

中华人民共和国国家生态环境标准

HJ□□□-202□

水质 阿维菌素 B_{1a} 和阿维菌素 B_{1b} 的测定 高效液相色谱法

Water quality—Determination of Avermectin B_{1a} and Avermectin B_{1b}—High performance liquid chromatography

(征求意见稿)

202□-□□-□□发布

202□-□□实施

生态环境部 发布

目 次

前 言.....	ii
1 适用范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 方法原理.....	1
4 干扰和消除.....	1
5 试剂和材料.....	1
6 仪器和设备.....	2
7 样品.....	3
8 分析步骤.....	4
9 结果计算与表示.....	4
10 准确度.....	5
11 质量保证和质量控制.....	6
12 废物处置.....	6
13 注意事项.....	7
附录 A（资料性附录） 方法的准确度.....	8

前 言

为贯彻《中华人民共和国环境保护法》《中华人民共和国水污染防治法》，防治生态环境污染，改善生态环境质量，规范水中阿维菌素 B_{1a}和阿维菌素 B_{1b}的测定方法，制定本标准。

本标准规定了测定地表水、地下水、生活污水、工业废水和海水中阿维菌素 B_{1a}和阿维菌素 B_{1b}的高效液相色谱法。

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准首次发布。

本标准由生态环境部生态环境监测司、法规与标准司组织制订。

本标准主要起草单位：江苏省南京环境监测中心。

本标准验证单位：河北省生态环境监测中心、江苏省镇江环境监测中心、江苏省扬州环境监测中心、江苏省泰州环境监测中心、江苏省苏力环境科技有限责任公司和江苏新锐环境监测有限公司。

本标准生态环境部 202□年□□月□□日批准。

本标准自 202□年□□月□□日起实施。

本标准由生态环境部解释。

水质 阿维菌素 B_{1a} 和阿维菌素 B_{1b} 的测定 高效液相色谱法

警告：实验中使用的标准物质和有机溶剂均具有一定的毒性，试剂配制和样品前处理过程应在通风橱内进行，操作时应按要求佩戴防护器具，避免直接接触皮肤和衣物。

1 适用范围

本标准规定了测定水中阿维菌素 B_{1a} 和阿维菌素 B_{1b} 的高效液相色谱法。

本标准适用于地表水、地下水、生活污水、工业废水和海水中阿维菌素 B_{1a} 和阿维菌素 B_{1b} 的测定。

当取样体积 100 ml，定容体积 1 ml，进样体积 20 μ l 时，阿维菌素 B_{1a} 和阿维菌素 B_{1b} 的方法检出限为 0.03 μ g/L，测定下限为 0.12 μ g/L。

2 规范性引用文件

本标准引用了下列文件或其中的条款。凡是注明日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本标准。凡是未注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

GB 17378.3 海洋监测规范 第 3 部分：样品采集、贮存与运输

HJ 91.1 污水监测技术规范

HJ 91.2 地表水环境质量监测技术规范

HJ 164 地下水环境监测技术规范

HJ 442.3 近岸海域环境监测技术规范 第三部分 近岸海域水质监测

3 方法原理

水样中阿维菌素 B_{1a} 和阿维菌素 B_{1b} 经二氯甲烷和乙酸乙酯混合溶剂萃取，提取液经净化后浓缩至干，在 *N*-甲基咪唑存在下与三氟乙酸酐衍生化反应生成荧光物质，经高效液相色谱分离，用荧光检测器检测。根据保留时间定性，外标法定量。

