

《保健食品中脱氢表雄甾酮(DHEA)的测定》

国家标准（征求意见稿）编制说明

一、工作简况

（一）任务来源

根据《国家标准化管理委员会关于下达 2023 年第二批推荐性国家标准计划及相关标准外文版计划的通知》（国标委发〔2023〕37 号），《保健食品中脱氢表雄甾酮(DHEA)的测定》（计划号 20230868-T-424）列入修订计划，由全国特殊食品标准化技术委员会归口，由中国食品发酵工业研究院有限公司等单位共同组织完成起草修订工作。

（二）简要起草过程

本标准计划代替 GB/T 5009.193-2003《保健食品中脱氢表雄甾酮（DHEA）的测定》。为了改进原有方法中存在的这些问题，本次扩充了方法适用范围，除了片剂和胶囊，增加了凝胶软糖、液体，软胶囊三种基质；同时增加了凝胶软糖、液体、软胶囊的前处理方法；修改了色谱条件及最大吸收波长；修改了方法的检出限、定量限的表达。具体的修订过程如下：

2023 年 8 月~2023 年 10 月，成立标准修订组，确定标准制修订方案和工作计划，并开展了方法学验证。

2023 年 11 月，全国特殊食品标准化技术委员会在北京召开《14 项保健食品分析方法标准启动会》修订工作启动会，会上讨论了《保健食品中脱氢表雄甾酮（DHEA）的测定》的修订方案。

2023 年 11 月~2024 年 1 月，起草组单位根据《保健食品中脱氢表雄甾酮（DHEA）的测定》标准修订方案开展实验室内方法验证的工作。

2024 年 1 月，开展新修订保健食品中脱氢表雄甾酮（DHEA）测定方法的实验室间方法验证工作。

2024 年 1 月，起草工作组在前期工作基础上形成标准征求意见稿。

二、国家标准编制原则、主要内容及其确定依据

（一）标准编制原则：

本方法的主要参数、公式、性能要求等主要依据 GB/T 1.1-2020 《标准化工作导则》和 GB/T 20001.4-2015 《标准编写规则》的要求进行编写。并且按照 GB/T 27404-2008 《实验室质量控制规范、食品理化检测》、GB/T 27417-2017 《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》对方法学进行了考察。

（二）主要修订内容

1. 适用范围：

在适用范围中增加了 DHEA 适用的具体的剂型。将标准适用范围修改为：

本文件描述了保健食品中脱氢表雄甾酮（DHEA）的液相色谱测定方法。

本文件适用于添加在软胶囊、硬胶囊、片剂、凝胶软糖、口服液等试样类型的保健食品中脱氢表雄甾酮(DHEA)的测定。

2. 标准溶液的制备

同标准征求意见稿。

3. 试样前处理的优化

1) 试样制备：根据市场调查，目前国内外食品中添加DHEA的剂型包括：片剂和硬胶囊。同时根据近几年保健品剂型流行趋势，增加了软胶囊、凝胶软糖、口服液剂型。本方法根据不同的剂型分别规定了前处理方法——软胶囊和硬胶囊：取不少于20粒或不低于5 g样品，剪开取其内容物，研细（必要时），混匀，封存备用；片剂：取不少于20片或不低于10 g试样，经高速粉碎机或研钵磨成粉状，混匀，封存备用；凝胶软糖：取样品不低于10粒（对于不同色泽或风味混装的试样，则按色泽或种类均匀取样），剪碎，备用；口服液等液体：取5支独立包装或不少于20 mL试样充分混匀，封存备用。

2) 试样的净化

经过调研发现：目前片剂的基质成分主要是麦芽糊精、大豆分离蛋白、乳糖等；硬胶囊的基质成分主要是麦芽糊精，微晶纤维素，羟甲基淀粉钠、羟丙基甲基纤维素、二氧化硅、硬脂酸镁；软糖的主要基质有：明胶、麦芽糖醇、赤藓糖糖醇、琼脂、柠檬酸、橙香精、黑胡萝卜汁、复配被膜剂（巴西棕榈蜡和MCT）；口服液样本的主要基质有：白砂糖、柠檬酸、牛磺酸、柠檬酸钠、苯甲酸钠、香精、氨基酸、维生素等。软胶囊的基质主要有：大豆油、蜂蜡、维生素E等。对于片剂和胶囊，实验通过流动相（乙腈/0.1%甲酸水=60/40）将DHEA提取检测，结果满意。但是对于凝胶软糖，首先用温水将其溶解，利用DHEA溶于有机相而不溶于水的特点，实验采用乙腈提取，为了使

乙腈和水分层，同时考虑需要去除基质中的明胶，最终实验采用硫酸铵沉淀明胶且实现乙腈与水的分层，有效的提取凝胶软糖中的DHEA。对于口服液剂型，实验采用乙腈提取DHEA，氯化钠使乙腈和水分层，实现DHEA的有效提取。对于软胶囊，以上方法不适用，主要原因是DHEA溶于有机相，而乙腈/甲醇与软胶囊内容物不完全互溶。然而可以利用DHEA溶于有机相正己烷的特点，考虑采用正相色谱分离检测DHEA，使用该检测方法前处理时只需使用正己烷完全溶解软胶囊内容物即可。因此试样的前处理为：（1）片剂和硬胶囊：称取0.2 g样品(准确至0.01 g)于50 mL离心管中，加入流动相A 20 mL。涡旋1 min，至分散；超声提取5 min后以10000 r/min离心5 min。上清液经0.45 μm 滤膜过滤后上机测定。（2）软糖：按照0.2 g 软糖和20 mL水的比例用温水溶解，然后取一定量溶解后的液体样品加入等比例乙腈提取，再加入硫酸铵至饱和使明胶完全沉淀同时实现乙腈和水分层。涡旋30 s，超声提取5 min后，以10000 r/min离心5 min。取上层（乙腈层）经0.45 μm 滤膜过滤后上机测定。（3）口服液剂型：量取5 mL口服液剂型试样(准确至0.1 mL)于50 mL离心管中，加入等比例乙腈提取，再加入氯化钠至饱和并分层。涡旋30s，超声提取5 min后以10000 r/min离心5 min。取上层（乙腈层）经0.45 μm 滤膜过滤后上机测定。（4）软胶囊：称取0.2 g（准确至0.01 g）于50 mL离心管中，加入流动相B溶液20 mL。涡旋1 min，至分散；经0.45 μm 滤膜过滤后上机测定。

4. 色谱参考条件

参考 GB/T5009.193-2003 的色谱条件基本能够满足市场销售产品

的检测需求，为了提高检测的灵敏度优化了检测波长和流动相比例，具体色谱推荐条件如下：

- a) 色谱柱：C₁₈（粒径 5 μm，150 mm×4.6 mm）或具有同等性能的色谱柱（反相色谱）。Silica 柱（4.6 mm×250 mm, 5.0 μm）或性能相当者（正相色谱）。
- b) 柱温：35 °C ±0.5 °C。
- c) 检测波长：200 nm（反相色谱），210 nm（正相色谱）。
- d) 流动相：乙腈+0.1%甲酸水（60+40）（反相色谱），等度洗脱；正己烷/异丙醇=20/1（正相色谱），等度洗脱
- e) 流速：1.0 mL/min。
- f) 进样量：10 μL 或 20 μL。

