

# Détermination de résidus de sulfamidés dans les œufs = Determination of sulfonamide residues in eggs

Autor(en): **Martin, E. / Duret, Monique / Vogel, J.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **84 (1993)**

Heft 2

PDF erstellt am: **12.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-982135>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

## Détermination de résidus de sulfamidés dans les oeufs

Determination of Sulfonamide Residues in Eggs

*E. Martin, Monique Duret et J. Vogel*  
Service du chimiste cantonal, Genève

### Introduction

Les sulfamidés font partie des substances pharmacologiquement actives (anti-bactériens) qui trouvent de nombreuses applications en thérapeutique humaine et vétérinaire. Ils sont considérés comme des substances étrangères aux denrées alimentaires dans lesquelles ils ne sont tolérés que s'ils sont présents en quantités inoffensives pour la santé et techniquement inévitables (1).

Différentes méthodes ont été publiées à titre provisoire dans une édition récente du Manuel suisse des denrées alimentaires (2, 3). Ces méthodes sont généralement complexes et certaines font appel à des équipements très spécifiques tels que détecteurs à barrettes de diodes et HPLC avec dérivation post-colonne.

La chromatographie HPLC des sulfamidés, appliquée aux oeufs, est satisfaisante pour la majorité des sulfamidés. Elle est toutefois sujette à des interférences importantes pour les sulfamidés dont l'élution est proche de celle du solvant injecté. La chromatographie sur couche mince, précédée d'une phase de purification efficace, ne présente pas cet inconvénient. C'est pour cette raison que nous l'avons choisie. Nous avons cherché à mettre au point une procédure simple et de ce fait utilisable par le plus grand nombre de laboratoires. La méthode proposée permet, dans un premier temps, d'identifier les échantillons d'oeufs contenant des résidus de sulfamidés et dans un deuxième temps de procéder à la détermination quantitative de ces résidus.

### Partie expérimentale

#### *Appareillage*

- Homogénéisateur (Polytron, PT 10/35, Kinematica)
- Evaporateur rotatif (Büchi RE 111) avec contrôleur de vide (Büchi 165)

- Centrifugeuse (Heraeus Christ Varifuge K)
- Centrifugeuse (Heraeus Biofuge A)
- Bain ultrasonique (Marin Elcasonic)
- Densitomètre CCM (Camag Scanner II configuration A)
- Applicateur CCM (Camag, Linomat IV)
- Cuves CCM avec couvercles en verre (Camag, 022.5250)
- Filtres 0,22 µm pour filtration centrifuge, volume 400 µl (Millipore Ultrafree-MC, non-stériles, n° UFC3 OGV OO)
- Cartouches échangeuses de cations Chromabond<sup>R</sup> SA (Macherey-Nagel, 500 mg, n° 730077)
- Ballons ronds de 10 ml, RN 14,5/23
- Fliale à vide de 100 ml avec bouchon de caoutchouc percé et muni d'une aiguille à embout Luer (Extrelut<sup>R</sup> 20 de 0,70 x 32 mm) pour recevoir les cartouches Chromabond<sup>R</sup> (fig. 1)
- Piston de seringue Once<sup>R</sup>, 2 ml

### *Réactifs*

- Fluram<sup>R</sup> (fluorescamine Fluka n° 47614)
- Solution de Fluram<sup>R</sup>: 2,5 mg/20 ml de chloroforme, fraîchement préparée pour la révélation
- Chloroforme p. a. (Fluka n° 25690)
- Acétone p. a. (Fluka n° 570)
- Chlorure de méthylène p. a. (Merck n° 6050)
- Méthanol p. a. (Merck n° 6009)
- n-Hexane pour résidus (Merck n° 4371)
- Triéthylamine p. a. (Fluka n° 90340)
- Ammoniaque 25% p. a. (Merck n° 5432)
- Papier indicateur universel pH 1,0-11,0 (Fluka n° 57010)
- Acide acétique 100% p. a. (Merck n° 63)
- Acide ortho-phosphorique 85% p. a. (Merck n° 573)
- Feuilles d'aluminium pour CCM: gel de silice 60 (sans indicateur fluorescent), 20 x 20 cm, épaisseur de la couche 0,2 mm (Merck n° 5553)
- Plaque CCM gel de silice préparative 20 x 20 cm, épaisseur de la couche 2 mm (Merck n° 5745)

