

HJ

中华人民共和国国家生态环境标准

HJ 1364—2024

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

本电子版为正式标准文本，由生态环境部环境标准研究所审校排版。

2024-11-02 发布

2025-05-01 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	3
9 结果计算与表示	4
10 准确度	5
11 质量保证和质量控制	5
12 废物处置	6
附录 A (资料性) 方法的准确度	7

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》《中华人民共和国海洋环境保护法》，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。

本标准为首次发布。

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 2024 年 11 月 2 日批准。

本标准自 2025 年 5 月 1 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操作,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。

取样体积 100 mL,进样体积 20 μ L 时,阿维菌素 B_{1a} 和阿维菌素 B_{1b} 的方法检出限均为 0.03 μ g/L,测定下限均为 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

样品中阿维菌素 B_{1a} 和阿维菌素 B_{1b} 用二氯甲烷和乙酸乙酯混合溶剂萃取,萃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,用高效液相色谱分离,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纯水。

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): $\rho=1.18\text{ g/mL}$, $w\in[36.0\%,38.0\%]$ 。

5.6 *N*-甲基咪唑($\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2$),纯度 $\geq 99\%$ 。

5.7 三氟乙酸酐($\text{C}_4\text{F}_6\text{O}_3$),纯度 $\geq 99\%$ 。

5.8 氢氧化钠(NaOH)。

5.9 氯化钠(NaCl)。

在 $400\text{ }^\circ\text{C}$ 下烘烤4 h,冷却至室温,于磨口玻璃瓶中密封保存。

5.10 无水硫酸钠(Na_2SO_4)。

在 $400\text{ }^\circ\text{C}$ 下烘烤4 h,冷却至室温,于磨口玻璃瓶中密封保存。

5.11 盐酸溶液。

用盐酸(5.5)和水按1:1的体积比混合。

5.12 氢氧化钠溶液: $\rho(\text{NaOH})=0.4\text{ g/mL}$ 。

称取40 g 氢氧化钠(5.8)溶于100 mL 水中。

5.13 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。

5.14 衍生化试剂 I。

用*N*-甲基咪唑(5.6)和乙腈(5.4)按1:1的体积比混合,临用现配。

5.15 衍生化试剂 II。

用三氟乙酸酐(5.7)和乙腈(5.4)按1:2的体积比混合,临用现配。

5.16 阿维菌素 B_{1a} ($\text{C}_{48}\text{H}_{72}\text{O}_{14}$):纯度 $\geq 90\%$ 。

$-18\text{ }^\circ\text{C}$ 以下冷冻、密封、避光保存。

5.17 阿维菌素 B_{1b} ($\text{C}_{47}\text{H}_{70}\text{O}_{14}$):纯度 $\geq 90\%$ 。

$-18\text{ }^\circ\text{C}$ 以下冷冻、密封、避光保存。

5.18 标准贮备液: $\rho=100\text{ mg/L}$ 。

准确称取1.0 mg 阿维菌素 B_{1a} (5.16)、1.0 mg 阿维菌素 B_{1b} (5.17),用乙腈(5.4)溶解后转移至10 mL 容量瓶,乙腈(5.4)定容至标线。 $-18\text{ }^\circ\text{C}$ 以下冷冻,密封、避光保存,保存期1年。亦可购买市售阿维菌素 B_{1a} 有证标准物质或阿维菌素 B_{1b} 有证标准物质,按照产品说明书保存。

5.19 标准使用液: $\rho=10.0\text{ mg/L}$ 。

准确移取500 μL 标准贮备液(5.18)至5 mL 容量瓶中,用乙腈(5.4)稀释定容至标线, $-18\text{ }^\circ\text{C}$ 以下冷冻、密封、避光保存,保存期1年。

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 $0.45\text{ }\mu\text{m}$,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 $5\text{ }\mu\text{m}$,柱长15 cm,内径4.6 mm 的 C_{18} 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 涡旋振荡混匀器。

6.6 分液漏斗:250 mL,玻璃材质。

6.7 离心管:5 mL,尖底具塞玻璃离心管。

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(5.11)或氢氧化钠溶液(5.12)调节 pH 值至 5~9,于 4℃以下冷藏、避光保存,4 天内完成萃取。若衍生化反应后不能及时分析,于-18℃以下冷冻、密封、避光保存,3 天内完成分析。

