

肥料中芸苔素内酯的测定 高效液相色谱法

国家标准编制说明

(送审稿)

山东省产品质量检验研究院
上海化工院检测有限公司等

二〇二五年十月

目录

一、工作简况.....	1
1.1 任务来源	1
1.2 标准制定背景	1
1.3 主要工作过程	2
二、标准编制原则、主要内容及确定的依据	3
2.1 标准编制原则	3
2.2 主要技术内容及确定的依据	3
三、主要验证试验的分析及预期的经济效果	5
3.1 方法一 高效液相色谱-紫外检测法	5
3.1.1 色谱条件的选择	5
3.1.2 样品前处理条件的确立	8
3.1.3 试验数据处理	10
3.1.4 线性范围	11
3.1.5 方法检出限	11
3.1.6 方法回收率	11
3.1.7 重复性试验	13
3.1.8 再现性实验	15
3.2 方法二 高效液相色谱-电雾式检测法	16
3.2.1 色谱条件的选择	16
3.2.2 样品前处理条件的确立	19
3.2.3 试验数据处理	20
3.2.4 线性范围	20
3.2.5 方法检出限	21
3.2.6 方法回收率	22
3.2.7 重复性试验	23
3.2.8 再现性试验	24
3.2.9 方法比对数据	25
3.3 预期的经济效果	26
四、采用国际标准和国外先进标准的程度	26
五、与有关的现行法律、法规和强制性国家标准的关系	26
六、重大分歧意见的处理经过和依据	26
七、标准性质的建议说明	27
八、贯彻标准的要求和措施建议	27
九、废止现行相关标准的建议	27
十、其它应予说明的事项	27

一、工作简况

1.1 任务来源

本标准根据国标委发〔2024〕25号《国家标准化管理委员会关于下达2024年第三批推荐性国家标准计划及相关标准外文版计划的通知》（项目编号为20241560-T-606）的要求，由全国肥料和土壤调理剂标准化技术委员会提出并归口，由山东省产品质量检验研究院、上海化工院检测有限公司、上海化工研究院有限公司、山东蓬勃生物科技有限公司、中国科学院生态环境研究中心、施可丰化工股份有限公司、贵州省产品质量检验检测院、广东省科学院生态环境与土壤研究所、云南省化工产品质量监督检验站、黑龙江省质量监督检测研究院、沃达农业科技股份有限公司、四川润尔科技有限公司共同起草，制定周期18个月，计划完成时间2025年11月，为首次制定。

1.2 标准制定背景

芸苔素内酯是一种高效、广谱、无毒的新型植物生长调节剂，其渗透强、内吸快，在很低的浓度下，即能显著增加植物的营养体生长和促进受精作用，在有效增加叶绿素含量、提高光合作用效率、促根壮苗、保花保果，提高作物的抗寒性、抗旱性、抗盐碱性，显著缓解药害等方面发挥了重要作用。截至2025年4月，国内芸苔素类农药产品登记共199个，剂型以可溶性粉剂和水剂为主，生产企业共126家，主要分布于山东、河南、江苏、浙江等地；其中登记名称为24-表芸苔素内酯、28-高芸苔素内酯或28-表高芸苔素内酯产品约80%。近年来产品推广应用显示，芸苔素内酯在农药减量控害等方面发挥了巨大潜力。

芸苔素内酯与冲施肥、液体硼、磷酸二氢钾等肥料复配使用可显著提高肥料的利用率，常被用作混配成分添加到肥料中，并以此开发出多功能肥料。统计显示，目前芸苔素内酯已在粮食、蔬菜和水果等20余种作物取得农药登记证，登记作用主要为增产和调节植物生长，但芸苔素内酯有一定的适宜使用浓度，使用浓度过高时可能会对作物出现不同程度的抑制现象，甚至导致细胞分裂异常，产生落花落果、果实畸形等药害。《农药管理条例》规定，未取得农药登记证的植物生长调节剂不

得在肥料中添加使用。为引导肥料行业健康可持续发展，保护农民的合法权益，制定高效、快捷的肥料中芸苔素内酯检测技术尤为重要。

目前针对肥料中芸苔素内酯的测定缺乏统一的检测技术标准，相关文献报道较少。芸苔素内酯类化合物沸点较高，难气化，无法用气相色谱检测；不含有共轭结构及光电响应基团，常规液相色谱结合紫外、荧光及光电检测器无法检测；也不含易离子化基团，无法使用质谱法检测。经研究可通过衍生化反应降低其沸点，或向其分子结构中引入生色基团或易离子化基团，选择适用的检测器进行测定。

本标准建立了肥料中芸苔素内酯的液相色谱-紫外检测法和液相色谱-电雾式检测法，将进一步完善肥料中植物生长调节剂检测标准体系，保护农民的合法权益，保障农作物质量安全，为规范市场良性竞争，保障我国肥料产品质量安全水平提供有效技术支撑。

1.3 主要工作过程

国家标准《肥料中芸苔素内酯的测定 高效液相色谱法》制定任务下达后，山东省产品质量检验研究院、上海化工院检测有限公司、上海化工研究院有限公司、山东蓬勃生物科技有限公司、中国科学院生态环境研究中心、施可丰化工股份有限公司、贵州省产品质量检验检测院、广东省科学院生态环境与土壤研究所、云南省化工产品质量监督检验站、黑龙江省质量监督检测研究院、沃达农业科技股份有限公司、四川润尔科技有限公司等单位共同成立标准起草工作组，制定工作方案，查阅了大量文献资料，进行了样品收集、实验室内和实验室间方法验证工作，在此基础上编写了本标准文本和编制说明。主要工作过程如下：

2024年6月-2025年3月，主要进行了资料调研与收集，包括国家及行业有关政策法规、国内肥料产业现状调研及现有国家标准、行业标准等的查阅，收集相关实验用样品，依据实验结果优化了实验条件，及时编写了《肥料中芸苔素内酯的测定 高效液相色谱法》征求意见稿及编制说明。

2025年4~5月，编制了《肥料中芸苔素内酯的测定 高效液相色谱法》（紫外检测法）作业指导书及实验室间比对方案，选取验证样品，在国内7家实验室开展样品比对工作，汇总比对数据。

2025 年 6 月，开发了肥料中芸苔素内酯的高效液相色谱-电雾式检测法，对主要技术指标进行了优化及确定，开展了该方法的实验室内验证工作。起草了征求意见稿及编制说明，并在全标准信息公共服务平台开展广泛征求意见。

2025 年 7 月，在黑龙江省同江市召开了标准工作会议，起草人员对标准制定的背景、技术路线与主要技术指标进行了汇报，与会委员和代表对具体实验验证内容提出了相关意见和建议。

2025 年 8~10 月，针对《肥料中芸苔素内酯的测定 高效液相色谱法》（电雾式检测法）在国内 5 家实验室开展实验室间比对，并汇总比对数据。

2025 年 10 月底，汇总、处理征集到的意见，修改完善文本及编制说明，形成《肥料中芸苔素内酯的测定 高效液相色谱法》送审稿及编制说明。

二、标准编制原则、主要内容及确定的依据

2.1 标准编制原则

标准编制遵循“先进性，实用性，统一性，规范性”的原则，按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则第 1 部分：标准的结构和编写规则》和 GB/T 20001.4-2015《标准编写规则第 4 部分：试验方法标准》进行编制。

起草小组在充分收集、认真研究相关标准及资料的基础上，结合本实验室的条件及方法的技术特点，按照 GB/T 27417-2017《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》对肥料中芸苔素内酯的检测方法各技术参数进行系统性试验，在论证方法的灵敏度、准确性、线性范围和应用范围的前提下，通过系统性和考察，建立了肥料中芸苔素内酯的高效液相色谱法，力求技术先进、经济合理，确保标准方法的准确性、可靠性和通用性。

