

CHROM. 6206

Méthode de dosage de la chlortétracycline et de l'oxytétracycline en mélange dans un lait réengraissé

Tel qu'il est décrit dans le recueil des méthodes d'analyse de l'Association of Official Agricultural Chemists¹ ou dans les méthodes de la Communauté Économique Européenne², le dosage de faibles concentrations de tétracyclines, par diffusion dans un milieu gélosé ensemencé avec *Bacillus cereus*, est attrayant par sa simplicité d'exécution. Mais il se révèle incapable de mesurer, dans un mélange de tétracyclines, l'activité propre à chacun de ces antibiotiques par suite du manque de sélectivité des solvants d'extraction proposés et de la sensibilité du germe à tous les antibiotiques de ce groupe.

Or, les trois substances principales qui le constituent, oxytétracycline (OTC), chlortétracycline (CTC) et tétracycline (TC), peuvent se retrouver associées dans un aliment pour animaux. Leur efficacité biologique pouvant être très variable, selon l'espèce animale considérée et son état physiologique, il est indispensable de disposer de méthodes non seulement de détection mais encore de dosage spécifiques.

Dans ce domaine, la chromatographie de partage sur papier a suscité l'intérêt de plusieurs chercheurs. En 1957, SELZER ET WRIGHT³, étudiant des produits pour l'alimentation animale contenant un mélange de 1,000 à 12,000 p.p.m. de tétracyclines, ont séparé par cette technique la CTC de l'OTC. Les zones d'activité, localisées en lumière UV, ont été découpées et, après élution, l'antibiotique dosé par la méthode de GROVE ET RANDALL⁴. BLAKELY *et al.*⁵, en 1969, ont recherché et identifié par chromatographie les tétracyclines éventuellement présentes dans le poisson conservé et ont procédé, lorsqu'ils n'en mettaient qu'une seule en évidence, à son dosage par la méthode de KRAMER *et al.*⁶.

Nous avons, dans notre étude, cherché à assurer non seulement la séparation, mais encore le dosage de la CTC et de l'OTC aux concentrations où elles sont habituellement présentes dans les aliments des animaux (10-160 p.p.m.).

Étude critique de la méthode

Les tétracyclines sont extraites par un mélange méthanol-acétone-acide chlorhydrique (49:49:2). L'extrait est déposé sur papier Schleicher & Schüll 2040b préalablement humidifié par de l'acétone-tampon McIlvaine pH 4.6 (30:70) (BLAKELY *et al.*⁵). Après migration du solvant sur 20 cm, les antibiotiques sont révélés par bioautographie sur gélose ensemencée de *Bacillus cereus* ATCC 11778, selon un principe analogue à celui décrit par MARTEN⁷. La détermination quantitative est effectuée par comparaison de la surface de la zone d'inhibition ou de sa racine carrée à une courbe étalon.

Les caractéristiques particulières de la méthode sont les suivantes:

(1) Chromatographie ascendante—Elle a l'avantage sur la chromatographie descendante citée par BIRD ET PUGH⁸ ainsi que par HICKEY ET PHILLIPS⁹ d'éviter des traînées lors de la migration.

(2) Humidification du papier par le mélange acétone-tampon pH 4.6—SELZER ET WRIGHT³ emploient un tampon pH 3.5. Cependant, BLAKELY *et al.*⁵ ayant remarqué,

dans ce cas, la formation de zones d'inhibition non spécifiques, nous avons adopté le tampon pH 4.6 que ces auteurs proposent.

(3) Composition de l'éluant—Plusieurs éluants ont été préconisés pour la séparation chromatographique des tétracyclines (BLAKELY *et al.*⁵, MARTEN⁷) mais la composition que nous avons retenue (nicrométhane-chloroforme- α -picoline, 20:10:3) donne, après bioautographie, des taches à contours plus nets favorables à un dosage précis.

(4) Utilisation du bleu de méthylène—L'addition de ce colorant au milieu de culture non seulement accentue, par contraste, la mise en évidence des zones d'inhibition mais encore les révèle sur le papier et facilite leur délimitation sur le chromatogramme lui-même, leur mesure et leur conservation ultérieures.

(5) Mesure des zones d'inhibition par planimétrie—Nos essais ont montré que, suivant la quantité d'antibiotique déposée et la sensibilité du germe test, le logarithme de la concentration est relié linéairement soit à la surface de la zone d'inhibition soit à sa racine carrée.

Application et résultats

Cette technique a été appliquée à la détermination du taux de recouvrement de la CTC et de l'OTC:

(1) Dans une solution contenant un mélange de ces deux substances—La Fig. 1 montre que, dans ce cas, la séparation des deux antibiotiques est satisfaisante (R_F

