

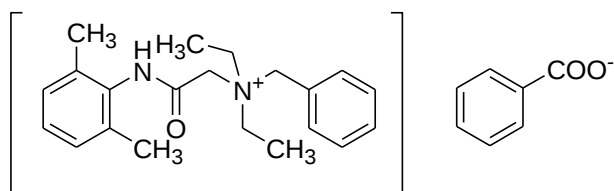
## 納乃得(Methomyl)成品農藥中苦味劑苯甲酸變性托寧 (Denatonium benzoate)檢驗方法

### 一、農藥結構及物理化學性質：

普通名稱：Denatonium benzoate (CIPAC No.845 )

化學名稱：benzyl diethyl((2,6-xylylcarbamoyl)methyl)ammonium benzoate(IUPAC)N-(2-((2,6-dimethylphenyl)amino)-oxoethyl)-N,N-diethylbenzenemethanaminium benzoate(CAS; 3734-33-6).

化學結構：



分子式： $C_{28}H_{34}N_2O_3$

分子量：446.59

理化性質：

外觀：白色顆粒狀粉體。

熔點：164.5°C。

沸點：沸騰前分解。

溶解度：水 42.4 g/L、丙酮 140g/L、苯 4.9g/L、乙醇 355g/L、乙酸乙酯 2.5g/L(20°C)。

安定性：於 20 °C(pH 7)時穩定不水解。

二、劑型：水溶性粉劑(SP)、乳劑(EC)、水懸劑(SC)、可濕性粉劑(WP)。

三、作用：苦味劑。

四、分析方法：

1. 適用範圍：本方法適用於納乃得成品農藥中苯甲酸變性托寧之定性及定量分析。
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)，InertSil ODS4，5μm 或相當等級。

2.1.2 超音波振盪裝置 (頻率 40-50 KHz)，振盪器。

#### 2.2 試藥：

2.2.1 參考物質：苯甲酸變性托寧，純度經標定之分析級對照用標準品。

2.2.2 氰甲烷 (Acetonitrile) 為 HPLC 級溶劑。

2.2.3 甲醇 (Methanol) 為 HPLC 級溶劑。

2.2.4 磷酸 (Phosphoric acid) 為試藥級。

2.2.5 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 螺旋蓋三角瓶，250mL。

2.3.3 刻度吸管。

2.3.4 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 (STD A)：

秤取約含苯甲酸變性托寧  $10 \pm 1$  mg (記錄至 0.1 mg) 之已知純度分析級對照用參考物質，置於 50 mL 定量瓶中，加入 45 mL 甲醇，以超音波振盪至完全溶解後 (約 5 分鐘)，回至室溫，以甲醇定容至刻度，為 200  $\mu\text{g/mL}$  貯存標準液。從中取 2.5mL 至 50 mL 定量瓶中以甲醇定容至刻度，為 10  $\mu\text{g/mL}$  貯存標準液。

## 2.5 標準檢量線 (Standard calibration curve) 製作(STDA-1~STDA-5)：

取 0.5、1、1.5、2、2.5 mL 之 10  $\mu\text{g/mL}$  苯甲酸變性托寧貯存標準液，分別置於 10 mL 定量瓶中，以甲醇稀釋定容至刻度，使成含 0.5、1、1.5、2、2.5  $\mu\text{g/mL}$  之苯甲酸變性托寧操作標準液 (Working standard solution)，各操作標準液以 0.22  $\mu\text{m}$  親水性聚丙烯過濾膜過濾後，分別取 10  $\mu\text{L}$  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 水溶性粉劑：

將檢體充分混合後，分別秤取 3 重複約含苯甲酸變性托寧  $0.0750 \pm 0.0075\text{mg}$  (記錄至 0.1 mg) 之樣品，置於 250 mL 螺旋蓋三角瓶中，加入 50 mL 甲醇，以超音波振盪 10 分鐘，回至室溫 (最後濃度約含 1.5  $\mu\text{g/mL}$  苯甲酸變性托寧)，並以 0.22  $\mu\text{m}$  親水性聚丙烯過濾膜過濾之，作為檢液。

### 2.6.2 乳劑：

將檢體充分混合後，分別秤取 3 重複約含苯甲酸變性托寧  $0.0750 \pm 0.0075\text{mg}$  (記錄至 0.1 mg) 之樣品，置於 50 mL 定量瓶中，加入 40 mL 甲醇，以超音波振盪 10 分鐘，回至室溫，以甲醇定容至刻度 (最後濃度約含 1.5  $\mu\text{g/mL}$  苯甲酸變性托寧)，並以 0.22  $\mu\text{m}$  親水性聚丙烯過濾膜過濾之，作為檢液。

