

# 超高效液相色谱法测定保健食品中脱氢表雄甾酮的不确定度评定

程家丽, 刘婷婷, 卓勤, 马妍, 宫照龙\*

(中国疾病预防控制中心营养与健康所, 北京 100050)

**摘要:** **目的** 评定超高效液相色谱法测定保健食品中脱氢表雄甾酮(dehydroepiandrosterone, DHEA)含量的不确定度。**方法** 依据 JJF1059.1-012《测量不确定度评定与表示》, 分析实验过程 DHEA 含量测定的不确定度来源。通过建立数学模型以量化不确定度分量, 计算合成不确定度及扩展不确定度。**结果** 本研究测得保健食品中 DHEA 的含量为(85.6±3.70) g/kg, 扩展不确定度为 3.70 g/kg( $k=2$ )。 **结论** UPLC 法测定 DHEA 的不确定度主要来源于标准溶液的制备和拟合, 其次为样品的重复测定和前处理过程引入的不确定度, 其他因素的影响相对较小。

**关键词:** 超高效液相色谱法; 保健食品; 脱氢表雄甾酮; 不确定度

## Uncertainty evaluation on determination of dehydroepiandrosterone in health food by ultra high performance liquid chromatography

CHENG Jia-Li, LIU Ting-Ting, ZHUO Qin, MA Yan, GONG Zhao-Long\*

(National Institute for Nutrition and Health, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China)

**ABSTRACT: Objective** To evaluate the uncertainty of determination of DHEA in health food by ultra high performance liquid chromatography (UPLC). **Methods** According to the JJF1059.12-012 Chinese regulation on the valuation and expression of uncertainty in measurement, the sources of uncertainty in the determination of DHEA content in the experimental process were analyzed. Through the establishment of mathematical models to quantify the component of uncertainty, the combined uncertainties and expanded uncertainties were calculated. **Results** The content of DHEA in health foods in this study was (85.6±3.70) g/kg, and the accompanying expanded uncertainty was 3.70 g/kg ( $k=2$ ). **Conclusions** The main sources of uncertainty in the determination by UPLC are preparation of standard solution and the standard curve fitting, followed by measurement repeatability and the sample pretreatment, and the influence of other factors are relatively small.

**KEY WORDS:** ultra high performance liquid chromatography; health food; dehydroepiandrosterone; uncertainty

## 1 引言

脱氢表雄甾酮(dehydroepiandrosterone, DHEA)的化学名称为 3- $\beta$ -羟基雄甾-5-烯-17-酮, 又名去氢表雄酮。DHEA

是人体自身合成的一种生物活性分子, 在人体肾上腺分泌<sup>[1,2]</sup>。DHEA 是人体内许多激素的前提物质, 可根据身体的需要转化为睾酮或雌激素。研究发现, 脱氢表雄甾酮具有抗衰老、糖尿病治疗、癌症治疗及生殖领域<sup>[3-5]</sup>。研究发

\*通讯作者: 宫照龙, 博士, 副研究员, 主要研究方向为营养与食品卫生。E-mail: gongzhaolong@163.com

\*Corresponding author: GONG Zhao-Long, Ph.D, Associate Professor, National Institute for Nutrition and Health, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China. E-mail: gongzhaolong@163.com

现, 体内 DHEA 的水平与精神疾病及焦虑症发展有相关性<sup>[6,7]</sup>。郭淘溢等<sup>[8]</sup>研究发现, 孕妇血清中脱氢表雄甾酮与雌二醇的比率与产期抑郁的发生也相关。因此人体在适当的时候补充一定的 DHEA 至关重要。

目前保健食品中 DHEA 常用测定方法为高效液相色谱法<sup>[9]</sup>, 但关于液相色谱法测定 DHEA 的不确定度未见报道。此外, 由于保健食品的基质较复杂, 给测定结果可能带来一定的影响, 为提高检测方法的可靠性, 进行相关不确定度的评定对质量控制具有重要意义。根据标准 GB/T 5009.193-2003《保健食品中脱氢表雄甾酮(DHEA)的测定》<sup>[10]</sup>测定保健食品中 DHEA 的含量, 依据 JJF 1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》<sup>[11]</sup>和 CNAS-GL 06: 2006《化学分析中不确定度的评估指南》<sup>[12]</sup>, 对保健食品中 DHEA 检测的不确定度进行分析, 评估不确定度的来源, 为科学评定保健食品中 DHEA 检测结果提供科学依据。