2.2 主要技术内容及确定的依据

本标准规定了方法的原理、试剂和材料、仪器设备、试样制备和试验步骤、试验数据处理、回收率和精密度等主要内容，同时根据实验数据，确定了方法的检出限和定量限。

目前国内登记的芸苔素内酯类产品登记成分主要是 24-表芸苔素内酯、28-高芸

苔素内酯和 28-表高芸苔素内酯，约占芸苔素内酯产品登记总数的 80%，因此选定 28-高芸苔素内酯、28-表高芸苔素内酯和 24-表芸苔素内酯为待测物，待测物信息见表 1。

表 1 待测物信息表

化合物名称	CAS号	分子式	分子量
24-表芸苔素内酯	78821-43-9	C ₂₈ H ₄₈ O ₆	480.68
28-高芸苔素内酯	82373-95-3	C ₂₉ H ₅₀ O ₆	494.70
28-表高芸苔素内酯	80483-89-2	C ₂₉ H ₅₀ O ₆	494.70

国内芸苔素相关行业标准，主要包括 HG/T 4922-2016《芸苔素乳油》、HG/T 4923-2016《芸苔素可溶粉剂》和 HG/T 4924-2016《芸苔素水剂》，该类技术标准中样品方法原理主要是采用有机试剂溶解，衍生化反应后利用液相色谱仪外标法定量；芸苔素内酯检测相关文献方面，定量方法主要涉及气相色谱法、液相色谱-质谱联用法和液相色谱法。王明月等利用配有荧光检测器的液相色谱仪对苦瓜中的 24-表芸苔素内脂进行了检测，但该方法样品处理过程操作繁琐，检出限偏高；龚丽文等用气相色谱对丙酰芸苔素内脂进行了检测，该方法存在的主要问题也是检测灵敏度较低；诸力等以分散固相萃取结合超高相液相色谱-串联质谱法测定了茶类中 24-表芸苔素内脂的残留，实验数据显示，不同种类茶叶中目标物基质效应较大。目前国内肥料产品中芸苔素内酯相关检测技术标准尚处于空白，本标准将以甲醇为溶剂进行样品提取，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，检测结果有争议时优先选择紫外检测法，主要技术路线如图 1。

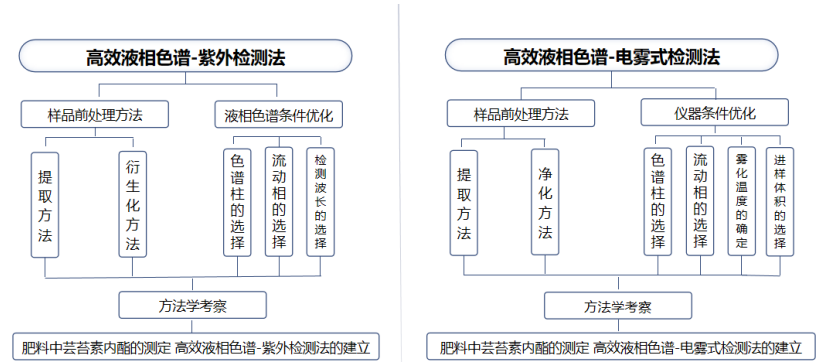


图 1 主要技术路线图

三、主要验证试验的分析及预期的经济效果

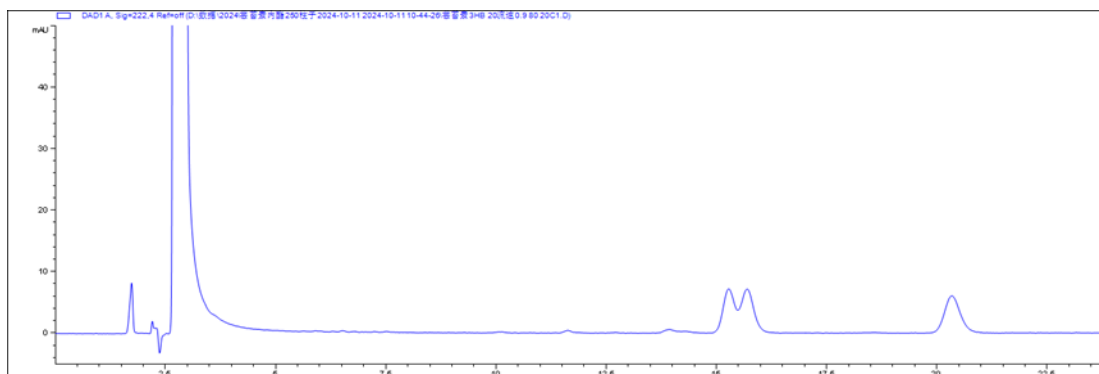
3.1 方法一 高效液相色谱-紫外检测法

该法以甲醇为溶剂提取样品后，采用高效液相色谱-紫外检测法测定待测物含量，试验过程中优化了衍生化反应条件（包括反应温度、反应时间和衍生化试剂用量），并确定了最佳色谱分离条件，通过紫外检测器在 222 nm 波长下进行定量分析。样品经制备后提取过程为：称取 0.5 g 至 2.0 g（精确至 0.1 mg）样品于 50 mL 塑料离心管中，准确加入 10 mL 苯硼酸甲醇溶液和 10 mL 甲醇，涡旋 1 min，室温超声 10 min，静置反应 30 min，转移至 25 mL 容量瓶中，用甲醇定容至刻度，摇匀，取上清液 1 mL 过 0.45 μm 有机相微孔滤膜，待测。

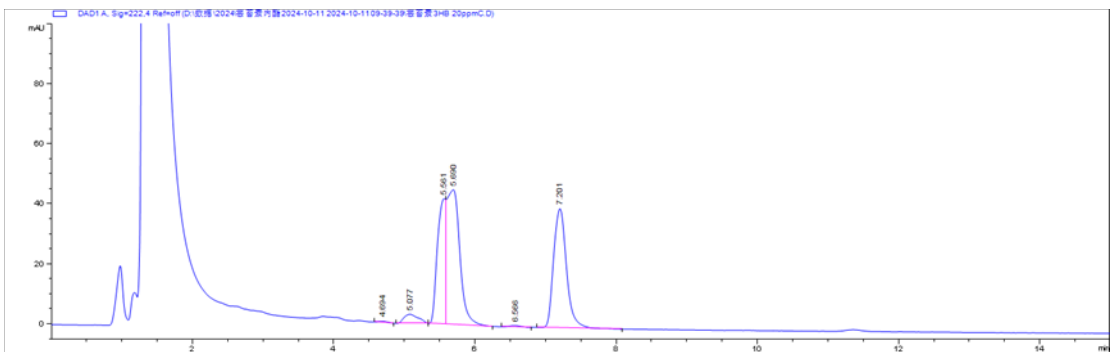
3.1.1 色谱条件的选择

3.1.1.1 色谱柱的选择

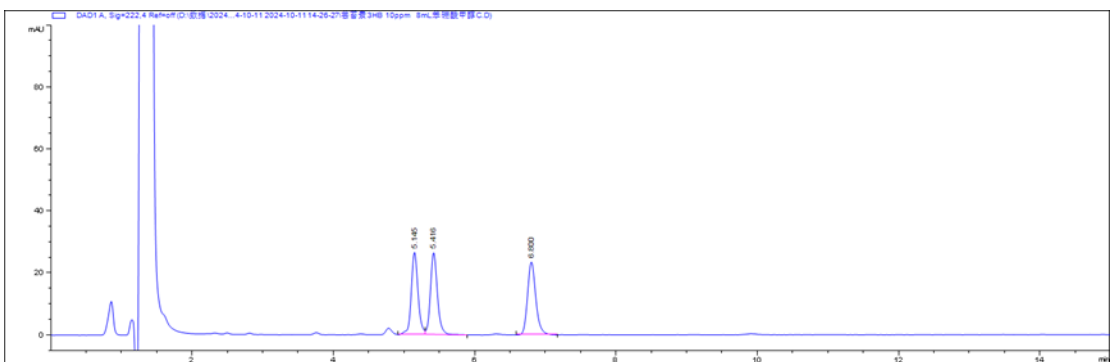
查询芸苔素内酯相关文献后发现，业内多使用 C_{18} 色谱柱对芸苔素内酯衍生物进行色谱分离，试验分别考察了 Column 1 (C_{18} , 4.6 mm \times 250 mm, 5.0 μm)、Column 2 (C_{18} , 4.6 mm \times 150 mm, 5.0 μm)、Column 3 (C_{18} , 4.6 mm \times 100 mm, 2.7 μm) 3 种色谱柱对待测物的分离效果，优化色谱条件后，试验结果显示，以 Column 1 和 Column 2 为分离柱时，28-表高芸苔素内酯和 24-表芸苔素内酯衍生物因极性相似难以分离，利用 Column 3 柱时 3 种芸苔素内酯衍生物的分离效果较好，最终确定 Column 3 (C_{18} , 4.6 mm \times 100 mm, 2.7 μm) 为色谱分离柱。



