ICS 点击此处添加 ICS 号
CCS 点击此处添加 CCS 号

T/CITS

中 国 检 验 检 测 学 会 团 体 标 准

T/CITS XXXX—2022

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

Determination of β-Nicotinamide mononucleotide (NMN) in NMN cosmetics High performance liquid chromatography

（征求意见稿）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

2022－XX－XX 发布　　XXXX－XX－XX 实施

中国检验检测学会　　发 布

前　　言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则　第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容有可能涉及专利，本文件的发布机构不应承担识别这些专利的责任。

本文件由中国标准化研究院提出。

本文件由中国检验检测学会归口。

本文件起草单位：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。

本文件主要起草人：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。

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

1 范围

本文件规定了含生物发酵的β-烟酰胺单核苷酸（NMN）的化妆品中NMN含量测定的高效液相色谱法。

本文件适用于含NMN的面膜、面霜、面乳类化妆品产品中NMN含量的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

试样经50%甲醇水溶液溶解，超声提取后经过净化柱净化，并经离心除杂，旋转蒸发浓缩，微孔滤膜过滤后，亲水色谱柱分离，紫外检测器检测，外标法定量。

4 试剂和材料

除另外有规定外，所用试剂均为分析纯。

4.1 甲醇（CH_3OH）：色谱纯。

4.2 甲酸（HCOOH）：色谱纯。

4.3 NMN 标准品（$C_{11}H_{15}N_2O_8P$）：CAS：1094-61-7，纯度 ≥98%。

4.4 试样提取溶液（50%甲醇水溶液）：准确量取 500 mL 甲醇（4.1）于 1 L 容量瓶，加水定容，使用前经滤膜（4.9）抽滤。

4.5 流动相 A（0.1%甲酸水溶液）：准确量取 1 mL 甲酸（4.2）于 1 L 容量瓶，加水定容，经滤膜（4.9）抽滤，超声脱气后使用。

4.6 流动相 B 为纯甲醇溶液（4.1），使用前经滤膜（4.9）抽滤，超声脱气后使用。

4.7 NMN 标准储备液（1 mg/mL）：准确称取 10 mg NMN 标准品（4.3）置于 10 mL 容量瓶中，用试样提取溶液（4.4）溶解并定容，标准储备溶液避光保存于 4℃冰箱备用，有效期 1 个月。

4.8 NMN 标准工作溶液：分别准确移取适量 NMN 标准储备溶液（4.6），以试样提取溶液（4.4）稀释定容，摇匀，得到 NMN 系列标准工作溶液（质量浓度分别为 5 μg/mL、10 μg/mL、25 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL、200 μg/mL、500 μg/mL）。

4.9 水相滤膜：尼龙，13 mm，孔径 0.45 μm。

4.10 LAPS 净化柱，KNORTH ZC69032 Clean-up LPAS 净化柱，或性能相当者。

5 仪器和设备

5.1 高效液相色谱，配有柱温箱。

5.2 电子天平，感量 0.00001 g

5.3 涡旋振荡器。

5.4 超声波清洗器，功率不低于 250 W，或相当的设备。

5.5 离心机，不低于 10000 rpm，或相当的设备。

5.6 浓缩装置：真空旋转蒸发器（推荐高通量真空平行浓缩仪，或性能相当者）。

6 测定步骤

注：本章所述操作尽可能避免阳光直射或在强光下操作。

6.1 提取和浓缩

6.1.1 提取

精密称取试样1.0 g（精确到0.001 g），置于15 mL具塞离心管中，记录称量质量m_i。加入10 mL试样提取溶液（4.4），震荡2 min使其溶解，超声20 min使试样充分溶解。

6.1.2 净化

面霜、面乳等含脂类样品宜进行净化，提取液过净化柱（4.10）净化，收集净化液于15mL离心管中，以10000 rpm的速度离心15 min，取上清液再次以10000 rpm的速度离心15 min后，收集上清液于梨形瓶中备用。

6.1.3 浓缩

将上述盛有提取液或精华液的容器置于真空旋转蒸发器（5.6）上，于55 ℃水浴温度，200 r/min的转速，低真空下旋转蒸发浓缩至近干，用1 mL试样提取溶液（4.4）溶解，过0.45 μm水相滤膜（4.9）后，待测。若待测样品中NMN浓度较高，也可不经浓缩，直接取上清液过滤膜待测。

6.2 测定

6.2.1 高效液相色谱参考条件

高效液相色谱参考条件如下：

a） 色谱柱：HILIC 亲水色谱柱，250 mm×4.6 mm，粒径 5 μm，孔径 100Å，或性能相当者；
b） 流动相：流动相 A（4.5）：流动相 B（4.6）=15：85（V/V）等度洗脱
c） 进样体积：10 μL；
d） 柱温：35 ℃；
e） 流速：0.8 mL/min；
f） 检测波长：235 nm

