

Obsah

1. Odběr a příprava vzorku krmiva	3
2. Úprava vzorku a extraktu	19
3. Vývoj a validace metod	39
Vitaminy rozpustné v tucích	53
4. Vitamin A a karotenoidy	53
5. Vitamin E	87
6. Vitamin D	105
7. Vitamin K	124
Vitaminy rozpustné ve vodě	138
8. Vitamin B ₁ (Thiamin)	138
9. Vitamin B ₂ (Riboflavin)	150
10. Vitamin B ₆ (Pyridoxin)	161
11. Vitamin B ₁₂	172
12. Vitamin C	182
13. Kyselina listová	199
14. Niacin	207
15. Kyselina D-pantothenová	217
16. Cholin	223
17. Biotin	227
Antikocidiostatika	235
18. Amprolium	235
19. Ethopabát	240
20. Meticlorpindol	244
21. Methylbenzochát	248
22. Robenidin	252
23. Nikarbazin	257
24. Polyetherová antibiotika	262
25. Halofuginon	284
26. Diclazuril	288
27. Decoquinat	291
28. Avilamycin	294

Stimulátory růstu	300
29. Carbadox	300
30. Olachindox	304
31. Virginiamycin	308
32. Avoparcin	315
33. Flavomycin	318
34. Tylosin	321
35. Tiamulin	325
36. Bacitracin	328
Chemoterapeutika	332
37. Dimetridazol	332
38. Nifursol	338
Antibaktericidní přípravky	342
39. Sulfonamidy	342
40. Tetracyklinová antibiotika	355
β-Laktamová antibiotika	370
41. Amoxicillin	370
Seznam symbolů a zkratek	374

9 Vitamin B₂ (Riboflavin)

Obsah

9.1 Vlastnosti	150
9.1.1 Obecné vlastnosti.....	150
9.1.2 Stabilita riboflavinu a reakce	151
9.1.3 Spektrální vlastnosti	152
9.2 Stanovení vitaminu B₂	154
9.2.1 Extrakce.....	154
9.2.2 Fluorimetrické metody	155
9.2.3 HPLC metody.....	155
9.2.4 Ostatní metody stanovení	157
9.3 Pracovní postup stanovení vitaminu B₂	158
9.3.1 Extrakce pro farmaceutické preparáty.....	158
9.3.2 Extrakce pro potraviny a krmiva	158
9.3.3 HPLC podmínky	158
Literatura	159

9.1 Vlastnosti

9.1.1 Obecné vlastnosti

Základem struktury riboflavinu (dříve též laktoflavin, ovoflavin, uroflavin nebo vitamin G) je isoalloxazonové jádro, na které je v poloze N-10 vázán ribitol (alditol odvozený od D-ribosy). Riboflavin, 7,8-dimethyl-10-(1'-D-ribityl)isoalloxazin [CAS=83-88-5] (9.I), sumárního vzorce C₁₇H₂₀N₄O₆ a molekulové hmotnosti 376,4 g/mol se vyskytuje také ve formě riboflavin-5'-fosfátu (flavinmononukleotid, FMN), který vzniká fosforylací na pozici 5' a adicí adenosin-5'-monofosfátu vzniká flavinadenindinukleotid (FAD). Tyto látky jsou kofaktory enzymů známých jako flavoproteiny. Vazba rybytylu pře dusíkový atom na flavinový kruh je stabilní v kyselém prostředí, FMN a FAD se hydrolyzují při pH<5 na riboflavin.⁴

Riboflavin tvoří jasně žlutou krystalickou látku s teplotou tání 280-290 °C (podle rychlosti zahřívání). Je rozpustný ve vodě a jeho rozpustnost závisí na teplotě (v 1000 ml vody se při teplotě 27,5 °C rozpustí 120 mg látky, při teplotě 40 °C 190 mg a při 100 °C 2,3 g). Nepatrně je rozpustný i v ethanolu (4,5 mg ve 100 ml), cyklohexanu, amylacetátu, amylalkoholu a fe-

10 Vitamin B₆ (Pyridoxin)

Obsah	
10.1 Vlastnosti	161
10.1.1 Obecné vlastnosti	161
10.1.2 Pyridoxol (PN)	163
10.1.3 Pyridoxal (PL)	164
10.1.4 Pyridoxamin (PM)	164
10.1.5 Stabilita vitaminů a jejich reakce	164
10.2 Stanovení vitaminu B₆	165
10.2.1 Extrakce	165
10.2.2 Ostatní metody stanovení	166
10.2.3 HPLC metody	167
10.2.4 Ostatní metody	168
10.3 Stanovení vitaminu B₁, B₂ a B₆	168
10.4 Pracovní postup stanovení celkového vitaminu B₆ v potravinách a krmivech	170
10.4.1 Extrakce	170
10.4.2 HPLC podmínky	170
Literatura	170

10.1 Vlastnosti

10.1.1 Obecné vlastnosti

Řada vitaminu B₆ je tvořena triádou vitaminů, které se označují takto: pyridoxol, pyridoxal a pyridoxamin (obrázek č. 10.1). Název *pyridoxin* se používá jako souhrnný název skupinového označení vše tří zmíněných vitaminů. Někdy se doporučuje používat tohoto názvu pouze pro 3-hydroxy-4,5-bis(hydroxymethyl)-2-methylpyridin a nepoužívat název pyridoxol. Alkylová skupina vznikající odštěpením 4'-hydroxyly se označuje pyridoxyl.

Základní struktura skupiny vitaminu B₆ je substituovaný derivát pyridinu, přičemž obměnou substituentu v poloze 4' dostaneme všechny tři vitaminy skupiny B₆ (pyridoxol – hydroxymethylenová skupina; pyridoxal – aldehydická skupina a pyridoxamin – aminoethylová skupina). Pyridoxalkináza fosforyluje všechny tři vitaminy B₆ na 5'-fosfáty, přičemž metabo-

11 Vitamin B₁₂

Obsah

11.1 Vlastnosti	172
11.1.1 Stabilita a reakce.....	173
11.1.2 Fyzikálně-chemické vlastnosti.....	174
11.2 Stanovení vitaminu B₁₂	175
11.2.1 Mikrobiologické metody.....	177
11.2.2 HPLC metody.....	178
11.2.2.1 Příprava vzorku.....	178
11.2.2.2 Separace a detekce.....	179
11.3 Pracovní postup stanovení vitaminu B₁₂ v potravinách a krmivech	180
11.3.1 Extrakce.....	180
11.3.2 Přečištění na imunoafinitních kolonkách.....	180
11.3.3 HPLC podmínky.....	180
Literatura	181

11.1 Vlastnosti

Vitaminy skupiny B₁₂ jsou organometalické sloučeniny mající obecnou korinoidní strukturu s měnící se vazbou na centrální atom kobaltu.^{1,2} Základem struktury je korinový cyklus, částečně hydrogenovaná téměř planární tetrapyrrolová struktura čtyř pyrrolových kruhů (11.I). Tři pyrrolové kruhy jsou spojené methenovými můstky, dva pyrroly jsou spojeny přímo. Substituenty jsou většinou methylenové skupiny (šest na pyrrolových jádrech, dvě v polohách 5 a 15) a amidové zbytky. Centrální atom kobaltu může tvořit až 6 koordinačních vazeb s ligandy. Je koordinačně vázán na čtyři atomy dusíku korinového cyklu (11.II), pátou vazbou je vázán na druhý atom dusíku 5,6-dimethylbezimidazolu a takzvané α -poloze a v šesté koordinační vazbě v β -poloze mohou být vázány různé skupiny nebo může být neobsazena. Strukturně je kyanokobalamin podobný struktuře krevního barviva heminu. Všechny formy vitaminu B₁₂ obsahující 5,6-dimethylbezimidazol se nazývají obecně kobalaminy, všechny strukturální analogy, jejichž základem je korinový skelet se nazývají souhrnně korinoidy.

12 Vitamin C

Obsah

12.1 Vlastnosti	182
12.1.1 Obecné vlastnosti.....	182
12.1.2 Spektrální vlastnosti.....	183
12.1.3 Stabilita a reakce.....	184
12.2 Stanovení vitamínu C	185
12.2.1 Extrakce kyseliny askorbové.....	185
12.2.2 HPLC metody.....	186
12.2.2.1 Separace.....	186
12.2.2.2 HPLC detekce.....	187
12.2.3 Ostatní metody stanovení.....	190
12.3 Vlastnosti a stanovení esterů kyseliny askorbové	192
12.4 Pracovní postup stanovení vitamínu C v potravinách a krmivech	195
12.4.1 Extrakce.....	195
12.4.2 HPLC podmínky.....	195
Literatura	197

12.1 Vlastnosti

12.1.1 Obecné vlastnosti

Kyselina L-askorbová, γ -lakton L-threo-2-hexenové kyseliny (dříve nazývaná také 2-keto-l-gulonová, L-xylo-2-hexuloseonová), [CAS=50-81-7], sumárního vzorce $C_6H_8O_6$ o molekulové hmotnosti $M_r = 176,13$ g/mol. L-kyselina askorbová má chirální centrum na atomu uhlíku 4 a 5 a tvoří čtyři stereoisomery, enantiomerový pár tvoří kyselina L- a D- askorbová a L- a D- araboaskorbová. L-askorbová kyselina a D-araboaskorbová kyselina (známější jako D-isoaskorbová kyselina) jsou epimery lišící se orientací hydroxyly a vodíku na atomu uhlíku C-5. Stereoisomery nevykazují žádnou biologickou účinnost nebo jen velmi malou ve srovnání s kyselinou L-askorbovou (isoaskorbová 2,5 - 5 %). Název vitamin C se označuje nejen L-askorbová kyselina, ale také celý reversibilní redoxní systém. Ten zahrnuje L-askorbovou kyselinu a kyselinu L-dehydroaskorbovou, což je produkt dvouelektronové oxidace (12.I). Meziproduktem oxidace je L-monodehydroaskorbová kyselina, která vzniká jednoelektronovou oxidací L-askorbové kyseliny.

