含量分别为 0.424 mg/kg, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 4.8%,6 份经 MAX 柱净化的样品中 β -NMN 测试结果的平均含量分别为 0.437 mg/kg, RSD 为 3.9%。以上结果均符合 GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》附录 F 中该浓度实验室内变异系数 \leq 11%的要求,方法重复性良好。

2.5 加标回收率

以新鲜番茄为样品,进行 α -NMN、 β -NMN 和 NAD⁺ 含量测定方法的准确度实验。向样品中加入适量 α -NMN、 β -NMN 和 NAD⁺ 标准品,按照上述优化好的前处理检测方法平行测定 6 次,计算回收率,结果见表 3。回收率均在 90~110%范围内,符合 GB/T 27404—2008 附录 F 的要求。

表 2 HLB 小柱和 MAX 小柱对 α -NMN、 β -NMN 和 NAD⁺ 的净化回收率
Table 2 Recoveries of α -NMN, β -NMN and NAD⁺ purified by HLB SPE cartridge and MAX SPE cartridge

待检物	未净化标准溶液质量浓度/ (ng/mL)	HLB 小柱 (直通净化)		MAX 小柱 (直通净化)		MAX 小柱 (KH ₂ PO ₄ 洗脱净化)	
		质量浓度/ (ng/mL)	回收率/%	质量浓度/ (ng/mL)	回收率/%	质量浓度/ (ng/mL)	回收率/%
α -NMN	249.6 \pm 6.2	235.2 \pm 8.1	94.2 \pm 0.9	7.6 \pm 0.8*	3.0 \pm 0.5	240.5 \pm 3.6	96.4 \pm 1.0
β -NMN	268.5 \pm 2.2	256.5 \pm 4.6	95.5 \pm 1.9	3.9 \pm 0.3*	1.5 \pm 0.4	254.3 \pm 6.2	94.7 \pm 1.9
NAD ⁺	296.1 \pm 1.8	316.5 \pm 2.4	106.9 \pm 2.1	4.7 \pm 0.6*	1.6 \pm 0.2	308.0 \pm 4.8	103.3 \pm 2.5

注: *所测浓度已低于实验线性范围。

2.6 实际样品含量测定

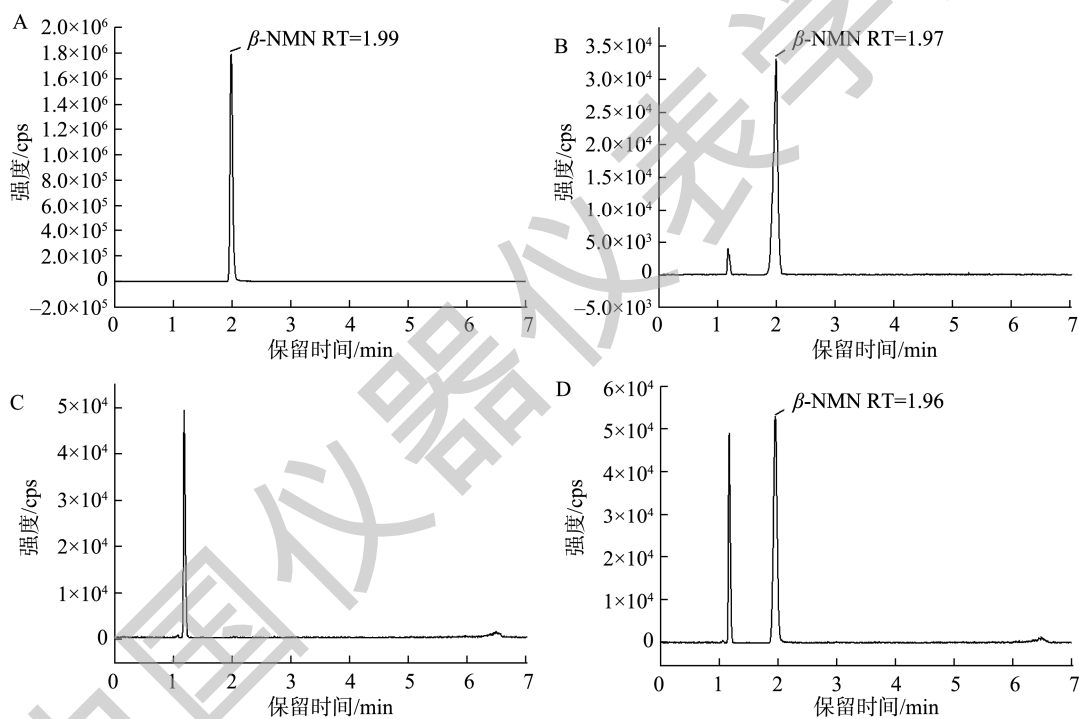
采用优化后的前处理方法提取净化 1.1 中所选食品材料, 其 α -NMN、 β -NMN 和 NAD^+ 含量检测结果见图 4 和表 4, 除胶囊和番茄中检出 β -NMN 外, 其余均为检出。其中图 4D 为