(a) 以 Column 1 (C_{18} , 4.6 mm \times 250 mm, 5.0 μm) 为分离柱



(b) 以 Column 2 (C_{18} , 4.6mm×150 mm, 5.0 μ m) 为分离柱



(c) 以 Column 3 (C_{18} , 4.6 mm×100 mm, 2.7 μ m) 为分离柱

图 2 20.0mg/L 混合标准溶液的色谱图

3.1.1.2 流动相的选择

将标准物质用甲醇溶解,经苯硼酸甲醇溶液衍生化后,以甲醇和水作为流动相,对试样进行分离测定,色谱峰出峰时间较长,且三种芸苔素内酯衍生物无法完全分离;以不同比例的乙腈和水为流动相,利用改变流动相配比和流速来观察三种待测物的保留时间和分离度。实验发现,当乙腈和水体积比为 85:15、流速为 0.8 mL/min 时,各待测物峰形对称,分离效果较好,待测物检测时间可控制在 15 分钟之内,因此选择体积比为 85:15 的乙腈和水为流动相,流速为 0.8 mL/min。

3.1.1.3 检测波长的选择

利用二极管阵列检测器,对浓度为 20 μ g/mL 的三种芸苔素内酯衍生物进行 190 nm~400 nm 全波长扫描,发现三种芸苔素内酯衍生物在 222 nm 处有较强吸收峰(待测物紫外全波长扫描光谱图见图 3)。因此确定检测波长为 222 nm,在试验确定的色谱条件下待测物峰型对称,分离良好。

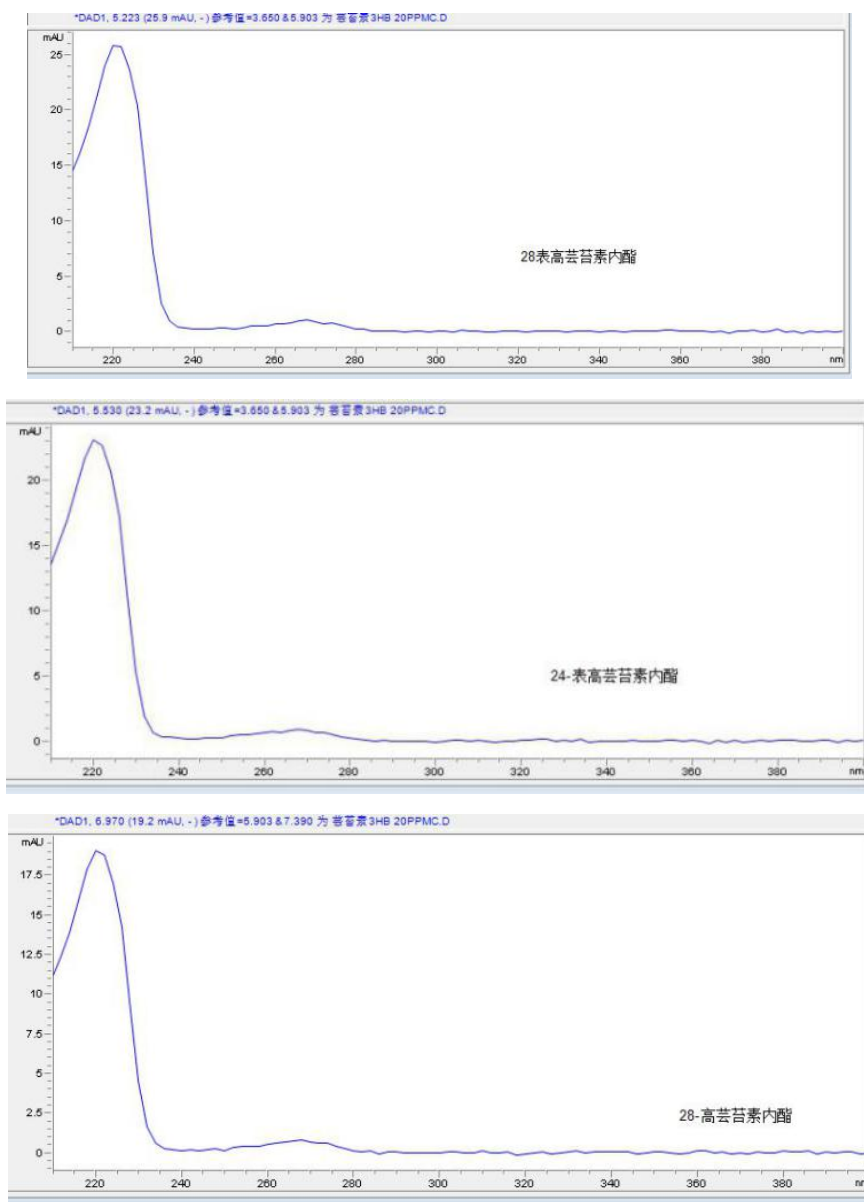


图3 芸苔素内酯衍生物紫外全波长扫描光谱图

通过以上试验验证，确定液相色谱条件如下：

色谱柱：C₁₈ 色谱柱，长 100 mm，内径 4.6 mm，粒径 2.7 μm，或性能相当者；

柱温：30℃；

流动相：V（乙腈）：V（水）=85：15（体积比）；

流速：0.8 mL/min；

检测波长：222 nm；

进样量：5 μL。

通过该色谱条件获得典型的芸苔素内酯衍生物色谱图见图 4。

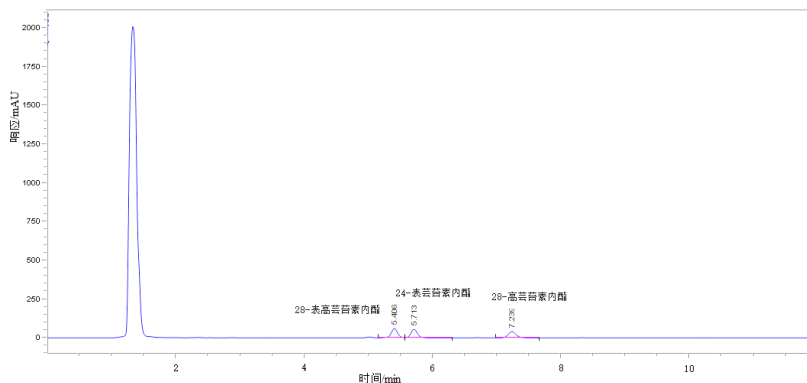


图 4 芸苔素内酯标准物质衍生物液相色谱图

3.1.2 样品前处理条件的确立

3.1.2.1 提取溶剂的选择

芸苔素内酯属于酯溶性激素，常温下其在水中的溶解度相对较低，仅约为 5 mg/kg，但它在有机溶剂如甲醇、乙腈中具有良好的溶解性。选取空白样品，进行加标浓度为 0.025% 的加标回收试验，考察了甲醇、乙腈、乙酸乙酯、丙酮四种溶剂对 3 种芸苔素内酯衍生物的提取效果（见图 5）。发现以丙酮为提取溶剂时，待测物的回收率低于 40%；以乙腈为提取溶剂时，待测物的回收率小于 60%；以甲醇和乙酸乙酯为提取溶剂时，待测物的回收率在 81%~123% 之间，但以乙酸乙酯为提取溶剂，需增加氮吹及复溶过程，为提高检测效率，实验最终选择甲醇为提取溶剂。