5. 线性范围的选择

考虑到目前产品中DHEA含量较高，同时兼顾新剂型和新仪器的方法开发，实验将线性范围修订为：5 μg/mL ~ 200 μg/mL。

同时为了防止样品中DHEA含量较高试样的测定浓度超出曲线范围，增加了备注“不超出标准曲线测定范围要求的条件下，操作者在可适当调整稀释倍数（f）后再测定。”。

6. 计算公式的修订

本方法计算公式为计算保健食品中DHEA的含量公式。与原标准相比进行了以下几个方面的修订：

1) 与原标准相比，由于DHEA的含量相对较高，因此将DHEA的含量单位修订为mg/100 g或mg/100 mL，更符合实际使用需求。

2) 由于试样前处理过程可能需求进行额外的稀释，故在公式中增加了稀释倍数“*f*”。

3) 修改了单位换算系数。

具体计算公式如下：试样中脱氢表雄甾酮的含量按式（1）计算：

$$X = \frac{C \times V \times f \times 100}{m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X——试样中脱氢表雄甾酮的含量，单位为毫克每百克或毫克每百毫升(mg/100 g或mg/100 mL)；

C——由标准曲线计算得到的试样溶液中待测组分的质量浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

V——试样提取中加入提取液的体积，单位为毫升（mL）；

f——稀释倍数；

m——试样的质量或体积，单位为克或毫升（g或mL）；

100、1000——单位换算系数。

结果保留三位有效数字。

7. 检出限和定量限的修订

经过实验确定了方法的检出限和定量限为：当片剂、硬胶囊、软胶囊、果糖试样称样量为0.2 g 时，检出限为0.15 g/kg，定量限为0.5

g/kg；当口服液剂型试样称样量为5 mL时，检出限为1.5 mg/L，定量限为5mg/L。

三、试验验证分析

方法线性关系：DHEA 5 $\mu\text{g/mL}$ ~200 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内，相关系数 R^2 大于0.999，线性关系良好。方法准确度和精密度：该方法的回收率在95.4%~104%范围区间，6次平行实验结果的RSD%在1.10%~4.31%范围区间，说明该方法精确度较好，能够满足保健食品中脱氢表雄甾酮的准确测定。方法重现性：方法验证基础上，起草工作组组织6家实验室进行验证，结果符合验证比对要求。

具体方法验证和实验室比对情况见附件一。

四、预期经济社会效益

随着食品工业的发展，更多的保健食品被开发出来，在我国，目前脱氢表雄甾酮（DHEA）以膳食补充剂的形式进口，为了适应市场的需求，本次方法修订在原标准的基础上，优化了试样前处理和净化的步骤，提高了检测的灵敏度，并通过评估方法检测成本与结果可信度对方法进行优化，控制关键步骤，确保标准方法可操作性强。本标准的修订能够更好的契合保健食品中脱氢表雄甾酮（DHEA）的测定，有利于规范和促进脱氢表雄甾酮（DHEA）在保健食品中的应用。

五、与我国有关法律法规和其他标准的关系

本标准与现行法律、法规和强制性国家标准协调一致。

六、国外有关法律、法规和标准情况的说明

无。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

本标准制定过程中无重大分歧意见。

八、涉及专利的有关说明

本标准不涉及专利。

九、实施国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议

建议标准实施前有6个月以上的宣贯培训期、缓冲期和过渡准备时间。

十、其他应当说明的事项

无。

附件：方法学验证报告

保健食品中脱氢表雄甾酮（DHEA）的测定

方法学验证

1、 检测方法的特异性

选择片剂、口服液、凝胶糖果、胶囊空白与脱氢表雄甾酮(DHEA)的标准谱图进行比对,结果显示 DHEA 保留时间为 1.66 min (反相色谱), 11.92 min (正相色谱) 空白辅料中无色谱峰对 DHEA 检测造成干扰。