### *Substances de référence*

- Sulfadiméthoxine sodique (Sigma, S-7385), S 03
- Sulfadimidine sodique BP 1980 (Siegfried, 21 58 40-01), S 04
- Sulfadoxine (Roche), S 05
- Sulfamérazine sodique (Sigma, S-9001), S 07

- Sulfaméthizole (Sigma, S-5632), S 08
- Sulfaméthoxyypyridazine (Sigma, S-7257), S 09
- Sulfanilamide (Sigma, S-9251), S 10
- Sulfadiazine (Sigma, S-8626), S 12
- Sulfaquinoxaline sodique (Sigma S-7382), S 13
- Sulfathiazole Ph. H. VII (Siegfried, 21 59 20-06), S 14
- Sulfatroxazole (Roche), S 16
- Sulfamethoxazole (Roche), S 18

La numérotation est la même que celle adoptée par le Laboratoire cantonal de Berne (2)

- Solutions de sulfamidés: 10 mg/20 ml; si les sulfamidés sont sous forme de sels, les solubiliser tout d'abord dans le minimum d'eau, puis compléter avec de l'acétone; les sulfamidés sous forme d'amines libres sont dissous directement dans l'acétone. Ces solutions doivent être faites fraîchement et leur durée de garde, au réfrigérateur, ne doit pas dépasser 48 heures. Protéger les solutions de l'action de la lumière en enveloppant les récipients avec du papier d'aluminium.

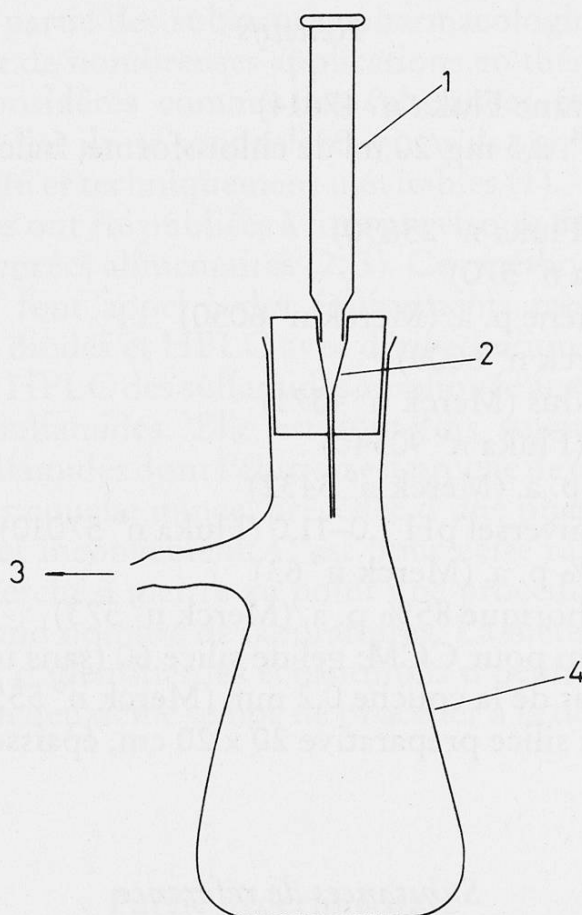


Fig. 1. Fiole à vide

- 1 = colonne Chromabond<sup>R</sup>
- 2 = aiguille Extrelut<sup>R</sup>
- 3 = source de vide
- 4 = fiole cônica de 100 ml

## Mode opératoire

Homogénéiser 3 oeufs au Polytron. Ajuster le pH à 5,1 avec de l'acide phosphorique. Dans un tube à centrifuger peser 10 g du mélange ainsi préparé. Ajouter 60 ml de chlorure de méthylène/acétone (1:1, v/v) et mélanger 30 secondes au Polytron. Rincer l'homogénéisateur avec 3 ml de solvant d'extraction. Centrifuger 10 minutes à 2500 t/minute. Filtrer sur tampon d'ouate cellulosique. Récupérer le filtrat dans un cylindre gradué de 100 ml. Rincer le culot de centrifugation (en le triturant à l'aide d'une baguette de verre) et le filtre avec le solvant d'extraction jusqu'à ce que le volume de filtrat atteigne 60 ml. Ajouter 5 ml d'acide acétique au filtrat. Le volume de filtrat obtenu est normalement de 65 ml. Si nécessaire, compléter à 65 ml avec du solvant d'extraction.