• UV detekce 360 nm

13 Kyselina listová

Obsah	
13.1 Vlastnosti	199
13.1.1 Obecné vlastnosti.....	199
13.1.2 Spektrální vlastnosti.....	200
13.1.3 Stabilita.....	201
13.2 Stanovení kyseliny listové	202
13.2.1 HPLC metody.....	202
13.2.2 Ostatní metody stanovení.....	204
Literatura	206

13.1 Vlastnosti

13.1.1 Obecné vlastnosti

Kyselina listová, N-[4-[(2-amino-1,4-dihydro-4-oxo-6-pteridiny)l)methyl]amino] benzo-yl]-L-glutamová kyselina [CAS=59-30-3], (13.I), sumárního vzorce $C_{19}H_{19}N_7O_6$, o molekulové hmotnosti 441,40 g/mol. Vitaminy kyseliny listové můžeme považovat za deriváty kyseliny pterové (4-[(pteridin-6-yl)methyl]amino]benzoová kyselina). Vitaminy kyseliny listové se odvozují záměnou substituentu na atomech dusíku v poloze 5 a 10 pterové kyseliny, které jsou konjugovány a jednou nebo více molekulami L-glutamové kyseliny přes γ -karboxyl aminokyseliny. Kyselina listová obsahující jednu molekulu kyseliny glutamové se nazývá pteroylglutamová kyselina. Souhrn vitaminů kyseliny listové substituentů je uveden níže:

Název	Zkratka	Pozice a název substituentu	
		N-5	N-10
Pteroylglutamová kyselina	Kyselina listová	-	-H
7,8-dihydrolistová kyselina	H ₂ folát	-H	-H
5-methyl-5,6-dihydrolistová kyselina		-CH ₃	-H
5,6,7,8-tetrahydrolistová kyselina	H ₄ folát	-H	-H
5-methyltetrahydrolistová	5-CH ₃ -H ₄ folát	-CH ₃	-H
5-formyltetrahydrolistová kyselina	5-CHO-H ₄ folát	-CHO	-H
10-formyltetrahydrolistová kyselina	10-CHO-H ₄ folát	-H	-CHO
5,10-methenyltetrahydrolistová kyselina	5,10-CH ₂ H ₄ folát	-CH ₂ -	-

14 Niacin

Obsah	
14.1 Vlastnosti	207
14.1.1 Obecné vlastnosti	207
14.1.2 Spektrální vlastnosti	208
14.1.3 Stabilita	209
14.1 Stanovení niacinu	209
14.2.1 Extrakce a hydrolýza	209
14.2.2 Spektrofotometrické metody	210
14.2.3 HPLC metody	211
14.2.4 Ostatní metody stanovení	213
14.3 Pracovní postup stanovení niacinu	214
14.3.1 Extrakce - kyselá hydrolýza	214
14.3.2 Extrakce - alkalická hydrolýza	215
14.3.3 SPE přečištění	215
14.3.4 HPLC podmínky	215
Literatura	216

14.1 Vlastnosti

14.1.1 Obecné vlastnosti

Niacin zahrnuje kyselinu nikotinovou a její amid – nikotinamid a obě sloučeniny mají stejnou biologickou aktivitu. Dříve se niacin označoval také jako vitamin B₃ nebo vitamin PP. Kyselina nikotinová (14.I) je po chemické stránce kyselina pyridin-3-karboxylová [CAS=59-67-6] sumárního vzorce C₆H₅O₂N o molekulové hmotnosti 123,1 g/mol; amid kyseliny nikotinové [CAS=98-92-0] sumárního vzorce C₆H₆ON₂ o molekulové hmotnosti 122,1 g/mol je amid pyridin-3-karboxylové kyseliny. Obě formy vitamínů jsou vzájemně přeměnitelné, kyselina nikotinová přechází na amid a ten na koenzymy - nikotinamid adenin dinukleotid (NAD) a nikotinamid adenin dinukleotidfosfát (NADP).

Kyselina nikotinová je bílá krystalická látka krystalizující z vody nebo alkoholu, teplota tání 236,6 °C, nehydroskopická a stabilní na vzduchu. Rozpustná ve vodě (1,67 g ve 100 ml při teplotě 20 °C) a ethanolu (0,73 g ve 100 ml při teplotě 20 °C), velmi rozpustná ve vroucí vodě, alkoholu, alkalických hydroxidech, částečně rozpustná v benzenu a chloroformu, ne-

15 Kyselina D-pantothenová

Obsah

15.1 Vlastnosti	217
15.1.1 Obecné vlastnosti	217
15.1.2 Spektrální vlastnosti	218
15.1.3 Stabilita	218
15.2 Stanovení kyseliny D-pantothenové	219
15.3 Pracovní postup stanovení kyseliny pantothenové v potravinách a krmivech	220
15.3.1 Extrakce volné kyseliny	220
15.3.2 Extrakce vázané kyseliny	221
15.3.3 Přečištění extraktu	221
15.3.4 HPLC podmínky	221
Literatura	222

15.1 Vlastnosti

15.1.1 Obecné vlastnosti

Molekula kyseliny D-pantothenové (dříve také vitamin B₅) se skládá z pantoové kyseliny spojené amidickým můstkem s β -alaninem (15.I). Chemický název je d(+)-N-(2,4-dihydroxy-3,3-dimethyl-1-oxobutyl)- β -alanin, [CAS=79-83-4], sumárního vzorce C₉H₁₇O₅N o molekulové hmotnosti 219,24 g/mol. Díky chiralitě na atomu uhlíku C-2 je vitamin opticky aktivní a syntézou vzniká racemická směs, ale pouze d(+) enantiomer je biologicky aktivní. Komerčně vyráběné produkty kyseliny pantothenové obsahují sodnou [CAS=867-81-2] a vápenatou sůl [CAS=137-08-6] kyseliny pantothenové a alkohol – pantothenol [CAS=81-13-0]. Samotná kyselina je viskózní, slabě nažloutle zbarvený olej. Volná kyselina pantothenová je relativně labilní, je silně hydroskopická a méně stabilní než soli kyselin. Je velmi dobře rozpustná ve vodě, alkoholu, ethylacetátu, dioxanu, ledové kyselině octové, částečně rozpustná v etheru, amyalkoholu, acetonu,¹ prakticky nerozpustná v benzenu, chloroformu a alifatických uhlovodících.² Disociační konstanta kyseliny pantothenové je $pK_A = 4,41$ (cit.³).

Pantothenol (2,4-dihydroxy-N-(3-hydroxypropyl)-3,3-dimethylbutyramid) je hydroskopický viskózní olej nepatrně rozpustný ve vodě a velmi rozpustný v ethanolu. 1 g pantothenátu vápenatého je ekvivalentní 0,92 g kyseliny pantothenové a 0,862 g pantothenolu. 1 g pantothenolu je ekvivalentní 1,16 g pantothenátu vápenatého.

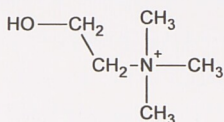
16 Cholin

Obsah	
16.1 Vlastnosti	223
16.2 Stanovení cholinu	223
16.3 Pracovní postup stanovení cholinu v potravinách a krmivech	225
16.3.1 Extrakce.....	225
Literatura	226

Do této kapitoly zařazují i cholin, který byl dříve zařazován do skupiny vitaminů, ale vzhledem k tomu, že nespĺňuje kritéria pro vitaminy, byl vyškrtnut. Ale vzhledem k jeho důležitosti z hlediska výživy zvířat jsem si dovolil jej zařadit do této skupiny.

16.1 Vlastnosti

Cholin (16.I) je základní součástí lecithinů (cholinfosfatidy) a chemicky se jedná o 2-hydroxy-N,N,N-trimethylethanamoniumhydroxid (sumárního vzorce $C_5H_{15}NO_2$ o molekulové hmotnosti 121,18 g/mol; [CAS=62-49-7]). Jako chemická báze tvoří soli z nichž nejběžnější je cholinchlorid ($C_5H_{14}NO.Cl$, $M_r = 139,6$ g/mol, [CAS=67-48-1]).



(16. I)

Báze cholinu je velmi hydrokopická, velmi rozpustná ve vodě, alkoholu, nerozpustná v hexanu, chloroformu, etheru.

16.2 Stanovení cholinu

Většina původních metod stanovení cholinu v premixech, finálních krmivech i surovinách byla založena na extrakci cholinu a poté jeho reakci s reineckátem amonným (diamino-tetrakis-isothiokyanatochromitan amonný). Cholin, jako všechny kvartérní amoniové báze, reagují s reineckátem za vzniku sraženiny. Reakce není tudíž příliš specifická, ale selektivitu je možné zvýšit úpravou experimentálních podmínek. Původně se vzniklá sraženina stanovila gravimetricky, později bylo stanovení založeno na spektrofotometrickém měření při 526 nm

17 Biotin

Obsah	
17.1 Vlastnosti	227
17.1.1 Obecné vlastnosti	227
17.1.2 Spektrální vlastnosti	228
17.1.3 Stabilita	228
17.2 Stanovení biotinu	229
17.2.1 Extrakce	229
17.2.2 HPLC metody	229
17.2.3 Ostatní metody	231
17.3 Pracovní postup stanovení biotinu v potravinách a krmivech	232
17.3.1 Extrakce	232
17.3.2 Přečištění imunoafinitní chromatografií	233
17.3.3 HPLC podmínky	233
Literatura	234

17.1 Vlastnosti

17.1.1 Obecné vlastnosti

Biotin [CAS=58-85-5], *cis*-hexahydro-2-oxo-1H-thieno[3,4-d-]imidazol-4-pentanová kyselina (17.I), sumárního vzorce $C_{10}H_{16}N_2O_3S$ o molekulové hmotnosti 244,31 g/mol. Označuje se také jako vitamin H nebo vitamin B7. Existuje 8 enantiomerů biotinu. Pouze d(+) biotin je biologicky aktivní forma a další isomery se nenacházejí v přírodě. Biotin má bicyklickou strukturu obsahující močovinový kruh sloučený s tetrathiofenovým kruhem s kyselinou valeřovou v postranním řetězci. V přírodě se biotin vyskytuje volný nebo vázaný na lysin jako biocytin (17.II) přes ϵ -amidickou vazbu lysinu. Krmné suroviny obsahují 11 až 29 % volného biotinu, v rostlinách je podíl volného biotinu vyšší okolo 23 až 80 %.