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

摇匀样品后量取 100 mL 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(5.13),振摇、放气、静置分层。有机相萃取液经无水硫酸钠(5.10)脱水后收集于浓缩管中,用浓缩装置(6.4)将萃取液浓缩至约 2 mL,待净化。

注:海水可不加氯化钠。

7.2.2 净化

分别用 6 mL 甲醇(5.2)、6 mL 二氯甲烷-乙酸乙酯混合溶剂(5.13)活化净化柱(5.20),弃去有机相,在活化过程中应确保净化柱填料不暴露于空气中,将浓缩后的萃取液(7.2.1)转移至净化柱上,自然流出,收集流出液,用 5 mL 二氯甲烷-乙酸乙酯混合溶剂(5.13)洗脱净化柱,合并所有洗脱液待浓缩。

7.2.3 浓缩

将洗脱液(7.2.2)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-乙酸乙酯混合溶剂(5.13)荡洗浓缩管,合并全部有机相至离心管中,60℃以下浓缩至干,待衍生化。

注:如浓缩管具塞,无需将萃取液或洗脱液转移至离心管,可直接浓缩至干后,待衍生化。

7.2.4 衍生化

向离心管(7.2.3)中加入 100 μ L 衍生化试剂 I(5.14),加盖于涡旋振荡混匀器(6.5)上涡旋约 30 s,再加入 150 μ L 衍生化试剂 II(5.15),加盖涡旋约 10 s,静置 20 min 以上,加入 750 μ L 甲醇(5.2),加盖涡旋约 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)和水按体积比 9:1 混合;柱温:40℃;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 μ L。

8.2 工作曲线的建立

移取一定体积的标准使用液(5.19),包含至少 5 个非零浓度点,于离心管(6.7)中 60 °C 以下浓缩至干,按照 7.2.4 步骤衍生化,配制成阿维菌素 B_{1a} 和阿维菌素 B_{1b} 的质量浓度均分别为 20.0 μg/L、100 μg/L、200 μg/L、500 μg/L 和 1000 μg/L 的标准系列(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,建立工作曲线。

8.3 试样的测定

将制备好的试样(7.2),按照与建立工作曲线相同的条件(8.2)测定。若试样浓度超出工作曲线浓度范围,应适当减少取样体积,重新制备试样。

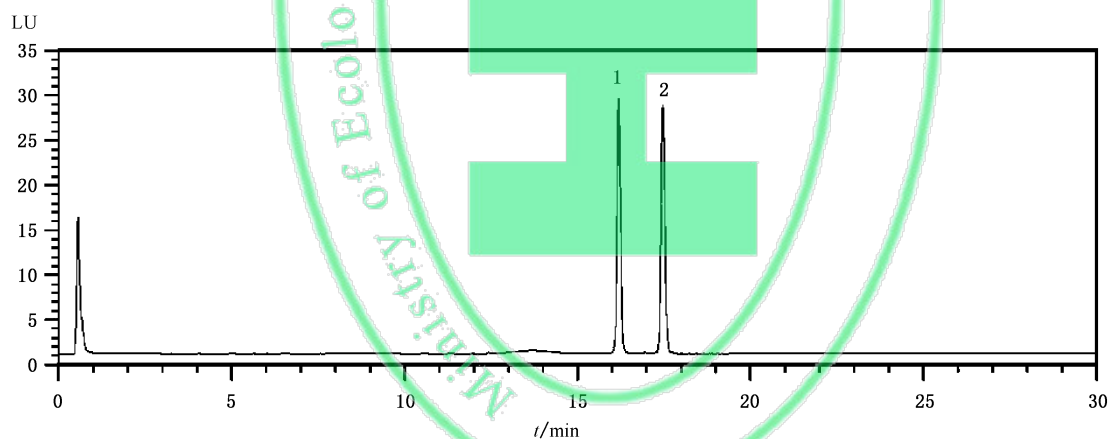
8.4 空白试样的测定

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 定性分析

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。样品分析前,建立保留时间窗 $t \pm 3S$ 。 t 为校准时各浓度级别的目标化合物保留时间均值, S 为校准时各浓度级别目标化合物保留时间的标准偏差,样品分析时,目标化合物应在保留时间窗内出峰。仪器参考条件(8.1)下,目标化合物的标准溶液衍生生物色谱图见图 1。



