

CHROM. 6974

## Note

---

### Méthode d'identification des antibiotiques dans les aliments des animaux par électrophorèse sur gélose

FERNANDE BOZZI\* et PAULETTE VALDEBOUZE\*

*Institut National de la Recherche Agronomique, Laboratoire d'Essai et d'Analyse des Aliments, 1, Rue Santos Dumont, Paris 15° (France)*

(Reçu le 31 juillet 1973)

Dans une publication précédente<sup>1</sup> nous avons décrit une méthode d'identification, par chromatographie en couche mince, des antibiotiques dans les aliments pour animaux. Ce procédé, rapide et simple, possède cependant certaines limites: il se prête difficilement à un dosage quantitatif des substances détectées et son champ d'application ne couvre pas la totalité des antibiotiques incorporés aux aliments.

Lightbown et De Rossi<sup>2</sup> ont mis en évidence les possibilités apportées par l'électrophorèse sur gélose pour l'identification et le dosage, dans le sang et le lait, des antibiotiques utilisés en thérapeutique humaine. Une application limitée en a été faite dans le domaine de l'alimentation animale par Dubost et Pascal<sup>3</sup>, qui ont décrit une méthode de dosage de la spiramycine.

A partir des résultats exposés par ces chercheurs, nous avons tenté d'adapter cette technique à la détection et à l'identification des antibiotiques dans les aliments des animaux et recherché les conditions optimum de séparation électrophorétique et de révélation microbiologique pour leur dosage quantitatif.

La méthode proposée permet d'identifier quatorze antibiotiques aux doses recommandées pour leur efficacité zootechnique.

## MÉTHODE

### Matériel

Tous les produits sont de qualité "pour analyse"; la gélose pour électrophorèse est Noble Difco No. 0142-01.

Les solvants d'extraction sont: (I) (Solution aqueuse de phosphate monopotassique 3.84 mM, phosphate bipotassique 0.096 M et carbonate monosodique 0.238 M) pH 8-méthanol (1:1); (II) (solution aqueuse de phosphate monopotassique 58.8 mM, phosphate bipotassique 11.5 mM) pH 6-méthanol (1:1); (III) eau-méthanol-acétone-acide chlorhydrique *d* 1.19 (13:13:13:1).

Les électrolytes sont: (A) Tris(hydroxyméthyl)aminométhane 0.075 M, acide maléique 0.075 M et hydroxyde de sodium 0.023 M; (B) diéthylbarbiturate de sodium 0.10 M et acide diéthylbarbiturique 0.02 M.

Les germes et milieux de culture (g/l) utilisés sont: *Sarcina lutea* ATCC

---

\* Nouvelle adresse: Laboratoire de Technologie des Aliments des Animaux C.N.R.Z., 78350 Jouy-en-Josas, France.

9341 —peptone 5, extrait de viande 1.5, extrait de levure 1.5, chlorure de sodium 3.5, gélose 10; pH 9 après stérilisation. *Bacillus subtilis* ATCC 6633 —peptone 5, extrait de viande 3, gélose 10; pH 7.5 après stérilisation. *Micrococcus flavus* ATCC 10240 —tryptone 10, extrait de viande 1.5, extrait de levure 3, glucose 1, gélose 10; pH 8.4 après stérilisation. *Bacillus cereus* ATCC 11778 —tryptone 10, extrait de viande 1.5, extrait de levure 3, glucose 1, gélose 10; pH 6.6 après stérilisation, puis addition de 10 ml d'une solution éthanolique de bleu de méthylène à 0.5%.

Pour obtenir les solutions étalons de référence dans les solvants I, II et III, trois mélanges sont préparés et désignés respectivement par (1), (2) et (3); ils contiennent chacun en  $\mu\text{g/ml}$ : bacitracine 10, chlortétracycline 1, érythromycine 1, flavomycine 0.25, framycétine 4, néomycine 4, oléandomycine 1, pénicilline 1, spiramycine 1, streptomycine 4, tylosine 2, virginiamycine 2.

### Appareil

Appareil pour électrophorèse sous haut voltage (environ 1000 V) avec plateau refroidi. Plaque de verre de  $50 \times 30$  cm.

### Séparation et identification

*Préparation des extraits.* Trois prises d'essai sont prélevées: (a) 3 g, destinée à la recherche de la flavomycine et des macrolides (érythromycine-oléandomycine-spiramycine-tylosine), (b) 3 g, destinée à la recherche de la pénicilline, de la virginiamycine et du groupe framycétine-néomycine, (c) 5 g, destinée à la recherche de la bacitracine, des tétracyclines et de la streptomycine. A ces prises d'essai sont ajoutés respectivement 10 ml de solvant I (a), 10 ml de solvant II (b) ou 10 ml de solvant III (c). L'extraction est effectuée dans un homogénéiseur à haute vitesse. La phase liquide est séparée par centrifugation, et le surnageant (c) est amené à pH 6.0.

*Préparation de la plaque d'électrophorèse.* Un mélange extemporané à  $80^\circ$  est constitué à parties égales d'une solution aqueuse à 1% de gélose autoclavée 20 min à  $120^\circ$  et d'électrolyte A ou B. Il est versé uniformément sur la plaque en verre en couche de 1.4 mm d'épaisseur.

Après refroidissement, des cavités espacées de 4 à 5 cm sont découpées à l'emporte-pièce à environ 8 cm de la cathode pour la pénicilline et la flavomycine ou à 8 cm de l'anode pour les autres antibiotiques. 50  $\mu\text{l}$  des extraits (a), (b), (c) et des solutions étalon de référence (1), (2), (3), y sont répartis. Après un temps suffisant (15–30 min), les cavités sont complétées à l'aide de gélose tamponnée fondue de même composition que celle ayant servi à préparer la plaque.

*Électrophorèse.* Les cuves d'électrophorèse sont remplies des électrolytes A ou B dilués de moitié. Leurs pH respectifs sont de 5.6 et 8.6. Une tension d'environ 1000 V est appliquée aux électrodes durant 2 h sous une intensité de 250 mA.

*Révélation microbiologique.* La plaque est retirée de la cuve, entourée d'un cadre et lutée intérieurement, puis 300 ml de l'un des quatre milieux ensemencés à  $48^\circ$  avec le germe correspondant sont répandus à sa surface. Après refroidissement, les plaques sont placées une nuit à l'étuve à  $30^\circ$ .

Les zones d'inhibition apparaissent en bleu sur fond bleu pâle pour *Bacillus cereus*; en présence de *Sarcina lutea*, leur mise en évidence est facilitée par pulvéri-

sation sur la plaque dès la sortie de l'étuve d'une solution de 2,3,5-triphényltétrazolium-glucose, qui colore le fond en rouge.

### INTERPRÉTATION ET DISCUSSION

Nous avons déterminé, dans nos conditions opératoires, le sens et les distances de migration des divers antibiotiques en fonction de l'électrolyte (Tableau I), ainsi que l'importance relative de leur action sur les germes retenus et la forme de la zone d'inhibition formée (Fig. 1 et 2).

A partir de ces critères et des différences de solubilité dans les trois solvants décrits, il est possible d'identifier quatorze antibiotiques, aux concentrations suivantes: bacitracine: 6 à 8 ppm; érythromycine, framycétine, néomycine, oléandomycine, pénicilline, spiramycine, streptomycine, tétracycline, chlortétracycline, oxytétracycline, tylosine et virginiamycine: 2 à 3 ppm; flavomycine: 0.5 ppm. La concentration de l'extrait par évaporation sous vide à basse température ou le dépôt d'un plus grand volume sont susceptibles d'accroître la sensibilité de la méthode.

La méthode proposée a cependant certaines limites: (i) En présence d'érythromycine ou d'oléandomycine la spiramycine ne peut être séparée que par une électrophorèse de 3 h. (ii) L'érythromycine et l'oléandomycine d'une part, la néomycine et la framycétine d'autre part, montrent un comportement analogue à l'électrophorèse, il en va de même pour les tétracyclines que l'on sait identifier par chromatographie de partage sur papier.