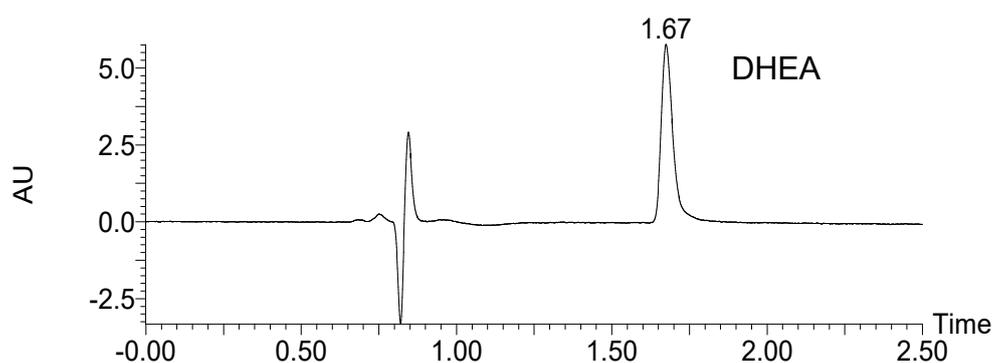


图 1-1 DHEA 标准的色谱图（反相色谱 UPLC）

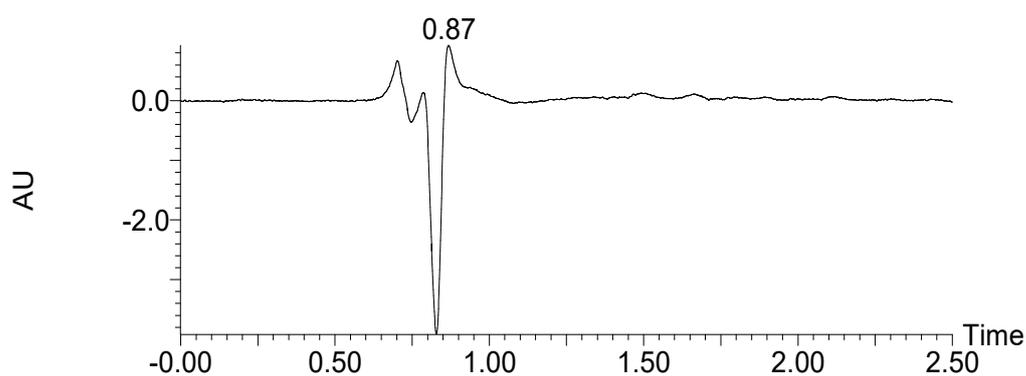


图 1-2 硬胶囊空白样品的色谱图（反相色谱 UPLC）

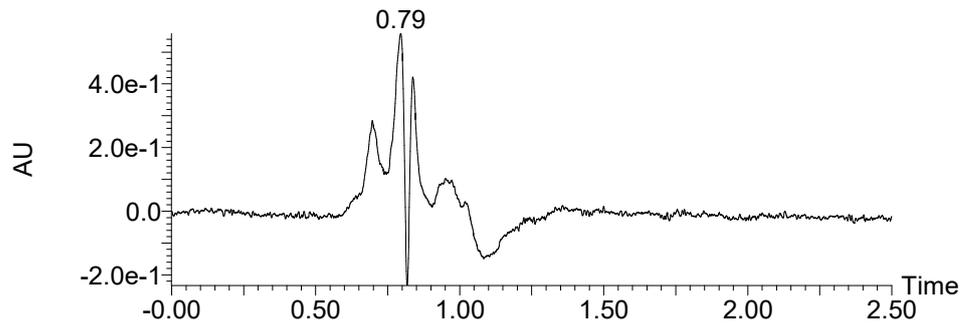


图 1-3 片剂空白样品的色谱图（反相色谱 UPLC）

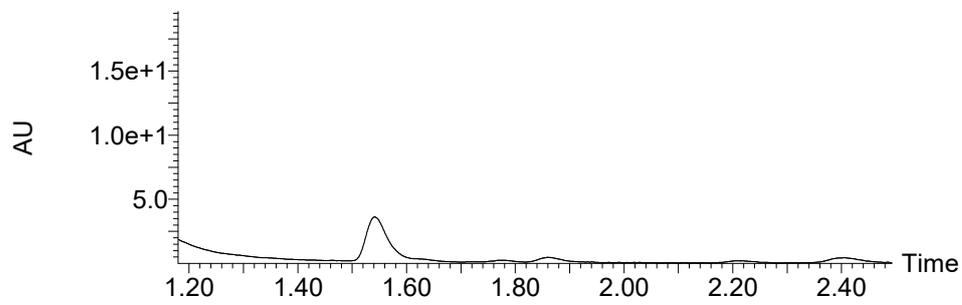


图 1-4 口服液空白样品的色谱图（反相色谱 UPLC）

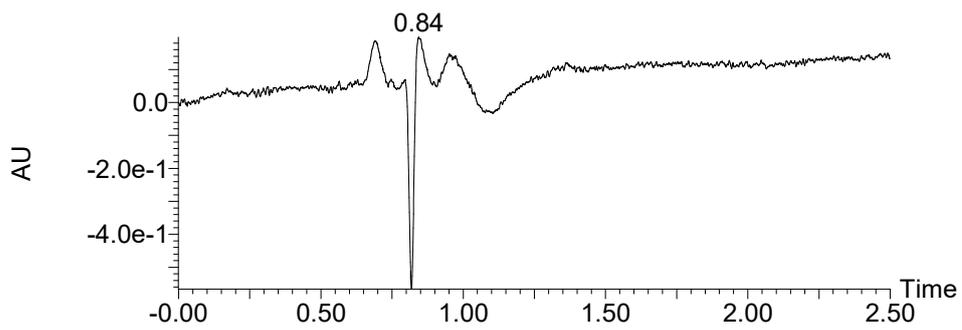


图 1-5 凝胶软糖空白样品的色谱图（反相色谱 UPLC）

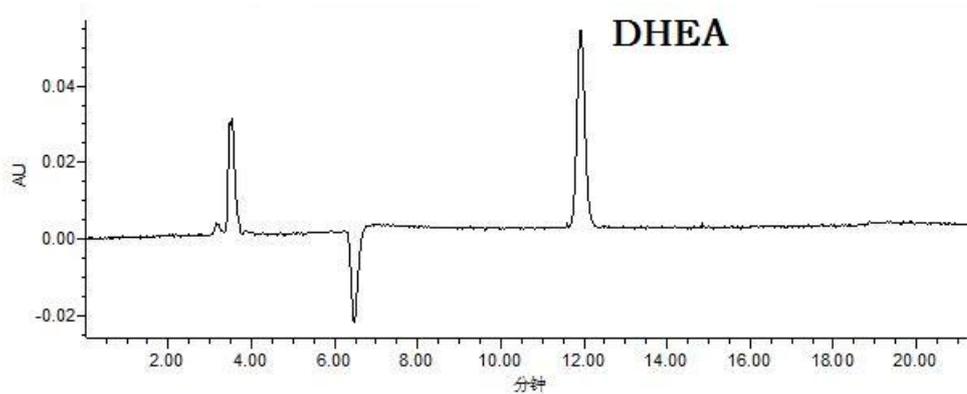


图 1-6 DHEA 标准的色谱图（正相色谱 HPLC）

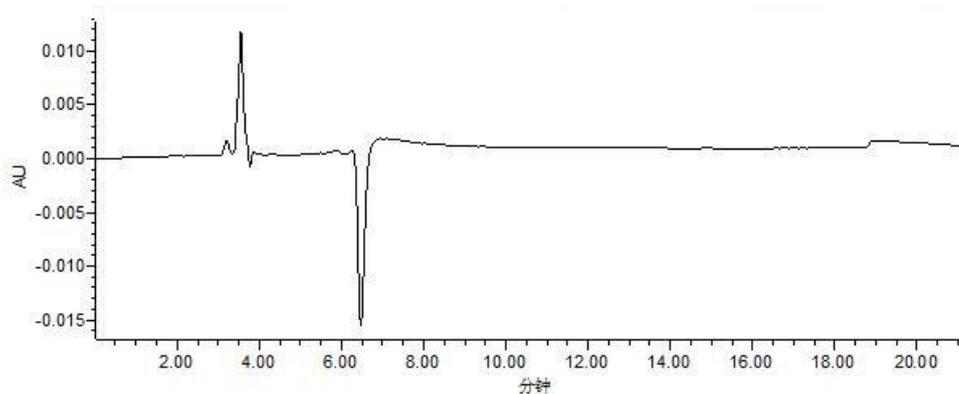


图 1-7 软胶囊空白样品的色谱图（正相色谱 HPLC）

