

¹H-NMRによるニコチンアミドモノヌクレオチド (NMN) 定量法の開発

笛木 周平, 近宗 雅人, 山本 佳奈, 道川 麻美, 内藤 早苗, 水越 一史, 加藤 毅
一般財団法人日本食品分析センター

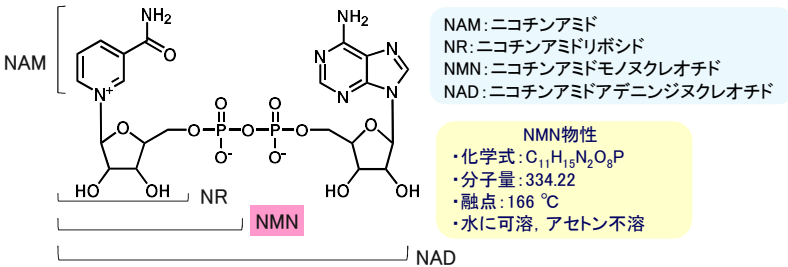
はじめに

NADは生体内中枢代謝経路の主要な補酵素として知られている。そのNADの補給源として、NMN及びNAD前駆体の、健康食品としての利用が近年期待されている。栄養補助食品(カプセル)中のNMN及びその関連成分について、¹H-NMRを用いた迅速かつ高精度な同時定量法の開発を目指し検討を行った。NMN及び6種の関連成分について¹H-NMRを測定し、NMNを識別できるか否かを検証した。開発した分析法の性能は、直線性、真度及び精度等の分析能パラメータについて評価した。また、NMN及びその関連成分を含有する栄養補助食品を分析し、開発した分析法を適用できるか否かを評価した。

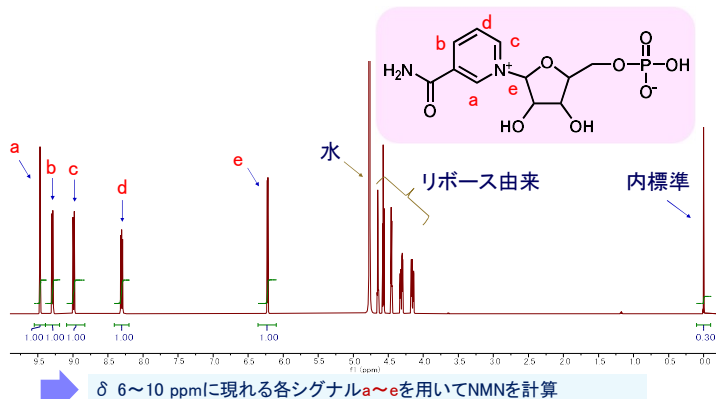
ニコチンアミドモノヌクレチド(NMN)とは

- ◆生体内の中枢代謝経路における酸化還元反応の主要な補酵素であるNADの前駆体。
- ◆加齢により体内で減少するNADの有力な補給源として注目される。
- ◆厚生労働省はNMN及びNRについて、2020年3月「非医薬品リスト」に追加^{*1)}。

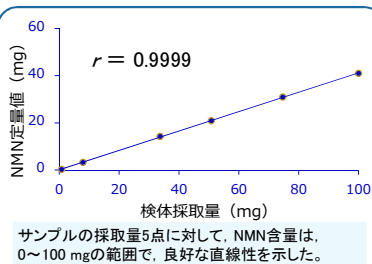
^{*1)} 厚生労働省HP: 食薬区分における成分本質(原材料)の取り扱いの例示(令和2年3月31日)