Enfin, l'examen des Figs. 1 et 2 montre que les critères nécessaires à un dosage

TABLEAU I

DISTANCES DE MIGRATION DES ANTIBIOTIQUES EN FONCTION DE L'ÉLECTROLYTE

<i>Antibiotique</i>	<i>Sens de migration</i>	<i>Distance de migration (cm)</i>	
		<i>Électrolyte A (pH 5.6)</i>	<i>Électrolyte B (pH 8.6)</i>
Streptomycine	Cathode	—	29
Érythromycine		20	17
Oléandomycine		20	17
Spiramycine		20	17
Tylosine		18	9
Bacitracine		14	13
Chlortétracycline		13	—
Oxytétracycline		13	—
Tétracycline		13	—
Virginiamycine		9	13
Framycétine		—	7 à 20   zones très
Néomycine		—	7 à 20   allongées
Flavomycine	Anode	9	6
Pénicilline		13	10

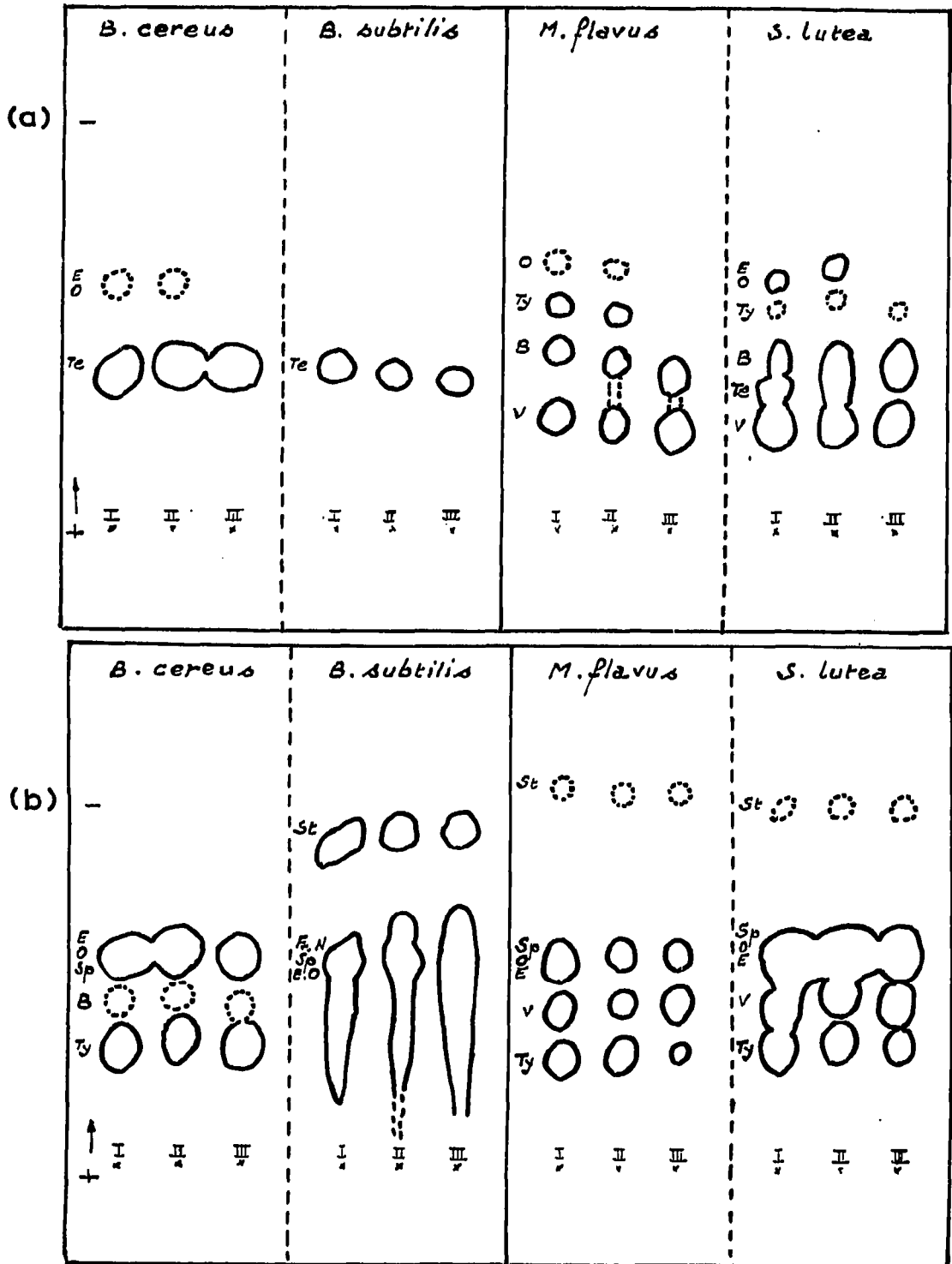


Fig. 1. Zones d'inhibition avec (a) électrolyte A (pH 5.6) et (b) électrolyte B (pH 8.6) après 2 h de migration vers la cathode. I=Solvant I, II=solvant II, III=solvant III. B=Bacitracine, E=érythromycine, Fr=framycétine, N=néomycine, O=oléandomycine, Sp=spiramycine, St=streptomycine, Te=tétracyclines, Ty=tylosine, V=virginiamycine.