标引序号说明:

1——阿维菌素 B_{1b} 衍生物;

2——阿维菌素 B_{1a} 衍生物。

图 1 阿维菌素 B_{1a} 和阿维菌素 B_{1b} 标准溶液衍生生物色谱图($\rho=100 \mu\text{g/L}$)

9.2 定量分析

9.2.1 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。

$$\rho_i = \frac{\rho_{1,i} \times V_1}{V} \times D \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中：

- ρ_i ——样品中目标化合物 i 的质量浓度, $\mu\text{g/L}$;
 $\rho_{1,i}$ ——由工作曲线计算所得的目标化合物 i 质量浓度, $\mu\text{g/L}$;
 V_1 ——试样体积, mL;
 V ——取样体积, mL;
 D ——试样的稀释倍数。

9.2.2 结果表示

测定结果小数点后位数与方法检出限一致,最多保留 3 位有效数字。

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} 加标浓度均为 0.20 $\mu\text{g/L}$ 的地表水、加标浓度均为 0.20 $\mu\text{g/L}$ 的地下水、加标浓度均为 1.00 $\mu\text{g/L}$ 的生活污水非统一样品重复测定 6 次;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 $\mu\text{g/L}$ 的工业废水非统一样品加标,低浓度加标浓度均为 2.00 $\mu\text{g/L}$,高浓度加标浓度均为 6.00 $\mu\text{g/L}$,重复测定 6 次;实验室内相对标准偏差范围分别为 2.2%~11% 和 4.0%~17%。

6 家实验室对阿维菌素 B_{1a} 和阿维菌素 B_{1b} 加标浓度均为 1.00 $\mu\text{g/L}$ 的海水统一样品重复测定 6 次;实验室内相对标准偏差为 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 $\mu\text{g/L}$ 。

精密度汇总数据参见附录 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} 加标浓度均为 0.20 $\mu\text{g/L}$ 的地表水、加标浓度均为 0.20 $\mu\text{g/L}$ 的地下水、加标浓度均为 1.00 $\mu\text{g/L}$ 的生活污水非统一样品重复测定 6 次;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 $\mu\text{g/L}$ ~2.03 $\mu\text{g/L}$ 的工业废水非统一样品加标,低浓度加标浓度均为 2.00 $\mu\text{g/L}$,高浓度加标浓度均为 6.00 $\mu\text{g/L}$,重复测定 6 次;加标回收率范围分别为 74.5%~99.6% 和 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 $\mu\text{g/L}$ 的海水统一样品重复测定 6 次;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%。

正确度汇总数据参见附录 A 中表 A.2。

11 质量保证和质量控制

11.1 空白试验

全程序空白样品测定结果应低于方法检出限。每批次样品应至少测定 1 个实验室空白,测定结果应低于方法检出限。

11.2 校准

工作曲线相关系数应 ≥ 0.995 。

11.3 连续校准

每 24 h 分析 1 次工作曲线中间浓度点,测定结果与工作曲线该点理论浓度的相对误差应在 $\pm 20\%$ 以内,否则应重新建立工作曲线。

11.4 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。

11.5 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 $60\% \sim 130\%$ 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。



附 录 A
(资料性)
方法的准确度

本方法的精密度和正确度汇总数据见表 A.1 和表 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	4.2~12	—	—	—
	地下水	0.20	4.2~14	—	—	—
	海水	1.00	2.0~13	4.1	0.21	0.29
	生活污水	1.00	4.0~15	—	—	—
	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	2.2~15	4.3	0.22	0.28
	生活污水	1.00	3.6~12	—	—	—
	工业废水	2.00	2.2~11	—	—	—
	工业废水	6.00	5.5~17	—	—	—

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_p (%)	$\bar{P} \pm 2S_p$ (%)
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	—	—