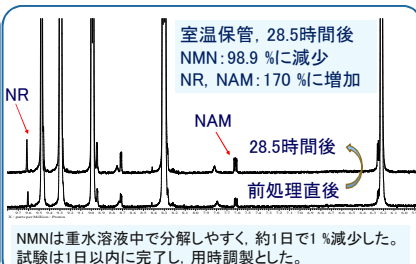
NMNの水素核一次元核磁気共鳴スペクトル



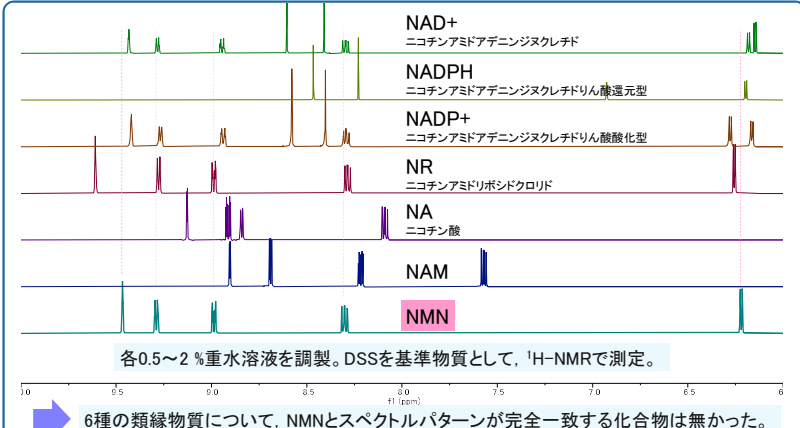
NMNの定量直線性



NMNの安定性



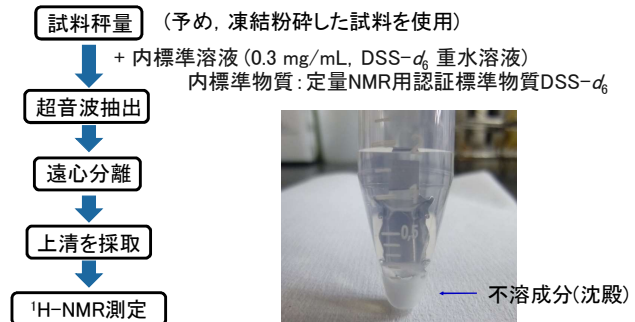
NMNの特異性の確認(類縁物質のNMRスペクトル測定)



まとめ

- ・本試験法はNMNとその類縁物質6種(NAM, NR, β -NADP⁺, β -NADPH及び β -NAD⁺)を識別可能であった。
- ・本試験法は直線性、真度及び精度ともに目標値を満たし、良好な性能を示した。
- ・市場から入手可能な栄養補助食品(ハードカプセル等)8種のうち、6種について、配合量と同等の結果を得ることができた。
- ・1検体あたりの分析時間は2時間程度で完了し、分解しやすいNMNの定量法として適切であった。

前処理方法



NMR測定条件

装置: JNM-ECA500 II [日本電子株式会社]
(水素核500 MHz-NMR)
待ち時間: 20秒(最長 T₁の5倍)
取り込み時間: 4秒
観測幅: 5.5 ppm ± 20 ppm
積算回数: 64回
パルス角: 90°
測定温度: 25 °C
デカップル核: ¹³C
スピニング: オフ
測定時間: 26.4分



分析法の性能評価

真度(3配合量, n=3)

NMN濃度	定量値(%)			平均回収率 (%)	RSD(%)
	n=1	n=2	n=3		
10 %含有	9.83	9.69	9.63	97.1	1.1
30 %含有	28.19	28.36	28.49	95.9	0.5
50 %含有	48.41	48.71	48.37	100.0	0.4

精度(50 %添加試料, n=2, 5日間)

定量値(%)						併行精度 (RSD _r %)	室内精度 (RSD _R %)
1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	平均		
48.41	48.04	47.46	48.51	47.54	48.1	0.6	0.9
48.71	47.99	48.25	48.38	47.76			

セルロース微結晶にNMNを相当量添加した試料について試験を行った。

目標の真度92 %以上、併行精度2 %及び室内精度4 %に対し^{*2)}、真度は平均97.7 % (96~100 %), 精度は併行精度0.6 %及び室内精度0.9 %と目標を満たした。

^{*2)} AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS (2013) GUIDELINES FOR DIETARY SUPPLEMENTS AND BOTANICALS Appendix Kより

市販サプリメント8種類の含量測定

検体	表示配合量 (mg/粒)	定量結果 (mg/粒, n=3)	RSD %
A	130	NMN: 134 NR: 0.7 NAM: 0.2	1.1
B	125	NMN: 126 NR: 0.15 NAM: 0.23	1.1
C	160	NMN: 118 NR: 0.09 NAM: 0.06	1.5
D	NMN 5 ナイシン 24	NMN: 4 NAM: 24	53 (NAM 4.5)
E	0.1	NMN: 0.1	31
F	表示なし	ND	-
G	NR 300	NR: 328	0.4
H	NAM 250	NAM: 268	1.3