## 2 材料与方 法

### 2.1 主要仪器和试剂

Waters ACQUITY UPLC I-Class 超高效液相色谱仪(配有 Waters UPLC TUV 紫外检测器, 美国 Waters 公司); Eppendorf 5430 R 离心机(美国 Eppendorf 公司); KQ5200 超声波清洗器(中国昆山舒美公司); Mettler-Toledo Ae50-S 电子天平(瑞士梅特勒公司); 超纯水仪(美国 Millipore 公司)。

甲醇(色谱纯, 美国 Fisher 公司); DHEA 标准品(纯度  $\geq 98\%$ , 上海源叶生物科技)。

### 2.2 标准溶液的配制

精密称量 DHEA 标准物质 0.0050 g, 加入流动相溶解并定容至 5 mL。此溶液中 DHEA 的浓度为 1 mg/mL。用

移液器逐级稀释, 配制成 10、50、100、200、500 和 1000  $\mu\text{g/mL}$  的标准系列工作液。以外标法绘制标准曲线, 采用最小二乘法进行线性拟合。

### 2.3 实验方法

取适量 DHEA 胶囊研磨或混匀, 称取 0.200 g(精确至 0.001 g)试样于容量瓶中, 加入流动相定容至 10.0 mL, 超声提取 5 min 后以 3000 r/min 离心 3 min, 准确取 2.0 mL 试样溶液于试管中, 加入流动相定容至 5.0 mL, 摇匀, 经 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后备用。取 2  $\mu\text{L}$  进超高效液相色谱仪进行分析, 样品中 DHEA 的色谱图见图 1。

### 2.4 仪器条件

液相色谱条件: Waters ACQUITY 色谱柱 BEH  $\text{C}_{18}$  柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ); 紫外检测波长 215 nm; 流动相: 甲醇和水(80:20, V:V); 流速: 2.0  $\mu\text{L/min}$ ; 柱温: 室温。

### 2.5 测量数学模型

$$X = \frac{c \times V \times 5}{m \times 2 \times 1000}$$

X: 试样中 DHEA 的含量, g/kg; c: 试样液中 DHEA 浓度,  $\mu\text{g/mL}$ ; V: 试样定容体积, mL; m: 试样质量, g。

## 3 结果与分析

### 3.1 不确定度的来源

依据样品的测量方法 GB/T 5009.193-2003 和 JJF 1059.1-2012 可知, 保健食品中 DHEA 含量的测定的不确定度主要来源为: 样品的称样量及定容体积; 样品重复测量; 标准品的纯度及标准溶液的配制; 标准曲线的拟合; 所用的玻璃仪器、环境温度及仪器等方面。