2、 色谱条件的比较

2.1 色谱柱的选择

实验参考 GB/T 5009.193.2003 和文献，选择 C₁₈ 柱作为分离 DHEA 的色谱柱。

2.2 流动相的选择

对于反相条件：DHEA 的最大吸收波长为 195-200 nm，选用甲醇时，甲醇的截止波长为 210 nm，基线背景较高，干扰大；选用乙腈时，乙腈的截止波长为 190 nm，干扰小。同时流动相里加入 0.1%甲

酸能有效的提高目标化合物灵敏度。且实验发现流动相等度洗脱和梯度洗脱均能将目标化合物全部洗脱，为防止梯度洗脱对基线的影响，实验采用等度洗脱。通过改变有机相乙腈和甲酸水（0.1%）的洗脱比例，更好的与基质分离，实验采用的乙腈/甲酸水（0.1%）的体积比为 60/40。

对于正相条件：DHEA 的在异丙醇和正己烷的流动相条件下最大吸收波长为 210 nm。

2.3 柱温和流速的选择

色谱柱温度和流速的改变可以影响目标化合物的出峰时间和响应强度，实验通过优化温度和流速结果见图 2。流速越快，温度越高，保留时间越靠前，受基质影响较大，因此，选择 0.3 mL/min 的流速和 35℃ 的柱温。