6.2.2 标准曲线绘制

将标准工作溶液（4.8），按6.3.1 列出的条件依次进样，扣除空白值，分别测定得到NMN的峰面积。以测得峰面积为纵坐标，对应的标准溶液浓度为横坐标，绘制标准曲线。

标准品色谱图参见附录A。

6.2.3 试样溶液的测定

将试样溶液（6.1）按仪器参考条件（6.2.1）进行测定，以保留时间定性，得到试样溶液中NMN组分的峰面积。根据标准曲线得到待测液中NMN的浓度，平行测定次数不少于两次。待测样液中NMN的响应值应在标准曲线线性范围内，超过线性范围则应稀释后再进行分析。NMN面膜精华液产品、NMN面乳产品、NMN面霜产品色谱图见附录A。

分析过程中，每 20 次试样测定后应加入1个与试样峰面积相近的标准工作液，如果测得的值与原值相对平均偏差超过 5.0%，则应重新进行标准曲线的制作。

6.2.4 空白实验

除不加试样外，采用完全相同的分析步骤、试剂和用量，进行平行操作。

7 结果计算与表示

7.1 结果计算

按照式 (1) 计算：

$$\omega = \frac{C \times V}{m_i} f \qquad (1)$$

式中：

ω—样品中 NMN 的质量分数，单位为 mg/kg；

V—提取溶液体积，单位为 mL；

C—由标准曲线所得出的溶液中 NMN 的浓度，单位为 μg/mL；

m_i—试样质量，单位为克 (g)；

f—稀释倍数。

注：计算结果应扣除空白值，测定结果用平行测定的算术平均值表示，保留三位有效数字。

8 重复性

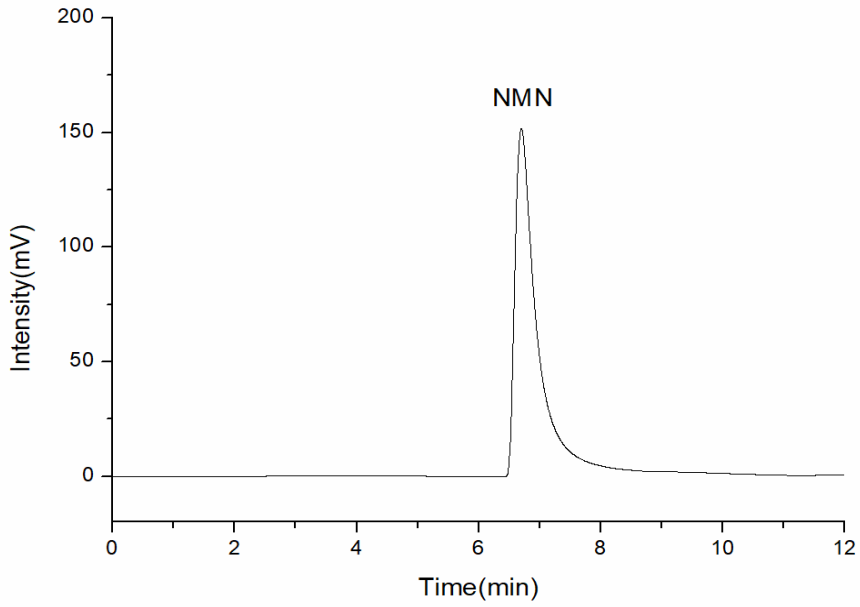
在重复条件下获得的2次独立测试结果的绝对差须不大于2 个测定值的算术平均值的 10%。

