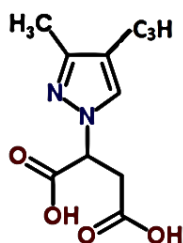
 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení hnojiv 20274.1 – Stanovení obsahu 2-(3,4-dimethyl-1H-pyrazol-1-yl) kyseliny jantarové (DMPSA) metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	0

STANOVENÍ OBSAHU 2-(3,4-DIMETHYL-1H-PYRAZOL-1-YL) KYSELINY JANTAROVÉ (DMPSA) METODOU HPLC

1 Rozsah a účel

Postup specifikuje podmínky pro stanovení 2-(3,4-dimethyl-1H-pyrazol-1-yl) kyseliny jantarové (DMPSA) v hnojivech.



Obrázek č. 1. DMPSA.

2 Princip


Vzorek hnojiva se rozpustí nebo extrahuje vodou. DMPSA se stanoví ve vhodně zředěném vodném roztoku metodou RP-HPLC s UV detekcí.

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Voda, čistota HPLC.
- 2 Acetonitril, čistota HPLC.
- 3 Kyselina fosforečná, p.a. 85%.
- 4 DMPSA, C₉H₁₂N₂O₄, M_r = 212,205, CAS-Nr. 940-877-5 (čistota > 99%).
- 5 Mobilní fáze.

Příprava: Do odměrné baňky se převede 500 ml vody (1), 100 ml acetonitrilu (2) a 1 ml kyseliny fosforečné (3). Objem baňky se doplní vodou (1) po značku. Roztok se odvzdušní na ultrazvukové lázni.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení hnojiv 20274.1 – Stanovení obsahu 2-(3,4-dimethyl-1H-pyrazol-1-yl) kyseliny jantarové (DMPSA) metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	0

6 Základní standardní roztok (ZSR) DMPSA, $c(\text{DMPSA}) = 100 \text{ mg/l}$.

Příprava: Do navažovací lodičky se s přesností 0,1 mg naváží 100 mg DMPSA (4). Navážka se kvantitativně převede do 1000ml odměrné baňky, krouživým pohybem se rozpustí ve vodě (1) a poté se doplní vodou (1) na objem 1000 ml. Roztok se připravuje vždy čerstvý.

4 Přístroje a pomůcky

- 1 HPLC zařízení pro práci v izokratickém režimu a UV detektorem.
- 2 Analytické váhy s přesností 0,1 mg.
- 3 Automatická pipeta v potřebném rozsahu.
- 4 Membránový filtr 0,45 μm .
- 5 Magnetická míchačka.
- 6 Filtrační jednotka s membránovým filtrem 0,45 μm nebo obdobným.
- 7 RP-HPLC separační kolona, Phenomenex, LUNA C18; 5 μm ; (250 \times 4,6) mm nebo podobná.

5 Pracovní postup


Příprava kalibračních roztoků

Do 100ml odměrných baněk se pipetuje ZSR (6) podle tabulky č. 1, doplní se po značku vodou (1) a důkladně se promíchá. Roztoky se připravují vždy čerstvé.

Tabulka č. 1. Příprava kalibračních roztoků pro DMPSA.

Kalibrační bod	Objem základního standardního roztoku (6) (ml)	$c(\text{DMPSA})$ (mg/l)
1	5	5
2	10	10
3	25	25
4	50	50

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

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení hnojiv 20274.1 – Stanovení obsahu 2-(3,4-dimethyl-1H-pyrazol-1-yl) kyseliny jantarové (DMPSA) metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	0

Příprava extraktu

Do 1000ml odměrné baňky se naváží asi 30 g zhomogenizovaného vzorku s přesností 0,1 mg. Přidá se asi 900 ml vody (1), vzorek se rozpouští na magnetické míchačce při laboratorní teplotě a poté doplní po značku vodou (1). Část extraktu se přefiltruje přes skládaný papírový filtr do vhodné skleněné nádoby. Vzorek se vhodně zředí vodou (1) tak, aby byl předpokládaný obsah DMPSA v rozsahu kalibrační křivky (5 – 50) mg/l. Před nástřikem na kolonu se vzorek ještě přefiltruje přes membránový filtr 0,45µm.

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 – příklad nastavení.


Kolona	C18, (4,6 × 250) mm, 5 µm nebo obdobná
Mobilní fáze	(5)
Průtok	1,0 ml/min
Teplota	laboratorní
Objem nástřiku	20 µl
Retenční čas	20 min
Doba analýzy	27 min
Detekce	UV detektor, vlnová délka 232 nm

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

6 Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah 2-(3,4-dimethyl-1H-pyrazolu-1-yl) kyseliny jantarové (DMPSA) ve vzorku, vyjádřený hmotnostním zlomkem v mg/kg (W_{DMPSA}) se vypočte podle vztahu

$$W_{DMPSA} = c \times V \times V_1/m \times a_1 \text{ (mg/kg)},$$

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení hnojiv 20274.1 – Stanovení obsahu 2-(3,4-dimethyl-1H-pyrazol-1-yl) kyseliny jantarové (DMPSA) metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	0

kde

c je koncentrace 2-(3,4-dimethyl-1H-pyrazolu-1-yl) kyseliny jantarové v měřeném roztoku vzorku (mg/l),

V celkový objem extraktu (ml),

m hmotnost navážky vzorku (g),

V₁ celkový objem extraktu po naředění (ml),

a₁ alikvotní objem extraktu použitý k ředění (ml).

Poznámky

1 *DMPSA existuje ve dvou izomerech, které mají fixní poměr. Oba izomery jsou stanoveny touto metodou a ve výpočtu se vyhodnocuje suma ploch obou chromatografických píků.*

7 Literatura

1 EN 17090:2018 Fertilizers - Determination of nitrification inhibitor DMPSA in fertilizers - Method using high-performance liquid chromatography (HPLC).