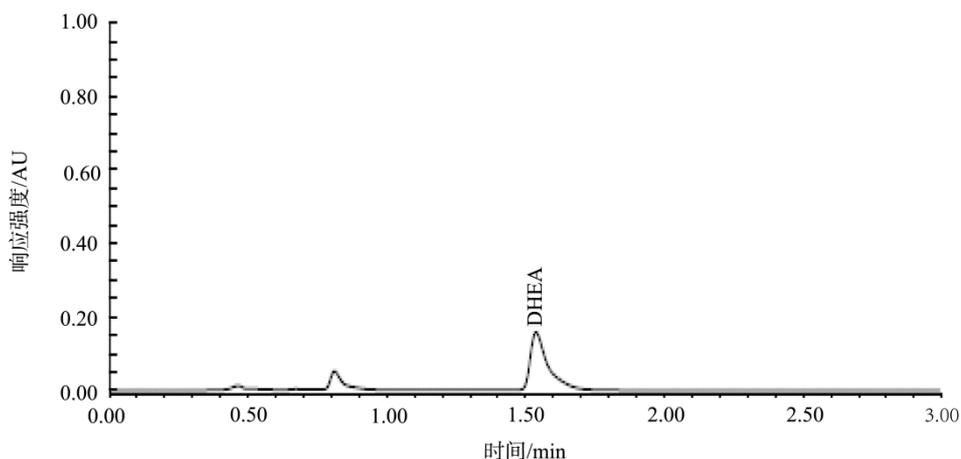


图 1 样品中 DHEA 的色谱图

Fig.1 Chromatogram of DHEA in the sample

### 3.2 不确定度的分量

#### 3.2.1 样品前处理引入的不确定度

##### (1) 样品称量引入的相对不确定度

本次样品称样量为 0.200 g, 天平校准证书中允差为  $\pm 0.0002$  g。按矩形分布计算, 则样品称量引入的相对标准不确定度为:

$$u_r(m) = \frac{0.0002}{\sqrt{3} \times 0.2} = 0.000575。$$

##### (2) 样品定容引入的不确定度

样品在前处理过程中, 主要使用了 5 mL 和 10 mL 的容量瓶及 2 mL 吸量管等玻璃器皿, 由 JJG 196-2006《常用玻璃仪器检定规程》<sup>[13]</sup>可知, 5 mL(A 级)容量瓶和 10 mL(A 级)容量瓶的容量允差均为  $\pm 0.020$ , 2 mL(A 级)吸量管的容量允差为  $\pm 0.012$ , 按三角形分布计算不确定度, 5、10 mL 移液管和 2 mL 吸量管引入的不确定度分别为:  $0.02/\sqrt{6}/5=0.00163$ ,  $0.02/\sqrt{6}/10=0.000816$ ,  $0.012/\sqrt{6}/2=0.00245$ , 则所有玻璃仪器引入的相对标准不确定度为:

$$u_r(A) = \sqrt{0.00163^2 + 0.000816^2 + 0.00245^2} = 0.00305。$$

通常实验室温度范围波动在  $20\text{ }^\circ\text{C} \pm 5\text{ }^\circ\text{C}$ , 玻璃仪器校准温度为  $20\text{ }^\circ\text{C}$ 。甲醇和水的膨胀系数分别为  $1.18 \times 10^{-3}/^\circ\text{C}$  和  $2.08 \times 10^{-4}/^\circ\text{C}$ , 合计为  $1.39 \times 10^{-3}/^\circ\text{C}$ 。移液管体积产生的变化为  $2 \times 5 \times 1.39 \times 10^{-3} = 0.0139$ , 5 mL(A 级)和 10 mL(A 级)容量瓶体积产生的变化分别为  $5 \times 5 \times 1.39 \times 10^{-3} = 0.0348$ ,  $10 \times 5 \times 1.39 \times 10^{-3} = 0.0695$ 。按均匀分布计算, 5 mL 和 10 mL 的容量瓶及 2 mL 吸量管由温度引入的合成不确定度为:

$$u_r(T) = \sqrt{\frac{(0.0139/\sqrt{3}/2)^2 + (0.0348/\sqrt{3}/5)^2}{+(0.0695/\sqrt{3}/10)^2}} = 0.00695。$$

样品定容体积引入的合成相对标准不确定度为:

$$u_r(V) = \sqrt{0.00305^2 + 0.00695^2} = 0.00759。$$

#### 3.2.2 重复性引入的不确定度

对样品进行了 8 次 ( $n=8$ ) 平行测定 (85.3、88.1、84.2、89.1、82.5、83.6、84.4、87.6 g/kg), 其平均值  $\bar{x}$  为 85.6 g/kg, 标准偏差  $S$  为  $\pm 2.38$  g/kg。按 A 类方法进行评定实验重复性引入的不确定度  $u(\bar{x})$ , DHEA 引入的相对标准不确定度为:

$$u_r(\bar{x}) = \frac{S}{\sqrt{n} \times \bar{x}} = 0.00983。$$

#### 3.2.3 标准溶液校正引入的相对不确定度

##### (1) 标准品纯度的相对不确定度

由于 DHEA 标准品证书上没有标出不确定度, 因此根据标准品的纯度计算其不确定度。由 DHEA 标准证书可知, 标准的纯度为  $>98\%$ , 则该标准上下限分别为  $a+=100\%$  和  $a-=98\%$ , 其半宽度为  $a=(1-0.98)/2=0.01$ , 按均匀分布计算, DHEA 标准品的引入的标准相对不确定度为:

$$u_r(c_s) = \frac{0.01}{\sqrt{3} \times 0.98} = 0.00589。$$

##### (2) 标准品称量的相对不确定度

按 3.2.1 中样品称量不确定度计算标准品称量的不确定度, 当标准品称样量为 0.0050 g 时, 则标准品引入的相对标准不确定度为:

$$u_r(m_1) = \frac{0.0002}{\sqrt{3} \times 0.005} = 0.00575。$$

##### (3) 标准溶液稀释引入相对标准不确定度

按 3.2.1 中前处理过程中样品定容的方法计算标准品稀释过程产生的不确定度。标准品度稀释过程主要使用的是 5 mL(A 级)容量瓶和 500  $\mu\text{L}$  微量移液器。由 3.2.1 可知 5 mL 容量瓶允差引入的不确定度为 0.00163, 温度引入的体积标准不确定度为 0.00401, 则温度引入的合成标准不确定度为:  $u_r(T_1) = \sqrt{0.00163^2 + 0.00401^2} = 0.00433$ 。

由 JJG 646-2006《移液器检定规程》<sup>[14]</sup>可知, 500  $\mu\text{L}$  微量移液器在  $20\text{ }^\circ\text{C}$  时容量允许值为  $\pm 0.005$  mL, 其由引入的相对标准不确定度为:  $0.005/\sqrt{6}/0.5=0.00408$ 。校准温度差引入的体积标准不确定度为:  $u_r(V_1) = \frac{0.5 \times 5 \times 0.00139}{\sqrt{3} \times 0.5} = 0.00401$ , 则 500  $\mu\text{L}$  微量移液器引入的合

成标准不确定度为:  $u_r = \sqrt{0.00408^2 + 0.00401^2} = 0.00572$ 。

将以上计算得到的不确定度分量合成, 得标准溶液稀释引入的合成相对不确定度为:

$$u_r(c_v) = \sqrt{0.00433^2 + 0.00572^2} = 0.00717。$$

##### (4) 标准曲线拟合引入的相对标准不确定度

本实验中, 配制了 6 个梯度标准溶液, 分别为 10、50、100、200、500、1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,

采用最小二乘法进行线性拟合, 拟合曲线为  $Y=960.9X-14622$ , 相关系数  $r^2=0.999$ 。表 1 为 DHEA 标准系列浓度及对应的峰面积。DHEA 标准溶液的残余标准偏差根据公式(1)计算, 得到标准偏差为  $S_R=13133$ 。本次试验中按回归方程计算的样品平均浓度为 684.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 测量次数  $p=8$ , 标准溶液测定次数为  $n=6$ , 依据公式(2)计算标准曲线过程引入的标准不确定度为:

$$u(c_p) = \frac{13133}{960.9} \sqrt{\frac{1}{8} + \frac{1}{6} + \frac{(684.8-310)^2}{726000}} = 9.52 \text{ } \mu\text{g}/\text{mL}, \text{ 则拟合曲线引入的相对标准不确定度 } u_r(c_p) = 9.52/684.8 = 0.0139。$$

$$S_R^{[13]} = \sqrt{\frac{1}{n-2} \sum_{j=1}^n [A_j - (B_0 + B_1 C_j)]^2} \quad (1)$$

$$u(c)^{[15]} = \frac{S_R}{b_1} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{Nn} + \frac{(c-\bar{c})^2}{\sum_{i=1}^n (C_i - \bar{c})^2}} \quad (2)$$

