CH 6.4.
Stanovenie tylozínu A v premixoch a kŕmnych zmesiach metódou HPLC

1.Určenie metódy

Metóda je vhodná na stanovenie tylozínu A vo vzorkách krmív.

2. Princíp metódy

Vzorky sa po homogenizácii a extrakcii extrakčnou zmesou analyzujú HPLC metódou na RP-C18 kolónach a detegujú sa DAD detektorom pri 290 nm. Nasnímané spektrá v intervale 250 – 340 nm sa porovnávajú s kalibračnými spektrami.

3.Prístroje a pomôcky

- ultrazvukový kúpeľ
- analytické váhy
- pH meter
- trepačka
- kvapalinový chromatograf s DAD detektorom
- kolóna Nova-Pak® C18, 3,9 x150 mm, Waters, alebo ekvivalentný typ kolóny
- automatické pipety s nastaviteľným objemom, jednokanálové
- filtračný papier
- striekačkové filtre
- mraznička
- chladnička

3. Chemikálie a roztoky

- metanol pre HPLC
- metanol p.a.
- acetonitril pre HPLC
- redestilovaná voda pre HPLC
- chloristan sodný, p.a
- dihydrogénfosforečnan drasený
- hydroxid sodný
- kyselina chlorovodíková, p.a.
- štandard: Tylosin A tartrat

Fosfátový pufor : pH 6,0 KH_2PO_4 , NaOH
Extrakčná zmes: fosfátového pufra pH 6,0 metanol
2M roztok chloristanu sodného
Mobilná fáza: 2M $NaClO_4$,acetonitrilu

4. Pracovný postup

- krmivo, s výnimkou premixov, tesne pred navažovaním dobre premiešať, pomlieť a znovu dobre premiešať, premixy dobre premiešať
- s presnosťou na 1 mg navážiť 2,5 g kŕmnej zmesi, resp. 50 mg premixu, do 100ml odmernej banky (v závislosti od reálnej vzorky môže byť navážka väčšia)
- pridať 50, resp. 25 ml extrakčnej zmesi , sonikovať v ultrazvukovom kúpeli 5 minút
- trepať zakryté na trepačke 60 min
- doplniť extrakčnou zmesou po značku
- prefiltrovať cez papierový filter, prvé podiely vyliať
- prefiltrovanú vzorku prečistiť cez striekačkový membránový filter
- aplikovať vzorku na HPLC meranie

5. Podmienky merania

Kolóna:	Nova-Pak C_{18}, 150 x 3,9 mm, 4 µm
Mobilná fáza :	$NaClO_4$, acetonitrilu
Prietok mobilnej fázy :	1,3 ml/min
Detekcia	DAD pri 290 nm (290/16, 500/100), snímanie spektier: 250 – 340 nm
Objem nástreku :	20 µl
Teplota kolóny:	35°C

6. Literatúra

SOP L 40, Biofaktory Praha, spol. s r.o.