Biotin je bílá krystalická látka s teplotou tání 232-233 °C, rozpustná ve vodě (při teplotě 25°C se rozpustí 22 mg ve 100 ml vody) a 95 % ethanolu (80 mg ve 100 ml). Je velmi rozpustný v horké vodě a alkáliích, nerozpustný v dalších organických rozpouštědlech.

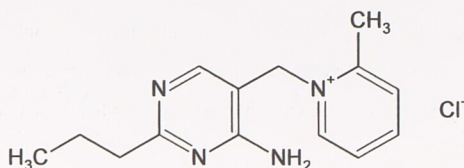
Antikokcidiostatika

18 Amprolium

Obsah	
18.1 Vlastnosti	235
18.2 Metody stanovení	236
18.2.1 Spektrometrické metody	236
18.2.2 Elektrochemické metody	236
18.2.3 HPLC metody	237
18.3 Pracovní postup stanovení amprolia v krmivech	238
18.3.1 Extrakce	238
18.3.2 HPLC podmínky	238
Literatura	239

18.1 Vlastnosti

Amprolium je derivátem pyrimidinu (1-[4-amino-2-propyl-5-pyrimidinyl] methyl)-2-methylpyrimidinium chlorid (18.I); [CAS=121-25-5], sumárního vzorce $C_{14}H_{20}N_4Cl_2$ a molekulové hmotnosti 315,25 g/mol). V kombinaci společně s ethopabátem se používá v krmivech jako prevence proti kokcidióze drůbeže v dávce 62,5-125 mg/kg finálního krmiva.¹ Amprolium je bílá krystalická látka s teplotou tání 248 – 249 °C, rozpustná ve vodě, 95 % ethanolu, dimethylformamidu, methanolu, špatně rozpustná v absolutním ethanolu, nerozpustná v 2-propanolu, butanolu, dioxanu a hexanu. UV spektrum má jedno absorpční maximum mezi 268 až 270 nm (rozpuštědlo methanol).

**(18. I)**

1 Odběr a příprava vzorku krmiva

Obsah

1.1 Základní pojmy	4
1.2 Odběr vzorku	5
1.2.1 Cíl odběru vzorku	5
1.2.2 Chyba odběru vzorku krmiva.....	6
1.2.3 Postup odběru a vzorkovací pomůcky	9
1.2.4 Způsoby vzorkování.....	9
1.3 Příprava vzorku.....	11
1.3.1 Úprava vzorku.....	11
1.3.1.1 Homogenizace	11
1.3.1.2 Úprava vzorku dělením	12
1.3.1.3 Úprava vzorku mletím	14
1.4 Zkoušení reprezentativnosti odběru vzorku a homogenity partie	14
1.4.1 Výpočet homogenity partie	16
1.4.1.1 Analýza rozptylu.....	16
1.4.1.2 Testování rozdílu dvou rozptylů	17
Literatura	18

V následujících kapitolách se zaměříme na odběr vzorků krmiv, ale všechny uvedené závěry jsou platné pro odběr vzorků obecně.

Cílem odběru vzorku krmiva a vzorkování je stanovení průměrné hodnoty analytu ve vzorkovaném celku a posouzení proměnlivosti obsahu analytu ve vzorkovacím celku. Správný odběr vzorku, jeho příprava, manipulace s ním a uchovávání vzorku před vlastní analýzou je jednou z nezbytných podmínek správné a přesné analýzy. Při odběru vzorků je třeba si uvědomit, že některé složky krmiv mohou být nestálé a mohou při nakládání se vzorkem, jehož jsou součástí, změnit chemické složení (ztráty těkavostí, biodegradací, oxidací a redukci). Zmrazení vzorku a tedy nízká teplota sice snižuje ztráty, ale zmrazení vzorků obsahujících vodu může způsobit jejich odplynění, rozbití nebo i rozdělení nemísitelných fází.

Volba vzorkovacího postupu a metoda odběru vzorku se řídí druhem a cílem vlastní analýzy, druhem vzorkovaného krmiva a jeho fyzikálními vlastnostmi (velikost částic, specifická hmotnost, sypkost) a množstvím a způsobem uložení vzorkovaného krmiva.

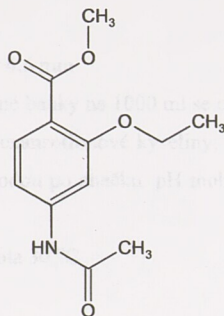
19 Ethopabát

Obsah

19.1 Vlastnosti	240
19.2 Metody stanovení	241
19.3 Pracovní postup stanovení ethopabátu v krmivech	242
19.3.1 Extrakce	242
19.3.2 HPLC podmínky	242
Literatura	243

19.1 Vlastnosti

Chemicky se jedná o methylester 2-ethoxy-4-acetamidobenzoové kyseliny ([CAS=59-06-3]; (19.I); sumárního vzorce $C_{12}H_{15}NO_4$ o molekulové hmotnosti 237,25 g/mol). Používá se v krmivech v kombinaci s amproliem jako prevence proti kokcidióze drůbeže v dávce 8 mg/kg finálního krmiva (jeho ochranná lhůta činí 3 dny). Bílá až růžová krystalická látka, rozpustná ve vodě, 95 % ethanolu, methanolu, acetonu, acetonitrilu, dichlormethanu nerozpustná v 2-propanolu, ethylacetátu, dioxanu. UV spektrum je charakteristické svými dvěma absorpčními maximy nad 250 nm při 267 až 268 nm ($A_{1cm}^{1\%} = 805$) a 298 až 300 nm ($A_{1cm}^{1\%} = 365$).



(19. I)

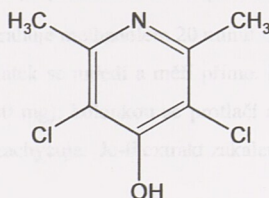
20 Meticlorpindol

Obsah

20.1 Vlastnosti	244
20.2 Metody stanovení	245
20.2.1 Spektrofotometrické metody	245
20.2.2 HPLC metody	245
20.3 Pracovní postup stanovení meticlorpindolu v krmivech	246
20.3.1 Extrakce A	246
20.3.2 Extrakce B (pro velmi nízké obsahy).....	246
20.3.3 HPLC podmínky.....	247
Literatura	247

20.1 Vlastnosti

Také clopidol nebo coyden. Meticlorpindol (20.I) je derivátem pyridinolu a po chemické stránce se jedná o 3,5-dichloro-2,6-dimethyl-4-pyridinol, [CAS=2971-90-6], sumárního vzorce $C_7H_7Cl_2NO$ o molekulové hmotnosti 192,06 g/mol. Nažloutlá krystalická substance s teplotou tání 360 °C. Používá se jako antikokcidikum k prevenci kokcidiózy drůbeže (kuřata, kuřice, krůty) v kombinaci s methylbenzochátem.¹ Absorpční maximum UV spektra v methanolu je při 217 nm a při 265 až 267 nm. Rozpustný v methanolu, dichlormethanu, prakticky nerozpustný ve vodě, diethyletheru a hexanu.



(20. I)

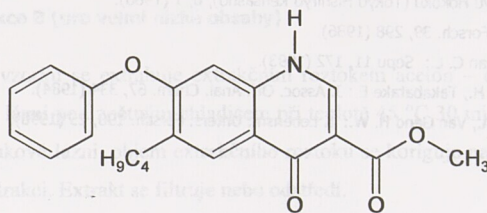
21 Methylbenzochát

Obsah

21.1 Vlastnosti	248
21.2 Metody stanovení	249
21.3 Pracovní postup stanovení methylbenzochátu v krmivech	250
21.3.1 Extrakce premixy doplňkových látek.....	250
21.3.2 Extrakce krmných směsí.....	250
21.3.3 HPLC podmínky.....	251
Literatura	251

21.1 Vlastnosti

Methylbenzochát (21.1) má několik používaných synonym (statoquate, nequinat, statyl). Po chemické stránce se jedná o derivát chinolinu (6-butyl-1,4-dihydro-4-oxo-7-(fenylmethoxy)-methylester kyseliny 3-chinolinkarboxylové; [CAS=13997-19-8]; sumárního vzorce $C_{22}H_{23}NO_4$ o molekulové hmotnosti 365,4 g/mol). Používá se v krmivech v kombinaci s clopidolem jako prevence proti kokcidióze drůbeže v dávce 8,35 mg/kg finálního krmi-va a jeho ochranná lhůta činí 5 dnů. UV spektrum je velmi charakteristické a má tři absorpční maxima a to při 257, 310 a 322 nm. Rozpustný v methanolu, dichlormethanu, nerozpustný v hexanu.



(21.1)

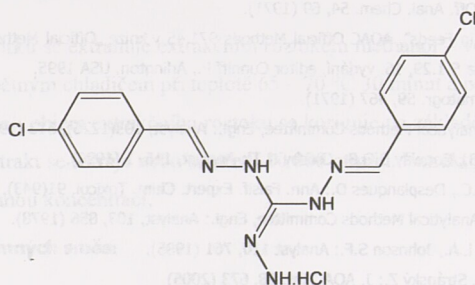
22 Robenidin

Obsah

22.1 Vlastnosti	252
22.2 Metody stanovení	253
22.2.1 Spektrofotometrické metody	253
22.2.2 HPLC metody	254
22.3 Pracovní postup stanovení robenidinu v krmivech	255
22.3.1 Extrakce.....	255
22.3.2 HPLC podmínky.....	255
Literatura	256

22.1 Vlastnosti

Robenidin (22.I) je derivátem guanidinu - (1,3-bis-(p-chlorbenzylidenamino)-guanidin) [CAS=25875-51-8]; sumárního vzorce $C_{15}H_{14}Cl_3N_5$ o molekulové hmotnosti 370,67 g/mol. Používá se jako antikokcidikum a chemoterapeutikum ve výkrmu kuřat, krůčat a králíků v preventivní dávce 30-66 mg/kg.^{1,2} UV spektrum má dvě absorpční maxima při 232 nm a 352 nm. Žlutá krystalická látka s teplotou tání 289 – 290 °C prakticky nerozpustná ve vodě, hexanu a diethyletheru, lépe rozpustná v methanolu, dobře v dichlormethanu.



