

嘉賜黴素 (Kasugamycin) 農藥有效成分檢驗方法修正規定

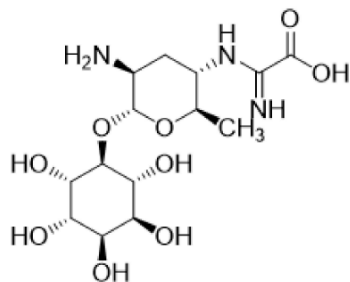
一、農藥結構及物理化學性質：

農藥有效成分1:

普通名稱：嘉賜黴素 (CIPAC No. 703)

化學名稱：1L-1,3,4/2,5,6-1-deoxy-2,3,4,5,6-pentahydroxycyclohexyl 2-amino-2,3,4,6-tetra de oxy-4-(α -iminoglycino)- α -D-arabino-hexopyranoside (IUPAC). 3-O-[2-amino-4-[(carboxyiminomethyl)amino-2,3,4,6-tetradexy- α -D-arabino-hexopyranosyl]-D-chiro-inositol.

化學結構：



分子式： $C_{14}H_{25}N_3O_9$

分子量：379.4

理化性質：

安定性：水解半衰期為 462 天 (pH 4)，630 天 (pH 5)，80 天 (pH 7)，11.4 天 (pH 11)。水中光分解半衰期為 173.3 天。

農藥有效成分2:

普通名稱：嘉賜黴素水合鹽酸鹽 (Kasugamycin hydrochloride hydrate)

化學名稱：1L-1,3,4/2,5,6-1-deoxy-2,3,4,5,6-pentahydroxycyclohexyl 2-amino-2,3,4,6-tetradexy-4-(α -iminoglycino)- α -D-arabino-hexopyranoside hydrochloride hydrate, [5-Amino-2-methyl-6-(2,3,4,5,6-pentahydroxycyclohexyloxy)tetrahydropyran-3-yl]amino- α -iminoacetic acid hydrochloride hydrate (IUPAC). 3-O-[2-Amino-4-[(carboxyiminomethyl)amino]-2,3,4,6-tetradexy- α -D-arabino-hexopyranosyl]-D-chiro-inositol hydrochloride hydrate.

分子式： $C_{14}H_{28}ClN_3O_{10}$

分子量：433.8

理化性質：

外觀：無色針狀結晶。

熔點：202-204 °C (分解)。

蒸氣壓： $<0.013\text{mPa}$ (25 °C)。

容積密度： 0.43g/cm^3 (20-25°C)。

溶解度：水 207(pH 5)，228(pH 7)，438(pH 9)。丙酮 <0.001 、甲醇 0.00276、二甲苯 <0.001 (均為 g/L, 20-25°C)。

安定性：50 °C時水解半衰期為 47 天 (pH 5)，14 天 (pH 9)。於25 °C時穩定不水解。

二、劑型：溶液 (SL)、可溼性粉劑 (WP)、超低容量液劑 (UL)、水溶性粒劑 (SG)。

三、作用：殺菌劑。

四、分析方法：(方法一)

