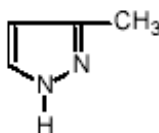
	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení hnojiv	Vydání	2
	20270.1 – Stanovení obsahu 3-methylpyrazolu metodou HPLC	Revize	0

STANOVENÍ OBSAHU 3-METHYLPYRAZOLU METODOU HPLC

1 Rozsah a účel

Postup specifikuje podmínky pro stanovení 3-methylpyrazolu v hnojivech, zejména v močovíně a přípravcích s obsahem močoviny.



2 Princip

Vzorek hnojiva se rozpustí ve vodě a 3-methylpyrazol se stanoví metodou HPLC na reverzní fázi s UV detekcí.

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

1 Destilovaná nebo deionizovaná voda.

2 Acetonitril, čistota HPLC.

3 Mobilní fáze.

Příprava: Smíchá se 800 ml vody (1) a 200 ml acetonitrilu (2).

4 3-methylpyrazol ($C_4H_6N_2$, $M_r = 82,11$ g/mol), standardní látka.

5 Základní standardní roztok 3-methylpyrazolu, $c(3\text{-methylpyrazol}) = 1$ g/l.


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

6 Pracovní standardní roztok 3-methylpyrazolu, $c(3\text{-methylpyrazol}) = 100$ mg/l.

Příprava: Do 50ml odměrné baňky se pipetuje 5 ml základního standardního roztoku 3-methylpyrazolu (5), doplní se vodou (1) po značku a promíchá.

4 Přístroje a pomůcky

1 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s UV detekcí.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení hnojiv	Vydání	2
	20270.1 – Stanovení obsahu 3-methylpyrazolu metodou HPLC	Revize	0

- 2 Analytické váhy s přesností 0,1 mg.
- 3 Ultrazvuková lázeň.
- 4 Automatická pipeta, rozsah (0,1 – 5,0) ml.
- 5 Membránový filtr 0,45 µm.

5 Pracovní postup

Příprava kalibračních roztoků

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

Tabulka č. 1. Příprava kalibračních roztoků pro metylpyrazol.

Kalibrační bod	Objem pracovního standardního roztoku (6) (ml)	c(3-methylpyrazol) (mg/l)
0	0	0
1	0,25	1
2	0,5	2
3	1,25	5
4	2,5	10
5	5	20

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


Příprava extraktu

Do 100ml odměrné baňky se naváží asi 5 g zhomogenizovaného vzorku s přesností 0,1 mg. Přidá se asi 80 ml vody, vzorek se rozpustí v ultrazvukové lázni a doplní po značku vodou (1). Vzorek se zředí tak, aby byl předpokládán obsah 3-methylpyrazolu (5 – 10) mg/l.

V každé sérii se provádí stanovení vhodného kontrolního vzorku (IRM nebo duplicitní vzorek).

Poznámky

- 1 Před nástřikem na kolonu je vhodné vzorek přefiltrovat přes membránový filtr 0,45 µm.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení hnojiv	Vydání	2
	20270.1 – Stanovení obsahu 3-methylpyrazolu metodou HPLC	Revize	0

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	SYMMETRY SHIELD TM RP 8, 5μm, (150 × 3,9) mm, fy Waters nebo obdobná
Mobilní fáze	(3)
Průtok	1,0 ml/min
Teplota	Laboratorní
Objem nástřiku	20 μl
Retenční čas	3 min
Doba analýzy	7 min
Detekce	UV detektor, vlnová délka 214 nm

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

6 Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah 3-methylpyrazolu ve vzorku, vyjádřený hmotnostním zlomkem v mg/kg (w) se vypočte podle vztahu

$$w = \frac{c \times V \times V_1}{m \times a_1} \quad (\text{mg/kg})$$

- c koncentrace 3-methylpyrazolu 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).

7 Literatura

- 1 EN 15905:2010 Hnojiva - Stanovení 3-methylpyrazolu (MP) metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie.