附件 3

中国检验检测学会团体标准草案编制说明

（参考格式）

<table>
<tr><td colspan="5">基本信息</td></tr>
<tr><td rowspan="2">标准草案名称</td><td>中文</td><td colspan="3">β-烟酰胺单核苷酸（NMN）化妆品中 NMN 含量测定 高效液相色谱法</td></tr>
<tr><td>英文</td><td colspan="3">Determination of β-Nicotinamide mononucleotide (NMN) in NMN cosmetics High performance liquid chromatography</td></tr>
<tr><td>项目类型</td><td colspan="2">☑ 制定 □修订
（被修订标准名称及编号： ）</td><td>计划编号</td><td>2022TB028</td></tr>
<tr><td>起止时间</td><td colspan="4">2022 年 7 月---2024 年 12 月</td></tr>
<tr><td>标准起草单位</td><td colspan="4">中国标准化研究院、湖北安琪邦泰生物科技有限公司、睿科集团(厦门)股份有限公司、内蒙古金达威药业有限公司、北京科德诺思技术有限公司、检科测试集团、康盈红莓（中山）生物科技有限公司、吉林百奥生物科技有限公司、蓝源大地（香港）有限公司、依利特(苏州)分析仪器有限公司、科诺美（北京）科技有限公司、庶正康讯（北京）商务咨询有限公司、北京信立方科技发展股份有限公司等。</td></tr>
<tr><td>起草组成员</td><td colspan="4">兰韬、张琦、徐鲁明、敖燕飞、艾红、曲彬、田世民、王大宏、乐粉鹏、高扬、王勇、孙元社、王覃、李芃、云振宇、于聪聪、吴琦、张文宇、周奇等。</td></tr>
<tr><td>项目调整情况</td><td colspan="4">无</td></tr>
<tr><td colspan="5">背景、目的和意义</td></tr>
<tr><td>背景</td><td colspan="4">β-烟酰胺单核苷酸(β-nicotinamide mononucleotide，NMN)是一种具有生物活性的核苷酸，由磷酸基和含核苷的核糖与烟酰胺反应自然形成。在动物细胞中，NMN 是一种细胞能量来源，是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide，NAD+)的前体物质，在细胞增殖和功能中起着至关重要的作用，比如参与调节细胞存活，细胞凋亡、DNA 修复、免疫应答、昼夜节律等多种生理功能。随着年龄增长，体内 NAD+水平会降低，导致 DNA 修复能力下降，驱动衰老进程。相关研究表明 NMN 是目前补充 NAD+最有效的方式，它可以通过消化系统完好无损地快速吸收，进而达到延缓衰老的作用，其作为化妆品原料具有抗皱、抗氧化、美白等功效，所以 NMN 近年来成为化妆品领域的研究热点，并成为化妆品行业的珍贵原料。
2022 年 1 月中国国家药监局 NMPA 公示了 NMN 作为化妆品新原料备案通过的信息，其可作为化妆品原料用于生产化妆品。从目前的备案信息发现，各企业备案的 NMN 在化妆品中的最大允许浓度为≤3%。但由于目前此类产品存在以次充好、虚假宣传的情况，国际上还没有 NMN 化妆品中 NMN 含量测定方法标准，无法对此类产品中 NMN 含量进行准确测定，就无法对相关化妆品进行质量控制和监管。所以非常有必要研制 NMN 类化妆品产品中 NMN 含量的检测方法标准，实现此类产品的有效监管，促进相关产品的高质量发展。</td></tr>
</table>

目的	本标准针对目前国际上还没有化妆品中 NMN 含量测定方法标准，此类产品中 NMN 含量无法进行准确测定，质量无法控制的问题，提出研制化妆品中 NMN 含量的检测方法标准。
意义	研制化妆品中 NMN 含量的检测方法标准，可以有效解决 NMN 行业中以次充好、虚假宣传的问题，实现此类产品的有效监管，从而实现净化市场的目的。我国是 NMN 原料的主要生产国之一，开发相关标准方法对于促进我国 NMN 的综合利用具有重要意义。
工作简况	
标准主要起草人任务分工	兰韬：标准牵头人，负责标准的技术内容确定、审核、文本撰写 张琦：标准主要参与人，负责标准技术内容的确定和修改 徐鲁明：标准主要参与人，负责标准技术内容的确定和修改 敖燕飞 ：标准主要参与人，负责标准技术内容的确定和修改 艾红：标准主要参与人，负责标准技术内容的确定和修改 曲彬：标准主要参与人，负责标准技术内容的确定和修改 田世民：标准主要参与人，负责标准技术内容的确定和修改 王大宏：标准主要参与人，负责标准技术内容的确定和修改 乐粉鹏：标准主要参与人，负责标准技术内容的确定和修改 高扬：标准参与人，负责标准内容的确定和验证 王勇：标准参与人，负责标准内容的确定和验证 孙元社：标准参与人，负责标准内容的确定和验证 王覃：标准参与人，负责标准内容的确定和验证 李芃：标准参与人，负责标准参与单位间协调 云振宇：标准参与人，负责标准技术内容的审核 于聪聪：标准参与人，负责标准文本的修改 吴琦：标准参与人，负责标准文本的修改 张文宇：标准参与人，负责检测方法开发工作 周奇：标准参与人，负责标准文本的修改