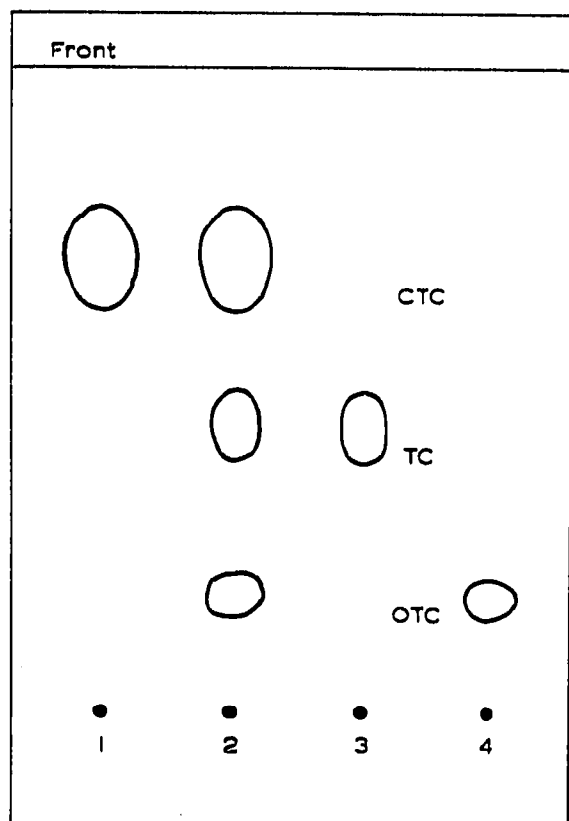


Fig. 1. Séparation des tétracyclines pures. (1) 0.0075 μ g de CTC; (2) 0.0075 μ g de CTC + 0.020 μ g de TC + 0.015 μ g de OTC; (3) 0.020 μ g de TC; (4) 0.015 μ g de OTC.

voisins de 0.70 pour la CTC et 0.20 pour l'OTC) et que, de plus, aucune des deux tétracyclines n'interfère dans le taux de recouvrement de l'autre; ces taux sont respectivement de 106% pour 0.75 $\mu\text{g/ml}$ de CTC et 102% pour 1.5 $\mu\text{g/ml}$ d'OTC.

(2) Ajoutées en solution à un lait réengraissé par 35% de suif (constituant principal des aliments pour veaux) soit isolément, soit en mélange—Les teneurs choisies étaient de 80 p.p.m. pour la CTC et de 160 p.p.m. pour l'OTC.

L'examen des données analytiques permet les conclusions suivantes: (a) dans le cas d'un seul antibiotique, le dosage réalisé par la méthode proposée donne des pourcentages de recouvrement comparables à ceux obtenus par les techniques microbiologiques classiques, soit 116% pour la CTC et 96% pour l'OTC; (b) le dosage quantitatif d'un mélange de CTC et d'OTC (Tableau I) peut être réalisé avec autant de précision que dans le cas de solutions pures, le lait n'ayant par lui-même aucune action interférente.

De la même façon il serait possible de procéder au dosage de la TC qui pourrait se trouver associée aux deux antibiotiques précédents; dans les conditions d'analyse retenues la séparation des trois tétracyclines est, en effet, très nette (Fig. 1).

TABLEAU I

RECouvreMENT DE CHLORTÉTRACYCLINE (80 p.p.m.) ET D'OXYTÉTRACYCLINE (160 p.p.m.) AJOUTÉES EN MÉLANGE À UN LAIT RÉENGRASSÉ À 35% DE SUIF

Essai	Chlortétracycline		Oxytétracycline	
	Quantité trouvée (p.p.m.)	Recouvrement (%)	Quantité trouvée (p.p.m.)	Recouvrement (%)
1	81	101	146	91
2	74	93	177	111
3	92	115	171	107
4	89	111	183	114
5	82	103	172	107
Moyenne	84	105	170	106
S	7		14	
C.V. %	8		8	

Conclusion

La méthode que nous avons décrite trouve une application concrète dans le dosage des aliments d'allaitement pour veaux; la CTC et l'OTC y sont en effet souvent associées dans des proportions voisines de celles citées dans cette note.

Ce mélange d'antibiotiques peut également être présent à des doses plus faibles (10 à 20 p.p.m.) dans des formules très différentes et destinées à d'autres espèces animales. Il sera alors vraisemblablement nécessaire de modifier certains détails du mode opératoire pour rester dans les limites des concentrations de la présente méthode.

Nous remercions THÉRÈSE MERA pour sa collaboration technique.

Institut National de la Recherche Agronomique,
Laboratoire d'Essai et d'Analyse des Aliments,
1, rue Santos Dumont, Paris 15^e (France)

FERNANDE BOZZI
PAULETTE VALDEBOUZE

- 1 *Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists*, Ass. Offic. Agr. Chem., Washington, 10th ed., 1965.
- 2 *Méthodes de la C.E.E.*, document non publié.
- 3 G. B. SELZER ET W. W. WRIGHT, *Antibiot. Chem.*, 7 (1957) 292.
- 4 D. C. GROVE ET W. A. RANDALL, *Assay Methods of Antibiotics; A Laboratory Manual*, Medical Encyclopedia, New York, 1955, p. 50.
- 5 J. BLAKELY, J. KRAMER ET G. B. SELZER, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 52 (1969) 935.
- 6 J. KRAMER, G. G. CARTER, B. ARRET, J. WILNER, W. W. WRIGHT ET A. KIRSHBAUM, *Antibiotics Residues in Milk, Dairy Products, and Animal Tissues: Methods Reports and Protocols*, National Center for Antibiotics and Insulin Analysis, Food and Drug Administration, Washington, October 1968.
- 7 G. MARTEN, *Landwirt. Forsch.*, 17 (1964) 277.
- 8 H. L. BIRD ET C. T. PUGH, *Antibiot. Chem.*, 4 (1954) 750.
- 9 R. J. HICKEY ET W. F. PHILLIPS, *Anal. Chem.*, 26 (1954) 1640.

Reçu le 1 mars 1972 ; manuscrit modifié reçu le 19 juin 1972

J. Chromatogr., 72 (1972) 426-429