STANOVENÍ OBSAHU STIMULÁTORŮ RŮSTU – o-NITROFENOL, p-NITROFENOL, 5-NITROGUAJAKOL METODOU HPLC

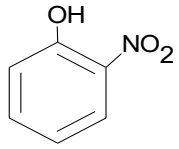
1 Rozsah a účel

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení nitrofenolů a guajakolu v hnojivech.

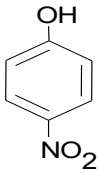
Poznámky

1 Nitrofenoly a guajakol se používají jako stimulátory růstu rostlin. Spolu s těmito látkami se vyskytují i doprovodné nečistoty 2,4-dinitrofenol, 2,6-dinitrofenol a 3-nitroguajakol, které je možno touto metodou také stanovit.

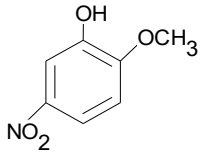
o–nitrofenol, $C_6H_5NO_3$



p-nitrofenol, $C_6H_5NO_3$



5-nitroguajakol, $C_7H_7NO_4$



2 Princip

Vzorek hnojiva se extrahuje roztokem okyseleného methanolu a stimulátory se v extraktu stanoví metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi C 18 s UV detekcí při vlnové délce 345 nm.

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

1 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).

2 Metanol, čistoty HPLC.

3 Kyselina fosforečná, H_3PO_4, 85 %, $\rho(H_3PO_4)$ = 1,71 kg/l.

4 Kyselina fosforečná, roztok $c(H_3PO_4)$ = 0,2 % (V/V).

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky s asi 500 ml vody (1) se přidá 1,4 ml koncentrované kyseliny fosforečné (3). Baňka se doplní vodou (1) po značku a promíchá.

5 Diisopropyleter.

6 Hydroxid sodný, NaOH.

7 Hydroxid sodný, roztok c(NaOH) = 0,1 mol/l.

Příprava: Do 50ml kádinky se naváží 0,4 g hydroxidu sodného (6), rozpustí se ve 20 ml vody (1) a po vytemperování se kvantitativně převede do 100ml odměrné baňky, doplní se vodou (1) po značku a promíchá.

8 Mobilní fáze.

Příprava: V 1000ml odměrné baňce se postupně smísí 260 ml metanolu (2), 230 ml roztoku kyseliny fosforečné (4) a 10ml diisopropyleteru (5). pH mobilní fáze se upraví pomocí roztoku hydroxidu sodného (7) na hodnotu 2,82.

9 2-nitrofenol (orto-nitrofenol; 1-hydroxy-2-nitrobenzen; M_r = 139,11; $C_6H_5NO_3$), standardní látka, CAS 88-75-5.

10 4-nitrofenol (para-nitrofenol; 1-hydroxy-4-nitrobenzen; M_r = 139,11; $C_6H_5NO_3$), standardní látka, CAS 100-02-7.

11 5-nitroguajakol (2-methoxy-5-nitrofenol; 2-methoxy-1-hydroxy-5-nitrobenzen; M_r = 169,13; $C_7H_7NO_4$), standardní látka, CAS 636-93-1.

12 Základní směsný standardní roztok.

Příprava: Do 50ml odměrné baňky se s přesností 0,1 mg odváží 60,0 mg 2-nitrofenolu (9), 90,0 mg 4-nitrofenolu (10) a 30,0 mg 5-nitroguajakolu (11) a po rozpuštění v metanolu (2), se doplní metanolem (2) po značku.

Takto připravený základní směsný standardní roztok obsahuje 1,2 g/l 2-nitrofenolu, 1,8 g/l 4-nitrofenolu a 0,6 g/l 5-nitroguajakolu.

Poznámky

2 Pokud se budou stanovovat i doprovodné nečistoty (2,4-dinitrofenol, 2,6-dinitrofenol a 3-nitroguajakol, připraví se jejich základní směsné roztoky s obsahem 1,0 g/l).

4 Přístroje a pomůcky

1 Analytické váhy s přesností 0,1 mg.

2 Analytické váhy s přesností 0,001 g.

3 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s UV detekcí.

4 Automatická pipeta, rozsah (0,1 – 5,0) ml.

5 Membránový filtr 0,45 μm.

5 Pracovní postup

Kalibrace

Do 50ml odměrných baněk se pipetuje základní směsný standardní roztok (12) podle tabulky č. 1., doplní se po značku mobilní fází (8) a důkladně se promíchá.

Tabulka č. 1. Příprava kalibračních roztoků.