主要工作过程	1.分工情况 （1）中国标准化研究院，负责标准总体策划，并负责标准框架构建和认证技术内容编写和完善；负责标准起草、修改、标准征求意见的汇总和处理、送审及报批等事宜 （2）湖北安琪邦泰生物科技有限公司、内蒙古金达威药业有限公司、康盈红莓（中山）生物科技有限公司、吉林百奥生物科技有限公司、蓝源大地（香港）有限公司，负责检测技术的研发和实践，负责标准技术适应性的验证； （3）睿科集团(厦门)股份有限公司、北京科德诺思技术有限公司、检科测试集团、依利特(苏州)分析仪器有限公司、科诺美（北京）科技有限公司，负责提供相应的认证技术支持和认证实践支持，并提出起草意见；协助完成标准起草、修改、标准征求意见的汇总和处理、送审及报批等事宜； （4）庶正康讯（北京）商务咨询有限公司、北京信立方科技发展股份有限公司等单位负责标准各单位的沟通联系，以及标准的宣贯工作。 2.起草阶段 （1）2022 年 5-6 月，相关文献检索和收集； （2）2022 年 6 月，开展标准编制可行性研讨，并协调开展标准立项工作； （3）2022 年 6 月，进一步完成相关标准及技术文件的收集、整理工作，讨论本标准制定的意义，并就形成的文献综述进行系统分析； （4）2022 年 7 月，完成标准立项申报工作； （5）2022 年 8-12 月，完成标准草案撰写，并召开启动会； （6）2023 年 1-6 月，完成标准验证工作； 3.征求意见阶段 （7）2024 年 4 月-5 月，开展标准的征求意见工作； （8）2024 年 5 月，修改标准 4.标准审定阶段 （9）2024 年 6 月，召开标准审定会； （10）2024 年 7 月，完善标准，形成标准报批稿；
标准编制原则和确定标准主要内容的论据	

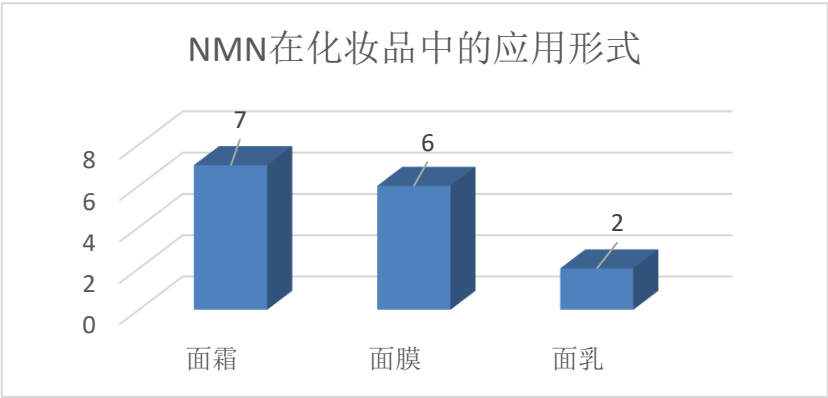
<table>
<tr>
<td>标准编制原则</td>
<td>1、 适用性
在确定标准项目时首先要注意标准的适用范围，既不要让标准所涵盖的领域过宽，使编制的标准没有实际技术内容；也不要让标准所涵盖的领域过窄，造成对标准的肢解，无谓地增加标准项目。
2、 先进性
制定标准时首先要注意标准所涉及的技术内容是否满足既定的需求。
3、 统一性和协调性
编写标准草案时要在充分调查研究的基础上，认真分析国内外同类技术标准的技术水平，在预期可达到的条件下，积极地把先进技术纳入标准，提高产品技术水平。编制过程中要注意符合法律法规的规定以及与相关标准协调，避免与法律法规、相关标准之间出现矛盾，给标准的实施造成困难。
4、 经济性和社会效益
制定标准时要以满足实际需要出发，不要一味地追求高性能、高指标，避免造成经济浪费。结合我国国情积极采用国际标准和国外先进标准，加快和国际接轨的步伐，提高标准的竞争能力。</td>
</tr>
<tr>
<td>确定标准主要内容的论据</td>
<td>1、确定标准的主要构成部分
参考通常的检测方法标准要求，本标准包括范围、规范性引用文件、原理、试剂和材料、仪器和设备、测定步骤、结果计算与表示、重复性、其他、附录等 10 部分组成。
2、范围的确定
目前含生物发酵的NMN化妆品产品主要以β-烟酰胺单核苷酸为原料，应用形式包括面霜、面膜、面乳等，标准起草组对目前电商平台售卖的NMN化妆品的产品进行调研，针对其应用形式进行了梳理，结果如图1所示。由图可得，NMN应用形式主要有三种，分别是NMN面霜产品（7种），面膜产品（6种），面乳产品（2种），且面霜和面膜约占据了NMN化妆品的87%。因此，确定本文件适用于含有NMN的面霜、面膜、面乳产品中NMN的测定。
 

图 1 NMN 在化妆品中应用形式分布图</td>
</tr>
</table>

3、方法学开发

3.1 液相色谱条件优化

本实验主要对色谱柱种类和流动相比例对 NMN 的分离条件进行了优化。首先，由于 NMN 地极性较大，实验对比了常规的 C18 色谱柱和 HILIC 色谱柱下 NMN 的分离情况，由图 2 可得，C18 色谱柱对 NMN 几乎没有保留，出峰时间过早，这样容易与样品基质峰发生重叠，而 HILIC 色谱柱对 NMN 有一定的保留，且出峰时间约为 6 min，所以本研究采用对于极性样品分离效果较好的 HILIC 色谱柱进行样品的分离。

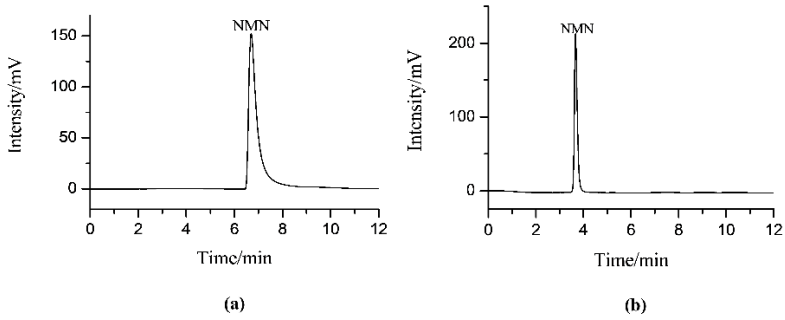


图 2 （a） HILIC 色谱柱下 NMN 的分离;（b） C18 色谱柱下 NMN 的分离

其次，实验还对流动相比例进行了优化，实验采用 50%甲醇水溶液作为提取液提取面膜精华液、面霜和面乳，配制成待测液，以 0.1%甲酸水溶液和 0.1%甲酸甲醇作为流动相，采用等度洗脱的方式，对比了三种基质中流动相比例为 80:20，50:50，85:15 时 NMN 的分离情况，分离谱图如图 3 所示，由图可得，随着流动相中甲醇含量的增大，三种基质中 NMN 的出峰时间逐渐后移，NMN 也逐渐与基质分离开来，当样品以 85%甲醇比例等度洗脱时，NMN 与基质得到有效分离，NMN 的出峰时间较短，峰形也基本满足高斯分布，可以达到基质中杂质峰与被分析物色谱峰分离的效果，降低了杂质峰干扰的可能，从而省去对提取液进行净化处理的步骤，使得操作简便、耗时较短，提高了分析检测效率。因此实验等度洗脱的方式，流动相比例为 85:15 进行后续的实验。

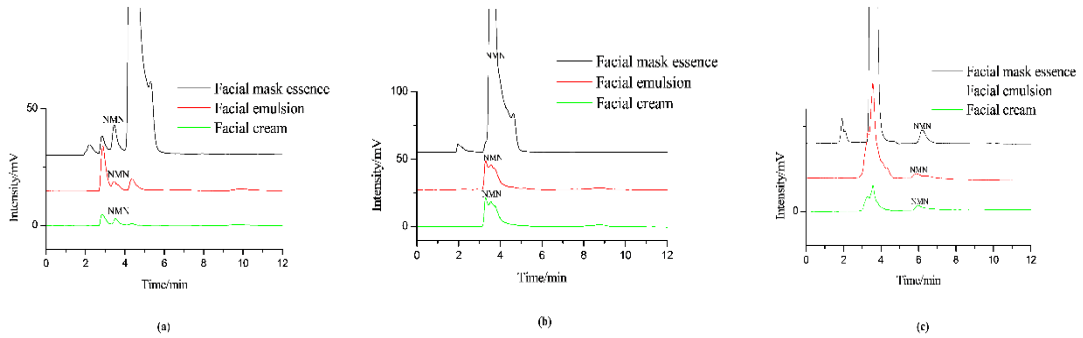


图 3(a) 面膜精华液、面霜和面乳在 80%(0.1%甲酸水溶液)+20%甲醇比例下的色谱图； (b) 面膜精华液、面霜和面乳在 50%(0.1%甲酸水溶液)+50%甲醇比例下的色谱图； (c) 面膜精华液、面霜和面乳在 15%(0.1%甲酸水溶液)+85%甲醇比例下的色谱图

3.2　前处理优化

3.2.1 提取溶剂的优化

根据 NMN 的理化性质[10-12]，NMN 在水中溶解度较大，在甲醇中溶解度较小，在仪器及实验条件相同情况下，本实验选择了水溶液、20%甲醇水溶液、50%甲醇水溶液、85%甲醇水溶液 4 种溶剂开展样品提取溶剂优化实验。分别称取 1.0g 面膜精华液、面霜和面乳样品，向其中各添加一定量的 NMN 标准储备液，使加标浓度为 10 μg/mL，分别以上述 4 种溶剂按照样品前处理过程进行提取，并测定加标回收率，结果如下表 1 所示。从表中可以看出，以 50%甲醇水溶液作为提取溶剂，样品的回收率可以控制在 90%-110%之间，同时偏差最小，具有最佳的提取效果。因此，在后续实验中采用 50%甲醇水提取溶剂进行提取。

表 1　不同提取溶剂下面膜精华液、面霜和面乳基质中 NMN 的加标回收率实验结果

化妆品	水溶液		85%甲醇水溶液		50%甲醇水溶液		20%甲醇水溶液	
	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
面膜	105.98	1.65	118.08	1.197	102.94	0.354	121.61	3.774
面霜	116.91	5.039	102.03	3.177	107.57	0.516	131.09	3.991
面乳	60.35	8.906	67.18	15.277	98.25	1.611	142.44	9.647

3.2.2 净化柱的优化

由于面乳、面霜样品中含有较多的酯类物质，样品过滤比较费力，且杂质物质对 NMN 的检测会有一定的影响，因此本实验采用两种净化柱对前处理过程也进行了优化，结果见表 2，由表可得，采用 2 号净化柱时，面霜和面乳基质中的 NMN 都能得到较好的回收率和较低的标准偏差，结果较为准确。

表 2 不同净化柱下面霜和面乳基质中 NMN 的加标回收率实验结果

化妆品	1 号净化柱（货号：ZC69028）		2 号净化柱（货号：ZC69032）	
	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
面霜	35.6	8.19	90.15	1.34
面乳	40.2	15.69	95.16	1.98

3.3 标准曲线、检出限、定量限

仪器条件：Venusil HILIC (4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 100 Å)，进样体积为 10 μL，流速 0.8 mL/min，柱温：35 ℃，检测波长为 235 nm，流动相 A 相为 0.1%甲酸水溶液，流动相 B 相为 0.1%甲酸甲醇溶液 A:B=15:85，等度洗脱，运行时间 12min。

在上述仪器条件对 NMN 的标准工作液进行上机实验，得到不同 NMN 浓度点的色谱图，通过 iChrom W5100 工作站绘制 NMN 标准曲线，得到线性回归方程，线性范围以及该方法的检出限和定量限，结果见表 3。

	保留时间 (min)	线性方程	线性相关系数 r	线性范围 (μg/mL)	检出限 (mg/kg)	定量限 (mg/kg)
NMN	6.98	Y=7.8X-75.1	0.999	5.0-500	86.4	0.3

3.4 仪器精密度实验

在参考的仪器条件下，对 NMN 标准溶液进行仪器精密度实验，平行测定 6 次，将测得的 NMN 的响应值带入线性方程计算得到溶液中 NMN 的含量，并计算 6 次测定结果的 RSD，结果如表 4 所示。