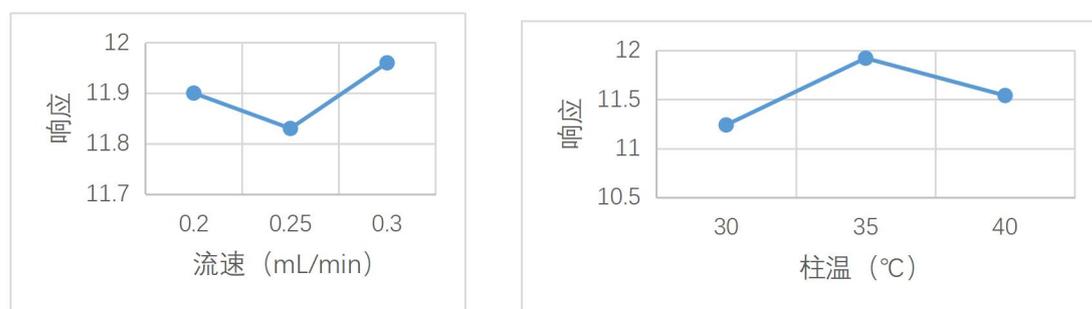


图 2-1 流速和柱温对 DHEA 的影响

3、 前处理方法比较

为了更好地比较不同前处理方法对 DHEA 检测的影响，选择了片剂、硬胶囊、软胶囊、凝胶糖果、口服液对试样的前处理方法进行了比对。

由于 DHEA 易溶于正己烷、甲醇等有机相和不溶于水的特点，

片剂和胶囊用流动相提取稀释即可实现片剂和胶囊中 DHEA 的回收率在 95%-105%之间。口服液，为水溶液，实验利用 DHEA 溶于有机相的特点，用乙腈提取，加入氯化钠使有机相和水层实现分层，上层检测，即可实现口服液中 DHEA 回收率在 95%-105%之间。对于凝胶软糖，辅料主要成分为明胶，首先考虑将其溶解，利用明胶溶于热水的特点，实验将凝胶软糖剪碎，用 70℃的温水溶解。同样利用 DHEA 溶于有机相的特点，用乙腈提取，加入饱和硫酸铵一方面可以使明胶沉淀，另一方面使有机相和水实现分层，测定有机相，即可实现凝胶软糖中 DHEA 的回收率在 95%-105%之间。对于软胶囊，用正己烷将其溶解直接测定，即可实现软胶囊中 DHEA 回收率在 95%-105%之间。