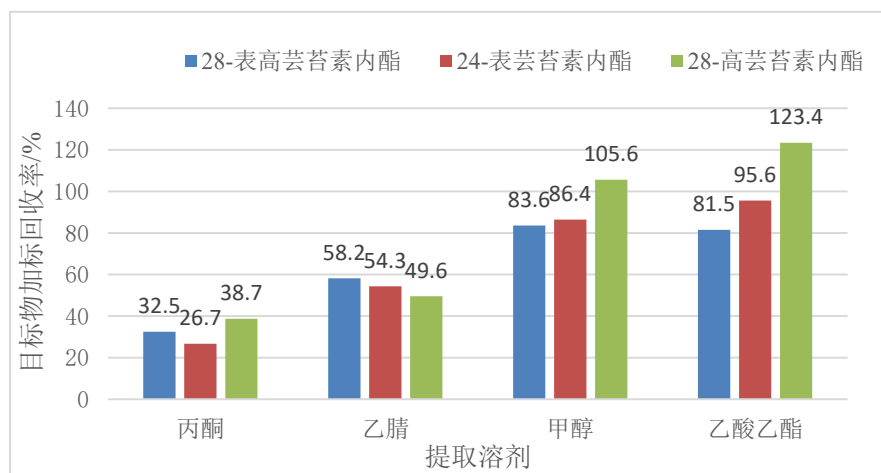


图 5 不同提取试剂下三种待测物加标回收率

3.1.2.2 衍生化条件的选择

硼酸类衍生剂作为环形衍生剂可与芸苔素内酯邻位的两个羟基形成五元环，是芸苔素内酯类化合物理想的衍生化试剂，参照行业标准 HG/T 4923-2016《芸苔素可溶粉剂》和 HG/T 4924-2016《芸苔素水剂》，选择苯硼酸作为衍生化试剂。因甲醇对芸苔素内酯衍生物的提取效率较高，试验对比了以甲醇为反应溶剂，在 80℃水浴和室温两种条件下苯硼酸对芸苔素内酯的衍生化效果。发现在 3 种芸苔素内酯浓度相同的条件下，80℃高温水浴下的衍生物色谱响应远低于室温，室温使用苯硼酸衍生化具有操作简便和衍生化效率高的优点，因此衍生化温度选择为室温。

试验设定衍生化时间为 10 min、20 min、30 min、40 min、50 min、60 min，对苯硼酸和 3 种芸苔素内酯的衍生化时间进行了研究（见图 6）。发现将已知含量的芸苔素内酯标准品与苯硼酸室温下衍生化反应，以芸苔素内酯衍生物响应峰面积作为衡量衍生反应的完成程度。28-表高芸苔素内酯、24-表芸苔素内酯和 28-高芸苔素内酯在衍生时间为 10 min 时分别完成反应进程的 66%、63%和 71%，3 种芸苔素内酯衍生化时间为 30 min 时可完成反应，因此衍生化时间确定为 30 min。

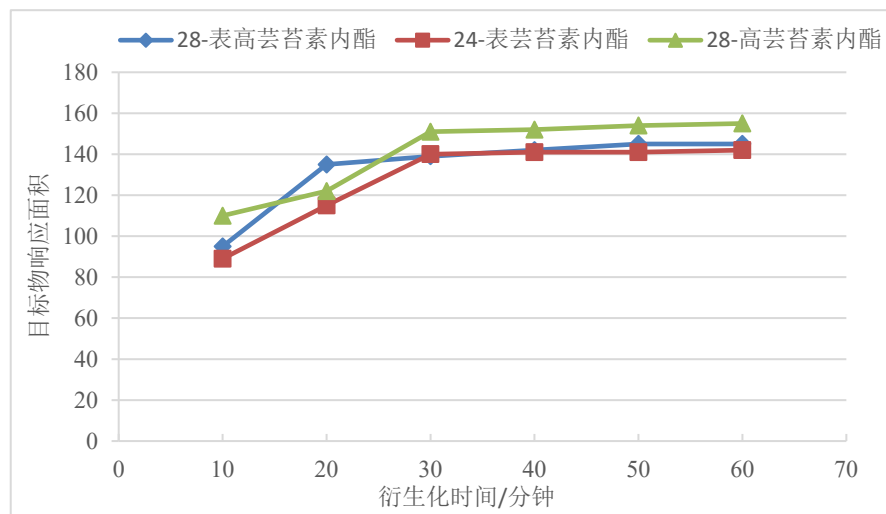


图 6 不同衍生化时间下待测物液相色谱响应峰面积

试验对衍生化试剂苯硼酸的用量进行了研究（图 7），发现苯硼酸浓度为 1.0 mg/mL 时，将已知含量的 3 种芸苔素内酯标准品溶液分别添加 2 mL、4 mL、6 mL、8 mL 和 10 mL 苯硼酸溶液进行反应，添加 8 mL 苯硼酸时衍生物色谱响应即可达到峰值，为避免操作误差及其他影响，实验采用过量苯硼酸进行衍生化，衍生试剂用量确定为 10 mL。

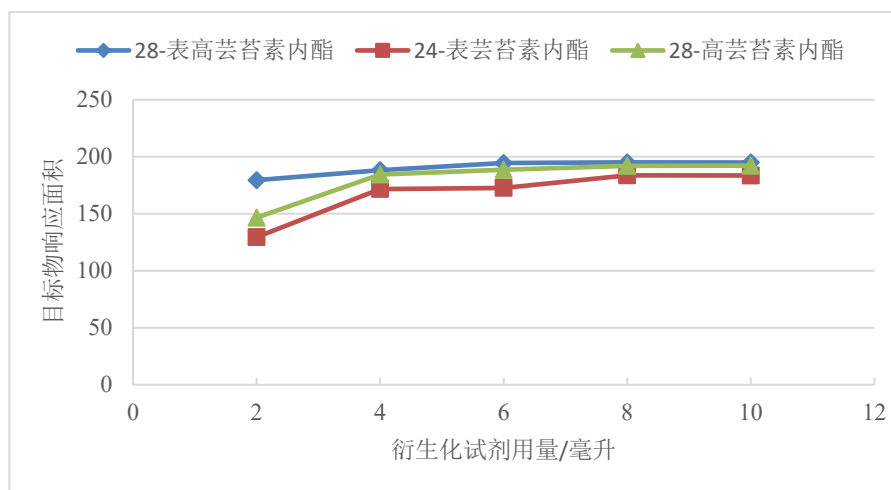


图 7 不同衍生化试剂用量下待测物液相色谱响应峰面积

3.1.2.3 提取方式的选择

考虑到不同肥料样品对提取溶剂的溶解性可能有差别，实验选择提取效率高、操作简便的超声提取方式对待测物进行提取，并研究了超声时间对提取效果的影响。设定超声时间分别为 3 min、5 min、10 min、15 min 进行平行实验，测定结果表明，四组样品加标回收率分别为 73%~113%、92%~98%、95%~103%、75%~131%。超声时间为 10 min 时，样品测定准确度和稳定性最佳，因此确定超声提取时间为 10 min。

3.1.3 试验数据处理

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：

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

式中：

ρ_i ——由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 ——由标准曲线查得空白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。

3.1.4 线性范围

在优化的实验条件下，对质量浓度分别为 1.0 mg/L、2.0 mg/L、5.0 mg/L、10.0 mg/L、20.0 mg/L 的 3 种待测物混合标准工作溶液按浓度从低到高依次分析测定。以芸苔素内酯衍生物的峰面积(y)为纵坐标，对应质量浓度(x)为横坐标，绘制标准曲线。待测物线性范围、线性回归方程、相关系数见表 2。

表 2 待测物线性范围、线性方程、相关系数（液相色谱-紫外检测法）

化合物名称	标准溶液系列(mg/L)	标准曲线回归方程	相关系数 r
28-表高芸苔素内酯	1.0、2.0、5.0、10.0、 20.0	$y=10.46040x-2.14145$	0.9998
24-表芸苔素内酯		$y=8.73765x-0.93777$	0.9990
28-高芸苔素内酯		$y=8.94655x-0.34157$	0.9997

