



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

肥料中芸苔素内酯的测定 高效液相色谱法

Determination of brassinolide in fertilizers—High performance liquid chromatography

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

(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。

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 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可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国石油和化学工业联合会提出。

本文件由全国肥料和土壤调理剂标准化技术委员会（SAC/TC 105）归口。

本文件起草单位：山东省产品质量检验研究院、上海化工院检测有限公司、国家化肥质量检验检测中心（上海）、山东蓬勃生物科技有限公司、云南化工产品质量监督检验站、贵州省产品质量检验检测院、沃达农业科技股份有限公司、四川润尔科技有限公司。

本文件主要起草人：

肥料中芸苔素内酯的测定 高效液相色谱法

1 范围

本文件规定了肥料中芸苔素内酯的高效液相色谱测定方法。

本文件适用于复合肥料、微量元素水溶肥料、有机水溶肥料等肥料中24-表芸苔素内酯、28-高芸苔素内酯和28-表高芸苔素内酯的测定。

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 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 方法摘要

用甲醇为溶剂提取样品后，采用高效液相色谱-紫外检测法或高效液相色谱-电雾式检测法测定待测物含量，以高效液相色谱-紫外检测法为仲裁法。

5 试验方法

5.1 样品制备

固体样品：将样品粉碎，全部过0.5 mm试验筛（对于潮湿样品可通过1.00 mm试验筛），待用。
液体样品混匀后直接称取。

5.2 方法一 高效液相色谱-紫外检测法

5.2.1 原理

试样中24-表芸苔素内酯、28-高芸苔素内酯和28-表高芸苔素内酯以甲醇为提取溶剂，用苯硼酸甲醇溶液常温下衍生反应30 min，在选定的工作条件下，用液相色谱-紫外检测器进行测定，以保留时间定性，外标法定量。

5.2.2 试剂和材料

5.2.2.1 除非另有说明，在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和 GB/T 6682 中的一级水。

5.2.2.2 甲醇：色谱纯。

5.2.2.3 乙腈：色谱纯。

5.2.2.4 苯硼酸：分析纯。

5.2.2.5 苯硼酸甲醇溶液：准确称取 1g（精确至 0.1 mg）苯硼酸于 1 L 容量瓶，用甲醇（5.2.2.2）溶解并定容至刻度。

5.2.2.6 24-表芸苔素内酯标准品（CAS 号：78821-43-9）：纯度 \geq 95.0%。

5.2.2.7 28-高芸苔素内酯标准品（CAS 号：82373-95-3）：纯度 \geq 96.0%。

5.2.2.8 28-表高芸苔素内酯标准品（CAS 号：110369-52-3）：纯度 \geq 95.0%。

5.2.2.9 混合标准储备液：准确称取 24-表芸苔素内酯、28-高芸苔素内酯和 28-表高芸苔素内酯标准品各 0.01 g（精确至 0.1 mg）于 10 mL 容量瓶中，用甲醇（5.2.2.2）溶解并定容至刻度，配制成质量浓度为 1000 mg/L 的混合标准储备液，置于-18℃条件下避光保存。

5.2.2.10 中间混合标准溶液：移取 1000 mg/L 的混合标准储备液（5.2.2.9）1 mL 于 10 mL 容量瓶中，用甲醇定容，配制成质量浓度为 100 mg/L 的标准溶液。现用现配。

5.2.3 仪器和设备

5.2.3.1 高效液相色谱仪：配有紫外检测器或二极管阵列检测器。

5.2.3.2 超声波清洗器。

5.2.3.3 电子天平：精度 0.1 mg。

5.2.3.4 漩涡混合器。

5.2.3.5 金属试验筛：孔径 0.5 mm、1.0 mm。

5.2.3.6 有机相微孔滤膜：孔径 0.45 μ m，尼龙微孔滤膜或相当者。

5.2.4 试验步骤

5.2.4.1 样品提取

称取 0.5 g 至 2 g（精确至 0.0001g）样品于 50 mL 离心管中，准确加入 10 mL 苯硼酸甲醇溶液（5.2.2.5）和 15 mL 甲醇（5.2.2.2），涡旋 1min，常温下超声 10 min，静置反应 30 min，取上清液 1 mL 过 0.45 μ m 有机相微孔滤膜，待测。

5.2.4.2 色谱参考条件

色谱参考条件如下：

- 色谱柱：C₁₈ 色谱柱，长 100 mm，内径 4.6 mm，粒径 2.7 μ m，或性能相当者；
- 流动相：V[乙腈（5.2.2.3）]: V(水)=85: 15（体积比）；
- 流速：0.8 mL/min；
- 柱温：30℃；
- 检测波长：222 nm；
- 进样量：5 μ L。

5.2.4.3 测定

5.2.4.3.1 标准曲线的绘制

分别移取0.25、0.50、1.25、2.50、5.00 mL中间混合标准溶液（5.2.2.10）至25 mL容量瓶中，加入10 mL苯硼酸甲醇溶液（5.2.2.5），用甲醇（5.2.2.2）定容后摇匀，静置反应30 min，配制质量浓度为1 mg/L、2 mg/L、5 mg/L、10 mg/L和20 mg/L的混合标准工作溶液。按照浓度由低到高的顺序测定，以色谱峰峰面积为纵坐标，对应的溶液浓度为横坐标，绘制标准工作曲线。芸苔素内酯标准物质液相色谱-紫外检测法色谱图见附录A中图A.1。

5.2.4.3.2 试样测定

取预处理后的待测液，按照色谱条件（5.2.4.2）进行测定，记录色谱峰的保留时间和峰面积，以外标法定量，同时进行平行试验。试样中待测物的响应值均应在标准曲线的线性范围之内，超出线性范围的试样溶液可用甲醇适当稀释后进行测定。

5.2.4.4 空白试验

除不称取试样外，均按上述步骤进行测定，平行进行2份空白试验。

5.2.5 分析结果表述

试样中待测物含量 X_i ，以质量分数计，数值用%表示，结果按式（1）计算：

$$X_i = \frac{(c_i - c_0) \times V_i \times D_i}{1000m} \times 100 \dots \dots \dots (1)$$

式中：

c_i ——标准曲线查得试样溶液中的待测物浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

c_0 ——标准曲线查得空白试样溶液中的待测物浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

V_i ——试样的定容体积，单位为升（L）；

D_i ——样品稀释倍数；

m ——样品质量，单位为克（g）。

计算结果保留两位有效数字，取平行测定结果的算术平均值作为测定结果。

5.2.6 精密度

在同一实验室，由同一操作者使用相同设备，按相同的测试方法，并在短时间内对同一被测对象相互独立进行测试获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于这两个测定值的算术平均值的20%，以大于这两个测定值的算术平均值的20%的情况不超过5%为前提。

在不同实验室间，由不同的操作者使用不同的设备，按相同的测试方法，对同一被测对象相互独立进行测试获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于这两个测定值的算术平均值的30%，以大于这两个测定值的算术平均值的30%的情况不超过5%为前提。

5.3 第二法 高效液相色谱-电雾式检测法

5.3.1 原理

试样中24-表芸苔素内酯、28-高芸苔素内酯和28-表高芸苔素内酯以甲醇为提取溶剂，在选定的工作条件下，用液相色谱仪-电雾式检测器进行测定，以保留时间定性，外标法定量。

5.3.2 试剂和材料

5.3.2.1 除非另有说明，在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和 GB/T 6682 中的一级水。

5.3.2.2 工业氮气。

5.3.2.3 甲醇：色谱纯。

5.3.2.4 乙腈：色谱纯。

5.3.2.5 24-表芸苔素内酯标准品（CAS 号：78821-43-9）：纯度 \geq 95.0%。

5.3.2.6 28-高芸苔素内酯标准品（CAS 号：82373-95-3）：纯度 \geq 96.0%。

5.3.2.7 28-表高芸苔素内酯标准品（CAS 号：110369-52-3）：纯度 \geq 95.0%。

5.3.2.8 混合标准储备液：同 5.2.2.9。

5.3.2.9 中间混合标准溶液：同 5.2.2.10。

5.3.3 仪器和设备

5.3.3.1 高效液相色谱仪：配电雾式检测器。

5.3.3.2 超声波清洗器。

5.3.3.3 电子天平：精度 0.1 mg。

5.3.3.4 漩涡混合器。

5.3.3.5 金属试验筛：孔径 0.5 mm、1.0 mm。

5.3.3.6 有机相微孔滤膜：孔径 0.45 μ m，尼龙微孔滤膜或相当者。

5.3.4 试验步骤

5.3.4.1 样品提取

称取 0.5 g 至 2 g（精确至 0.0001g）样品于 50 mL 离心管中，准确加入 25 mL 甲醇（5.3.2.3），涡旋 1 min，常温下超声 10 min，以 6000 r/min 高速离心 5 min，取上清液 1 mL 过 0.45 μ m 有机相微孔滤膜，待测。