Kalibrační bod	Objem směsného základního standardního roztoku (12) (ml)	*c* 2-nitrofenol (mg/l)	*c* 4-nitrofenol (mg/l)	*c* 5-nitroguajakol (mg/l)	*c* nečistoty (mg/l)
0	0	0	0	0	0
1	1,0	24,0	36,0	12,0	2,0
2	2,5	60,0	90,0	30,0	5,0
3	5,0	120,0	180,0	60,0	10,0

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

Příprava extraktu

Do 50ml odměrné baňky se naváží asi (1,5 −15) g zhomogenizovaného vzorku s přesností 0,1 mg a doplní se po značku mobilní fází (8). Takto připravený extrakt, popř. po naředění, se přefiltruje přes membránový filtr 0,45 μm nebo odstředí a použije k nástřiku na chromatografickou kolonu.

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

Chromatografické podmínky HPLC stanovení

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

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

Tabulka č. 2. Chromatografické podmínky HPLC stanovení.

Kolona	Symmetry Shield RP 18, (250 × 4,6) mm, 5µm, fy Waters nebo obdobná
Mobilní fáze	(8)
Průtok	0,8 ml/min
Teplota	Laboratorní
UV-detektor	345 nm
Objem nástřiku	10 µl
Retenční časy	9,30 min – 5-nitroguajakol
	12,0 min – 4-nitrofenol
	13,5 min – 2-nitrofenol
Run time	20 min

Poznámky

3 Tímto postupem je možné současně stanovit i nečistoty 2,4-dinitrofenol, 2,6- dinitrofenol a 3-nitroguajakol.

6 Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah jednotlivých stimulátorů 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 stimulátoru 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).

Nitrofenoly se vyjadřují jako sodné nebo draselné soli. Vypočtenou hodnotu je nutné násobit faktorem pro přepočet na sodnou, případně draselnou sůl, viz tabulka č. 3.

Tabulka č. 3. Přepočet na sodné a draselné soli.

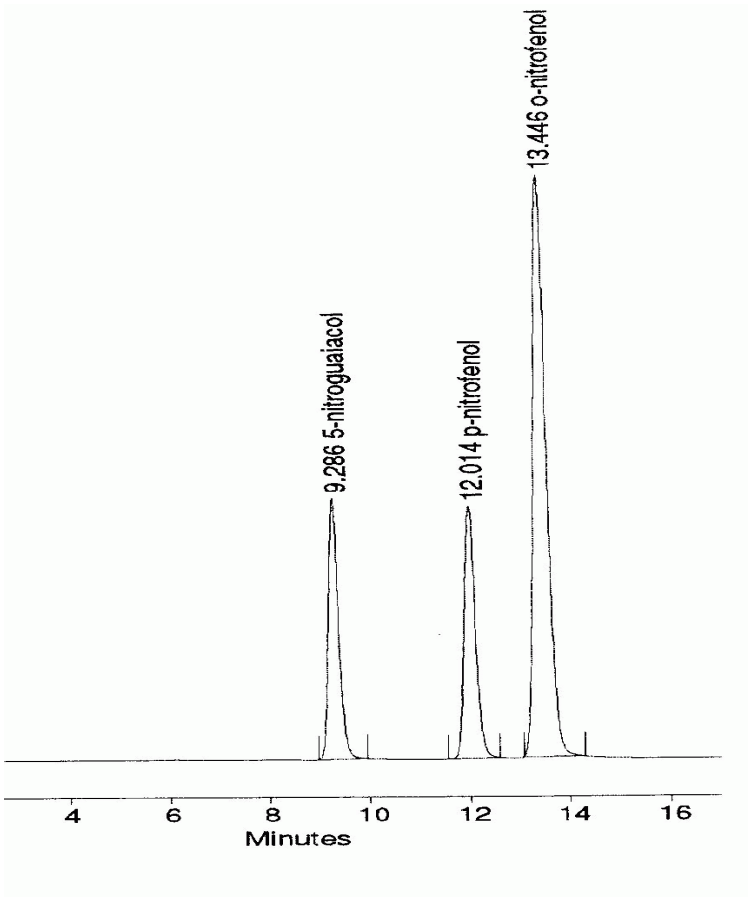
Přepočítávací faktor pro Na^+	Přepočítávací faktor pro K^+	Analyt
1,16	1,27	2-nitrofenol, 4-nitrofenol
1,13	1,23	3-nitroguajakol, 5-nitroguajakol
1,11	1,21	2,4-dinitrofenol, 2,6-dinitrofenol

7 Literatura

1 Podniková norma pro výrobu přípravku Atonic, Zdeněk Peza, Uherské Hradiště.

2 Podniková norma ASAHI CHEMICAL MFG.CO.LTD., Ikomagun Nara, Japonsko.

3 BULLETIN 2003, ročník VII. číslo 2/2003, Stanovení obsahu stimulátorů růstu v hnojivech (část III) VÚ A2-2002.

4 Dudíková, L.: Závěrečná zpráva vývojového úkolu VÚ A2-2002.

Obrázek č. 1. Ukázka chromatogramu.