

CHROM. 6941

Note

Méthode d'identification des antibiotiques dans les aliments pour animaux par chromatographie en couche mince

DANIELLE FRÈRES et PAULETTE VALDEBOUZE

Institut National de la Recherche Agronomique, Laboratoire d'Essai et d'Analyse des Aliments, J, Rue Santos Dumont, Paris 15° (France)

(Reçu le 21 mai 1973; manuscrit modifié reçu le 17 juillet 1973)

L'addition des antibiotiques aux aliments des animaux pose à l'analyste de nombreux problèmes: s'il est relativement facile de mettre en évidence une action antimicrobienne, il est beaucoup plus compliqué d'en connaître l'origine. En effet, outre le fait que plusieurs antibiotiques peuvent être présents en même temps dans un même aliment, d'autres substances naturelles ou ajoutées (sulfamides, anticoccidiens etc.) peuvent être responsables de l'activité antimicrobienne observée.

Il est donc nécessaire de pouvoir identifier ces substances avant de procéder à leur dosage par des méthodes microbiologiques très sensibles, mais peu spécifiques, qui seules peuvent être mises en oeuvre en raison des faibles teneurs présentes dans les aliments des animaux.

La chromatographie en couche mince a été décrite dans de nombreuses études portant sur la classification des antibiotiques en plusieurs groupes (Aszalos *et al.*¹, Ikekawa *et al.*²) ou sur la séparation de substances d'un même groupe: tétracyclines (Sonanini et Anker³), érythromycines (Anderson⁴), antibiotiques glycosidiques (Borowiecka⁵, Ito *et al.*⁶) mais, dans tous les cas, les travaux portent sur des échantillons à teneur élevée en antibiotique.

En raison de l'intérêt qu'il présente (rapidité, simplicité, facilité d'implantation dans un laboratoire) c'est ce procédé que nous avons retenu, mais la méthode que nous proposons s'applique par contre aux très faibles concentrations rencontrées en alimentation animale: 2-20 ppm; elle permet, après révélation bioautographique, d'identifier 10 des antibiotiques les plus couramment utilisés: tétracycline, chlortétracycline, oxytétracycline, bacitracine, érythromycine, oléandomycine, spiramycine, tylosine, virginiamycine, pénicilline.

MÉTHODE

Réactifs

Tous les réactifs sont purs pour analyse: méthanol, acétone, chloroforme débarrassé de l'éthanol par passage sur une colonne d'alumine Merck 1097, acétonitrile, hexane, éthanol.

Tampons: phosphate-bicarbonate pH 8 (phosphate dipotassique (16.73 g)-phosphate monopotassique (0.523 g)-carbonate monosodique (20 g)-eau (q.s.p. 1000

ml)); phosphate pH 6.5 (phosphate dipotassique (22.15 g)–phosphate monopotassique (27.85 g)–eau (q.s.p. 1000 ml)); acide citrique–phosphate pH 3.7 (acide citrique 0.1 M (66 ml)–phosphate disodique 0.2 M (34 ml)).

Solution d'imprégnation: mélange tampon pH 3.7–glycerol (19:1).

Solvants d'extraction: méthanol–acide chlorhydrique *N* (9:1); méthanol–tampon phosphate bicarbonate pH 8 (1:1).

Solvants de migration: (A) chloroforme–acétone–solution d'imprégnation (5:5:2); (B) éthanol–eau–ammoniaque (8:1:1); (C) chloroforme–méthanol (9:1); (D) méthanol–acétone (3:2).

Réactifs colorants: solution éthanolique à 0.5% de bleu de méthylène; solution à 10% de chlorure de triphényltétrazolium et à 10% de glucose (solution de CTT).

Matériel

Deux sortes de plaques (200×200×0.5 mm) sont utilisées: plaque de silica gel G (Merck) activée 1 h à 110° avant emploi; plaque de terre siliceuse G (Merck) ayant subi un traitement préalable: ces plaques sont plongées dans une cuve à chromatographie contenant 100 ml de solution d'imprégnation et séchées à l'air libre pendant 45 min avant emploi.

Germes

Sarcina lutea ATCC 9341; *Bacillus cereus* ATCC 11778; *Micrococcus flavus* ATCC 10240.