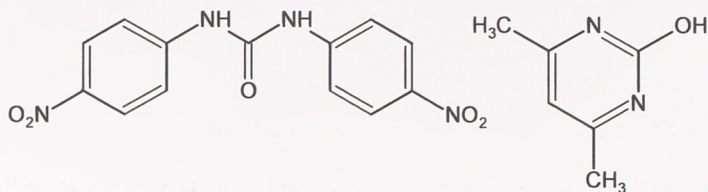
(22. I)

23 Nikarbazin

Obsah	
23.1 Vlastnosti	257
23.2 Metody stanovení	258
23.2.1 Spektrofotometrické a polarografické metody	258
23.2.2 HPLC metody stanovení nikarbazinu ve zvířecích tkáních.....	258
23.2.3 HPLC metody stanovení nikarbazinu v krmivech	259
23.2.4 Simultánní HPLC metody.....	260
23.3 Pracovní postup stanovení nikarbazinu v krmivech	260
23.3.1 Extrakce	260
23.3.2 HPLC podmínky.....	260
Literatura	261

23.1 Vlastnosti

Nikarbazin (23.I) (nicarb, nicoxin, nicrazin) je ekvimolární komplex 1,3-bis-(4-nitrofenyl) močoviny a 4,6-dimethylpyrimidin-2-olu ([CAS=330-95-0]; sumárního vzorce $C_{19}H_{18}N_6O_6$ o molekulové hmotnosti 426,38 g/mol. Používá se v kombinaci s narasinem jako účinné antikokcidikum.¹ UV spektrum má v kyselině sírové jedno absorpční maximum při 298 nm, v neutrálních rozpouštědlech se maximum posouvá k vyšším vlnovým délkám na 351 nm (obrázek 23.1). Nikarbazin je žlutá krystalická látka s teplotou tání mezi 265 - 275 °C, při které se rozkládá. Je nerozpustný ve vodě, rozpustný v kyselinách. Suché krystaly jsou velmi silně elektrostatické a velmi obtížně jsou mísitelné.



(23. I)

24 Polyetherová antibiotika

Obsah

24.1 Vlastnosti	262
24.1.1 Monensin	264
24.1.2 Salinomycin	265
24.1.3 Narasin	265
24.1.4 Lasalocid	266
24.1.5 Maduramicin	267
24.1.6 Semduramicin	267
24.2 Metody stanovení	268
24.2.1 Stanovení monensinu, salinomycinu a narasinu	268
24.2.1.1 Mikrobiologické metody	268
24.2.1.2 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)	269
24.2.1.3 Spektrofotometrické stanovení	269
24.2.1.4 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)	269
24.2.1.5 Výpočet obsahu monensinu	276
24.2.2 Stanovení lasalocidu	277
24.2.3 Stanovení maduramicinu	278
24.2.4 Stanovení semduramicinu	279
24.3 Pracovní postup stanovení monensinu, salinomycinu a narasinu v krmivech	281
24.3.1 Extrakce premixy doplňkových látek	281
24.3.2 Extrakce krmných směsí	281
24.3.3 HPLC podmínky – postkolonová derivatizace	281
Literatura	282

24.1 Vlastnosti

Polyetherová antibiotika (PA) reprezentují významnou skupinu ionoforních sloučenin, produkovaných kmeny *Streptomyces*. Příprava a vlastnosti prvních polyetherových antibiotik byly popsány již v 50. letech 20. století. V současné době se odhaduje, že bylo připraveno asi 80 různých ionoforních polyetherových monokarboxylových kyselin (polyetherových antibiotik), ze kterých mají největší význam monensin, salinomycin, narasin, lasalocid, semduramicin a maduramicin.¹ Z těchto antibiotik pak na salinomycin a monensin připadá v současnosti 65-75 % podíl na jejich celosvětové spotřebě. Většina polyetherových antibiotik se vyrábí

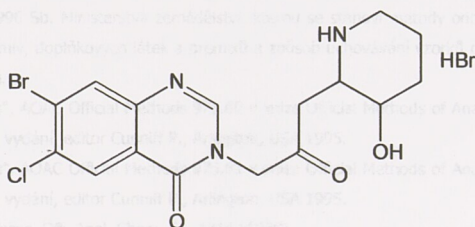
25 Halofuginon

Obsah

25.1 Vlastnosti	284
25.2 Metody stanovení	285
25.3 Pracovní postup stanovení halofuginonu v krmivech	286
25.3.1 Extrakce	286
25.3.2 HPLC podmínky	286
Literatura	287

25.1 Vlastnosti

Halofuginon (25.I) ale také Stenorol, po chemické stránce (trans-7-bromo-6-chloro-3-[3-(3-hydroxy-2-piperidyl)-acetyl]-4(3H)-chi- nazolidon hydrobromid) [CAS=64924-67-0], sumárního vzorce $C_{16}H_{18}N_3O_3Br_2Cl$ o molekulové hmotnosti 495,6 g/mol se používá jako antikokcidikum v dávce 3 mg/kg finálního krmiva pro výkrm brojlerů, výkrm krůtat a pro odchov kuřat. Halofuginon je účinné antikokcidikum proti patogenům *Eimeria meleagriditis*, *E. adenoides*, *E. gallopavonis* a *E. dispersa*.^{1,2} Bílá až šedá krystalická látka, rozpustná v methanolu, ethanolu, acetonitrilu a zředěných roztocích kyselin, nerozpustná v chloroformu, hexanu, benzenu. UV spektrum halofuginonu má v methanolu jedno absorpční maximum při 243 nm ($A_{1cm}^{1\%} = 907$). Do krmive se halofuginon dává také ve formě halofuginonpoly(styrensulfonátu) (HPS) vápenatého nebo draselného.



(25. I)

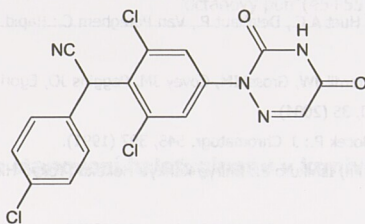
26 Diclazuril

Obsah

26.1 Vlastnosti	288
26.2 Metody stanovení	288
26.3 Pracovní postup stanovení diclazurilu v krmivech	289
26.3.1 Extrakce	289
26.3.2 HPLC podmínky	289
Literatura	290

26.1 Vlastnosti

Diclazuril (26.1) po obchodním názve také jako Clinacox (2,6-dichloro-(4-chlorfenyl)-4-(4,5-dihydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2(3H)-yl) benzenacetonitril; [CAS=101831-37-2]; sumárního vzorce $C_{17}H_9N_4O_2Cl_3$ o molekulové hmotnosti 407,64 g/mol) se používá jako anti-kokcidikum pro výkrm kuřat o obsahu řádově 1 mg/kg. Diclazuril je účinné antikokcidikum proti všem hlavním patogenům druhu *Eimeria*: *E. tenella*, *E. acervulina*, *E. necatrix*, *E. brunetti*, *E. maxima* a *E. mitos*.^{1,2}



(26. 1)

26.2 Metody stanovení

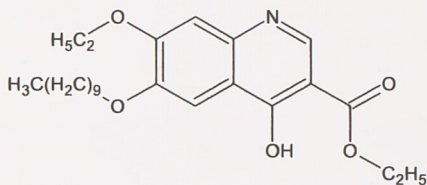
HPLC stanovení diclazurilu v krmivech pro drůbež pro obsahy 1 mg/kg bylo popsáno v roce 1992 (cit.³). Diclazuril je extrahován okyseleným methanolem a extrakt je přečištěn na pevné fázi (SPE C18). Eluát je poté odpařen k suchu a odparek rozpuštěn v dimethylformamidu a analyzován na reverzní fázi s UV detekcí při 280 nm. Ke kvantifikaci se používá interní standard (8062646, strukturální analog diclazurilu). Výtěžnost metody se

27 Decoquinat

Obsah	
27.1 Vlastnosti	291
27.2 Metody stanovení	291
Literatura	293

27.1 Vlastnosti

Decoquinat je po chemické stránce ethylester 6-decyloxy-7-ethoxy-4-hydroxy-3-quinolin karboxylové kyseliny (27.I), [CAS=18507-89-6], sumárního vzorce $C_{24}H_{35}NO_5$, molekulové hmotnosti 417,53 g/mol. Používá se jako kokcidiostatikum v krmivech.



(27. I)

27.2 Metody stanovení

Ke stanovení decoquinatu v krmivech byla popsána řada metod přes fluorimetrické metody až po metody HPLC. První HPLC metody stanovení decoquinatu popisují jeho stanovení ve zvířecích tkáních.¹ Decoquinat je extrahován směsným rozpouštědlem methanol – chloroform a poté je extrakt převeden do ethylacetátu. Extrakt se odpaří k suchu, odparek se rozpustí v chloroformu a takto získaný extrakt je analyzován přímo na reverzní fázi (Zorbax ODS) za použití mobilní fáze methanol – voda (obsahující 10 mM $CaCl_2$) s fluorescenční detekcí (excitační vlnová délka 326 nm, emisní vlnová délka 384 nm). Výtěžnost metody pro 0,01 mg/kg byla 94,0 %, pro 0,05 mg/kg 99,0 % a pro 0,5 mg/kg 97,4 %. Limit detekce se pohyboval okolo 1 ng. Jednoduchou metodu stanovení decoquinatu bez předchozí předseparace popsal Kinoshita.² Decoquinat je extrahován chloroformem a po vysušení extraktu byl extrakt analyzován na koloně Wakosil 5C18 s fluorescenční detekcí. Průměrná hodnota výtěžnosti metody je 95,7 % a směrodatná odchylka stanovení 8,2 %. Stejný autor popsal i metodu stanovení

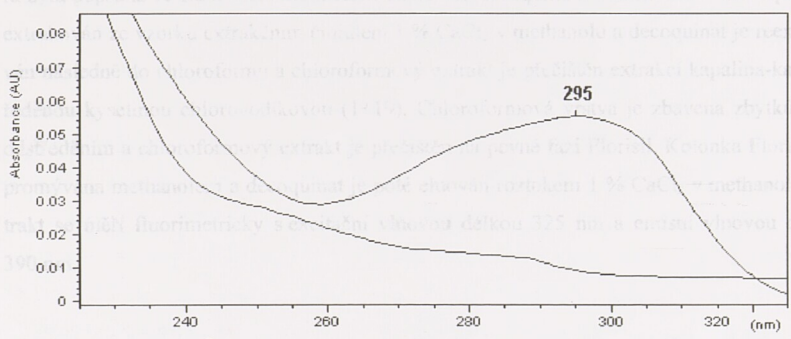
28 Avilamycin

Obsah

28.1 Vlastnosti	294
28.2 Metody stanovení	296
28.3 Pracovní postup stanovení avilamycinu v krmivech	297
28.3.1 Extrakce	297
28.3.2 HPLC podmínky	298
Literatura	299

28.1 Vlastnosti

Avilamycin (polyetherický antibiotický komplex) (28.I) patří do skupiny orthosomycinových antibiotik a je produkován *Streptomyces viridochromogenes*. Avilamycin je vícesložkové antibiotikum, majoritní složkou avilamycinu je složka A a B. Struktura avilamycinu byla již popsána¹ a jednotlivé složky jsou popsány. Používá se jako stimulant růstu v krmivech pro selata, prasata a brojlerů v dávce řádově kolem 10 mg/kg až 40 mg/kg a jeho účinnost jako antibiotika byla již rovněž popsána.^{2,3,4,5}



Obrázek č. 28. 1 Absorpční spektrum avilamycinu. (—) = pH 1, (·) = pH 9.