Préparation de la colonne Chromabond<sup>R</sup>: Juste au moment de l'emploi, placer la colonne sur la fiole à vide prévue à cet effet (fig. 1) et raccorder la fiole à une source de vide. Rincer la colonne avec 6 ml d'hexane puis la sécher par aspiration d'air à l'aide de la source de vide durant 10 minutes. Faire passer 6 ml du mélange chlorure de méthylène : acétone : acide acétique (10:10:1, v/v) avec un débit de 1-2 ml/minute. Veiller à ce que la colonne ne vienne pas à sec, puis immédiatement après, avec le même débit, faire passer 7 ml de filtrat.

Attention: Lors du passage des différentes fractions il faut veiller à ce que la colonne ne vienne jamais à sec.

Faire passer 5 ml d'eau, puis 5 ml de méthanol. Sécher le contenu de la colonne par aspiration d'air à l'aide de la source de vide durant 10 minutes. Aspirer durant 1 minute à travers la colonne un courant d'air saturé d'ammoniac gazeux produit par barbotage d'air dans un flacon laveur contenant 50 ml d'ammoniaque. Vérifier à la fin du passage, avec du papier indicateur, qu'à la sortie de la colonne le pH est de 11 (papier indicateur coloré en bleu). Remplir la cartouche, sans qu'il y ait surplus, avec du méthanol saturé d'ammoniac gazeux et laisser agir 10 minutes. Par pression à l'aide d'un piston de seringue approprié éluer les sulfamidés avec 3 ml de méthanol saturé d'ammoniac gazeux et récolter l'éluat dans un ballon de 10 ml. Retirer lentement le piston de la seringue afin de laisser en place le remplissage de la colonne et poursuivre l'élution des sulfamidés avec une seconde portion de 3 ml de méthanol. Évaporer sous vide à 40 °C. Reprendre le résidu avec 150 µl de mélange acétone/eau (1:1, v/v). Fermer le ballon et le placer dans le bain ultrasonique durant 1 minute. Veiller à ce que le ballon reste bien fermé. Laisser refroidir, transférer le contenu du ballon sur un filtre de 400 µl et centrifuger 5 minutes à 12 000 t/min. Oter le filtre et fermer le tube de collecte. Remarque importante: L'extrait ainsi obtenu doit impérativement être chromatographié dans un délai maximum de 48 h.

## Chromatographie sur couche mince (CCM)

Phase mobile: Acétate d'éthyle/méthanol/triéthylamine (65:15:1, v/v/v)

Préparation de la cuve: Verser dans la cuve la phase mobile et laisser l'atmosphère s'équilibrer durant une nuit. (Pour faciliter la saturation, placer dans la cuve une

plaque CCM préparative de 2 mm.) Une première CCM permet de déceler la présence de résidus de sulfamidés. Pour cela utiliser les solutions des sulfamidés S 05, S 08, S 12 et S 14. Déposer, à l'aide de l'applicateur, 12 µl de chaque solution témoin (dépôt de 24 ng). Faire des dépôts en bandes de 8 mm de large à 2 cm du bas de la plaque. Pour l'extrait, déposer au minimum 50 µl. Faire migrer sur une distance de 15 cm. Laisser la plaque sécher à l'air. Pulvériser la solution de Fluram<sup>R</sup>. Examiner sous lumière UV à 366 nm. L'absence de taches visibles à des R<sub>f</sub> proches de ceux des témoins est une indication de l'absence de sulfamidés. L'examen visuel est suffisant. Il est néanmoins possible, si cela est jugé nécessaire, d'effectuer une lecture densitométrique. En présence de sulfamidés, préparer une solution du ou des témoins concernés à la concentration de 10 mg/20 ml. Diluer cette solution dans la proportion de 1:250 (concentration de sulfamidé 2 ng/µl). A l'aide de l'applicateur, déposer 6, 8, 10 et 12 µl de solution témoin diluée ainsi que 50 µl de l'extrait purifié obtenu à partir de l'oeuf. Ces conditions de calibration couvrent un domaine de concentration de 0,030 à 0,070 mg de sulfamidé/kg d'oeuf (valeur de tolérance 0,1 mg/kg). Développer et révéler la plaque. Procéder à la lecture densitométrique. Estimer la concentration à l'aide de la courbe de calibration. La surface d'intégration correspondant à la solution analysée doit être comprise dans l'intervalle des surfaces d'intégration correspondant aux taches des solutions témoins ceci afin de garantir que le résultat a été obtenu par interpolation sur la courbe de calibration. Si la solution analysée est trop concentrée, la diluer en conséquence, puis refaire une CCM.