4 干扰和消除

多环芳烃类化合物对测定有干扰，可通过净化柱消除。

5 试剂和材料

除非另有说明，分析时均使用符合国家标准和分析纯试剂，实验用水为不含目标化合物的二次蒸馏水或用纯水设备制备的水。

5.1 乙酸乙酯 (C₄H₈O₂)：色谱纯。

- 5.2 甲醇 (CH₃OH): 色谱纯。
- 5.3 二氯甲烷 (CH₂Cl₂): 色谱纯。
- 5.4 乙腈 (CH₃CN): 色谱纯。
- 5.5 盐酸 (HCl): $\rho=1.18$ g/ml, $w\in[36.0\%, 38.0\%]$ 。
- 5.6 盐酸溶液。
用盐酸 (5.5) 和水按 1:1 的体积比混合。
- 5.7 氢氧化钠 (NaOH)。
- 5.8 氢氧化钠溶液: $\rho(\text{NaOH})=0.4$ g/ml。
称取 40 g 氢氧化钠 (5.7) 溶于 100 ml 实验用水中。
- 5.9 氯化钠 (NaCl)。
在 400 °C 下烘烤 4 h, 冷却至室温, 贮于磨口玻璃瓶中密封保存。
- 5.10 无水硫酸钠 (Na₂SO₄)。
在 400 °C 下烘烤 4 h, 冷却至室温, 贮于磨口玻璃瓶中密封保存。
- 5.11 *N*-甲基咪唑 (C₄H₆N₂)。
- 5.12 三氟乙酸酐 (C₄F₆O₃)。
- 5.13 阿维菌素 B_{1a} (C₄₈H₇₂O₁₄): 纯度 \geq 98%。
- 5.14 阿维菌素 B_{1b} (C₄₇H₇₀O₁₄): 纯度 \geq 90%。
- 5.15 二氯甲烷-乙酸乙酯混合溶剂。
用二氯甲烷 (5.3) 和乙酸乙酯 (5.1) 按 3:1 的体积比混合。
- 5.16 衍生化试剂 I: 用 *N*-甲基咪唑 (5.11) 和乙腈 (5.4) 按 1:1 的体积比混合, 临用现配。
- 5.17 衍生化试剂 II: 用三氟乙酸酐 (5.12) 和乙腈 (5.4) 按 1:2 的体积比混合, 临用现配。
- 5.18 阿维菌素 B_{1a} 和阿维菌素 B_{1b} 标准贮备液: $\rho=1000$ mg/L。
准确称取 1 mg 阿维菌素 B_{1a} (5.13) 和 1 mg 阿维菌素 B_{1b} (5.14), 用乙腈 (5.4) 溶解定容至 1 ml 容量瓶, -18 °C 避光保存, 保存期 1 a。可单独配制, 也可配成混合标准贮备液或购买市售阿维菌素 B_{1a}、阿维菌素 B_{1b} 有证标准溶液, 按照产品说明书保存。
- 5.19 阿维菌素 B_{1a} 和阿维菌素 B_{1b} 标准使用液: $\rho=10.0$ mg/L。
准确移取 50 μ l 阿维菌素 B_{1a} 和阿维菌素 B_{1b} (5.18) 标准贮备液至 5 ml 容量瓶中, 用乙腈 (5.4) 稀释定容至刻度, -18 °C 避光保存, 保存期 1 a。
- 5.20 净化柱: 500 mg/6 ml, 填料为石墨化碳黑, 或其他等效净化柱。
- 5.21 滤膜: 孔径 0.45 μ m, 聚四氟乙烯或其他等效材质。

6 仪器和设备

- 6.1 采样瓶: 500 ml 具塞磨口棕色玻璃瓶。
- 6.2 高效液相色谱仪: 具荧光检测器。
- 6.3 色谱柱: 填料粒径为 5 μ m, 柱长 15 cm, 内径 4.6 mm 的 C₁₈ 反相色谱柱, 或其他等效色谱

柱。

6.4 浓缩装置：氮吹浓缩仪或其他性能相当的浓缩装置。

6.5 涡旋混合器。

6.6 分液漏斗：250 ml，玻璃材质。

6.7 离心管：尖底具塞玻璃离心管，5 ml。

6.8 一般实验室常用仪器和设备。

7 样品

7.1 样品采集和保存

按照GB 17378.3、HJ 91.1、HJ 91.2、HJ 164和HJ 442.3的相关规定采集和运输样品。使用采样瓶（6.1）采集样品，用盐酸溶液（5.6）或氢氧化钠溶液（5.8）调节pH值至5~9，于4℃以下冷藏、避光保存，4 d内完成萃取。若衍生化反应后不能及时分析，应于-18℃冷冻保存，3 d内完成分析。