式中:  $p$  为测溶液的测量次数;  $n$  为标准溶液的测试次数;  $B_1$  为斜率;  $B_0$  为截距;  $C_i$  为第  $i$  个标准溶液的浓度;  $A_j$  为第  $i$  个标准溶液的第  $j$  次峰面积值;  $C_j$  为第  $i$  个标准溶液的第  $j$

次浓度;  $c$  为待测样品溶液按回归方程计算得到的浓度平均值;  $\bar{c}$  为不同校准标准溶液的平均值; 下标  $i$  表示第  $i$  个标准溶液; 下标  $j$  表示获得标准曲线的测量次数<sup>[15]</sup>。

表 1 DHEA 标准品的峰面积  
Table 1 Peak area of DHEA standard series measured

系列	标准溶液浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	峰面积	$B_0+B_1c_j$	$A-(B_0+B_1c_j)$	$c_i-\bar{c}$
1	10	6855	-5012.8	11867.8	-300
2	50	38328	33424	4904	-260
3	100	77696	81470	-3774	-210
4	200	156379	177562	-21183	-110
5	500	473710	465838	7872	190
6	1000	946615	946298	317	690

表 2 DHEA 的测定相对不确定度分量  
Table 2 Determination of DHEA relative uncertainty component

不确定度来源	不确定度分量	评定方法	量值	不确定度的贡献率/%	
样品前处理	称量	$u_r(m)$	B 类评定	0.000575	0.976
	稀释	$u_r(V)$	B 类评定	0.00759	12.9
样品重复性测定		$u_r(\bar{x})$	A 类评定	0.00983	16.7
	标准品纯度	$u_r(c_s)$	B 类评定	0.00589	9.99
标准溶液	标准品称量	$u_r(m_i)$	B 类评定	0.00575	19.5
	标准溶液稀释	$u_r(c_v)$	B 类评定	0.00717	10.8
	标准曲线拟合	$u_r(c_p)$	A 类评定	0.0139	29.0
仪器产生	$u_r(y)$	B 类评定	0.0000809	0.137	
不确定度的总贡献率/%				100	

### 3.4 扩展不确定度及测量结果

按 0.95 信概率, 包含因子  $k=2$ , 则计算 DHEA 的扩展不确定度为  $u(x)=2 \times 1.85=3.70 \text{ g/kg}$ , 因此, 保健食品中 DHEA 的含量为  $(85.6 \pm 3.70) \text{ g/kg}$ ,  $k=2$ 。

## 4 结论

本研究通过对保健食品中 DHEA 含量测定的各分量不确定度评定分析可知, 该方法的不确定度的主要来源为标准溶液的配制和拟合, 其贡献率达到了 69.3%, 其中标准曲线的拟合和标准品的称量影响较大。此外, 样品的重复测定及样品前处理过程对测量结果的不确定度的影响也较大, 其他不确定度影响较小, 可忽略不计。此外, 研究发现样品中 DHEA 含量的标准偏差(2.38)和扩展不确定度(3.70)差异较大, 表明样品在测定过程中存在较多不确定因素, 因此对样品中 DHEA 含量进行不确定度评定可以更

### 3.2.4 仪器引入的相对不确定度

本次实验中超高效液相色谱仪校准证书上的定量重复性误差为 1.2%, 按照 B 类不确定度评定。则仪器引入的相对标准不确定度为:

$$u_r(y) = \frac{0.012}{\sqrt{3} \times 85.6} = 0.0000809。$$

## 3.3 不确定度的合成

表 2 汇总了各分量的不确定度的来源、量值及贡献率, 保健食品中 DHEA 含量测定的合成不确定度按式计算, 其合成不确定度为  $1.85 \text{ g/kg}$ 。

$$u_r(x) = x \sqrt{\frac{u_r(m)^2 + u_r(V)^2 + u_r(\bar{x})^2 + u_r(c_s)^2}{+u_r(m_i)^2 + u_r(c_v)^2 + u_r(c_p)^2 + u_r(y)^2}}$$