5.3.4.2 仪器参考条件

5.3.4.2.1 色谱参考条件

色谱参考条件如下：

- a) 色谱柱：C₁₈ 色谱柱，长 100 mm，内径 4.6 mm，粒径 2.7 μ m，或性能相当者；
- b) 流动相：V[乙腈（5.3.2.3）]: V(水)=38: 62（体积比）；
- c) 流速：0.6 mL/min；
- d) 柱温：30°C；
- e) 进样量：8 μ L。

5.3.4.2.2 电雾式检测器参考条件

电雾式检测器参考条件如下：

- a) 采集频率：5Hz；
- b) 雾化温度：50℃。

5.3.4.3 测定

5.3.4.3.1 标准曲线的绘制

分别移取0.25、0.50、1.25、2.50、5.00 mL中间混合标准溶液（5.3.2.8）至25 mL容量瓶中，用甲醇（5.3.2.3）定容后摇匀，静置反应30 min，配制质量浓度为1 mg/L、2 mg/L、5 mg/L、10 mg/L和20 mg/L的混合标准工作溶液。按照浓度由低到高的顺序测定，以色谱峰面积为纵坐标，对应的溶液浓度为横坐标，绘制标准工作曲线。芸苔素内酯标准物质液相色谱-电雾式检测法色谱图见附录B中图B.1。

5.3.4.3.2 试样测定

取预处理后的待测液，按照色谱条件(5.3.4.2)进行测定，记录待测物的保留时间和色谱峰面积，以外标法定量，同时进行平行试验。试样中待测物的响应值均应在标准曲线的线性范围之内，超出线性范围的试样溶液可用甲醇适当稀释后进行测定。

5.3.4.4 空白试验

除不称取试样外，均按上述步骤进行测定，平行进行2份空白试验。

5.3.5 分析结果表述

试样中待测物含量 ω_i ，以质量分数计，数值用%表示，结果按式（1）计算：

$$\omega_i = \frac{(\rho_i - \rho_0) \times V_i \times D_i}{1000m} \times 100 \dots \dots \dots (1)$$

式中：

ρ_i ——标准曲线查得试样溶液中的待测物浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

ρ_0 ——标准曲线查得空白试样溶液中的待测物浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

V_i ——试样的定容体积，单位为升（L）；

D_i ——样品稀释倍数；

m ——样品质量，单位为克（g）。

计算结果保留两位有效数字，取平行测定结果的算术平均值作为测定结果。

5.3.6 精密度

在同一实验室，由同一操作者使用相同设备，按相同的测试方法，并在短时间内对同一被测对象相互独立进行测试获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于这两个测定值的算术平均值的25%，以大于这两个测定值的算术平均值的25%的情况不超过5%为前提。

附录 A

(资料性)