La composition des milieux de culture, leur pH, les réactifs colorants ajoutés pour faciliter la révélation des taches et les conditions d'incubation sont indiqués au Tableau I. Il faut signaler que, pour compenser l'acidité relative des plaques, ces pH sont plus alcalins que ceux généralement utilisés pour ces germes. Les deux réactifs

TABLEAU I
CONDITIONS DE RÉVÉLATION MICROBIOLOGIQUE DES PLAQUES

Milieu de culture	Germe		
	<i>Sarcina lutea</i> ATCC 9341	<i>Micrococcus flavus</i> ATCC 10240	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778
Peptone	5.0 g	6.0 g	6.0 g
Tryptone		4.0	
Extrait de boeuf	1.5 g	1.5 g	1.5 g
Extrait de levure	1.5 g	3.0 g	3.0 g
Chlorure de sodium	3.5 g		
Glucose		1.0 g	
Gélose	10.0 g	10.0 g	10.0 g
Eau	1000 ml	1000 ml	1000 ml
pH	8.3	8.5	8.7
Incubation	20 h à 30°	16 h à 37°	16 h à 30°
Réactif colorant	solution de CTF		solution de bleu de méthylène

colorants sont employés différemment : la solution de bleu de méthylène est ajoutée au bouillon gélosé avant ensemencement à raison de 0.7% et celle de CTT est vaporisée sur les plaques à la fin du temps d'incubation dès la sortie de l'étuve. Dans le premier cas les taches antibiotiques apparaissent en bleu foncé sur fond bleu pâle et dans le second en blanc sur fond rouge.

TECHNIQUE DE DOSAGE

Préparation des extraits

Extraction des tétracyclines et de la bacitracine. Une préextraction est nécessaire pour éviter la trop grande concentration de substances gênantes.

Dans un pot à centrifuger, 20 g d'aliment sont agités avec 100 ml d'hexane puis 100 ml d'acétonitrile chaud (50°). Les surnageants sont rejetés, l'aliment est séché sous vide, puis agité avec 100 ml du mélange méthanol-acide chlorhydrique pendant 30 min. Après centrifugation (10 min à 4000 g), 5 ml de surnageant sont mis de côté (*extrait A*).

Le reste du surnageant est évaporé sous vide, repris par 5 ml de tampon phosphate pH 6.5, amené à pH 6.5 par NaOH 10 N et complété à 10 ml par du méthanol. Cette solution est agitée avec 50 ml de chloroforme et utilisée telle que après rejet de la solution chloroformique (*extrait B*).

Extraction des macrolides. 20 g d'aliment sont agités pendant 30 min avec 100 ml du mélange méthanol-tampon phosphate bicarbonate pH 8. Après centrifugation (10 min à 4000 g), 5 ml de surnageant sont mis de côté (*extrait C*).

Le reste du surnageant est agité avec un égal volume de chloroforme. La solution chloroformique est concentrée sous vide et le résidu est repris par 5 ml de chloroforme (*extrait D*).

Chromatographie

Chaque extrait est chromatographié suivant le schéma indiqué au Tableau II. Sur chaque plaque est déposée, en référence, à côté de l'extrait, la (les) solution(s) de

TABLEAU II
CONDITIONS DE CHROMATOGRAPHIE DES EXTRAITS

No. plaque	Extrait	Quantité déposée (µl)	Adsorbant	Solvant de migration	Germe de détection	Antibiotiques mis en évidence
1	A	50	terre siliceuse G imprégnée	solvant A	<i>B. cereus</i>	les tétracyclines
2	B	250 (en bande)	silica gel G	solvant B	<i>M. flavus</i>	bacitracine
3	C	10	silica gel G	solvant C	<i>S. lutea</i>	pénicilline, tylosine, virginiamycine
4	D	20	silica gel G	solvant D	<i>S. lutea</i>	érythromycine, oléandomycine
5	D	20	silica gel G	solvant D	<i>M. flavus</i>	érythromycine, oléandomycine
6	D	20	terre siliceuse G imprégnée	solvant A	<i>M. flavus</i>	spiramycine

l'antibiotique pur recherché. A la sortie des cuves à chromatographie, les plaques sont séchées, placées sur d'autres plaques en verre plus grandes, et entourées d'un cadre en matière plastique. Après lutation du moule ainsi formé, 100 ml de bouillon gélosé ensemencé sont répandus sur la plaque préalablement amenée à la température du milieu de culture (50°) par un séjour de 15 min dans une étuve. Après refroidissement, les cultures sont mises à incuber à 30° ou 37° selon le germe choisi.