1. 適用範圍：本方法適用於嘉賜黴素溶液、可溼性粉劑、超低容量液劑及水溶性粒劑中有效成分之定性及定量分析。

2. 檢驗方法：高效液相層析法 (High performance liquid chromatography，簡稱 HPLC)。

2.1 裝置：

2.1.1 高效液相層析儀：

2.1.1.1 檢出器：紫外光檢出器 (Ultraviolet detector，簡稱 UV)。

2.1.1.2 層析管柱：逆相層析管柱，4.6 mm × 250 mm (ID × L)，YMC Triart-C8，5 μm，或相當等級。

2.1.2 超音波振盪裝置，振盪器。

2.2 試藥：

2.2.1 標準品：嘉賜黴素 (水合鹽酸鹽)，純度經標定之分析級對照用標準品。

2.2.2 磷酸氫二鉀 (K_2HPO_4) 為試藥級。

2.2.3 去離子水 (18.0 MΩ-cm 以上，經 0.22 μm 濾膜過濾)。

2.3 器具及材料：

2.3.1 定量瓶 10 mL、25 mL、50 mL。

2.3.2 刻度吸管。

2.3.3 0.22 μm 親水性聚丙烯 (Hydrophilic polypropylene) 過濾膜。

2.4 貯存標準液 (Standard stock solution) 配製：

秤取嘉賜黴素 (水合鹽酸鹽) 25 ± 5 mg (記錄至 0.1 mg) 之已知純度分析級對照用標準品，置於 25 mL 定量瓶中，加入 20 mL 去離子水，以超音波振盪至完全溶解後 (約 5 分鐘)，回至室溫，以去離子水定容至刻度，為 1000 μg/mL 貯存標準液，再取此溶液 5 mL，置於 25 mL 定量瓶中，以去離子水定容至刻度，混合均勻，為 200 μg/mL 貯存標準液。

2.5 標準檢量線 (Standard calibration curve) 製作：

取 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 之 200 μg/mL 嘉賜黴素貯存標準液，分別置於 10 mL 定量瓶中，以去離子水稀釋定容至刻度，使成含 20、40、60、80、100 μg/mL 之嘉賜黴素操作標準液 (Working standard solution)。各操作標準液分別以 0.22 μm 親水性聚丙烯過濾膜過濾後，分別取 10 μL 注入高效液相層析儀分析之，以其濃度為 x 軸、尖峰面積為 y 軸，經迴歸分析求得標準檢量線： $y = a + bx$ ，a、b 為常數。

2.6 檢液之配製：

2.6.1 溶液：

將檢體充分混合後，分別秤取 3 重複約含嘉賜黴素 3 ± 0.3 mg (記錄至 0.1 mg) 之樣品，置於 50 mL 定量瓶中，加入 40 mL 去離子水定容至刻度，混合均勻 (最後濃度約含 60 μg/mL 嘉賜黴素)，以 0.22 μm 親水性聚丙烯過濾膜過濾之，作為檢液。

2.6.2 超低容量液劑：

將檢體充分混合後，分別秤取 3 重複約含嘉賜黴素 6 ± 0.6 mg (記錄至 0.1 mg) 之樣品，置於 100 mL 定量瓶中，加入 90 mL 去離子水，以超音波振盪 10 分鐘，回至室溫，以去離子水定容至刻度 (最後濃度約含 60 μg/mL 嘉賜黴素)，以 0.22 μm 親水性聚丙烯過濾膜過濾之，作為檢液。

2.6.3 可溼性粉劑：

將檢體充分混合後，分別秤取 3 重複約含嘉賜黴素 3 ± 0.3 mg (記錄至 0.1 mg) 之樣品，置於 30 mL 離心管中，加入 15 mL 去離子水以超音波振盪 5 分鐘，於

25°C、3000rpm下，離心5分鐘，取上層液置於50mL定量瓶中，重覆萃取3次，以去離子水定容至刻度(最後濃度約含60 µg/mL嘉賜黴素)，並分別以0.22 µm親水性聚丙烯過濾膜過濾之，作為檢液。

2.6.4 水溶性粒劑：

將檢體充分混合後，分別秤取3重複約含嘉賜黴素 20 ± 2 mg (記錄至 0.1 mg) 之樣品，置於 100 mL 定量瓶中，加入 90 mL 去離子水，以超音波振盪 10 分鐘，回至室溫，以去離子水定容至刻度，再取此溶液 3 mL 置於 10 mL 定量瓶，以去離子水定容至刻度(最後濃度約含 60 µg/mL 嘉賜黴素)，並以 0.22 µm 親水性聚丙烯過濾膜過濾之，作為檢液。

2.7 鑑別試驗及含量測定：

2.7.1 儀器操作條件：

2.7.1.1 波長：220nm。

2.7.1.2 動相：0.1M K₂HPO₄，pH 9.0 緩衝溶液。

2.7.1.3 流速：0.5 mL/min。

2.7.1.4 注入量：10 µL。

2.7.1.5 分析溫度：40°C。

2.7.2 取操作標準液及檢液各 10 µL，分別注入高效液相層析儀，就操作標準液與檢液所得尖峰之滯留時間比較鑑別之，由標準檢量線計算檢液濃度： $x = \frac{y-a}{b}$ ，式中 x 為檢液濃度、y 為檢液尖峰面積，

並依下式計算其含量：

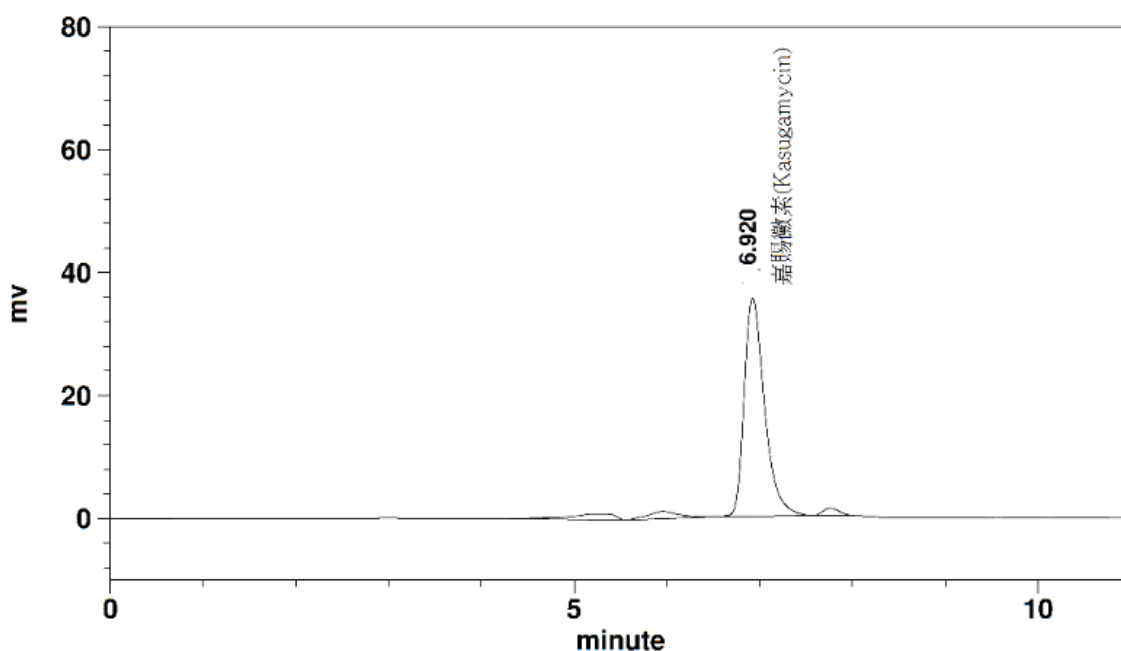
有效成分(嘉賜黴素水合鹽酸鹽)(%，w/w)

$$= \text{檢液濃度} (\mu\text{g/mL}) \times \text{稀釋體積} (\text{mL}) \times \frac{1\text{g}}{10^6 \mu\text{g}} \times \frac{1}{\text{檢體重} (\text{g})} \times 100 (\%)$$

$$\text{嘉賜黴素} (\%, \text{w/w}) = \text{嘉賜黴素(水合鹽酸鹽)含量} \times \left(\frac{379.4}{433.8} = 0.8746 \right)$$

(公式中分子為嘉賜黴素之分子量，分母為嘉賜黴素水合鹽酸鹽之分子量)

2.8 圖譜：



五、分析方法：(方法二)