Avilamycin A, sumárního vzorce $C_{61}H_{88}Cl_2O_{32}$, [CAS=11051-71-1], $M_r = 1403,9$ g/mol. Bezbarvá krystalická látka krystalizující z chloroformu, teplota tání leží v intervalu 181–182 °C. UV spektrum má dvě absorpční maxima (methanol): 227 nm ($\log \epsilon = 4,12$) a 286 nm ($\log \epsilon = 3,33$). Absorpční spektrum je ukázáno na obrázku č.28.1. Poloha absorpčního maxi-

2 Úprava vzorku a extraktu

Obsah

2.1 Úprava vzorku	19
2.1.1 Odtučnění vzorku.....	20
2.2 Extrakce	20
2.2.1 Extrakce rozpouštědly	20
2.2.2 Vysokotlaká extrakce rozpouštědlem	24
2.2.3 Superkritická fluidní extrakce	24
2.3 Úprava extraktu	25
2.3.1 Filtrace a odstředění extraktu.....	25
2.3.2 Čiření extraktu.....	27
2.4 Přečištění extraktu	28
2.4.1 Extrakce z kapaliny do kapaliny.....	28
2.4.2 Technika SPE	29
2.4.3 Technika SPME	31
2.4.3.1 Techniky SPME.....	32
2.4.3.2 Faktory ovlivňující SPME.....	32
2.4.4 Afinitní chromatografie	33
2.4.5 Technika Extrelut.....	34
2.4.6 Technika off-line dvourozměrné HPLC	34
2.5 Úprava extraktu – derivatizační reakce	34
2.5.1 Předkolonová derivatizace (derivatizace off-line).....	36
2.5.2 Postkolonová derivatizace (derivatizace on-line)	36
2.5.2.1 Derivatizační techniky v průtokových reaktorech.....	37
Literatura	38

2.1 Úprava vzorku

Příprava a úprava vzorku jsou velmi často časově nejnáročnější a nejkritičtější kroky celkové analýzy. To platí zejména v případech velmi nízkých koncentrací látek ve složité matici, kterou krmivo bezesporu je. Pro účely přípravy a úpravy vzorku resp. vlastního extraktu se používá celá řada separačních a koncentračních technik.

Stimulátory růstu

29 Carbadox

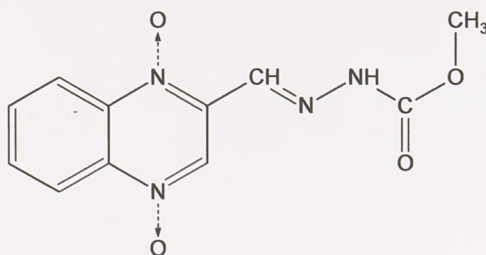
Obsah

29.1 Vlastnosti	300
29.2 Metody stanovení	301
29.2.1 Spektrofotometrické metody.....	301
29.2.2 HPLC metody.....	301
29.2.3 Simultánní HPLC metody a stanovení reziduí.....	302
Literatura	303

29.1 Vlastnosti

Carbadox, ale také mecadox (29.1), derivát chinoxalinu (N,N'- dioxid methylesteru-3-(2-chinoxalin-methylen)karbazové kyseliny se řadí mezi chinoxalin-N,N-dioxidy, sumárního vzorce $C_{11}H_{10}N_4O_4$ o molekulové hmotnosti 262,23 g/mol, [CAS=6804-07-5]). Používá se jako stimulátor růstu ve výkrmu prasat. Carbadox je vysoce účinný proti bakteriím *Brachyspira hyodysenteriae*, *Escherichia coli* a dalším gram-negativním mikroorganismům.^{1,2,3}

Žlutá krystalická látka, málo rozpustná ve vodě, teplota tání 239 - 240 °C při které se rozkládá. Carbadox má velmi charakteristické UV spektrum⁴ s maximy 236 nm ($\epsilon = 11\,000$ l/mol/cm), 251 nm ($\epsilon = 10\,900$ l/mol/cm), 303 nm ($\epsilon = 36\,400$ l/mol/cm), 366 nm ($\epsilon = 16\,100$ l/mol/cm) a 373 nm ($\epsilon = 16\,200$ l/mol/cm), na světle se rychle rozkládá.



(29. 1)

30 Olachindox

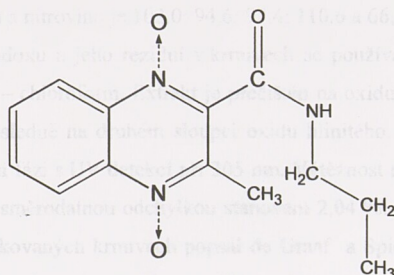
Obsah

30.1 Vlastnosti	304
30.2 Metody stanovení	305
30.3 Pracovní postup stanovení olachindoxu v krmivech	306
30.3.1 Extrakce krmné směsi.....	306
30.3.2 Extrakce premixy.....	306
30.3.3 HPLC podmínky.....	306
Literatura	307

30.1 Vlastnosti

Olachindox (30.I), derivát chinoxalinu (N-(2-hydroxyethyl)-3-methylquinoxalinecarboxamide 1,4-dioxide, sumárního vzorce $C_{12}H_{13}N_3O_4$ o molekulové hmotnosti 263,25 g/mol, [CAS=23696-28-8]) se používá jako stimulant růstu ve výkrmu prasat.

Žlutá krystalická látka, rozpustná ve vodě, nerozpustná v organických rozpouštědlech. Ultrafialové spektrum má charakteristické spektrum se čtyřmi absorpčními maximy: $\lambda_1=240$ nm; $\lambda_2=259$ nm; $\lambda_3=356$ nm a $\lambda_4=374$ nm. Na světle se roztoky olachindoxu velmi rychle rozkládají (obrázek č.30.1). Teplota tání 209 °C (rozkládá se).



(30. I)

31 Virginiamycin

Obsah

31.1 Vlastnosti	308
31.2 Metody stanovení	310
31.3 Pracovní postup stanovení virginiamycinu v krmivech	313
31.3.1 Extrakce	313
31.3.2 HPLC podmínky.....	314
Literatura	314

31.1 Vlastnosti

Virginiamycin je vicesložkový antibiotický laktonový polypeptid produkovaný *Streptomyces virginiae* s majoritní složkou virginiamycinu M_1 a S_1 . Komerčně vyráběný produkt obsahuje asi 75 % složky M_1 a 5 % složky S_1 . Antibiotický komplex je amorfni, bílý prášek, rozkládá se při 138 – 140 °C. Mírně rozpustný ve vodě a zředěných kyselinách, rozpustný v alkalických roztocích (pH >9,5) se ztrátou biologické účinnosti. Rozpustný v methanolu, ethanolu, acetonu, ethylacetátu, chloroformu, dichlormethanu a benzenu. Virginiamycin je extrahován z fermentační směsi a surový produkt je granulován po přidávku karboxymethylcellulosity a uhličitanu vápenatého na požadovanou aktivitu.

Virginiamycin S_1 (31.I), sumární vzorec $C_{43}H_{49}N_7O_{10}$, molekulové hmotnosti 823,90 g/mol; [CAS=23152-29-6]. Krystalizuje z methanolu, teplota tání 240-242 °C. Rozpustný je v etheru (0,1 %), methanolu (0,5 %), ethanolu (1,5 %), benzenu (2,5 %), acetonu a ethylacetátu (3%) a dioxanu (4%), velmi rozpustný v chloroformu, dichlormethanu a dimethylformamidu. Prakticky nerozpustný ve vodě a petroletheru. UV spektrum má pouze jedno absorpční maximum při 305 nm (ethanol; log ϵ = 3,85).

Virginiamycin M_1 (31.II), sumární vzorec $C_{28}H_{35}N_3O_7$, molekulové hmotnosti 525,60 g/mol; [CAS=21411-53-0]. Nahnědlý prášek krystalický ze směsného rozpouštědla aceton-petrolether, rozkládá se při teplotě 165-167 °C. Rozpustný je v etheru (0,1 %), benzenu (0,3 %), ethylacetátu (0,5 %), acetonu (2 %), methanolu a ethanolu (4 %), dioxanu a tetrahydrofuranu (5 %), velmi rozpustný v chloroformu, dichlormethanu a dimethylformamidu. Prak-

32 Avoparcin

Obsah	
32.1 Vlastnosti	315
32.2 Stanovení	316
Literatura	317

32.1 Vlastnosti

Avoparcin (32.I) je glykopeptidický komplex účinný proti gram pozitivním organismům produkovaný *Streptomyces candidus*. Molekulová hmotnost komplexu je vyšší než 1900 g/mol. Používá se jako stimulant růstu v dávce 7,5 – 40 mg/kg krmiva v závislosti na kategorii a druhu zvířete. Existují dvě formy avoparcinu – nesubstituovaný α -avoparcin [CAS =37332-99-3] a substituovaný chlorderivát β -avoparcin o molekulové hmotnosti 1909 g/mol resp. 1944 g/mol. Poměr obou forem (α -avoparcin/ β -avoparcin) je 1:4. Glykopeptid molekuly avoparcinu obsahuje sedm aromatických kruhů a čtyři molekuly cukerných jednotek. Ty jsou spojené amidickými nebo etherickými můstky. Molekula se vyskytuje ve 32 stereoisomerech. Avoparcin je citlivý k tepelné degradaci což vede ke ztrátě jeho biologické aktivity (řádově 10 až 100 krát).