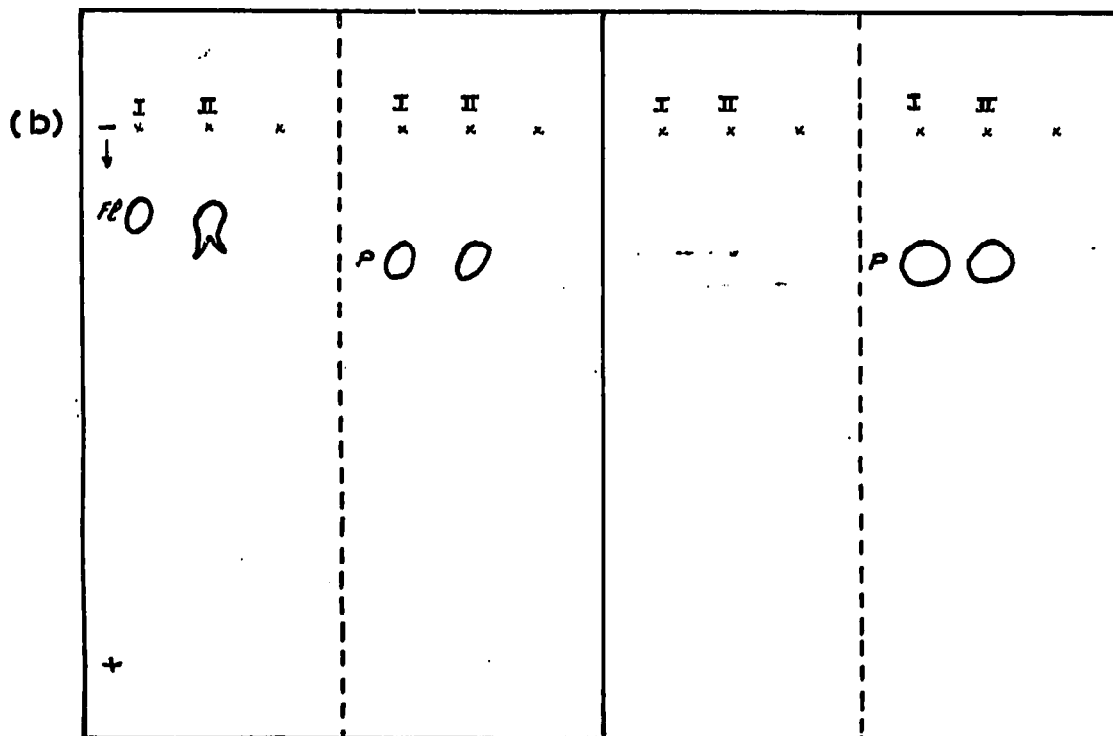
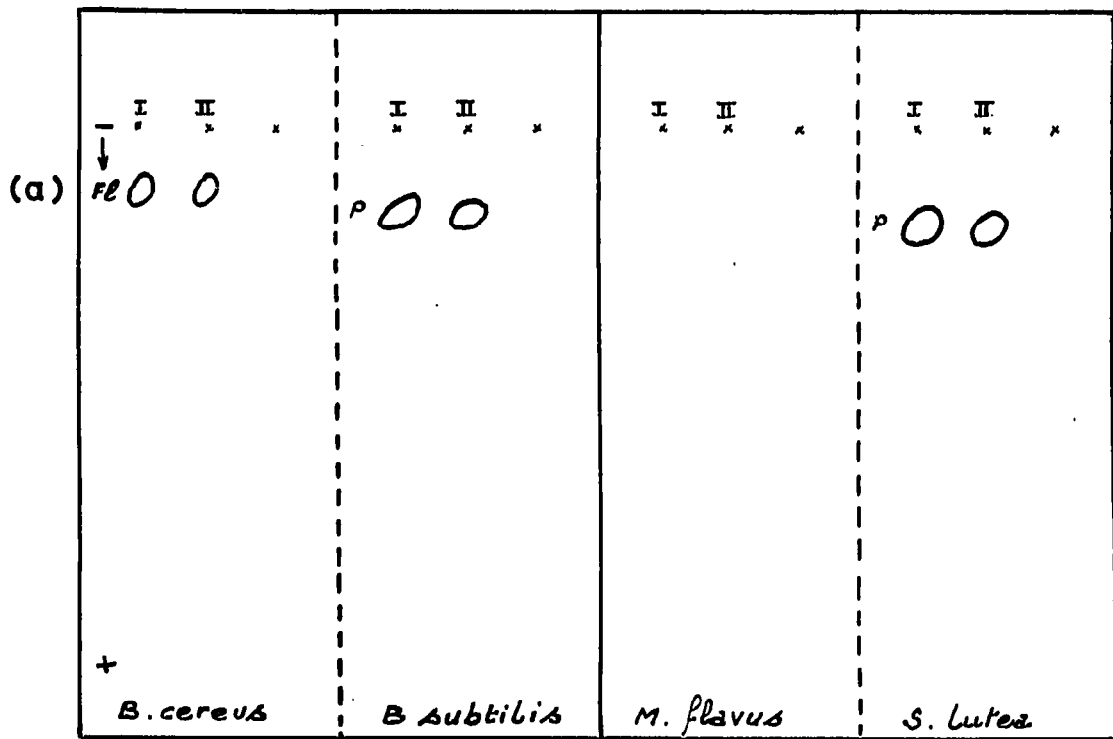


Fig. 2. Zones d'inhibition avec (a) électrolyte A (pH 5.6) et (b) électrolyte B (pH 8.6) après 2 h de migration vers l'anode. I=Solvant I, II=solvant II, III=solvant III. Fl=Flavomycine, P=pénicilline.

quantitatif (séparation nette d'avec les autres substances, zones d'inhibition grandes et bien délimitées, sensibilités suffisantes) sont réunies pour certains des antibiotiques étudiés: tylosine, virginiamycine, streptomycine, bacitracine, spiramycine, pénicilline et flavomycine.

#### REMERCIEMENTS

Nous remercions Thérèse Méra pour sa collaboration technique et M. Sallantin, I.N.R.A., Versailles, qui nous a aidés de ses conseils.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 D. Frères et P. Valdebouze, *J. Chromatogr.*, 87 (1973) 300.
- 2 J. W. Lightbown et P. De Rossi, *Analyst (London)*, 90 (1965) 89.
- 3 M. Dubost et Cl. Pascal, *Ann. Falsif. Expert. Chim.*, (1970) 189.