### 2.6.3 水懸劑：

將檢體充分混合後，分別秤取 3 重複約含苯甲酸變性托寧  $0.0625 \pm 0.0062\text{mg}$  (記錄至 0.1 mg) 之樣品，置於 25 mL 定量瓶中，加入 20 mL 甲醇，以超音波振盪 20 分鐘，回至室溫，以甲醇定容至刻度，混合均勻，再取此溶液 6 mL 置於 10 mL 定量瓶，以甲醇定容至刻度，混合均勻 (最後濃度約含 1.5  $\mu\text{g/mL}$  苯甲酸變性托寧)，並以 0.22  $\mu\text{m}$  親水性聚丙烯過濾膜過濾之，作為檢液。

### 2.6.4 可濕性粉劑：

將檢體充分混合後，分別秤取 3 重複約含苯甲酸變性托寧  $0.03 \pm 0.003\text{mg}$  (記錄至 0.1 mg) 之樣品，置於 250 mL 螺旋蓋三角瓶中，加入 10 mL 甲醇，以超音波振盪 10 分鐘，回至室溫，混合均勻，再取此溶液 5 mL 置於 10 mL 定量瓶，以甲醇定容至刻度，混合均勻 (最後濃度約含 1.5  $\mu\text{g/mL}$  苯甲酸變性托寧)，並以 0.22  $\mu\text{m}$  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：210 nm。

2.7.1.2 動相：A: 氬甲烷 B: 0.1% 磷酸水溶液(v/v)

2.7.1.3 梯度條件：

| 時間 | A: 氬甲烷 | B: 0.1% 磷酸水溶液(v/v) |
|----|--------|--------------------|
| 0  | 10     | 90                 |
| 1  | 10     | 90                 |
| 20 | 100    | 0                  |
| 30 | 10     | 90                 |

2.7.1.4 流速：1.0 mL/min。

2.7.1.5 注入量：10  $\mu$ L。

2.7.1.6 分析溫度：40 $^{\circ}$ C。

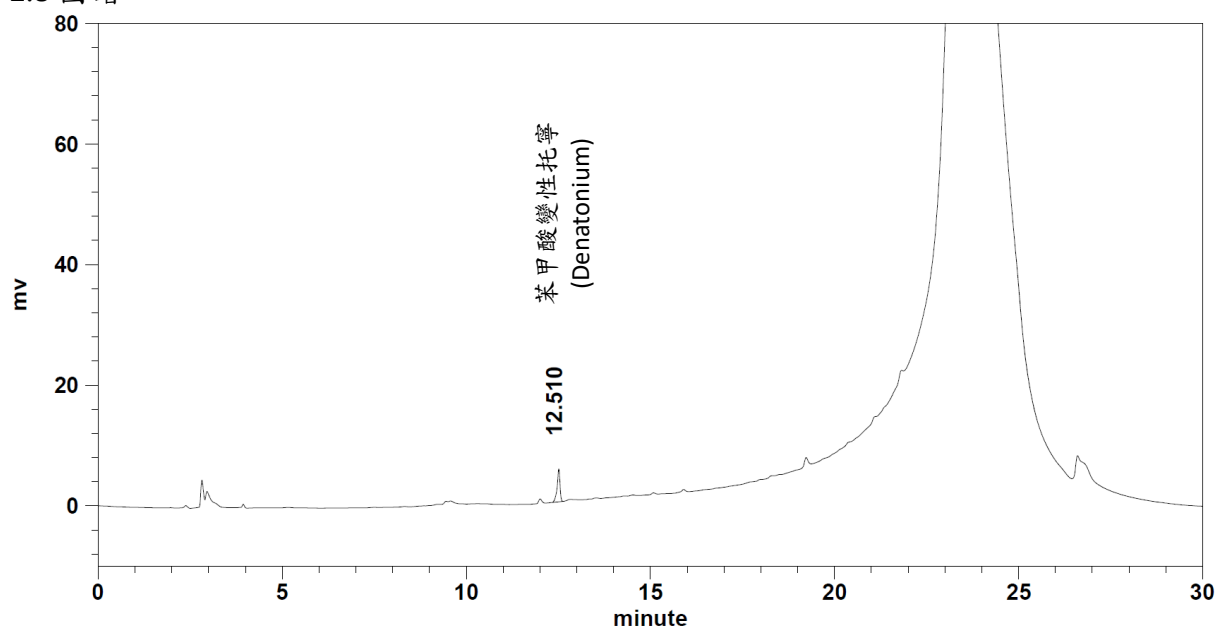
2.7.2 取操作標準液及檢液各 10  $\mu$ L，分別注入高效液相層析儀，就操作標準液與檢液所得尖峰之滯留時間比較鑑別之，由標準檢量線計算檢液濃度： $x = \frac{y-a}{b}$ ，式中 x 為檢液中苯甲酸變性托寧濃度，y 為檢液中苯甲酸變性托寧尖

峰面積，並依下式計算其含量：

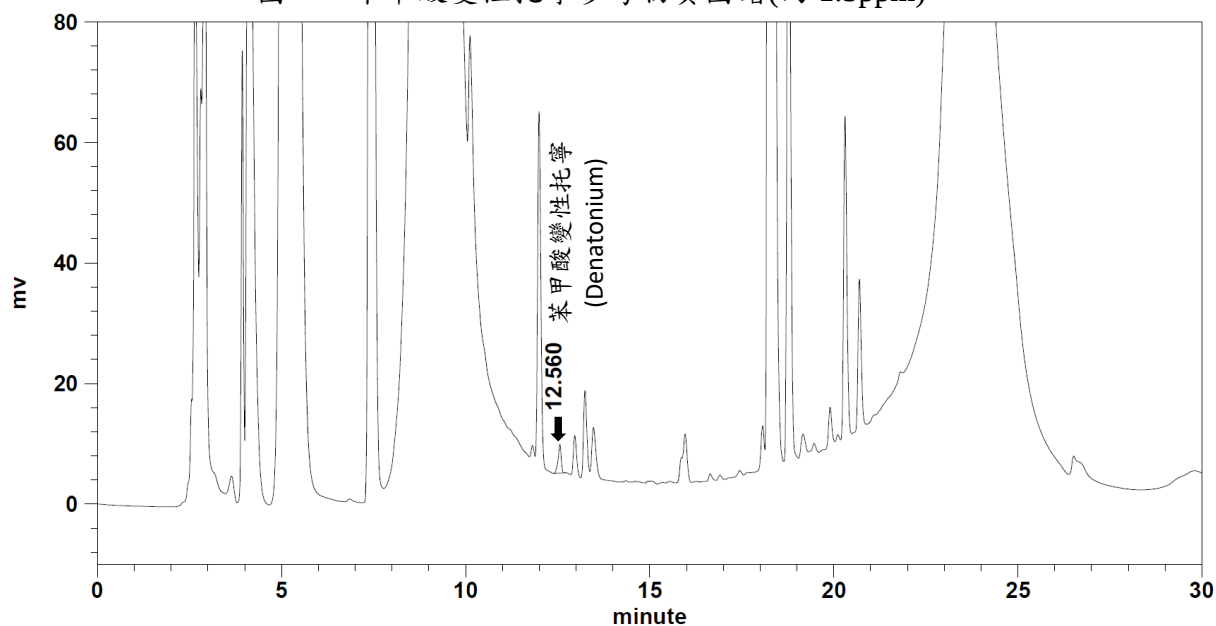
有效成分(%，w/w)

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

2.8 圖譜：



圖一、苯甲酸變性托寧參考物質圖譜(約 1.5ppm)



圖二、納乃得中苯甲酸變性托寧圖譜(約 1.5ppm)

五、參考文獻：

1. Arthur, F., and Pierre, D.M. 1995. High-performance liquid chromatographic determination of denatonium benzoate in ethanol with 5% polyvinylpyrrolidone. J. Chromatography A, 715(1995)189-194.
2. N.Muller. 2019. Reference Material Certificate of denatonium benzoate. LGC. Germany.2pp.
3. PPDB : Pesticide Properties DataBase.  
<https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/1398.htm> (擷取日期：2023/12/25)。

#### 六、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. 建議使用不同來源或相同來源不同批號之標準品做為查核標準品，配製貯存標準液 (STD A) 及貯存查核標準液 (STD B) 之標準品，其秤取量應為  $10 \pm 1$  mg，且二者之相差應不大於 0.2 mg。
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：每注入三個檢液後，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<sub>r</sub> 值。例如：依 Horwitz 方程式 ( $RSD_R = 2^{(1-0.5\log C)}$ ),  $RSD_r = RSD_R \times 0.67$ ), 0.003% 苯甲酸變性托寧含量之樣品可接受 RSD<sub>r</sub> 值，計算如下：  
 $C = 0.00003$   
 $RSD_R = 2^{(1-0.5\log 0.00003)} = 9.59$   
 $RSD_r = 9.59 \times 0.67 = 6.43$
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。