Bílý hydrokopický amorfní prášek rozpustný ve vodě (rozpustnost je větší než 5 g/l), dimethylformamidu a dimethylsulfoxidu méně v methanolu. Absorpční maximum UV spektra je při 280 nm v kyselých a neutrálních roztocích, v alkalickém roztoku se posouvá k 300 nm. Spektrální charakteristiky avoparcinu jsou uvedeny v tabulce č. 32.1. Stabilita roztoků se pohybuje v rozmezí pH 4 - 8. Disociační konstanta pK_a α -avoparcinu je 10,3 a β -avoparcinu je 7,99 (cit.¹⁾).

Tabulka č. 32. 1 Spektrální charakteristiky avoparcinu

Homolog vitamínu A	Rozpouštědlo	λ_{max} (nm)	$A_{1cm}^{1\%}$	$[\alpha]_D^{25}$ ¹⁾
α -avoparcin	0,1 M HCl	280	42,0	-96 ± 2°
β -avoparcin	0,1 M HCl	280	44,0	-102 ± 2°

Poznámka: ¹⁾ pro koncentraci $c = 0,65$.

33 Flavomycin

Obsah

33.1 Vlastnosti	318
33.2 Metody stanovení	318
Literatura	320

33.1 Vlastnosti

Flavomycin (33.I), ale také moenomycin, flavophospholipol nebo banbermycins [CAS=11015-37-5] je glykopeptidický komplex produkovaný *Streptomyces bambergiensis* a *Streptomyces ghanensis*. Flavomycin má sumární vzorec $C_{69}H_{108}N_5O_{34}P$ o molekulové hmotnosti 1582,58 g/mol. Antibiotický komplex má přibližné složení: moenomycin A: 40-80%; moenomycin A_{1/2}: 0-20%; moenomycin C₁: 0-20%; moenomycin C₃: 5-25%; moenomycin C₄: 0-15%. Toto antibiotikum je účinné proti gram-positivním bakteriím a používá se jako stimulant růstu v dávce 1 – 25 mg/kg krmiva v závislosti na kategorii a druhu zvířete.^{1,2}

Rozpouští se ve vodě (250 g/l), methanolu (64 g/l), dimethylformamidu, ethanolu, špatně v diethyletheru, ethylacetátu, nerozpustný v benzenu a chloroformu. V neutrálním prostředí jsou roztoky poměrně stabilní, v alkalickém a kyselém prostředí se rozkládá. Absorpční maximum UV spektra je v neutrálních rozpouštědlech 258 nm ($A_{1cm}^{1\%}=102 - 106$). Flavomycin je mírně toxický a jeho akutní toxicita vyjádřená jako LD₅₀ pro myši je 1 520-1 580 mg/kg; LD₅₀ myši (i.v.) je 738 mg/kg, byly publikovány také hodnoty LD₅₀ - myši (oral): 2 000-10000 mg/kg; LD₅₀ kuřata: 8900 mg/kg; LD₅₀ krysy: 14400 mg/kg

33.2 Metody stanovení

Ke stanovení flavomycinu v krmivech se používají především mikrobiologické metody. Flavomycin se stanoví na základě inhibičního účinku na růst testovacího mikroorganismu *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 nebo *Bacillus stearothermophilus* difúzní plotnovou metodou³ a mez detekce je 0,01 mg/kg.

Většina dalších metod stanovení flavomycinu je věnována jeho stanovení v mase, tkáních a krvi. Jedná se především o metody separační a to metody HPLC, TLC⁴ nebo elektroforetic-

34 Tylosin

Obsah	
34.1 Vlastnosti	321
34.2 Metody stanovení	323
Literatura	324

34.1 Vlastnosti

Tylosin je makrolidové antibiotikum produkované *Streptomyces fradiae* a je směsí čtyř antibiotických složek (A, B, C a D). Obsah tylosinu A (34.I) v antibiotickém komplexu je nejméně 80 % (cit.¹) a používá se jako stimulant růstu v dávce 5 – 40 mg/kg krmiva v závislosti na kategorii a druhu zvířete. Do krmiv se dává také často ve formě vinanu (molekulová hmotnost 1066,2 g/mol, [CAS=74610-55-2]). Světle hnědý prášek rozpustný v organických rozpouštědlech (hexan, aceton, acetonitril, chloroform, dichlormethan, ethylacetát, methanol, tetrahydrofuran); rozpustnost ve vodě závisí na teplotě a pH roztoku. Nejvyšší stabilita roztoků je v rozmezí pH 4-9. Krystalizuje z vody s teplotou tání mezi 128 – 132 °C.

Tabulka č. 34. 1 Fyzikálně-chemické vlastnosti tylosinu

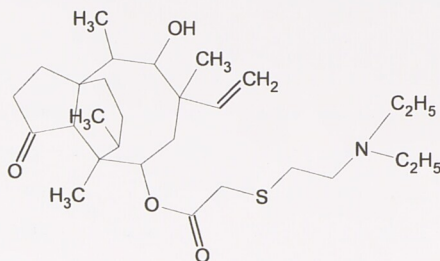
Antibiotická složka	Sumární vzorec	Molekulová hmotnost [g/mol]	Spektrální vlastnosti (λ_{\max} (nm); $A_{1\text{cm}}^{1\%}$; $[\alpha]_D^{25}$)
Tylosin A ([CAS=1401-69-0])	$C_{47}H_{79}NO_{17}$	930,13	282 nm; 245; - 46 ° (c = 2 v methanolu)
Tylosin B (Descmycosin; 34.II)	$C_{39}H_{65}NO_{14}$	771,93	
Tylosin C (Macrocin)	$C_{46}H_{77}NO_{17}$	916,10	
Tylosin D (Relomycin)	$C_{47}H_{81}NO_{17}$	932,14	

35 Tiamulin

Obsah	
35.1 Vlastnosti	325
35.2 Metody stanovení	326
Literatura	327

35.1 Vlastnosti

Tiamulin (35.I) je semisyntetický derivát pleuromutilinu produkovaný houbami *Pleurotus mutilis*. Tiamulin (volná báze) je strukturního vzorce $C_{28}H_{47}NO_4S$; [CAS=55297-95-5] nebo se vyskytuje také jako sůl ve formě fumaranu $C_{32}H_{51}NO_8S$; [CAS=55297-96-6]) o molekulové hmotnosti 493,76 g/mol resp. 609,8 g/mol. Chemicky se jedná o 6-ethenyldekahydro-5-hydroxy-4,6,9,10-tetramethyl-1-oxo-3a,9-propano-3aH-cyklo-pentacyklookten-8-yl ester [3a S-(3a α ,4 β ,5 α 6 α ,8 β ,9a β ,10S*)]-[2-(diethylamino)ethyl]thio]octové kyseliny. Tiamulin je vysoce účinné antibiotikum proti bakteriím *Escherichia coli* a *Treponema hyodysenteriae*¹ v doporučené dávce 25 – 30 mg/kg jako preventivní nebo v léčebné dávce 120 – 200 mg/kg. Akutní toxicita tiamulin fumarátu vyjádřená jako LD₅₀ je 2230 mg/kg (orálně, krysy).



(35. I)

Tiamulin jako báze je mazlavá nažloutlá hmota, slabě hygroskopická, která je nerozpustná ve vodě, velmi dobře rozpustná v dichlormethanu a bezvodém ethanolu. Tiamulin fumaran krystalizuje z acetonu a má teplotu tání 147-148 °C. Bílý nebo světle žlutý prášek, dobře roz-

36 Bacitracin

Obsah

36.1 Vlastnosti	328
36.2 Metody stanovení	330
Literatura	331

36.1 Vlastnosti

Bacitracin (ale také baciferem, ocumycin) je cyklické polypeptidické antibiotikum produkované *Bacillus subtilis* a *Bacillus licheniformis*¹ [CAS = 1405-87-4] a používá se jako stimulant růstu ve výživě hospodářských zvířat^{2,3} v dávce 5 – 40 mg/kg. Pro použití v krmivech se používá jeho zinečnatá sůl [CAS=1405-89-6] nebo methylen bacitracin disalicylát [CAS=1405-88-5] z důvodu vyšší stability oproti volnému bacitracinu.⁴

Bacitracin A (36.I) je bílý hydroskopický prášek sumárního vzorce C₆₆H₁₀₃N₁₇O₁₆S a molekulovou hmotností 1422,71 g/mol. Je rozpustný ve vodě, nerozpustný v acetonu, diethyletheru a chloroformu. Struktura bacitracinu byla zjištěna již v padesátých letech 20 století (cit.⁵⁻⁶) a byla confirmována v 90 letech technikou NMR (cit.⁷) a MS (cit.^{8,9,10}). Bacitracin A tvoří stechiometrické komplexy s divalentními kationty Ni²⁺ a Zn²⁺ s pak blízké hodnotě 5,5. Při rozpouštění v methanolu, ethanolu a ledové kyselině octové dochází k deprotonizaci za vzniku sraženiny.^{11,12} Divalentní kationty jsou vázány koordinačně kovalentní vazbou na karboxyl glutamátu, imidazolový kruh histidinu a thiazolový kruh. Karboxyl aspartamové kyseliny a N-koncová aminoskupina do těchto vazeb nevstupuje.¹²

Zinc-bacitracin nemá výrazné absorpční spektrum a je závislé na pH roztoku. V 0,1 M NaOH je výrazné maximum při 207 nm, s klesajícím pH se maximum posouvá k nižším vlnovým délkám (obrázek č. 36.1).