3.1.5 方法检出限

本方法中，以空白肥料样品为基质进行加标实验，加标浓度范围为 1~50 mg/kg，考察方法检出限和定量限，按 3 倍信噪比(S/N=3)和 10 倍信噪比(S/N=10)计算方法的检出限和定量限，经试验确定，当称样量为 1.0 g，定容体积为 25 mL 时，本文件的方法检出限为：28-表高芸苔素内酯 3.75 mg/kg，24-表芸苔素内酯 3.75 mg/kg，28-高芸苔素内酯 5.0 mg/kg；方法定量限为：28-表高芸苔素内酯 11.25 mg/kg，24-表芸苔素内酯 11.25 mg/kg，28-高芸苔素内酯 15.0 mg/kg。

3.1.6 方法回收率

根据实际样品检出浓度情况，称取空白样品，分别设高、低两个添加水平，每个水平重复测定六次。按优化后的方法进行样品前处理，采用选定的液相色谱条件依次对样品进行检测。分别计算两个浓度的加标回收率，实验数据见表 3~表 5，3 种待测物不同添加水平的平均添加回收率在 94.4%~101.7%之间，RSD 值范围为 3.52%~8.16%，满足定量分析检测要求。

表 3 28-表高芸苔素内酯加标回收率数据表

平行样编号	28-表高芸苔素内酯测定结果			
	低水平		高水平	
	添加量/ μg	测定值 (μg)	添加量/ μg	测定值/ μg
1	50	46.85	125	118.08
2		44.95		126.72
3		43.96		117.56
4		43.57		116.57
5		52.16		129.62
6		51.73		129.18
测定平均值/ μg	/	47.20	/	122.96
回收率/%	94.40		98.37	
RSD/%	8.16		5.03	

表 4 24-表芸苔素内酯加标回收率数据表

平行样编号	24-表芸苔素内酯测定结果			
	低水平		高水平	
	添加量/ μg	测定值/ μg	添加量/ μg	测定值/ μg
1	50	45.05	125	121.12
2		49.23		132.87
3		46.56		129.23
4		48.64		126.99
5		50.82		131.68
6		52.42		132.83
测定平均值/ μg	/	48.79	/	129.12
回收率/%	97.58		101.70	
RSD/%	5.53		3.52	

表 5 28-高芸苔素内酯加标回收率数据表

平行样编号	28-高芸苔素内酯测定结果			
	低水平		高水平	
	添加量/ μg	测定值/ μg	添加量/ μg	测定值/ μg
1	50	46.17	125	116.94
2		44.63		114.82
3		46.45		127.81
4		47.68		131.29
5		52.14		117.21
6		50.83		126.83
测定平均值/ μg	/	47.98	/	122.48
回收率/%	95.96		97.98	
RSD/%	6.07		5.68	

3.1.7 重复性试验

选取 9 批次实际样品，利用高效液相色谱-紫外检测法测定芸苔素内酯的含量，对肥料中芸苔素内酯测定结果的实验室内误差进行综合统计，统计数据见表 6。计算每组平行的算术平均值以及相对相差（相对相差表示两次测定差值的绝对值与算术平均值的比值）。按照相对相差由大到小排序，发现最大相对相差为 18.9%。因此，同一实验室进行样品测定时，两次独立测试结果的绝对差值应不大于这两个测定值的算术平均值的 20%。

表 6 芸苔素内酯重复性数据（紫外检测法）

待测物	样品编号	平行 1 (%)	平行 2 (%)	平行 3 (%)	平行 4 (%)	平行 5 (%)	平行 6 (%)	平行 7 (%)	算术平均值 (%)	最大相对相差 (%)
28-表 高芸苔 素内酯	yp-1	0.0091	0.011	0.0091	0.0092	0.0094	0.0094	0.0096	0.0095	18.9
	yp-2	0.0092	0.0090	0.0092	0.0094	0.0097	0.0096	0.0095	0.0094	7.5
	yp-3	0.0203	0.0211	0.0194	0.0188	0.0184	0.0191	0.0193	0.0195	13.7

待测物	样品 编号	平行 1 (%)	平行 2 (%)	平行 3 (%)	平行 4 (%)	平行 5 (%)	平行 6 (%)	平行 7 (%)	算术平 均值 (%)	最大相 对相差 (%)
24-表 芸苔素 内酯	yp-4	0.0102	0.0104	0.0113	0.0102	0.0103	0.0101	0.0114	0.0106	11.2
	yp-5	0.0124	0.0103	0.0121	0.0112	0.0123	0.0104	0.0113	0.0114	18.5
	yp-6	0.0193	0.0184	0.0191	0.0183	0.0201	0.0212	0.0203	0.0195	14.7
28-高 芸苔素 内酯	yp-7	0.0042	0.0043	0.0041	0.0042	0.0042	0.0044	0.0043	0.0042	7.1
	yp-8	0.0039	0.0044	0.0041	0.0042	0.0043	0.0038	0.0041	0.0041	14.6
	yp-9	0.0094	0.0097	0.0099	0.0095	0.0094	0.0089	0.0091	0.0094	10.6

3.1.8 再现性实验

选取 5 个芸苔素内酯肥料样品，利用高效液相色谱-紫外检测法测定芸苔素内酯的含量，按实验方法在 7 家单位开展实验室间比对验证试验，所得数据见表 7 所示。对肥料中芸苔素内酯检测结果进行实验室间误差统计。计算每个样品中待测物质的不同实验室间最大相对相差，按照相对相差由大到小排序（ $\text{相对相差} = |A - B| / [(A + B)/2] \times 100\%$ ），得出最大相对相差为 26.8%。考虑众实验室间操作人员技术水平及设备精密度差异，不同实验室测定时，两次独立测试结果的绝对差值不大于这两个测定值算术平均值的 30%。

表 7 芸苔素内酯再现性试验数据汇总表（紫外检测法）

样品 编号	检验项目	实验室 A 检验结果 /%	实验室 B 检验结果 /%	实验室 C 检验结果 /%	实验室 D 检验结果 /%	实验室 E 检验结果 /%	实验室 F 检验结果 /%	实验室 G 检验结果 /%	最大相对 相差/%
0320-A	24-表芸苔素内酯	0.0152	0.0147	0.0154	0.0178	0.0177	0.0168	0.0171	19.1
	28-高芸苔素内酯	0.0186	0.0157	0.0180	0.0176	0.0198	0.0178	0.0182	23.1
0320-B	24-表芸苔素内酯	0.0071	0.0087	0.0093	0.0092	0.0084	0.0076	0.0076	26.8
	28-高芸苔素内酯	0.0092	0.0080	0.0085	0.0092	0.0080	0.0085	0.0085	14.0
0320-C	28-表高芸苔素内酯	0.0084	0.0089	0.0090	0.0081	0.0091	0.0079	0.0079	14.1
0320-D	24-表芸苔素内酯	0.0165	0.0178	0.0194	0.0192	0.0186	0.0161	0.0162	18.6
	28-高芸苔素内酯	0.0206	0.0186	0.0200	0.0204	0.0208	0.0184	0.0183	12.8
0320-E	28-表高芸苔素内酯	0.0192	0.0192	0.0184	0.0192	0.0198	0.0166	0.0174	17.6

3.2 方法二 高效液相色谱-电雾式检测法

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。试验过程中研究确定了提取溶剂、色谱分离柱，优化了流动相比比例、流速等色谱分离条件以及检测器参数。确定样品经制备后提取过程为：称取 0.5 g 至 2 g（精确至 0.0001g）样品于 50 mL 塑料离心管中，准确加入 20 mL 甲醇，涡旋 1 min，室温超声 10 min，转移至 25 mL 容量瓶中，用甲醇定容至刻度，摇匀，取上清液 1 mL 过 0.45 μm 有机相微孔滤膜，待测。