1. 適用範圍：本方法適用於嘉賜銅可溼性粉劑中嘉賜黴素有效成分之定性及定量分析。

2. 檢驗方法：高效液相層析法 (High performance liquid chromatography，簡稱HPLC)。

2.1 裝置：

2.1.1 高效液相層析儀：

2.1.1.1 檢出器：紫外光檢出器。

2.1.1.2 層析管柱：逆相層析管柱，3.2 mm × 250 mm (ID × L)，Inertsil 5 μm C8，或相當等級。

2.1.2 超音波振盪裝置，振盪器。

2.2 試藥：

2.2.1 標準品：嘉賜黴素 (水合鹽酸鹽)，純度經標定之分析級對照用標準品。

2.2.2 氫甲烷 (Acetonitrile) 為 HPLC 級溶劑。

2.2.3 磷酸 (Phosphoric acid) 為分析級試藥。

2.2.4 Sodium 1-heptanesulfonate 為試藥級試藥。

2.2.5 去離子水 (18.0 MΩ-cm以上，經0.22 μm 濾膜過濾)。

2.2.6 稀釋溶劑：氫甲烷 + 去離子水 (10 + 90, v/v)。

2.3 器具及材料：

2.3.1 定量瓶 10 mL、50 mL、100 mL。

2.3.2 刻度吸管。

2.3.3 0.22 μm 親水性聚丙烯(Hydrophilic polypropylene)過濾膜。

2.4 貯存標準液配製：

秤取嘉賜黴素 (水合鹽酸鹽) 50±5 mg (記錄至 0.1 mg) 之已知純度分析級對照用標準品，置於 50 mL 定量瓶中，加入 40 mL 稀釋溶劑，振盪至完全溶解後，回至室溫以稀釋溶劑定容至刻度，相當於 1000 μg/mL 貯存標準液。

2.5 標準檢量線製作：

取 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL 之 1000 μg/mL 嘉賜黴素貯存標準液，分別置於 10 mL 定量瓶中，以稀釋溶劑稀釋並定容至刻度，使成含 50、100、150、200、250 μg/mL 之嘉賜黴素操作標準液。各操作標準液分別以 0.22 μm 親水性聚丙烯過濾膜過濾後，分別取 20 μL 注入高效液相層析儀分析之，以其濃度為 x 軸、尖峰面積為 y 軸，經迴歸分析求得標準檢量線： $y=a+bx$ ，a、b 為常數。

2.6 檢液之配製：

將檢體充分混合後，分別秤取3重複約含嘉賜黴素 15±1.5 mg (記錄至 0.1 mg) 之樣品，置於 100 mL 定量瓶中，加入稀釋溶劑定容至刻度，混合均勻 (最後濃度約含 150 μg/mL 嘉賜黴素)，並分別以 0.22 μm 親水性聚丙烯過濾膜過濾之，作為檢液。

2.7 鑑別試驗及含量測定：

2.7.1 儀器操作條件：

2.7.1.1 波長：220 nm。

2.7.1.2 動相：氫甲烷 + 0.05 M Sodium 1-heptanesulfonate 水溶液 (10 + 90, v/v)。
Sodium 1-heptanesulfonate 水溶液先以 1% 磷酸調整為 pH 5.0。

2.7.1.3 流速：0.2 mL/min。

2.7.1.4 注入量：20 μL。

2.7.1.5 分析溫度：室溫。

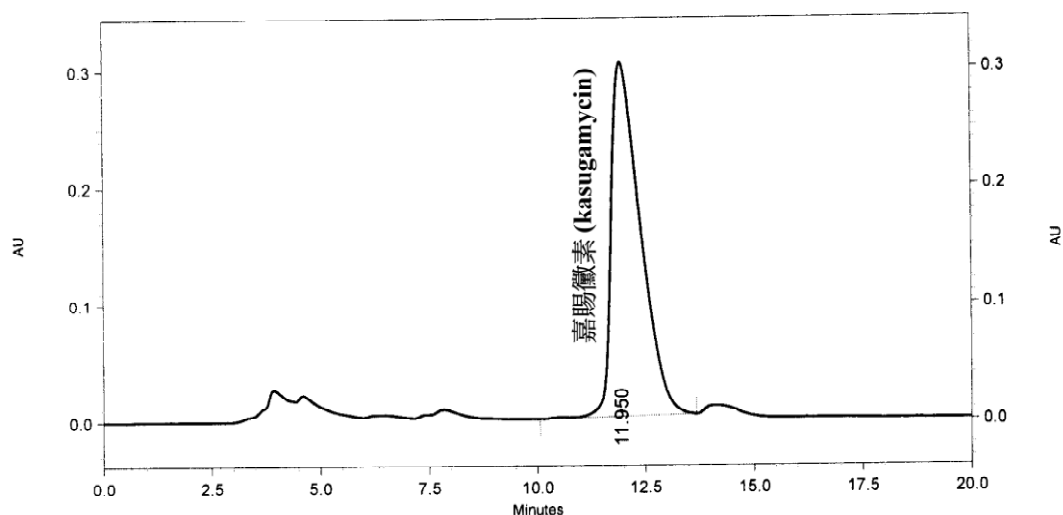
2.7.2 取操作標準液及檢液各 10 μL ，分別注入高效液相層析儀，就操作標準液與檢液所得尖峰之滯留時間比較鑑別之，由標準檢量線計算檢液濃度： $x = \frac{y-a}{b}$ ，式中 x 為檢液濃度、 y 為檢液尖峰面積，