铁皮石斛样品加入 β -NMN 标准溶液后按 2.2 前处理方法后的检测结果, 其与图 4C 比较说明, 样品溶液并未因基质效应导致目标峰偏离。这也说明了本研究建立的方法对 β -NMN 的检测准确性高, 不会受样品中的杂质干扰, 基质效应可忽略。

表 3 回收率实验结果

Table 3 Experimental result of recoveries

项目	净化方式	本底含量/(mg/kg)	加标量/(mg/kg)	平均回收率/%	RSDs/%
α -NMN	HLB	0.000	0.400	93.8	2.5
	MAX	0.000	0.400	96.0	2.1
β -NMN	HLB	0.424	0.400	102.3	5.7
	MAX	0.424	0.400	103.8	5.0
NAD^+	HLB	0.000	0.400	94.7	6.5
	MAX	0.000	0.400	90.3	5.4



注: A. 胶囊; B. 新鲜番茄; C. 干制铁皮石斛; D. 干制铁皮石斛+ β -NMN 标准溶液。

图 4 不同食品样品提取物总离子流色谱图

Fig.4 Total ion chromatograms of extracts from different food samples

表 4 样品中 α -NMN、 β -NMN 和 NAD^+ 的含量

Table 4 Content of α -NMN, β -NMN and NAD^+ in the samples

样品编号	净化方式	α -NMN 含量/(mg/kg)	β -NMN 含量/(mg/kg)	NAD^+ 含量/(mg/kg)
A(胶囊)	HLB	N.D.	1.15×10^5	N.D.
	MAB	N.D.	1.12×10^5	N.D.
B1(番茄)	HLB	N.D.	0.41	N.D.
	MAX	N.D.	0.45	N.D.
B2(铁皮石斛)	HLB	N.D.	N.D.	N.D.
	MAX	N.D.	N.D.	N.D.

注: N.D.表示未检出。

3 结论

本研究建立了一种利用超高效液相色谱-串联质谱法同时快速检测食品中 NMN 异构体和 NAD⁺含量的方法。该方法灵敏度高、选择性好、结果准确可靠,可应用于不同基质食品中 NMN 异构体和 NAD⁺含量的检测,用于产品的质量控制在满足国内市场对食品中 NMN 和 NAD⁺监管的需要。此外,本研究通过优化色谱条件,使 NMN α 、 β 异构体达到完全分离,因此还可应用于常规大量生产过程中 NMN 的异构体分析,为该物质的进一步研究提供了一种有效的分离检测手段。