准确反映保健食品中 DHEA 的含量。因此, 为获得较准确的测定结果, 实验过程中应严格控制标准溶液的配制, 尤其是标准品的称量及标准曲线的拟合。此外, 实验人员应重视样品前处理过程及重复性带来的误差, 尽量选用 A 级玻璃器皿, 以确保测量结果的准确性。

### 参考文献

- [1] 马志民, 刘兰服, 姚海兰, 等. 脱氢表雄甾酮研究进展[J]. 河北农业科学, 2014, 18(3): 60-62.
- [2] Ma ZM, Liu LF, Yao HL, et al. Research progress of dehydroepiandrosterone [J]. Hebei Agric Sci, 2014, 18(3): 60-62.
- [3] Kroboth PD, Salek FS, Pittenger AL, et al. DHEA and DHEAS: A review [J]. J Clin Pharmacol, 1999, 39: 327-348.
- [4] 梁卓. 脱氢表雄甾酮在妇科手术后卵巢功能恢复中的应用[J]. 中国生化药物杂志, 2012, 33(5): 671-672.
- [5] Liang Z. Application of dehydroepiandrosterone in ovarian function recovery after gynecological surgery [J]. Chin J Biochem Med, 2012,

- 33(5): 671–672.
- [4] Gleicher N, Barad DH. Increased oocyte production after treatment with dehydroepiandrosterone [J]. *Fertil Steril*, 2005, 84(3): 756–761.
- [5] Gleicher N, Barad DH. Dehydroepiandrosterone (DHEA) supplementation in diminished ovarian reserve(DOR) [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2011, 17(9): 67–72.
- [6] Mulligan, EM, Hajcak G, Crisler S, *et al.* Increased dehydroepiandrosterone (DHEA) is associated with anxiety in adolescent girls [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2020, 119: 104751.
- [7] Davies W, Sulfationg P. The steroid sulfate axis and its relationship to maternal behaviour and mental health [J]. *J Molecul Endocrinol*, 2018, 61(2): 199–210.
- [8] 郭洵溢, 赵丹青, 贾春平, 等. 围产期孕妇抑郁与血清雌激素和脱氢表雄酮水平的相关性[J]. *贵州医科大学学报*, 2020, 45(6): 700–703.  
Guo XY, Zhao DQ, Jia CP, *et al.* Correlation between perinatal depression and the levels of serum estrogen and dehydroepiandrosterone [J]. *J Guizhou Med Univ*, 2020, 45(6): 700–703.
- [9] 刘莉治. 保健食品中 DHEA 含量的测定[J]. *中国卫生检验杂志*, 2005, 15(1): 68, 84.  
Liu LZ, Determination of DHEA in healthy food [J]. *Chin J Health Lab*, 2005, 15(1): 68, 84.
- [10] GB/T 5009.193-2003 保健食品中脱氢表雄甾酮(DHEA)的测定[S].  
GB/T 5009.193-2003 Determination of dehydroepiandrosterone (DHEA) in health food [S].
- [11] JJF 1059.1-2012 测量不确定度评定与表示[S].  
JJF 1059.1-2012 Evaluation and expression of measurement uncertainty [S].
- [12] CNAS-GL06 化学分析中不确定度的评估指南[S].  
CNAS-GL06 Guidelines for evaluation of uncertainty in chemical analysis [S].
- [13] JJG 196-2006 常用玻璃量器检定规程[S].  
JJG 196-2006 Verification regulation of common glass measuring instruments [S].
- [14] JJG 646-2006 移液器检定规程[S].  
JJG 646-2006 Pipette verification regulation [S].
- [15] JJF 1135-2005 化学分析测量不确定度评[S].  
JJF 1135-2005 Evaluation of uncertainty in chemical analysis measurement [S].

(责任编辑: 于梦娇)

## 作者简介



程家丽, 硕士, 副研究员, 主要研究方向为营养与食品卫生。

E-mail: jlcheng77@163.com



宫照龙, 博士, 副研究员, 主要研究方向为营养与食品卫生。

E-mail: gongzhaolong@163.com