每批次样品应至少采集1个全程序空白样品，将1份实验用水放入采样瓶（6.1）中，带到采样现场，与盛装样品的采样瓶同时开盖和密封，随样品一起保存运回实验室。

7.2 试样的制备

7.2.1 萃取

摇匀水样，量取100 ml（视水样实际情况，取样量可适当减少）于250 ml分液漏斗（6.6）中，加入6 g氯化钠（5.9），待氯化钠溶解后，加入20 ml二氯甲烷-乙酸乙酯混合溶剂（5.15），充分振摇，注意放气，静置分层。提取液经无水硫酸钠（5.10）脱水后收集于浓缩管中，若提取液颜色较深或有多环芳烃存在，用浓缩装置（6.4）将提取液浓缩至约2 ml，按7.2.2步骤净化。

注：海水可不加氯化钠。

7.2.2 净化

用6 ml甲醇（5.2）活化净化柱（5.20），再用6 ml二氯甲烷-乙酸乙酯混合溶剂（5.15）冲洗，弃去有机相，待净化柱（5.20）填料暴露于空气前，将样品提取液（7.2.1）转移至净化柱（5.20）上，自然流出，收集流出液，用5 ml二氯甲烷-乙酸乙酯混合溶剂（5.15）淋洗净化柱，合并所有流出液待浓缩。

7.2.3 浓缩

将7.2.1的提取液或7.2.2净化收集的溶液用浓缩装置（6.4）浓缩至1 ml左右，转移至离心管（6.7）中，再用2 ml二氯甲烷（5.3）荡洗浓缩瓶，合并全部有机相至离心管（6.7）中，60℃以下浓缩至干，待衍生化。

注：如浓缩管具塞，则提取液或净化收集的溶液可直接浓缩至干后直接衍生，无需转移至离心管。

7.2.4 衍生化

向离心管（6.7）中加入100 μl 衍生化试剂I（5.16），于涡旋混合器（6.5）上涡旋30 s，再加入150 μl 衍生化试剂II（5.17），加盖于涡旋混合器（6.5）上涡旋10 s，静置反应20 min，加入750 μl 甲醇（5.2），涡旋混合10 s，静置30 min以上，用滤膜（5.21）过滤，待测。

7.3 空白试样的制备

用实验用水代替样品，按照与试样制备（7.2）相同的步骤制备实验室空白试样。

8 分析步骤

8.1 仪器参考条件

流动相：甲醇（5.2）：水体积比 9:1 混合；柱温：40 $^{\circ}\text{C}$ ；流速：1.0 ml/min；荧光检测器：激发波长 365 nm，发射波长 475 nm；进样体积：20 μl ，可根据仪器灵敏度调整。

8.2 校准曲线的建立

移取一定量的阿维菌素 $\text{B}_{1\text{a}}$ 和阿维菌素 $\text{B}_{1\text{b}}$ 标准使用液（5.19），于离心管（6.7）中60 $^{\circ}\text{C}$ 以下浓缩至干，按照7.2.4进行衍生化，制备至少5个浓度点的标准系列，目标化合物的质量浓度分别为20.0 $\mu\text{g/L}$ 、100 $\mu\text{g/L}$ 、200 $\mu\text{g/L}$ 、500 $\mu\text{g/L}$ 和1000 $\mu\text{g/L}$ （此为参考浓度），按照仪器参考条件（8.1），由低浓度到高浓度依次进样，以目标化合物浓度为横坐标，以峰面积（或峰高）为纵坐标，建立校准曲线。