参考文献

- [1] 赵娟,张健,余志坚. 烟酰胺单核苷酸的研究及应用进展[J]. 食品科技, 2018, 43(4): 257-262.
ZHAO J, ZHANG J, YU ZJ. Research and application progress of niacinamide mononucleotides [J]. Food Sci Technol, 2018, 43(4): 257-262.
- [2] 史海波,赵海,周春松. β -烟酰胺单核苷酸制备研究进展[J]. 精细化工中间体, 2020, 50(4): 1-5.
SHI HB, ZHAO H, ZHOU CS. Advances in preparation of β -nicotinamide mononucleotide [J]. Res Chem Int, 2020, 50(4): 1-5.
- [3] YOSHINO J, BAUR JA, IMAI SI. NAD⁺ intermediates: The biology and therapeutic potential of NMN and NR [J]. Cell Metab, 2018, 27(3): 513-528.
- [4] 陈韬,曹卉,董丽,等. β -烟酰胺单核苷酸对生理机能影响的研究进展[J]. 食品科学, 2023, 44(9): 382-391.
CHEN T, CAO H, DONG L, et al. Advance in understanding the effect of β -nicotinamide mononucleotide on physiological functions [J]. Food Sci, 2023, 44(9): 382-391.
- [5] 张颖,蒋雨馨,朱逸浩,等. β -烟酰胺单核苷酸合成技术研究进展[J]. 食品科技, 2020, 45(10): 236-240.
ZHANG Y, JIANG YX, ZHU YH, et al. Advance in synthesis of β -nicotinamide mononucleotide [J]. Food Sci Technol, 2020, 45(10): 236-240.
- [6] VERDIN E. NAD⁺ in aging, metabolism, and neurodegeneration [J]. Science, 2015, 350(6265): 1208-1213.
- [7] IMAI SI. The NAD world: A new systemic regulatory network for metabolism and aging-Sirt1, systemic NAD biosynthesis, and their importance [J]. Cell Biochem Biophys, 2009, 53(2): 65-74.
- [8] OKABE K, YAKU K, UCHIDA Y, et al. Oral administration of nicotinamide mononucleotide is safe and efficiently increases blood nicotinamide adenine dinucleotide levels in healthy subjects [J]. Front Nutr, 2022, 9: 868640.
- [9] MIAO RR, WANG LB, CHEN ZG, et al. Advances in the study of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in myocardial remodeling [J]. Front Cardiovascul Med, 2022, 9: 1000578.
- [10] 黄丁宇,缪丹旎,赵巧灵,等. QuEChERS 结合超高效液相色谱-串联质谱法同时测定果蔬中 12 种新烟碱类农药残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(9): 186-194.
HUANG DN, MIAO DY, ZHAO QL, et al. Simultaneous determination of 12 kinds of neonicotinoid pesticides in fruits and vegetables by QuEChERS combined with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2023, 14(9): 186-194.
- [11] POLJSAK B, KOVAČ V, MILISAV I. Healthy lifestyle recommendations: Do the beneficial effects originate from NAD⁺ amount at the cellular level? [J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 1-12.
- [12] FAN L, CACICEDO JM, IDO Y. Impaired nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) metabolism in diabetes and diabetic tissues: Implications for nicotinamide-related compound treatment [J]. J Diabetes Invest, 2020, 11(6): 1403-1419.
- [13] MAKAROV MV, MIGAUD ME. Syntheses and chemical properties of β -nicotinamide riboside and its analogues and derivatives [J]. Beilstein J Org Chem, 2019, 15(1): 401-430.
- [14] MAKAROV MV, HAYAT F, GRAVES B, et al. Chemical and biochemical reactivity of the reduced forms of nicotinamide riboside [J]. ACS Chem Biol, 2021, 16(4): 604-614.
- [15] NADEESHANI H, LI J, YING T, et al. Nicotinamide mononucleotide (NMN) as an anti-aging health product—promises and safety concerns [J]. J Adv Res, 2022, 37: 267-278.
- [16] 邱世婷,侯雪,雷绍荣,等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定茶叶中烟酰胺腺嘌呤二核苷酸及其 4 种前体化合物含量[J]. 茶叶科学, 2023, 43(2): 216-226.
QIU ST, HOU X, LEI SR, et al. Simultaneous determination of nicotinamide adenine dinucleotide and its four precursors in tea by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Tea Sci, 2023, 43(2): 216-226.