注：电雾式检测器（CAD）是一种新型质量型检测技术，其工作原理为液相色谱洗脱由氮气分散雾化，排出较大的雾滴后，其余较小的雾滴在干燥管中受热迅速干燥形成溶质颗粒。溶质颗粒与带正电荷的氮气发生逆向碰撞并使其表面带上正电荷，再经过负电荷离子阱，使电迁移率较大的氮气与易挥发溶剂颗粒的表面的正电荷被中和，最后，电迁移率小的带电溶质颗粒进入收集器，由高灵敏度的静电检测计测量其电信号，该信号强度与溶质的质量成正比。

3.2.1 色谱条件的选择

3.2.1.1 色谱柱和流动相的选择

28-表高芸苔素内酯、24-表芸苔素内酯和 28-高芸苔素内酯因自身结构的特异性，可被 C_{18} 色谱柱分离，试验分别考察了 Agilent Zorbox SB- C_{18} （4.6 mm \times 100 mm，2.7 μm ）色谱柱和 ThermoFisher FOODKIT1&2 ADE（4.6 \times 100mm，2.6 μm ）色谱柱对待测物的分离效果（图 8）。优化色谱条件后，发现利用 ThermoFisher FOODKIT1&2 ADE 色谱柱，三种待测物可快速出峰，但分离效果远低于 Agilent Zorbox SB- C_{18} 柱，且 Agilent Zorbox SB- C_{18} 柱条件下检测基线噪音较低，因此选定 Agilent Zorbox SB- C_{18} （4.6 mm \times 100 mm，2.7 μm ）柱为色谱分离柱。

前期利用高效液相色谱-紫外检测法测定 3 种待测物时，选定液相色谱流动相为乙腈和水体积比为 85:15，试验分别尝试了乙腈水体积比为 85:15、65:35、55:45 和 35:65 四种液相色谱流动相体系。发现待测物的出峰时间对流动相中乙腈的体积变化较为敏感，流动相体系中随着乙腈体积的减小，待测物的出峰时间逐渐变快；当

流动相中乙腈-水体积比为 85:15 时，待测物检测时间超过 35 分钟；当乙腈-水体积比流动相比比例为 65:35 和 55:45 时，三种待测物无法实现完全分离；当乙腈-水体积比为 35:65 时，三种待测物出峰时间适中，基本实现分离。进一步优化调整色谱流动相条件，确定最佳液相色谱检测条件为乙腈-水体积为 38:62，该条件下三种待测物可实现完全分离，且测定时间控制在 30min 以内。

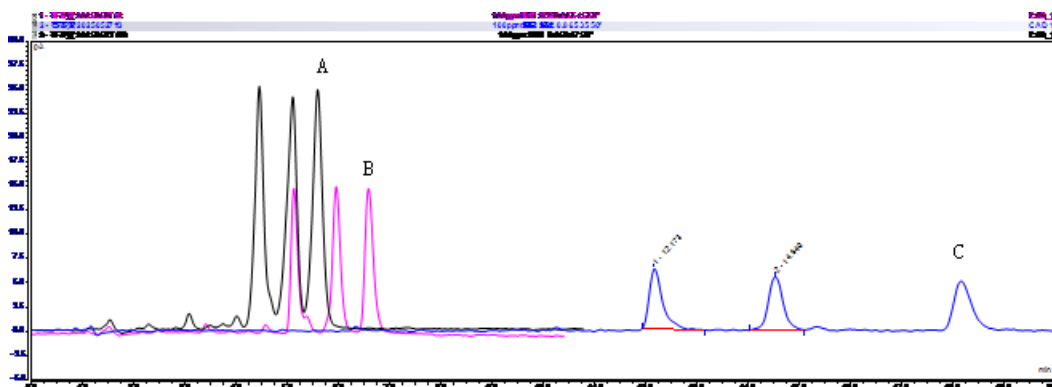


图 8 不同色谱分离柱条件下 100.0mg/L 混合标准溶液的色谱图

注：A、B 为利用 ThermoFisher FOODKIT1&2 ADE 柱获得的色谱图，C 为利用 Agilent Zorbox SB-C₁₈ 柱获得的色谱图。

3.2.1.2 进样体积的选择

基于电雾式检测器的特点，高进样量可能导致溶剂蒸发不完全，降低灵敏度，同时，色谱进样体积需考虑到色谱柱载样能力。实验选定的 Agilent Zorbox SB-C₁₈ (4.6 mm×100 mm, 2.7 μm) 色谱柱属于粒径小的填料，载样量较低，需适当考虑减少进样体积。试验分别考察了进样体积为 5μL、8μL 和 10 μL 下三种待测物的分离效果及检测灵敏度（见图 9），发现质量浓度为 20 μg/mL 的标准溶液进样体积为 10 μL 时，28-表高芸苔素内酯和 24-表芸苔素内酯分离度小于 1.0，未达到检测要求；进样体积为 5 μL 和 8 μL 时，三种待测物分离度均大于 1.5，考虑到尽可能提高检测方法灵敏度，实验选择色谱进样体积为 8 μL。

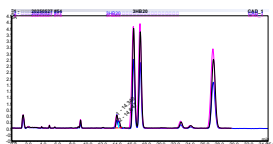


图 9 不同进样体积下待测物液相色谱图

3.2.1.3 雾化温度的选择

在液相色谱-电雾式检测器中，雾化温度的选择直接影响检测灵敏度、基线稳定性和溶剂蒸发效率。雾化温度过低，溶剂蒸发不全，可能导致基线噪音大；雾化温度过高，可能导致化合物分解，导致待测物响应峰面积下降。试验分别考察了质量浓度为 $2\ \mu\text{g/mL}$ 的混合标准溶液在雾化温度为 35°C 、 50°C 和 70°C 条件下的色谱响应值（见图 10），发现随着雾化温度的升高，3 种待测物的色谱响应呈下降趋势；雾化温度为 35°C 时，3 种待测物的色谱响应最高，但此条件下基线波动较大，影响待测物检测灵敏度。综合考虑，选定电雾式检测器的雾化温度为 50°C 。

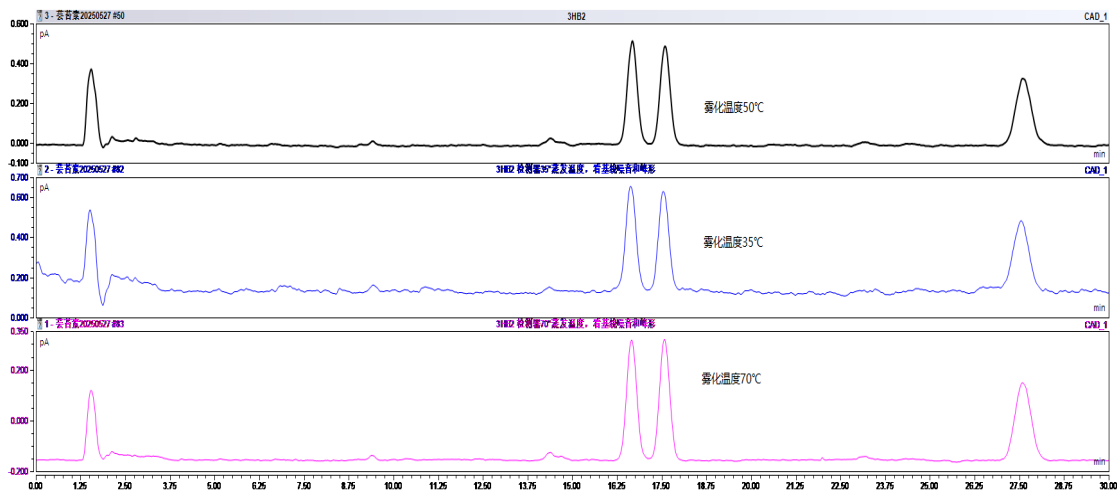


图 10 不同雾化温度下待测物液相色谱图

通过以上试验验证，确定检测条件如下：

色谱柱：C₁₈ 色谱柱，长 100 mm，内径 4.6 mm，粒径 2.7 μm，或性能相当者；

流动相：V（乙腈）：V（水）=38：62（体积比）；

柱温：30℃；

流速：0.6 mL/min；

进样量：8 μL。

采集频率：5 Hz；

雾化温度：50℃。

通过该色谱条件获得典型的芸苔素内酯标准物质液相色谱图见图 11。

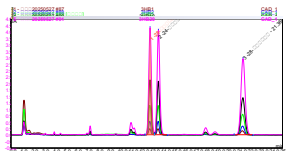


图 11 芸苔素内酯标准物质液相色谱图

3.2.2 样品前处理条件的确立

液相色谱-电雾式检测法中，除了色谱柱和流动相的选择外，前处理过程中试样溶液的制备需重点考察，根据芸苔素内酯液相色谱-紫外检测法提取溶剂选择试验结果，选择甲醇为芸苔素内酯的有机相提取溶剂。称取 1.00 g 空白样品于 50 mL 离心管中，进行 0.02% 的加标回收试验，分别准确加入 20 mL 10% 甲醇、30% 甲醇、50% 甲醇、70% 甲醇、90% 甲醇和甲醇，涡旋 1 min，常温下超声 10 min，转移至 25 mL 容量瓶中，用甲醇定容至刻度后摇匀，取上清液 1 mL 过 0.45 μm 有机相微孔滤膜，待测液上机进行测定，计算各个样品的加标回收率。试验表明，采用 10% 甲醇、30%

甲醇、50%甲醇为提取溶剂时，3 种待测物的加标回收率均低于 40%，采用 70%甲醇、90%甲醇为提取溶剂时，3 种待测物的加标回收率在 52.7%~64.8%之间；随着提取溶剂中水相比比例增加，待测物的峰型和响应变差；采用甲醇为提取溶剂时，3 种待测物的加标回收率在 79.5%~112.3%之间，因此最终选择甲醇为提取溶剂。

3.2.3 试验数据处理

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（2）计算：

$$X_i = \frac{(\rho_i - \rho_0) \times V_i \times D_i}{1000m} \times 100 \dots\dots\dots (2)$$

式中：

ρ_i ——由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 ——由标准曲线查得空白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。

3.2.4 线性范围

在优化的实验条件下，对质量浓度分别为 1.0 μg/mL、2.0 μg/mL、5.0 μg/mL、10.0 μg/mL、20.0 μg/mL 的 28-表高芸苔素内酯、24 表芸苔素内酯和 28-高芸苔素内酯标准工作溶液按浓度从低到高依次分析测定。以芸苔素内酯的峰面积(y)为纵坐标，对应质量浓度(x)为横坐标，绘制标准曲线，3 种待测物线性曲线图见图 12，试验结果表明 3 种待测物在 1 μg/mL~20 μg/mL 质量浓度范围内线性关系良好，相关系数在 0.9985 以上。

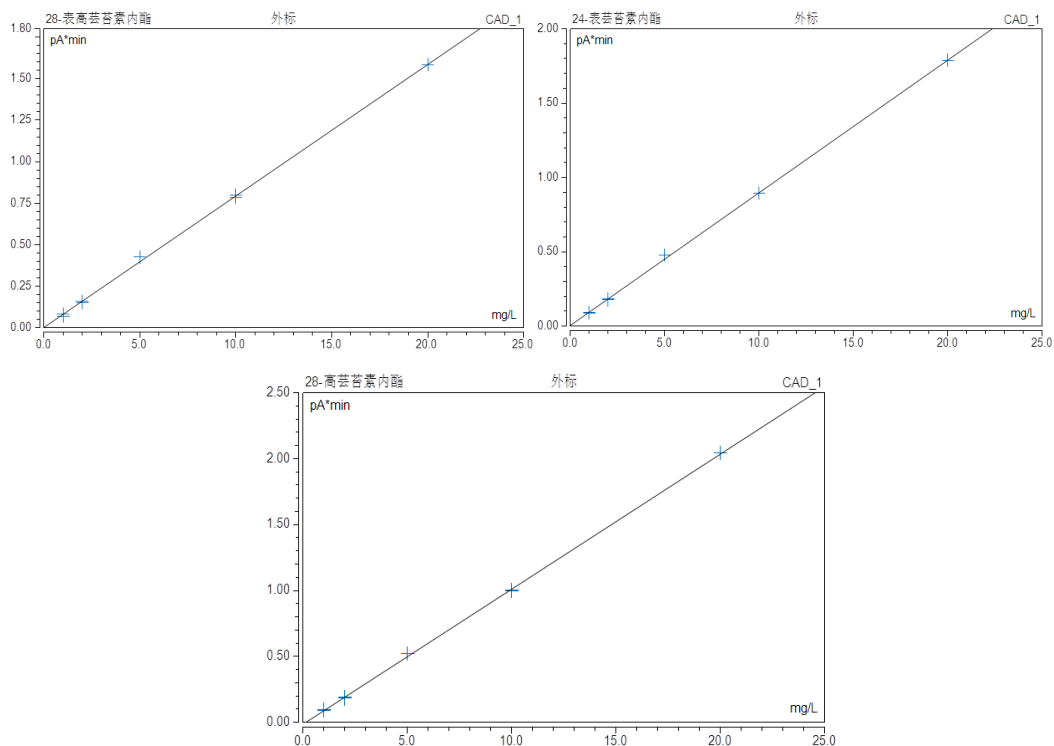


图 12 3 种待测物标准曲线图

表 8 待测物线性范围、线性方程、相关系数（液相色谱-电雾式检测法）

待测物名称	标准溶液系列(mg /L)	标准曲线回归方程	相关系数 r
28-表高芸苔素内酯	1.0、2.0、5.0、10.0、 20.0	$y=0.1299x-0.0048$	0.9983
24-表芸苔素内酯		$y=0.1285x-0.0027$	0.9991
28-高芸苔素内酯		$y=0.1455x-0.0195$	0.9989

3.2.5 方法检出限

本方法中，以空白肥料样品为基质进行加标实验，加标浓度范围为 1~50 mg/kg, 考察方法检出限和定量限，按 3 倍信噪比(S/N=3)和 10 倍信噪比(S/N=10)计算方法的检出限和定量限。试验结果表明，当称样量为 1.0 g，定容体积为 25 mL 时，本文件的方法检出限为：28-表高芸苔素内酯 5.0 mg/kg，24-表芸苔素内酯 5.0 mg/kg，28-高芸苔素内酯 6.25 mg/kg；定量限为：28-表高芸苔素内酯 15.0 mg/kg，24-表芸苔素内酯 15.0 mg/kg，28-高芸苔素内酯 18.75 mg/kg。

3.2.6 方法回收率

根据实际样品检出浓度情况，称取空白样品，分别设高、低两个添加水平，每个水平重复测定六次。按优化后的方法进行样品前处理，采用选定的液相色谱条件依次对样品进行检测。分别计算两个浓度的加标回收率，实验数据见表 9~表 11，3 种待测物不同添加水平的平均添加回收率在 82.96%~102.49%之间，RSD 值范围为 4.75%~9.61%，满足定量分析要求。

表 9 28-表高芸苔素内酯加标回收率数据表

平行样编号	28-表高芸苔素内酯测定结果			
	低水平		高水平	
	添加量/ μg	测定值 (μg)	添加量/ μg	测定值/ μg
1	50	45.93	125	105.36
2		41.31		103.74
3		46.25		101.22
4		50.67		98.57
5		51.74		96.45
6		48.29		109.58
测定平均值/ μg	/	47.36	/	102.49
回收率/%	94.72		102.49	
RSD/%	8.16		5.03	

表 10 24-表芸苔素内酯加标回收率数据表

平行样编号	24-表芸苔素内酯测定结果			
	低水平		高水平	
	添加量/ μg	测定值/ μg	添加量/ μg	测定值/ μg
1	50	42.51	125	96.27
2		41.87		85.35
3		40.92		93.48
4		45.69		86.36

平行样编号	24-表芸苔素内酯测定结果			
	低水平		高水平	
	添加量/ μg	测定值/ μg	添加量/ μg	测定值/ μg
5		43.74		106.25
6		52.63		98.47
测定平均值/ μg	/	44.56	/	94.36
回收率/%	89.12		94.36	
RSD/%	9.61		8.32	