La lecture commence par les plaques 4 et 5. Tous les antibiotiques cités sauf les tétracyclines apparaissent mais seul peut être identifié avec certitude le groupe érythromycine-oléandomycine. La présence des autres antibiotiques est confirmée par la lecture des plaques 2, 3 et 6. Les tétracyclines sont mises en évidence à la seule lecture de la plaque 1.

Interprétation des chromatogrammes

Les chromatogrammes sont interprétés en s'aidant des Tableaux II et III. Il faut toutefois avoir présent à l'esprit que les R_F n'ont qu'une valeur indicative et que c'est surtout la comparaison avec la solution étalon qui permet l'identification d'un antibiotique.

TABLEAU III

R_F DES ANTIBIOTIQUES DANS LES DIFFÉRENTS SOLVANTS

<i>Antibiotique</i>	R_F			
	<i>Solvant D</i>	<i>Solvant C</i>	<i>Solvant B</i>	<i>Solvant A</i>
Chlortétracycline	0	0	invisible	0.55
Oxytétracycline	0	0	invisible	0.18
Tétracycline	0	0	invisible	0.28
Bacitracine	0	0	0.75	0
Erythromycine	0.30	0.15	0.93	0.35
Oléandomycine	0.35	0.17	0.93	0.30
Spiramycine	0.50	0.29 et 0.39	0.99	0
Tylosine	0.85	0.39	1.0	0.75
Virginiamycine	0.90	0.62	0.95	1.0
Pénicilline	0.90	0	invisible	1.0

DISCUSSION

Cette méthode a été testée sur des aliments contenant plusieurs antibiotiques inconnus de l'expérimentateur.

À la concentration de 10 ppm, les antibiotiques ont été régulièrement mis en évidence quels que soient les mélanges rencontrés. À 5 ppm, il en est de même sauf pour la bacitracine qui n'est pas toujours identifiée. Par contre, l'oléandomycine a pu être détectée facilement jusqu'à 2 ppm. Cependant, les R_F de l'érythromycine et de l'oléandomycine étant très voisins, il est seulement possible de conclure à la présence de l'un ou de l'autre sans préciser davantage. Une étude est actuellement en cours pour les séparer.

Les mélanges étudiés contenaient quelquefois des antibiotiques glycosidiques ou

de l'hygromycine. Ils n'interfèrent pas dans cette méthode, étant insolubles dans nos conditions d'extraction et, à faibles doses, sans activité sur les germes choisis.

Par contre les anticoccidiens peuvent être solubles dans ces solvants. C'est pourquoi une étude systématique de leur comportement a été entreprise en surchargeant les aliments, aux doses actuellement autorisées en France, par des solutions pures: amprolium, buquinolate, carbadox, chlorhydroxyquinoléine, clopidol, décoquinate, dimétridazole, dinitro-*o*-toluamide, éthopabate, furoxone, méthylbenzoquate, nifursol, nitrofurazone, payzone, ronidazol.

Parmi tous ces additifs, seul le payzone interfère au niveau de la chlortétracycline; on vérifie sa présence par la méthode de Bories⁷ et celle de la chlortétracycline par chromatographie de partage sur papier.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Edith Bergeron et Bernadette Gutel pour leur collaboration technique.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 A. Aszalos, S. Davis et D. Frost, *J. Chromatogr.*, 37 (1968) 487.
- 2 T. Ikekawa, F. Iwami, E. Akita et H. Umezawa, *J. Antibiot., Ser. A*, 16 (1963) 56.
- 3 D. Sonanini et L. Anker, *Pharm. Acta Helv.*, 39 (1964) 518.
- 4 T. T. Anderson, *J. Chromatogr.*, 14 (1964) 127.
- 5 B. Borowiecka, *Diss. Pharm. Pharmacol.*, 22 (1970) 345.
- 6 Y. Ito, M. Namba, N. Nagahama, T. Yamaguchi et T. Okuda, *J. Antibiot., Ser. A*, 17 (1964) 218.
- 7 G. F. Bories, *J. Chromatogr.*, 59 (1971) 467.