- [17] ANAIZI N. Nicotinamide adenine dinucleotide, the sirtuins, and the secret of a long health span [J]. Ibmnsina J Med Biome, 2020, 12(1): 8-22.
- [18] 孙笑笑. 原料再上新!“NMN”能否搅动美妆市场? [J]. 中国化妆品, 2022, 439(Z2): 16-17.
SUN XX. The raw material is new again! Can 'NMN' stir the beauty market? [J]. China Cosmet, 2022, 439(Z2): 16-17.
- [19] SOMA M, LALAM SK. The role of nicotinamide mononucleotide (NMN) in anti-aging, longevity, and its potential for treating chronic conditions [J]. Mol Biol Reports, 2022, 49: 9737-9748.
- [20] NADEESHANI H, LI J, YING T, et al. Nicotinamide mononucleotide (NMN) as an anti-aging health product—Promises and safety concerns [J]. J Adv Res, 2022, 37: 267-278.
- [21] SHEN Q, ZHANG SJ, XUE YZ, et al. Biological synthesis of nicotinamide mononucleotide [J]. Biotechnol Lett, 2021, 43: 2199-2208.
- [22] 刘文强,李莉. 手性药物及其中间体拆分方法的研究进展[J]. 药学学报, 2018, 53(1): 37-46.
LIU W, LI L. Research progress in separation of chiral drugs and their intermediates [J]. Acta Pharm Sin, 2018, 53(1): 37-46.
- [23] 陈宇娟,周楚然,黄建忠,等. β -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 β -nicotinamide mononucleotides [J]. *J Biol Eng*, 2023, 39(2): 516–536.
- [24] 赵彤, 赵洪木, 宋美洁, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定蜂王幼虫中烟酰胺单核苷酸的含量[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(8): 265–269.
- ZHAO T, ZHAO HM, SONG MJ, *et al.* Determination of niacinamide mononucleotides in queen bee larvae by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Ferment Ind*, 2022, 48(8): 265–269.
- [25] 冯雪萍, 朱银宏, 程倩, 等. 高效液相色谱法测定保健食品中 β -烟酰胺单核苷酸[J]. *中国食品添加剂*, 2021, 32(11): 153–157.
- FENG XP, ZHU YH, CHENG Q, *et al.* Determination of β -nicotinamide mononucleotides in health food by high performance liquid chromatography [J]. *China Food Addit*, 2021, 32(11): 153–157.
- [26] 孟辰笑凝, 郭中原, 李春, 等. 定量核磁共振法测定 β -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 β -niacinamide mononucleotide by quantitative nuclear magnetic resonance [J]. *Chin Pharm J*, 2021, 56(2): 135–139.
- [27] 张文宇, 兰韬, 赵溪, 等. β -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, 22.
- ZHANG WY, LAN T, ZHAO X, *et al.* Determination of NMN content in β -nicotinamide mononucleotide cross-border products [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2022, 43(10): 1–7, 22.
- [28] 马晓丽, 邹萍萍, 雷伟, 等. 定量核磁技术参数的优化及其在中草药定量分析领域的应用[J]. *药学报*, 2014, 49(9): 1248–1257.
- MA XL, ZOU PP, LEI W, *et al.* Optimization of quantitative nuclear magnetic parameters and its application in quantitative analysis of Chinese herbal medicine [J]. *Acta Pharm Sin*, 2014, 49(9): 1248–1257.
- [29] REDEUIL K, VULCANO J, PRENCIPE FP, *et al.* First quantification of nicotinamide riboside with B3 vitamers and coenzymes secreted in human milk by liquid chromatography-tandem-mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2019, 1110-1111: 74–80.
- [30] 国家药典委员会.《中国药典》[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020. National Pharmacopoeia Commission. *Chinese pharmacopoeia* [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020.

(责任编辑: 韩晓红 郑 丽)

作者简介

黄莹涓, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: huangyj2@grgtest.com

白卫东, 博士, 教授, 主要研究方向为食品风味化学。

E-mail: weidong_bai2010@163.com

董 浩, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品质量安全控制与营养健康。

E-mail: donghao@zhku.edu.cn