芸苔素内酯标准物质液相色谱-紫外检测法色谱图

芸苔素内酯标准物质液相色谱-紫外检测法色谱图见图A.1。

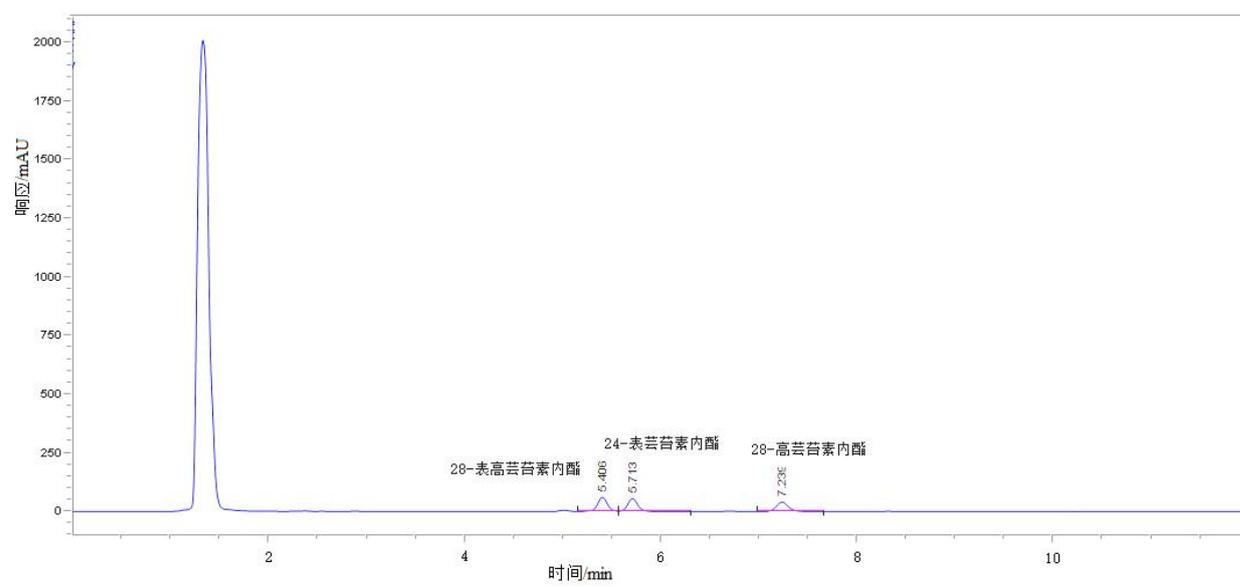


图 A.1 芸苔素内酯标准物质液相色谱-紫外检测法色谱图

附录 B

(资料性)

芸苔素内酯标准物质液相色谱-电雾式检测法色谱图

芸苔素内酯标准物质液相色谱-电雾式检测法色谱图见图B.1。

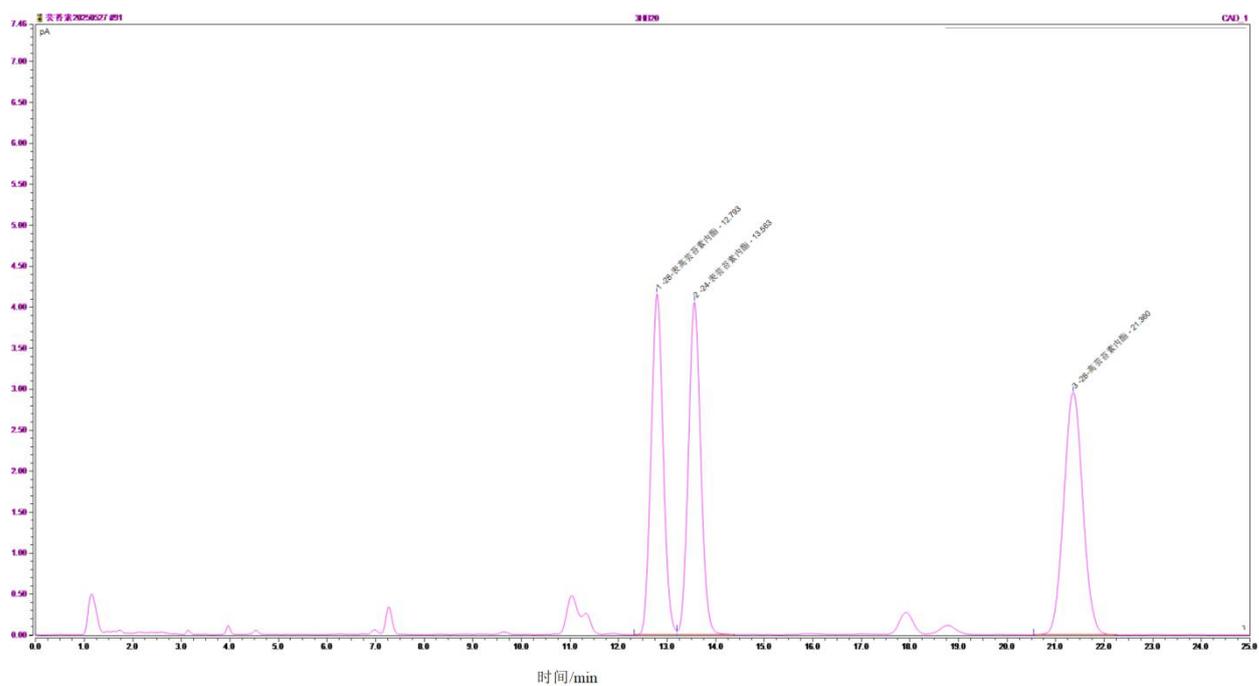


图 B.1 芸苔素内酯标准物质液相色谱-电雾式检测法色谱图