9 其他

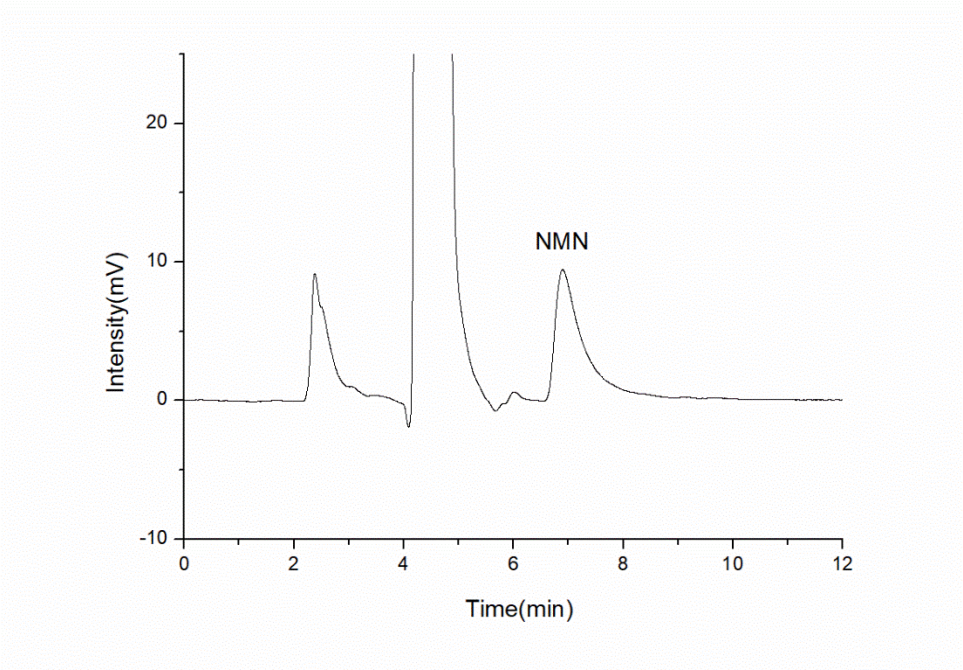
当试样量为1.0 g，定容体积为1 mL，NMN的定量限为1.5 mg/kg。

附　录　A
(附录性资料)

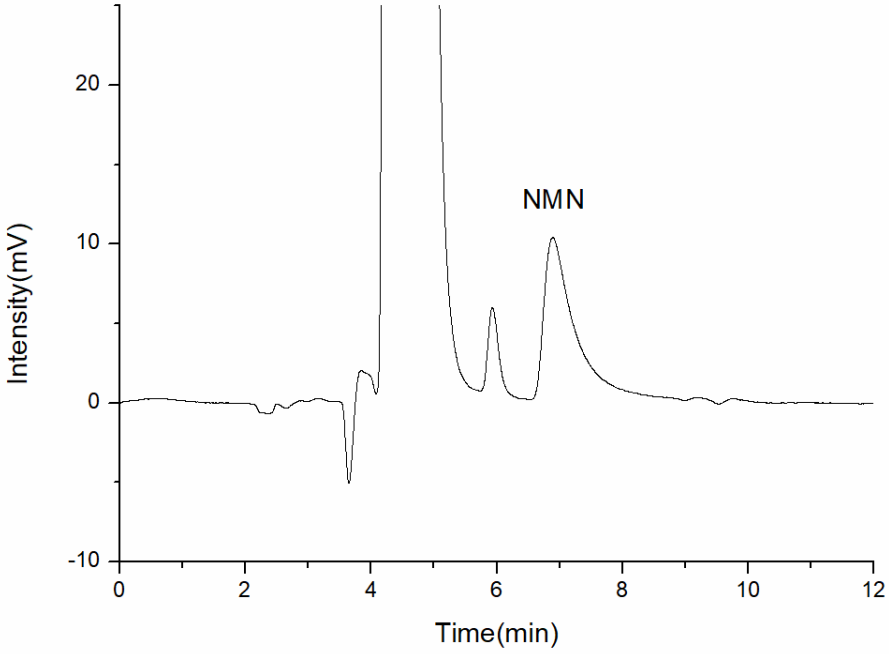
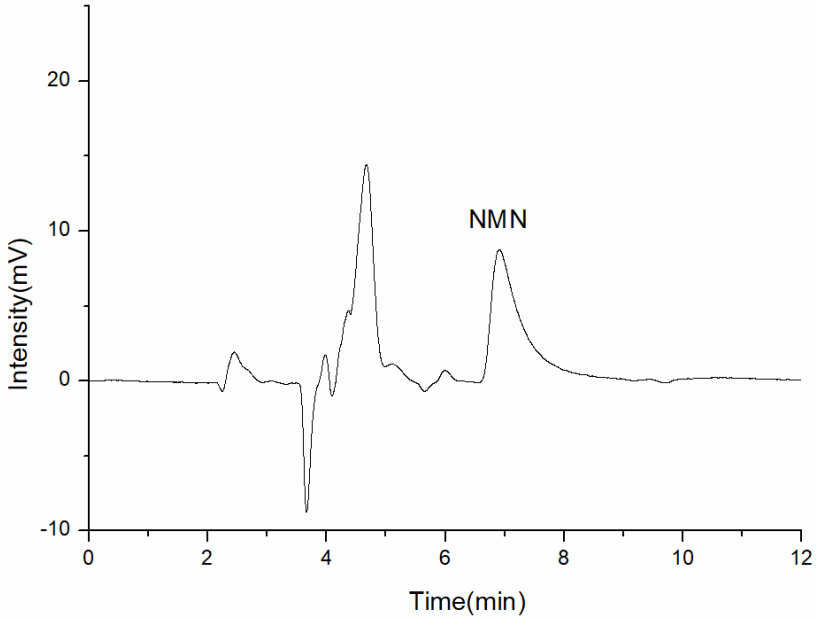
A.1 NMN 标准溶液色谱图



A.2 NMN面膜产品色谱图



A.3 NMN面霜产品溶液色谱图



A.4 NMN面乳产品溶液色谱图