並依下式計算其含量：

有效成分(嘉賜黴素水合鹽酸鹽，%，w/w)

$$= \text{檢液濃度 } (\mu\text{g/mL}) \times \text{稀釋體積 (mL)} \times \frac{1\text{g}}{10^6 \mu\text{g}} \times \frac{1}{\text{檢體重 (g)}} \times 100 (\%)$$

2.8 圖譜：



六、參考文獻：

1. 嘉賜黴素 (Kasugamycin) 農藥有效成分檢驗方法。行政院農業委員會動植物防疫檢疫局 96 年 10 月 11 日防檢三字第 0961484600 號公告修訂。
2. BCPC Online Pesticide Manual.
http://pmonline.azurewebsites.net/_Main/Pesticide.aspx#cplArticle_rblViewResults (擷取日期：2021/03/17)。

七、品質管制：

1. 所有品質管制數據，均需保存以便參考及檢查。
2. 配置貯存標準液(STD A)及貯存查核標準液(STD B)之標準品，其稱取量應大於 25mg，且二者之相差應不大於 0.2mg，若有不同來源或相同來源不同批號之標準品，應使用查核標準液之配製。
3. 系統平衡測試：重複連續注入操作標準液 (STD A-3)，其連續 2 次注入所得之感應因子比值，皆應介於 98~102% 之間。(感應因子 = 尖峰面積 / 濃度)
4. 標準液查核：注入查核標準液 (STD B-3)，其與系統平衡測試操作標準液 (STD A-3) 注入 1 所得之感應因子比值，應介於 98~102% 之間。
5. 感應因子比值管制：操作標準液 (STD A-3) 與查核標準液 (STD B-3) 注入所得之感應因子與系統平衡測試操作標準液 (STD A-3) 注入 1 之比值應介於 98~102% 之間，若超出範圍，則應重新注入分析。
6. 貯存標準液與標準檢量線於每次同批檢驗時，新鮮配製，且不可使用超過 3 日。
7. 檢量線之線性相關係數平方值 r^2 需達 0.999 或以上。
8. 檢量線查核：每注入 3 個檢液後，須注入查核標準液 (STD B-3) 查核檢量線，依所得之標準品尖峰面積代入檢量線計算標準液濃度，其與配製濃度之查核比值應介於 98~102% 之間，若超出範圍，則應重新配製標準液並製備檢量線。

- 9.滯留時間管制：注入之操作標準液、查核標準液及檢液，其標準品尖峰滯留時間與進行系統平衡測試注入 1 所得之滯留時間相較，其比值應介於 98 ~ 102% 之間。
- 10.每個樣品應取樣 3 重複，其分析結果相對標準差 (RSD，即 coefficient of variance) 應小於依 CIPAC 農藥成品分析方法確認指南中 Horwitz 方程式計算之可接受 RSD_r 值。例如：依 Horwitz 方程式 ($RSD_R = 2^{(1-0.5\log C)}$ ， $RSD_r = RSD_R \times 0.67$)，10% 有效成分含量之樣品可接受 RSD_r 值，計算如下：
- $$C = 0.10$$
- $$RSD_R = 2^{(1-0.5\log 0.10)} = 2.83$$
- $$RSD_r = 2.83 \times 0.67 = 1.90$$
- 11.若有查核樣品應於有效成分檢驗後重複注入分析 2 次，並注入查核標準液(STD B-3) 查核檢量線，其管制依 8. 規定。
- 12.由樣品分析結果之層析圖研判，或對分析有效成分有懷疑時，應以添加試驗、變更層析條件或其他鑑定方法加以確認。