Lecture densitométrique:

- Lampe à vapeur de mercure
- Longueur d'onde d'excitation 366 nm
- Filtre visible > 400 nm
- Bande passante du monochromateur: 10 nm
- Fente: largeur 7, longueur 7
- Condenseur: position «Micro»

Taux de récupération

A la limite de 100 µg/kg les taux de récupération exprimés en % sont les suivants:

- Sulfadiméthoxine 30%
- Sulfadoxine 87%
- Sulfamérazine 75%
- Sulfaméthoxypyridazine 44%
- Sulfadiazine 55%
- Sulfaquinoxaline 70%
- Sulfatrioxazole 75%

Limite de détection: 3 µg/kg

Répétabilité: Deux analyses individuelles effectuées avec la même méthode sur une matière soumise à l'essai (oeuf de poule traitée avec un médicament à base de sulfaquinoxaline) dans les mêmes conditions (même opératrice, même appareil, même laboratoire et court intervalle de temps) ont donné les deux résultats suivants: 6186 et 7991 µg/kg avec un écart-type de 18% sur la moyenne des 2 résultats.

Dans les mêmes conditions, mais sur un autre oeuf de poule traité, les teneurs trouvées étaient de 6813 et 7785  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Dans ce cas l'écart-type est de 9% sur la moyenne des 2 résultats.

En conclusion, la méthode décrite permet de trier parmi les échantillons soumis au contrôle, ceux qui ne contiennent pas de résidus de sulfamidés de ceux qui en contiennent et, dans ces derniers, de déterminer avec précision la teneur de ces résidus médicamenteux dont la somme (substances d'origine et métabolites) doit rester inférieure à 0,100 mg/kg. Le problème des métabolites n'a pas été pris en compte dans ce travail.

### *Résumé*

Une méthode chromatographique sur couche mince de gel de silice est proposée pour la détermination des résidus de sulfamidés dans les oeufs. L'échantillon est homogénéisé, extrait avec du chlorure de méthylène/acétone (1:1 v/v) et purifié sur colonne. Les sulfamidés sont révélés sur les plaques CCM par pulvérisation d'une solution de fluorescamine. L'évaluation quantitative est réalisée à l'aide d'un scanner. Dans les conditions opératoires décrites, la limite de détection est de 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Avec deux déterminations distinctes, la répétabilité, à un niveau de concentration de 7 mg/kg est de 9% et 18%.

### *Zusammenfassung*

Es wird eine DC-Methode über Silicagel für die Bestimmung von Sulfonamidrückständen in Eiern vorgeschlagen. Die Probe wird homogenisiert, mit Methylenchlorid/Aceton (1:1 v/v) extrahiert und durch eine chromatographische Kolonne gereinigt. Sulfonamidrückstände werden als fluoreszierende Komponenten nach Besprühung mit einer Fluorescaminlösung sichtbar gemacht. Die quantitative Auswertung wird durch Densitometrie ermittelt. Unter bestimmten Bedingungen ist die Nachweisgrenze 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Die Wiederholbarkeit einer Konzentration von 7 mg/kg (zwei Bestimmungen) ist 9% und 18%.

### *Summary*

A TLC method on silicagel is given for the determination of sulfonamide residues in eggs. The sample is homogenized, extracted with methylenchloride/acetone (1:1 v/v) and purified by column chromatography. Sulfonamides are revealed with fluorescamine and quantitatively monitored with densitometric scanning. Under the experimental conditions given the detection limit is 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . The repeatability (2 determinations) at a level of 7 mg/kg is 9% and 18%.

### *Bibliographie*

1. Ordonnance sur les substances étrangères et les composants, OSEC, du 27 février 1986. Office central fédéral des imprimés et du matériel, Berne.

2. Schweiz. Lebensmittelbuch, Kapitel 55, Tierarzneimittelrückstände, Form. 311.520.071 d 11.91 1600 58181. Eidgenössische Drucksachen- und Materialzentrale, Bern 1991.
3. *Rychener, M., Mooser, A.E. und Koch, H.:* Rückstandbestimmung von Sulfonamiden und deren N<sup>4</sup>-Metaboliten in Fleisch, Leber und Niere mit HPLC. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **81**, 522–543 (1990).

Dr E. Martin  
Monique Duret  
Dr J. Vogel  
Service du chimiste cantonal  
Case postale 166  
CH-1211 Genève 4