8.3 试样的测定

将制备好的试样（7.2），按照与绘制校准曲线相同的条件（8.2）测定。当试样浓度超出校准曲线浓度范围时，适当稀释后测定。

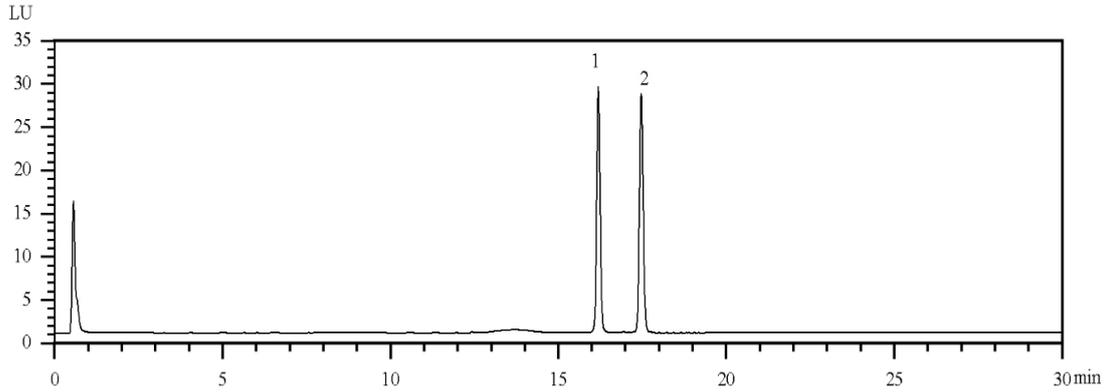
8.4 空白试样的测定

按照与试样的测定（8.3）相同的步骤，测定空白试样（7.3）。

9 结果计算与表示

9.1 目标化合物的定性

根据样品中目标化合物与校准系列中目标化合物的保留时间定性。在本标准推荐的仪器参考条件下，目标化合物的标准高效液相色谱图见图1。



1——阿维菌素B_{1b}; 2——阿维菌素B_{1a}。

图1 阿维菌素B_{1a}和阿维菌素B_{1b}标准溶液高效液相色谱图 ($\rho=100 \mu\text{g/L}$)

9.2 结果计算

根据目标化合物的峰面积（或峰高），采用外标法定量。

样品中目标化合物的质量浓度，按照公式（1）计算。

$$\rho = \frac{\rho_1 \times V_1}{V} \times D \quad (1)$$

式中： ρ ——样品中目标化合物的质量浓度， $\mu\text{g/L}$ ；

ρ_1 ——由校准曲线计算所得的目标化合物质量浓度， $\mu\text{g/L}$ ；

V_1 ——试样的定容体积，ml；

V ——取样体积，ml；

D ——试样的稀释倍数。

9.3 结果表示

测定结果最多保留3位有效数字，小数点后位数最多与方法检出限一致。

10 准确度

10.1 精密度

6家实验室对阿维菌素B_{1a}和阿维菌素B_{1b}加标浓度分别为0.20 $\mu\text{g/L}$ 、0.20 $\mu\text{g/L}$ 和1.00 $\mu\text{g/L}$ 的地表水、地下水、生活污水实际样品进行了6次重复测定，实验室内相对标准偏差范围分别为：3.9%~12%、3.6%~14%和3.6%~15%。

6家实验室对阿维菌素B_{1a}和阿维菌素B_{1b}测定浓度范围为0.02 $\mu\text{g/L}$ ~2.03 $\mu\text{g/L}$ ，加标浓度分别为2.00 $\mu\text{g/L}$ 、6.00 $\mu\text{g/L}$ 的工业废水实际样品进行了6次重复测定，实验室内相对标准偏差范围分别为：2.2%~11%、4.0%~17%。

6家实验室对阿维菌素B_{1a}和阿维菌素B_{1b}加标浓度为1.00 $\mu\text{g/L}$ 的海水统一实际样品进行了6次重复测定：实验室内相对标准偏差范围为2.0%~15%；实验室间相对标准偏差为4.1%~4.3%；重复性限为0.21 $\mu\text{g/L}$ ~0.22 $\mu\text{g/L}$ ，再现性限为0.28 $\mu\text{g/L}$ ~0.29 $\mu\text{g/L}$ 。

精密度结果参见附录 A 中表 A.1。

10.2 正确度

6 家实验室对阿维菌素 B_{1a} 和阿维菌素 B_{1b} 加标浓度分别为 0.20 μg/L、0.20 μg/L 和 1.00 μg/L 的地表水、地下水、生活污水实际样品进行了 6 次重复测定，加标回收率范围分别为：72.5%~105%、78.5%~97.0%和 69.6%~117%。