表 4 精密度实验结果

	1	2	3	4	5	6	RSD (%)
NMN 含量（mg/kg）	41.3	42.5	41.7	41.5	43.7	42.0	2.7

由上表数据可知，仪器精密度实验结果的 RSD 为 2.7%，表明精密度较好，可以用于后续实际样品中 NMN 含量的测定。

3.5 稳定性实验

在优化的实验条件及仪器条件下，采用 NMN 面膜、NMN 面霜和 NMN 面乳实际样品考察该方法的稳定性，经过 6 次平行实验，测得实际样品中 NMN 的浓度与 RSD，结果如表 5 所示。

表 5　方法稳定性测试结果

	1	2	3	4	5	6	RSD (%)
面膜（mg/kg）	12.0	11.8	12.1	11.8	12.0	12.0	5.3
面霜（mg/kg）	151.0	149.6	149.9	150.6	150.4	149.8	1.2
面乳（mg/kg）	13.6	13.7	13.5	13.7	13.6	13.7	2.5

结果表明，6 次平行测定的 RSD 在 1.2%-5.3%之间，说明精密度良好。

3.6 重复性实验

在优化的实验条件及仪器条件下，采用 NMN 面膜、NMN 面霜和 NMN 面乳实际样品考察该方法的重复性，经过 6 次平行实验，测得实际样品中 NMN 的浓度与 RSD，结果如表 5 所示。

表 6　重复性实验结果

	1	2	3	4	5	6	RSD (%)
面膜（mg/kg）	12.2	12.0	11.8	11.9	11.8	11.9	5.3
面霜（mg/kg）	151.1	150.5	150.3	150.2	150.1	150.9	0.3
面乳（mg/kg）	13.7	13.6	13.4	13.7	13.7	13.6	2.5

由上表数据可知，6 次测定结果的 RSD 在 0.3%-5.3%之间，说明该方法具有较好的稳定性。

3.7 加标回收实验

在优化的实验条件下，对 NMN 面膜、NMN 面霜和 NMN 面乳样品进行加标回收实验，加标水平为 5 mg/kg、10 mg/kg、50 mg/kg，测定的回收率及 RSD 结果见表 7。

表 7 加标回收实验结果

面膜精华液	5 mg/kg		10 mg/kg		50 mg/kg	
	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)
NMN	103.4	0.3	94.2	0.7	97.2	1.0
面霜	5 mg/kg		10 mg/kg		50 mg/kg	
	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)
NMN	105.7	0.02	109.4	0.2	102.2	0.3
面乳	5 mg/kg		10 mg/kg		50 mg/kg	
	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)
NMN	94.1	1.7	96.9	3.7	93.9	2.3

由上表数据可知，3 种不同基质中 NMN 的加标回收率实验结果在 93.9%-109.4%，回收率较好，RSD<3.7%，结果较为准确。

3.8 实际样品测定

按照本标准开发的 NMN 面膜、NMN 面霜和 NMN 面乳基质中 NMN 含量的检测方法对市售 5 个品牌的 7 个 NMN 产品中的 NMN 含量进行分析测试，检测结果见表 8。

表 8　7 种不同 NMN 产品中 NMN 含量(mg/kg) (n=3)

序号	NMN(测定值)	产品标称情况
1-面膜	12.1	标称含有，未标量
2-面膜	ND	标称含有，未标量
3-面霜	ND	标称含有，未标量
4-面霜	ND	标称含有，未标量
5-面霜	1501.8	标称含有，未标量
6-面霜	17.6	标称含有，未标量
7-面乳	13.7	标称含有，未标量

实际样品分析结果表明，部分标称含有 NMN 的实际样品并没有检出 NMN，说明部分产品存在虚假宣称的问题，且产品说明部分都未标识 NMN 的实际添加量，NMN 添加量参差不齐，NMN 的添加限量也没有明确的标准依据，说明此类相关化妆品的真实性及成分添加的准确性应加强监测，因此应当制定相应的化妆品中 NMN 的检测方法，完善监管制度以保障消费者的权益。

与现行法律法规、强制性标准和其他有关标准的关系	
法律法规和强制性标准的关系	无
与其他有关标准的关系	推荐性国家标准： 推荐性行业标准： 团体标准：《食品中 β-烟酰胺单核苷酸（NMN）含量测定 高效液相色谱法》（T/CCAA 65—2023） 国际标准和国外先进标准：
重大分歧意见的处理经过和依据	
贯彻该标准的要求和措施建议	