表 11 28-高芸苔素内酯加标回收率数据表

平行样编号	28-高芸苔素内酯测定结果			
	低水平		高水平	
	添加量/ μg	测定值/ μg	添加量/ μg	测定值/ μg
1	50	41.73	125	89.43
2		47.85		85.35
3		52.41		80.14
4		43.39		83.27
5		49.84		80.62
6		44.75		78.97
测定平均值/ μg	/	46.66	/	82.96
回收率/%	93.32		82.96	
RSD/%	8.74		4.75	

3.2.7 重复性试验

选取 4 批次实际肥料样品, 利用高效液相色谱-电雾式检测法测定芸苔素内酯的含量, 对其中芸苔素内酯测定结果的实验室内误差进行综合统计, 统计数据见表 12。计算每组平行的算术平均值以及相对相差 (相对相差表示两次测定差值的绝对值与算术平均值的比值)。按照相对相差由大到小排序, 最大相对相差为 24.0%。因此, 在重复性条件下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%。

表 12 芸苔素内酯重复性数据（电雾式检测法）

待测物	样品 编号	平行 1 (%)	平行 2 (%)	平行 3 (%)	平行 4 (%)	平行 5 (%)	平行 6 (%)	平行 7 (%)	算术平 均值 (%)	最大相 对相差 (%)
28-表 高芸苔 素内酯	yp11	0.0101	0.0099	0.0112	0.0099	0.0098	0.0094	0.0093	0.0099	18.5
	yp12	0.0202	0.0215	0.0177	0.0181	0.0185	0.0191	0.0187	0.0191	19.4
24-表 芸苔素 内酯	yp13	0.0103	0.0107	0.0109	0.0103	0.0107	0.0117	0.0108	0.0108	12.7
	yp14	0.0224	0.0215	0.0206	0.0198	0.0192	0.0201	0.0193	0.0204	15.4
28-高 芸苔素 内酯	yp13	0.0091	0.0089	0.0088	0.0095	0.0112	0.0094	0.0098	0.0095	24.0
	yp14	0.0228	0.0216	0.0209	0.0205	0.0197	0.0191	0.0213	0.0208	17.7

3.2.8 再现性试验

选取 5 个芸苔素内酯肥料样品，利用高效液相色谱-电雾式检测法在 5 家单位开展实验室间比对验证试验，所得数据见表 13 所示。对肥料中芸苔素内酯检测结果进行实验室间误差综合统计。计算每个样品中待测物质的不同实验室间最大相对相差，按照相对相差由大到小排序，得出最大相对相差为 28.2%。考虑众实验室间操作人员技术水平及设备精密度差异，不同实验室测定时，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%。

表 13 芸苔素内酯再现性试验数据汇总表（电雾式检测法）

样品 编号	检验项目	检测结果/%						
		实验室 a	实验室 b	实验室 c	实验室 d	实验室 e	平均值	最大相 对相差
A	24-表芸苔素内酯	0.0172	0.0148	0.0157	0.0176	0.0183	0.0167	21.1
	28-高芸苔素内酯	0.0189	0.0167	0.0182	0.0205	0.0217	0.0192	26.0
B	24-表芸苔素内酯	0.0102	0.0082	0.0092	0.0083	0.0091	0.0090	21.7
	28-高芸苔素内酯	0.0089	0.0084	0.0082	0.0078	0.0102	0.0087	26.7

样品 编号	检验项目	检测结果/%						
		实验室 a	实验室 b	实验室 c	实验室 d	实验室 e	平均值	最大相 对相差
C	28-表高芸苔素内酯	0.0097	0.0082	0.0073	0.0077	0.0088	0.0084	28.2
D	24-表芸苔素内酯	0.0206	0.0175	0.0191	0.0198	0.0186	0.0191	16.3
	28-高芸苔素内酯	0.0223	0.0184	0.0205	0.0227	0.0228	0.0213	21.4
E	28-表高芸苔素内酯	0.0182	0.0183	0.0163	0.0174	0.0195	0.0179	17.9

3.2.9 方法比对数据

选择 4 个实际肥料样品，按照选定的试验方法进行前处理，采用高效液相色谱紫外检测法和高效液相色谱-电雾式检测法分别测定，进行方法比对试验，并对不同样品中 3 种待测物的检测结果进行比对（见表 14）并计算相对相差（ $\text{相对相差} = |A - B| / [(A + B)/2] \times 100\%$ ）。检测结果显示，两种方法的测定结果相对相差为 4.3%~16.6%，说明利用高效液相色谱-电雾式检测法和利用高效液相色谱-紫外检测法测定肥料中芸苔素内酯的含量，结果具有一致性。

表 14 方法比对数据汇总表

样品编号	检验项目	高效液相色谱-紫外检测法检验结果/%	高效液相色谱-电雾式检测法检验结果/%	相对相差/%
0320-B	24-表芸苔素内酯	0.0086	0.0094	8.9
	28-高芸苔素内酯	0.0091	0.0084	8.0
0320-C	28-表高芸苔素内酯	0.0083	0.0098	16.6
0320-D	24-表芸苔素内酯	0.0182	0.0164	10.4
	28-高芸苔素内酯	0.0191	0.0183	4.3
0320-E	28-表高芸苔素内酯	0.0182	0.0204	11.4

电喷雾检测是一种通用型高效液相色谱检测方式，通过雾化和电荷化样品颗粒实现检测；该法无需对样品衍生化即可对待测物进行检测，在一定程度上提高了检

测效率，但在基质复杂的肥料样品中，待测物可能会受到轻微干扰。相比之下，紫外检测法在定性分析时具有一定优势，其不仅可通过保留时间定性，还可利用二极管阵列检测器采集待测物的全波长扫描光谱图，通过比对浓度相当的标准溶液和待测液的光谱图，有效排除假阳性干扰。因此，检验结果有争议时，优先选择高效液相色谱-紫外检测法作为肥料中芸苔素内酯的测定方法。

3.3 预期的经济效果

国家标准《肥料中芸苔素内酯的测定 高效液相色谱法》可对肥料中 28-表高芸苔素内酯、24-表芸苔素内酯和 28-高芸苔素内酯进行准确定性和定量，完善了肥料中植物生长调节剂检测技术标准体系，将为政府部门对作为重点工业产品之一的肥料产品进行监管提供重要技术支撑；该标准的发布实施，可增强肥料产品检验机构的服务能力，促进肥料检测行业技术升级，有效提升肥料产品质量安全水平及风险预警能力，为肥料行业高质量发展提供有力技术支撑；可进一步规范肥料产品贸易市场，保障农业生产安全，具有明显的社会效益。标准实施后，将助力生产企业研发新型药肥产品，促进企业发展产生直接经济收益；检测机构将承担政府、生产企业、销售企业或个人委托的检测业务，产生事业收益；对产品质量问题产生的纠纷进行仲裁、维权的质量鉴定等服务，也将带来显著的经济效益和社会效益。

四、采用国际标准和国外先进标准的程度

编制本标准前详细查阅了国内外标准发布部门的相关信息，至标准编制之日尚未发现与计划编制标准类同或相似标准。

可在国标发布实施后，向 ISO/TC134 提案国际标准。

五、与有关的现行法律、法规和强制性国家标准的关系

本标准符合现行法律、法规和规章的要求，与其它相关标准之间不存在矛盾之处。本标准的制定会进一步推动肥料行业的规范与自律，为行业的健康发展提供必要的依据。

六、重大分歧意见的处理经过和依据

无。

七、标准性质的建议说明

本标准和方法标准，标准属性建议为推荐性标准。

八、贯彻标准的要求和措施建议

为贯彻好本标准，建议标准起草单位，及时通过行业协会网站、社交媒体平台等渠道，发布国家标准的解读文章、宣传视频，深入解读标准的编制背景、主要技术指标，使相关单位全面准确了解标准技术要求，推动标准有效实施。

九、废止现行相关标准的建议

该标准为首次制定，与现行国家标准和行业标准协调一致，不涉及标准废止建议。

十、其它应予说明的事项

无。