Chemoterapeutika

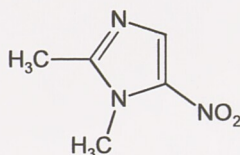
37 Dimetridazol

Obsah

37.1 Vlastnosti	332
37.2 Metody stanovení	333
37.2.1 Spektrofotometrické a polarografické metody	333
37.2.2 Separční metody	333
37.2.3 Simultánní HPLC metody	335
37.2.4 Metody stanovení ve zvířecích tkáních	335
37.3 Pracovní postup stanovení dimetridazolu v krmivech	336
37.3.1 Extrakce	336
37.3.2 HPLC podmínky	336
Literatura	337

37.1 Vlastnosti

Derivát imidazolu (1,2-dimethyl-5-nitro-imidazol, sumárního vzorce $C_5H_7N_3O_2$ o molekulové hmotnosti 141,1 g/mol, [CAS=551-92-8]; 37.I) se používá jako chemoterapeutikum v preventivní dávce řádově 100 mg/kg. UV spektrum má dvě absorpční maxima při 230 nm a 309-311 nm ($\epsilon = 8\,810$ l/mol/cm, $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 625$). Poloha absorpčního maxima spektra závisí na pH roztoku. S klesajícím pH dochází k hypsochromnímu posunu ke kratším vlnovým délkám ($\lambda_{\text{max}} = 273$ nm ($\epsilon = 6\,420$ l/mol/cm, $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 454$ v prostředí pH = 1,0 0,1 mol/l kyseliny chlorovodíkové) a nastává hyperchromní efekt.



(37. I)

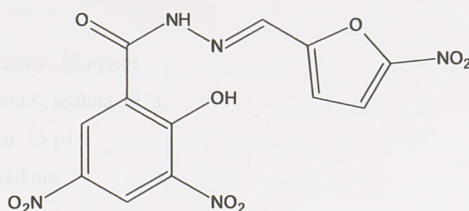
38 Nifursol

Obsah

38.1 Vlastnosti	338
38.2 Metody stanovení	338
38.3 Pracovní postup stanovení dimetridazolu v krmivech	340
38.3.1 Extrakce	340
38.3.2 HPLC podmínky	341
Literatura	341

38.1 Vlastnosti

Nifursol (38.I) je derivát kyseliny 3,5 dinitrosalicylové (3,5-dinitro-2'-(5-nitrofurfuryliden)salicylohydrazid, [CAS=16915-70-1], sumárního vzorce $C_{12}H_7N_5O_9$ o molekulové hmotnosti 365,21 g/mol) se používá k prevenci histaminózy krůt jak chemoterapeutikum a je stimulatorem růstu v dávce kolem 50-75 mg/kg. Dobře rozpustný v tetrahydrofuranu, acetonu, acetonitrilu, dimethylformamidu, méně rozpustný ve vodě, nerozpustný v hexanu, etheru. UV spektrum vykazuje jedno absorpční maximum při 383 nm (rozpuštěldo tetrahydrofuran - voda, 1+1).



(38. I)

38.2 Metody stanovení

Podle oficiálních metodik sdružení AOAC se nifursol v krmivech stanoví po extrakci do dimethylformamidu a přečištění extraktu na bazické alumině spektrofotometricky.^{1,2} Nifursol se detekuje po reakci s fenylhydrazinem za vzniku 5-nitrofurfuralfenylhydrazonu. Re-

3 Vývoj a validace metod

Obsah

3.1 Vývoj metod	39
3.1.1 Vývoj a optimalizace metody.....	39
3.1.2 Praktické příklady	40
3.1.2.1 Optimalizace extrakce technikou kapalina-kapalina	40
3.1.2.2 Optimalizace přečištění extraktu technikou SPE.....	42
3.1.2.3 Optimalizace podmínek detekce - selektivita	44
3.1.2.4 Optimalizace podmínek extrakce.....	45
3.1.2.5 Ovlivnění směrodatné odchylky stanovení.....	46
3.2 Validace metod.....	48
3.2.1 Definice	48
3.2.2 Parametry	48
3.2.2.1 Doporučené postupy pro zjištění přesnosti a správnosti	49
3.2.3 Validací protokol	51
3.2.4 Systém suitability.....	51
Literatura	52

3.1 Vývoj metod

3.1.1 Vývoj a optimalizace metody

V současné době je vývoj metod založen na zpracování existujících literárních údajů zahrnující získání informací o fyzikálně-chemických vlastnostech analytu (spektrální vlastnosti, rozpustnost ve vodě a organických rozpouštědlech, disociační konstanty, stabilita analytu, termální, fotochemická a chemická degradace), vlastnostech vzorku (složení, homogenita, velikost částic, skupenství aj.) a analytických metodách zkoušení v daných nebo podobných materiálech. Vždy jsou dostupné některé informace z nichž se pak vychází, dále je pak nutné přizpůsobit vývoj nebo optimalizaci metody vzhledem k nám dostupné instrumentaci a pomocnému zkušebnímu zařízení. Investice do vývoje nových metod se vyplatí v případě, že neexistuje vhodná metoda pro daný analyt a matici vzorku, existující metody jsou příliš drahé, časově náročné, nejsou správné a přesné, jsou málo citlivé nebo je třeba vyvinout alternativní metodu ke confirmaci metody stávající.

Antibaktericidní přípravky

39 Sulfonamidy

Obsah

39.1 Vlastnosti	343
39.1.1 Sulfadiazin.....	345
39.1.2 Sulfadimethoxin.....	345
39.1.3 Sulfamerazin.....	345
39.1.4 Sulfamethazin.....	347
39.1.5 Sulfamethizol.....	348
39.1.6 Sulfamethoxazol.....	348
39.1.7 Sulfamethoxyypyridazin.....	348
39.1.8 Sulfachinoxalin.....	348
39.1.9 Sulfapyridin.....	348
39.1.10 Sulfapyrazin.....	349
39.1.11 Sulfathiazol.....	349
39.1.12 Sulfamethylthiazol.....	349
39.2 Metody stanovení	349
39.2.1 Extrakce.....	349
39.2.2 Metody TLC a spektrofotometrické metody.....	350
39.2.3 Metody separační.....	350
Literatura	354

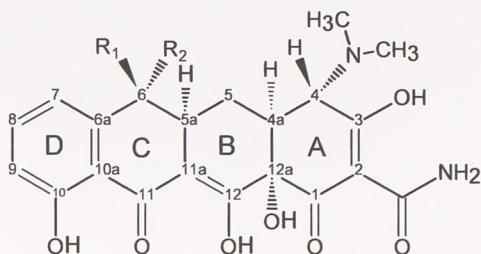
40 Tetracyklinová antibiotika

Obsah

40.1 Vlastnosti	355
40.1.1 Chlortetracyklin.....	359
40.1.2 Doxycyklin.....	359
40.1.3 Oxytetracyklin.....	360
40.1.4 Tetracyklin.....	360
40.2 Metody stanovení	361
40.2.1 Mikrobiologické metody stanovení.....	361
40.2.2 Spektrální metody.....	361
40.2.3 HPLC metody.....	362
40.3 Pracovní postup stanovení tetracyklinových antibiotik v krmivech	367
40.3.1 Extrakce.....	367
40.3.2 HPLC podmínky pro chlortetracyklin, tetracyklin a doxycyklin.....	367
40.3.2 HPLC podmínky pro oxytetracyklin.....	367
Literatura	368

40.1 Vlastnosti

Tetracykliny jsou semi-syntetického původu odvozené od systému čtyř anelovaně spojených šestičlenných cyklů (1, 4, 4a, 5, 5a, 6, 11, 12a-oktahydronaftalen). Molekula tetracyklinu obsahuje pět asymetrických center - C-4, -4a, -5a, -6, a -12a. Struktura tetracyklinu byla jednoznačně objasněna použitím techniky $^1\text{H NMR}^{1,2,3}$ a IR spektroskopie.⁴ Obecná struktura tetracyklinů je znázorněna na obrázku č. 40.1.



Obrázek č. 40. 1 Obecná struktura tetracyklinových antibiotik

β -Laktamová antibiotika

41 Amoxicillin

Obsah

41.1 Vlastnosti	370
41.2 Metody stanovení	371
Literatura	373

β -Laktamová antibiotika jsou dipeptidické sloučeniny cysteinu a valinu obsahující ve své molekule thiazolidinový kruh a β -laktamový kruh, na který je vázán acylový postranní řetězec, který udává hlavní vlastnosti antibiotika a jejich rozdílnosti v chemických a farmakologických vlastnostech. Díky přítomnosti volné karboxylové skupiny v jejich molekule, vystupují jako poměrně silné kyseliny. Na druhé straně, přítomnost volné aminoskupiny v postranním acylovém řetězci u některých antibiotik (ampicillin $pK_{COO^-} = 2,6$; $pK_{NH_3^+} = 7,2$), propůjčuje antibiotikám amfoterní vlastnosti. β -laktamová antibiotika v roztoku jsou stabilní v rozmezí pH 6-7, pro amfoterní antibiotika je maximální stabilita v jejich isoelektrickém bodě. β -laktamový kruh je snadno atakován nukleofilními činidly a ztrácí pak svou biologickou aktivitu.