6 家实验室对阿维菌素 B_{1a} 和阿维菌素 B_{1b} 测定浓度范围为 0.02 μg/L~2.03 μg/L，加标浓度分别为 2.00 μg/L、6.00 μg/L 的工业废水实际样品进行了 6 次重复测定，加标回收率范围分别为：74.5%~99.6%、71.0%~104%。

6 家实验室对阿维菌素 B_{1a} 和阿维菌素 B_{1b} 加标浓度为 1.00 μg/L 的海水统一实际样品进行了 6 次重复测定：加标回收率为 79.6%~102%；加标回收率最终值为 88.6%±15.0%~90.2%±13.6%。

正确度结果参见附录 A 中表 A.2。

11 质量保证和质量控制

11.1 空白试验

每 20 个样品或每批次样品（少于 20 个）应至少测定 1 个实验室空白和全程序空白样品，测定结果应低于方法检出限。

11.2 校准

每批样品绘制校准曲线，校准曲线相关系数应 ≥ 0.995 ，否则应查找原因，重新绘制校准曲线。

每 20 个样品或每批次样品（少于 20 个）应测定 1 个校准曲线中间浓度点，其测定结果与校准曲线该点浓度的相对误差应在 $\pm 20\%$ 以内，否则应重新绘制校准曲线。

11.3 平行样

每 20 个样品或每批次样品（少于 20 个）应至少测定 1 个平行样。平行样测定结果的相对偏差应在 $\pm 30\%$ 以内。

11.4 基体加标

每 20 个样品或每批次样品（少于 20 个）应测定 1 个基体加标样，基体加标回收率应在 60%~130%之间。

12 废物处置

实验中产生的废物应集中收集，分类保存，并做好相应的标识，依法处置。

13 注意事项

三氟乙酸酐（5.12）容易吸水失效，开瓶后注意密闭保存。

附录 A
(资料性附录)
方法的准确度

方法的精密度和正确度汇总数据见表A.1~表A.2。

表A.1 精密度汇总表

目标化合物名称	样品类型	加标浓度 ($\mu\text{g/L}$)	实验室内 相对标准偏差 (%)	实验室间 相对标准偏差 (%)	重复性限 ($\mu\text{g/L}$)	再现性限 ($\mu\text{g/L}$)
阿维菌素 B _{1a}	地表水	0.20	4.2~11.4	//	/	/
	地下水	0.20	4.2~13.2	/	/	/
	海水	1.00	2.0~12.4	4.1	0.21	0.29
	生活污水	1.00	4.0~14.9	/	/	/
	工业废水	2.00	2.6~8.6	/	/	/
	工业废水	6.00	4.0~9.7	/	/	/
阿维菌素 B _{1b}	地表水	0.20	3.9~6.5	/	/	/
	地下水	0.20	3.6~9.9	/	/	/
	海水	1.00	2.2~14.1	4.3	0.22	0.28
	生活污水	1.00	3.6~11.5	/	/	/
	工业废水	2.00	2.2~10.6	/	/	/
	工业废水	6.00	5.5~16.4	/	/	/

表A.2 正确度汇总表

目标化合物名称	样品类型	加标浓度 ($\mu\text{g/L}$)	加标回收率范围 (%)	$S_{\bar{P}}$ (%)	$\bar{P} \pm 2S_{\bar{P}}$ (%)
阿维菌素B _{1a}	地表水	0.20	73.5~105	/	/
	地下水	0.20	78.5~97.0	/	/
	海水	1.00	79.6~101	7.5	88.6 \pm 15.0
	生活污水	1.00	75.2~117	/	/
	工业废水	2.00	81.9~99.6	/	/
	工业废水	6.00	71.0~94.8	/	/
阿维菌素B _{1b}	地表水	0.20	72.5~105	/	/
	地下水	0.20	83.5~93.7	/	/
	海水	1.00	84.9~102	6.8	90.2 \pm 13.6
	生活污水	1.00	69.6~115	/	/
	工业废水	2.00	74.5~96.9	/	/
	工业废水	6.00	86.5~104	/	/