4、 检出限

检出限估值：采用信噪比法估计方法检出限：向空白样品基质添加目标分析物，信噪比为 3 时的添加浓度作为估算检出限。结果见表 1。

表 1 保健食品分析方法检出限验证估算结果

信噪比 (S: N=3:1)		
样品基质 (剂型)	取样量	最低检出浓度
硬胶囊	0.2 g	0.15 g/kg
片剂	0.2 g	0.15 g/kg
凝胶软糖	0.2 g	0.15 g/kg

软胶囊	0.2 g	0.15 g/kg
口服液	5 mL	1.5 mg/L

测定：选取空白样品基质至少 20 个平行样，分别添加估算检出限浓度的目标分析物，如目标分析物的检出概率不低于 95%，则定为检出限，见表 2。

表 2 方法检出限验证结果

基质	目标分析物检出数量	目标分析物检出率
硬胶囊	20	100%
片剂	20	100%
凝胶软糖	20	100%
软胶囊	20	100%
口服液	20	100%

5、 定量限

估算：向空白样品基质添加目标分析物，信噪比为大于 10: 1 时的添加浓度作为定量限。

表 3 保健食品分析方法定量限验证估算结果

信噪比 (S: N>10:1)		
样品基质 (剂型)	取样量	最低定量浓度
硬胶囊	0.2 g	0.5 g/kg
片剂	0.2 g	0.5 g/kg
凝胶软糖	0.2 g	0.5 g/kg

软胶囊	0.2 g	0.5 g/kg
口服液	5 mL	5 mg/L

测定：采用估算定量限浓度水平的有证标准物质/标准样品、质控样品或标准添加样品进行独立检测，至少检测 6 个平行样品。

表 4 方法定量限验证结果

样品名称	本底值	添加定量限浓度 g/kg	实测值 g/kg	回收率 (%)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 RSD%
硬胶囊	未检出	0.5	0.488	97.70	95.7	1.86
			0.469	93.80		
			0.474	94.80		
			0.490	98.06		
			0.472	94.42		
			0.476	95.23		
片剂	未检出	0.5	0.484	96.8	96.1	2.90
			0.471	94.1		
			0.461	92.1		
			0.477	95.4		
			0.491	98.3		
			0.499	99.8		
凝胶软糖	未检出	0.5	0.512	102	99.6	3.53
			0.486	97.3		
			0.492	98.4		
			0.511	102		
			0.515	103		
			0.471	94.2		
软胶囊	未检出	0.5	0.482	96.3	96.3	2.98
			0.476	95.2		
			0.484	96.7		
			0.457	91.4		
			0.491	98.3		
			0.499	99.8		

样品名称	本底值	添加定量限浓度 mg/L	实测值 mg/L	回收率 (%)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 RSD%
口服液	未检出	5	5.01	100	102	3.76
			5.32	106		
			5.21	104		
			4.94	98.8		
			5.21	104		
			4.82	96.4		

6、测定范围

采用标准曲线法定量，定量方法标准曲线的线性相关系数应大于等于 0.99，并具有 6 个数据点（不包括 0 点）。

表 5 方法的标准曲线

浓度 μg/mL	5	10	20	50	100	200
峰面积	869.464	1683.272	3321.085	8116.318	16221.308	31723.555
	标准曲线 $Y = 159.9 * X + 44.3$ 相关系数 $R^2 = 0.999$					

7、正确度和重复性

片剂、硬胶囊、凝胶软糖、软胶囊以 0.5 g/kg，5 g/kg 和 10 g/kg，进行加标回收率实验，口服液以 5 mg/L、50 mg/L、100 mg/L 进行 6 次平行独立试验。计算每个样品中目标分析物的浓度，计算每个浓度的平均回收率，计算 6 次重复性实验的标准偏差。结果显示回收率在 95.4%~104%之间，详见表 6。

表 6 方法正确度和重复性验证结果

样品名称	本底值	添加水平 mg/kg	实测值 mg/kg	回收率 (%)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 RSD%
硬胶囊	未检出	0.5	0.488	97.70	95.7	1.86

			0.469	93.80				
			0.474	94.80				
			0.490	98.06				
			0.472	94.42				
			0.476	95.23				
		5.0	4.82	96.5	96.7	1.17		
			4.81	96.3				
			4.91	98.2				
			4.76	95.1				
			4.89	97.9				
			4.81	96.3				
		10.0	9.47	94.7	96.9	2.14		
			9.84	98.4				
			9.48	94.8				
			9.80	98.0				
			9.59	95.9				
			9.97	99.7				
		片剂	未检出	0.5	0.484	96.8	96.1	2.90
					0.471	94.1		
					0.461	92.1		
					0.477	95.4		
0.491	98.3							
0.499	99.8							
5.0	4.84			96.9	98.6	1.10		
	5.00			100				
	4.94			98.7				
	4.96			99.1				
	4.95			98.9				
	4.90			98.0				
10.0	9.67			96.7	97.7	3.34		
	9.84			98.4				
	10.1			101				
	9.86			98.6				
	9.95			99.5				
	9.16			91.6				

凝胶软糖	未检出	0.5	0.512	102	99.6	3.53
			0.486	97.3		
			0.492	98.4		
			0.511	102		
			0.515	103		
			0.471	94.2		
		5.0	5.13	103	103	2.22
			5.17	103		
			5.01	100		
			5.23	105		
			5.32	106		
			5.05	101		
		10.0	10.6	106	104	2.04
			10.6	106		
			10.6	106		
			10.4	104		
			10.2	102		
			10.1	101		
软胶囊	未检出	0.5	0.482	96.3	96.3	2.98
			0.476	95.2		
			0.484	96.7		
			0.457	91.4		
			0.491	98.3		
			0.499	99.8		
		5.0	4.76	95.2	95.4	1.81
			4.65	93.0		
			4.88	97.6		
			4.84	96.8		
			4.71	94.1		
			4.81	96.1		
		10.0	9.86	98.6	99.6	4.31
			10.2	102		
			9.28	92.8		
			10.3	103		
			9.69	96.9		

			10.4	104		
样品名称	本底值	添加水平 mg/L	实测值 mg/L	回 收 率 (%)	平均回收 率 (%)	相对标 准偏差 RSD%
口服液	未检出	5	5.01	100	102	3.76
			5.32	106		
			5.21	104		
			4.94	98.8		
			5.21	104		
			4.82	96.4		
		50	49.3	98.5	101	2.29
			50.8	102		
			49.9	99.8		
			52.2	104		
			49.6	99.2		
			51.6	103		
		100	104	104	101	2.76
			101	101		
			97	97		
			99	99		
			102	102		
			105	105		

8、重现性（实验室间方法验证）

本方法经过中国海关科学技术研究中心、北京化工大学、北京市科学技术研究院分析测试研究所、北京市朝阳区疾病预防控制中心、北京市延庆区疾病预防控制中心、北京疾病预防控制中心营养与食品卫生所等 6 家单位，根据标准草案进行实验室间方法验证（包括检出限、定量限、测定范围、正确度和再现性），结果符合要求，实际样品再现性验证结果见表 7。

表 7 实际样品实验室间比对结果

编号	DHEA 含量 (mg/kg)						RSD (%)
	Lab 1	Lab 2	Lab 3	Lab 4	Lab 5	Lab 6	
样品 1 软胶囊 DHEA-01S	97.7	102	106	104	98.7	103	3.43
样品 2 硬胶囊 DHEA-02S-2	386	374	405	375	371	387	3.65
样品 3 片剂 DHEA-03S	78.5	73.6	78.3	76.0	71.7	76.6	3.92