41.1 Vlastnosti

Amoxicillin (také AMPC, alafamox, almodan, amocilline, amopenixin, amoxipen, betamox, simoxil, sumox) patří mezi β -laktamová antibiotika. Chemicky se jedná o [2S-[2 α ,5 α ,6 β (S*)]]-6-[[amino(4-hydroxyphenyl)acetyl]amino]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptane-2-karboxylovou kyselinu o sumárním vzorci $C_{16}H_{19}N_3O_5S$ (CAS [26787-78-0]) a molekulové hmotnosti 365,41 g/mol. Amoxicillin se vyskytuje také jako trihydrát hydrochloridu (CAS [61336-70-7]) s teplotou tání mezi 216 – 218 °C. Amoxicillin má dvě charakteristická absorpční maxima v závislosti na použitém rozpouštědle. Pro ethanol platí: $\lambda_1=230$ ($\epsilon=10\ 850$), $\lambda_2=274$ ($\epsilon=1\ 400$); pro 0,1M HCl $\lambda_1=229$ ($\epsilon=9\ 500$), $\lambda_2=272$ ($\epsilon=1\ 080$) a pro 0,1M KOH $\lambda_1=248$ ($\epsilon=2\ 200$), $\lambda_2=291$ ($\epsilon=3\ 000$) kde ϵ je molární absorpční koeficient v l/mol/cm. Amoxicillin je rozpustný v polárních rozpouštědlech (mg/100 ml při 25 °C): ve vodě 400, methanol – 750 a abs. ethanol – 340 (platí pro trihydrát hydrochloridu). Neroz-

Vitaminy rozpustné v tucích

4 Vitamin A a karotenoidy

Obsah

4.1 Vlastnosti vitaminu A.....	53
4.1.1 Fyzikálně chemické vlastnosti.....	53
4.1.2 Spektrální vlastnosti.....	55
4.1.3 Biologická aktivita a mezinárodní jednotka vitaminu A.....	57
4.1.4 Stabilita vitaminu A.....	58
4.2 Analytické stanovení vitaminu A.....	58
4.2.1 Příprava vzorku a manipulace se vzorkem.....	59
4.2.2 Alkalická hydrolyza a alkoholýza.....	60
4.2.3 Přímá extrakce.....	62
4.2.4 Extrakce a přečištění extraktu.....	63
4.2.5 Analytická koncovka stanovení.....	66
4.2.5.1 HPLC metody.....	66
4.2.5.2 Ostatní metody stanovení.....	67
4.3 Vlastnosti karotenoidů.....	70
4.3.1 Fyzikálně chemické vlastnosti.....	70
4.3.2 Stabilita karotenoidů.....	76
4.3.3 Spektrální charakteristika a identifikace.....	77
4.4 Stanovení karotenoidů.....	80
4.4.1 Extrakce.....	80
4.4.2 Metody stanovení.....	81
Literatura.....	83

4.1 Vlastnosti vitaminu A

4.1.1 Fyzikálně chemické vlastnosti

Účinnou formou vitaminu A jsou retinol a retinal (4.I). Molekula retinolu obsahuje ve své molekule β -jonový kruh (4-{2,6,6-trimethyl-2-cyklohexen-1-yl}-3buten-2-on) a pět konjugovaných dvojných vazeb, z nichž čtyři jsou v postranním řetězci (čtyři isoprenové jednotky,

5 Vitamin E

Obsah

5.1 Vlastnosti	87
5.1.1 Fyzikálně chemické vlastnosti	87
5.1.2 Biologická aktivita a mezinárodní jednotka vitaminu E	89
5.1.3 Spektrální vlastnosti	90
5.1.4 Stabilita vitaminu E	91
5.1.5 Deriváty tokoferolů.....	91
5.2 Stanovení vitaminu E.....	93
5.2.1 HPLC metody.....	94
5.2.1.1 Separace	94
5.2.1.2 Detekce.....	96
5.2.2 Ostatní metody stanovení	99
5.3 Zdroje chyb při stanovení vitaminu A, karotenoidů a vitaminu E	100
5.4 Stanovení vitaminu A, β-karotenu a vitaminu E.....	101
Literatura.....	102

5.1 Vlastnosti

5.1.1 Fyzikálně chemické vlastnosti

Strukturálním základem, který je společný všem sloučeninám vykazujícím aktivitu vitaminu E (tzv. vitagenům E) jsou tokol (2-methyl-2-(4', 8', 12'-trimethyltrideca)-chroman-6-olu; obrázek č.5.1) a tokotrienol (2-methyl-2-(4', 8', 12'-trimethyldeca-3',7', 11'-trienyl)-chroman-6-olu; obrázek č. 5.2), které obsahují chromanový cyklus s nasyceným (tokoferoly) nebo nenasyčeným (tokoly) isoprenoidním postranním řetězcem o 16 atomech uhlíku.¹ Jednotlivé tokoferoly a tokotrienoly se liší polohou a počtem methylových skupin v chromanovém cyklu. Tokoly jsou charakterizovány plně nasyceným postranním uhlíkovým řetězcem obsahující tři isoprenové jednotky. Tokotrienoly mají dvojné vazby v postranním řetězci v poloze C-3', C-7' a C-11'. Přítomnost chirálních center na uhlíku v poloze C-2 chromanového kruhu a na uhlíku C-4' a C-8' postranního řetězce tokolu je příčinou tvorby 8 možných diastereoisomerů. Tokotrienoly obsahující tři dvojné vazby v postranním řetězci se mohou vyskytovat v osmi různých *cis*- resp. *trans*-isomerech a jejich kombinacích.

6 Vitamin D

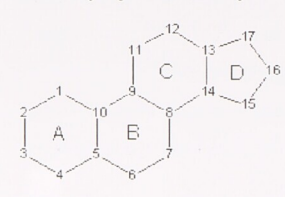
Obsah

6.1 Vlastnosti	105
6.1.1 Fyzikálně chemické vlastnosti	105
6.1.3 Stabilita vitamínu D	108
6.2 Stanovení vitamínu D	110
6.2.1 Hydrolyza a extrakce vitamínu D	110
6.2.2 Přímá extrakce	111
6.2.3 Přečištění extraktu	113
6.2.3.1 Semipreparativní HPLC	113
6.2.3.2 On-line 2D-HPLC	114
6.2.4 HPLC metody	115
6.2.5 Ostatní metody stanovení	119
Literatura	122

6.1 Vlastnosti

6.1.1 Fyzikálně chemické vlastnosti

Vitamin D se zařazuje z chemického hlediska mezi steroidy, které jsou odvozeny od uhlovodíku cyklopentanoperhydrofenanthrenu. Podle nomenklatury se jednotlivé kruhy označují velkými písmeny A, B, C a D a číslování uhlíků začíná na kruhu A (6.I). Číslování postupuje podle sledu kruhů, pouze angulární methylové skupiny na C10 a C13 jsou číslovány tak, že angulárnímu metylu mezi kruhy C a D přísluší nižší číslice než metylu mezi kruhy A a B. Struktura vitamínu D vychází z cholesterolu¹ a přeměna provitamínu na previtamin D vyžaduje otevření kruhu B mezi atomy uhlíku C9 a C10 (6.II). Struktury vitamínu D s otevřeným kruhem se nazývají secosteroidy.



(6. I)

7 Vitamin K

Obsah

7.1 Vlastnosti	124
7.1.1 Vlastnosti vitaminů skupiny K.....	127
7.1.2 Spektrální vlastnosti vitaminů skupiny K.....	128
7.1.3 Stabilita vitaminů skupiny K.....	129
7.2 Stanovení vitaminu K	129
7.2.1 Extrakce.....	129
7.2.2 Přečištění extraktu.....	130
7.2.3 HPLC metody.....	132
7.2.3.1 Separace.....	132
7.2.3.2 Detekce.....	132
7.2.4 Ostatní metody stanovení.....	134
Literatura	136

7.1 Vlastnosti

Všechny látky vykazující aktivitu vitaminu K jsou deriváty 2-methyl-1,4-naftochinonu (7.I) s nenasyceným isoprenoidním postranním řetězcem v poloze C-3 aromatického jádra. V současné době se rozlišují dva druhy vitaminu K v závislosti na struktuře postranního řetězce.

Vitamin K₁, K₁₍₂₀₎ (7.II) [CAS=84-80-0] neboli fyllochinon obsahuje hexahydrotetraperynový řetězec fytyl (2-methyl-3-(3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecyl)-1,4-naftochinon) a vyskytuje se jako 2'-*trans*,7'R, 11'R stereoisomer. Isomer s *cis*- konfigurací v postranním řetězci není biologicky aktivní. Postranní řetězec obsahuje 20 atomů uhlíku (4 isoprenové jednotky z nichž 3 jsou redukované). Vitamin K₁ se vyskytuje v potravinách rostlinného původu.

¹ Ollivier J., Thibault A., Kuylenstierna B.: *J. Biol. Chem.* 236, 1266 (1961).

² Smith D.C., Muecke B.E.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 56, 177 (1973).

³ van Nuland P.J., Smit S.C.D.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 57, 497 (1974).

⁴ Pecher H., Weller P.: *Mit. Gebiete Lebensm. Hyg.* 6, 112 (1963).

⁵ Goshof J.J., van den Hulst J.W.: *Recht. PNR Dairy* 42, 423 (1966).

⁶ DeVito J.W., Zeeman J., Esch R.J.E., Bange A., Muller F.J.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 62, 129 (1979).

⁷ Tachibana R.I., Capriano G.: *J. Chromatogr.* 136, 337 (1977).

⁸ Sato F., Steicher B., Balowsky T.: *J. Chromatogr.* 746, 105 (1982).

Vitaminy rozpustné ve vodě

8 Vitamin B₁ (Thiamin)

Obsah

8.1 Vlastnosti	138
8.1.1 Obecné vlastnosti.....	138
8.1.2 Spektrální vlastnosti	139
8.1.3 Stabilita thiaminu a reakce.....	139
8.2 Stanovení vitamínu B₁	141
8.2.1 Extrakce a přečištění extraktu	141
8.2.2 Fluorimetrické metody	142
8.2.3 HPLC metody.....	144
8.2.4 Ostatní metody stanovení	145
8.3 Pracovní postup stanovení vitamínu B₁ v potravinách a krmivech	146
8.3.1 Extrakce.....	146
8.3.2 HPLC podmínky	147
Literatura	148

8.1 Vlastnosti

8.1.1 Obecné vlastnosti

Molekula thiaminu obsahuje pyrimidinový cyklus spojený methylenovou skupinou na uhlíku C-5 s dusíkem thiazolového cyklu a z chemického hlediska se jedná o 3-[4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl]-5-(2-hydroxyethyl)-4-methylthiazoliniumchlorid, sumárního vzorce C₁₂H₁₇ClN₄OS.X. Thiamin (8.I) se vyskytuje především jako volná látka a ve formě fosforečnanových esterů (mono-, di- a trifosfátu). Vyrábí se také syntetický chlorid (X=Cl⁻) [CAS = 67-03-8] nebo nitrát (X=NO₃⁻) [CAS = 532-43-4] thiaminu. Molekulová hmotnost M_r(X=Cl⁻) = 337,28 g/mol, M_r(X=NO₃⁻) = 327,4 g/mol.

Thiamin hydrochlorid je bílý krystalický prášek, velmi rozpustný ve vodě (1000 g/l) a glycerolu (56 g/l), méně rozpustný v ethanolu (10 g/l 95 % ethanolu, 3 g/l abs. ethanolu), nerozpustný v etheru, benzenu, acetonu, chloroformu a hexanu. Thiamin hydrochlorid krystalizuje