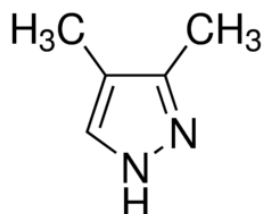
	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení hnojiv 20273.1 – Stanovení obsahu 3,4-dimethyl-1H-pyrazolu metodou HPLC a 3,4-dimethyl-1H-pyrazol fosfátu výpočtem	Vydání	1
		Revize	0

STANOVENÍ OBSAHU 3,4-DIMETHYL-1H-PYRAZOLU METODOU HPLC A 3,4-DIMETHYL-1H-PYRAZOL FOSFÁTU VÝPOČTEM

1 Rozsah a účel

Postup specifikuje podmínky pro stanovení 3,4-dimethyl-1H-pyrazol fosfátu v minerálních hnojivech obsahujících dusík, stanovovaný jako 3,4-dimethyl-1H-pyrazol



Obr. 1. 3,4-dimethyl-1H-pyrazol.

2 Princip


Vzorek hnojiva se rozpustí ve vodě a 3,4-dimethyl-1H-pyrazol se stanoví ve zředěném vodním roztoku metodou HPLC na reverzní fázi s UV detekcí.

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Voda (deionizovaná, destilovaná nebo demineralizovaná).
- 2 Acetonitril, C₂H₃N, čistota pro HPLC.
- 3 Dihydrogenfosforečnan sodný monohydrát, NaH₂PO₄ · H₂O.
- 4 3,4-dimethyl-1H-pyrazol, C₅H₈N₂ (čistota > 99 %), CAS Number 2820-37-3, Mr = 96,13.
- 5 Mobilní fáze.

Příprava: V 800 ml vody se rozpustí 1,38 g dihydrogenfosforečnanu sodného (3) a doplní se vodou na objem 1000 ml. K takto připravenému roztoku se přidá 175 ml acetonitrilu (2). Roztok se odvzdušní asi 5 min na ultrazvukové lázni při laboratorní teplotě.

	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení hnojiv 20273.1 – Stanovení obsahu 3,4-dimethyl-1H-pyrazolu metodou HPLC a 3,4-dimethyl-1H-pyrazol fosfátu výpočtem	Vydání	1
		Revize	0

6 Základní standardní roztok (ZSR) 3,4-dimethyl-1H-pyrazolu, $c = 1$ g/l.

Příprava: Do 100ml odměrné baňky se s přesností 0,1 mg naváží 0,1 g 3,4-dimethyl-1H-pyrazolu (4) a rozpustí se ve vodě (1).

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s UV detekcí.
- 2 Analytické váhy s přesností 0,1 mg.
- 3 Ultrazvuková lázeň.
- 4 Automatická pipeta v potřebném rozsahu.
- 5 Membránový filtr 0,45 μm , teflonový.

5 Pracovní postup

Příprava kalibračních roztoků

Do 25ml odměrných baněk se pipetuje ZSR (6) podle tabulky č. 1, doplní se po značku vodou (1) a důkladně se promíchá.


Tabulka č. 1. Příprava kalibračních roztoků pro 3,4-dimethyl-1H-pyrazol.

Kalibrační bod	Objem základního standardního roztoku (6) (ml)	$c(3,4\text{-dimethyl-1H-pyrazolu})$ (mg/l)
1	0,05	2,0
2	1	20,0
3	3	60,0
4	5	100,0

Kalibrační roztoky se postupně dávkuje na chromatografickou kolonu. Z hodnot ploch píků, odpovídajících jednotlivým kalibračním roztokům, se sestrojí kalibrační křivka.

Příprava extraktu vzorku

Do 500ml odměrné baňky se naváží asi 15 g zhomogenizovaného vzorku s přesností 0,1 mg. Přidá se asi 450 ml vody (1), vzorek se rozpouští 15 min v ultrazvukové lázni při laboratorní teplotě a poté doplní po značku vodou (1). Vzorek se vhodně zředí vodou (1) tak, aby byl předpokládáný

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení hnojiv 20273.1 – Stanovení obsahu 3,4-dimethyl-1H-pyrazolu metodou HPLC a 3,4-dimethyl-1H-pyrazol fosfátu výpočtem	Vydání	1
		Revize	0

obsah 3,4-dimethyl-1H-pyrazolu v rozsahu kalibrační křivky (3 – 100) mg/l. Před nástřikem na kolonu se vzorek přefiltruje přes membránový filtr 0,45 µm.

Chromatografické podmínky HPLC stanovení

Kalibrační roztoky i extrakty zkušebních vzorků se měří za separačních podmínek chromatografického systému, které jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2. Chromatografické podmínky HPLC stanovení.

Kolona	ASCENTIS C18, 4,6 × 150 mm, 5µm nebo obdobná
Mobilní fáze	(5)
Průtok	1,5 ml/min
Teplota kolony a autosampleru	laboratorní
Objem nástřiku	10 µl
Retenční čas	3 min
Doba analýzy	12 min
Detekce	UV detektor, vlnová délka 224 nm

Uvedené podmínky jsou doporučené, mohou být použity i jiné podmínky, za předpokladu, že poskytnou rovnocenné výsledky.

6 Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah 3,4-dimethyl-1H-pyrazolu ve vzorku, vyjádřený hmotnostním zlomkem v mg/kg (W_{DMP}) se vypočte podle vztahu

$$W_{DMP} = c \times V \times V_1 / m \times a_1$$

kde


c je koncentrace 3,4-dimethyl-1H-pyrazolu v měřeném roztoku vzorku (mg/l),

V celkový objem extraktu (ml),

m hmotnost navážky vzorku (g),

V_1 celkový objem extraktu po naředění (ml),

a_1 alikvotní objem extraktu použitý k ředění (ml).

	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení hnojiv 20273.1 – Stanovení obsahu 3,4-dimethyl-1H- pyrazolu metodou HPLC a 3,4-dimethyl-1H-pyrazol fosfátu výpočtem	Vydání	1
		Revize	0

Obsah 3,4-dimethyl-1H-pyrazol fosfátu ve vzorku, vyjádřený hmotnostním zlomkem v mg/kg (W_{DMPP}) se vypočte podle vztahu

$$W_{DMPP} = W_{DMP} \times 194,2/96,1$$

kde $M_r(DMPP) = 194,2$

$M_r(DMP) = 96,1$

7 Literatura

- 1 EN 16328:2013 Hnojiva - Stanovení 3,4-dimethyl-1H-pyrazol fosfátu (DMPP) - Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie.