

DÉTERMINATION DU SULFATHIAZOLE DANS LES MIELS PAR CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE

Sulfathiazol-Bestimmung im Honig mittels der Dünnschicht-Chromatographie

Augusto GRANDI

Istituto di Zooculture della Università — Perugia (Italie).

SUMMARY

DETERMINATION OF SULPHATHIAZOL IN HONEYS BY THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY

A method is proposed for the determination of sulphathiazol in honeys.

20 g of honey are extracted three times with 30 ml of acetone at each time. Concentrated extracts are transferred into a chromatographic column which contains basic alumina (activity Brockmann III). The elution is carried out with 30 ml of chloroform, then 5 ml of acetone acidified by 1,5 ml of HCl 2 N, and further with 60 ml of acetone. The last elution is collected, concentrated and dissolved in 0,5 ml of acetone. The chromatography is achieved on a thin-layer of silica gel H Merck using chloroform/methanol (4/1) as developing solvent.

When the migration is over, the chromatogram is air-dried before being sprayed with a reagent for visualization.

The sensitivity of the method is 0,1 ppm.

RÉSUMÉ

On propose une méthode pour la détermination du sulfathiazole dans les miels.

On extrait 20 g de miel par trois fois avec 30 ml d'acétone chaque fois; les extraits sont concentrés dans une colonne chromatographique contenant de l'oxyde d'aluminium basique (activité Brockman III). On élue par 30 ml de chloroforme, 5 ml d'acétone acidifiés par 1,5 ml de HCl 2 N et par 60 ml d'acétone. Le dernier éluat est recueilli, concentré et repris avec 0,5 ml d'acétone. On effectue ensuite la chromatographie sur plaque de gel de silice H Merck, en employant comme solvant mobile le chloroforme/méthanol (4/1).

Lorsque la migration est terminée, on fait sécher la plaque en plein air puis on vaporise le mélange révélateur.

La sensibilité de la méthode est de 0,1 ppm.

INTRODUCTION

Parmi les maladies des abeilles, la loque américaine est sans doute celle qui cause les préoccupations les plus grandes. En effet, en plus d'être extrêmement contagieuse, elle provoque, dans les colonies atteintes, des dégâts très importants qui vont jusqu'à la mort, si l'on n'intervient pas à temps.

Il s'agit d'une maladie du couvain à caractère épizootique, causée par *Bacillus larvae* WHITE, pour laquelle les règlements sanitaires prévoient deux possibilités : la destruction des colonies infectées et les traitements chimiothérapeutiques.

On ne recourt au premier moyen que dans les cas extrêmes; dans les autres cas on procède à un traitement médicamenteux.

Les médicaments les plus utilisés dans la lutte contre *Bacillus larvae* sont essentiellement les sulfamides et les antibiotiques; parmi ceux-ci, le sulfathiazole et la terramycine se sont montrés les plus efficaces. Le sulfamide est préférable à l'antibiotique, car il est plus stable dans les conditions ambiantes de la ruche et il peut garder ultérieurement son efficacité dans le miel.

Actuellement on emploie le sulfathiazole sodique, car il a le mérite d'être entièrement soluble dans l'eau.

Les sulfamides, lorsqu'ils sont administrés au début du printemps et en automne aux concentrations conseillées (0,5 g pour 4 litres de sirop de sucre), sont inoffensifs pour les abeilles et ne contaminent pas le miel. Mais si l'on exagère dans l'emploi et dans les doses, le produit passe dans le miel en portant préjudice à son caractère naturel.

Étant donné qu'il est possible d'effectuer des contrôles sur les échantillons pour en déterminer le taux de contamination, on a mis au point la méthode ci-dessous décrite.

MATÉRIEL UTILISÉ ET TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

Réactifs et appareillages

- a) Standard : sulfathiazole ou sulfathiazole sodique dans l'acétone, à la concentration de 0,1 mg/ml.
- b) Gel de silice H Merck, pour chromatographie en couche mince.
- c) Solvant mobile : chloroforme/méthanol (4/1).
- d) Détecteur : 1 g de p-Diméthylaminobenzaldéhyde dissout dans 100 ml d'éthanol et additionné de 1 ml d'HCl concentré.
- e) Oxyde d'aluminium basique C. ERBA.

f) Appareillage pour couches minces : plaque de verre 20×5 cm avec une épaisseur de 0,25 mm de gel de silice H Merck en suspension dans l'eau dans le rapport 1 : 2,8.

Les plaques sont prêtes à l'usage après les avoir laissé sécher en plein air.

Méthode analytique

On additionne 20 g de miel, placés dans un tube à centrifugation de 100 ml, avec 30 ml d'acétone. On agite pendant 2 minutes environ; on centrifuge le mélange pendant 5 minutes à 2500 t/min. On répète l'extraction encore deux fois.

On concentre à petit volume (5 ml environ) les extraits réunis. On les transfère ensuite avec 15 ml d'acétone/DMF 5/1 employés pour les lavages dans une colonne à chromatographie en verre d'un diamètre intérieur de 10 mm. contenant 10 g d'oxyde d'aluminium basique (activité Brockman III).

Ensuite, on élué par 30 ml de chloroforme, 5 ml d'acétone acidifiés par 1,5 ml de HCl 2 N et enfin par 60 ml d'acétone. Cet éluat, contrairement aux autres, est recueilli, porté à sec et repris avec 0,5 ml d'acétone. La solution est placée sur la plaque chromatographique à des doses comprises entre 1 μ l et 10 μ l selon le taux de sulfamides contenus dans le miel. Après avoir séché les taches, la plaque est placée dans une cuve cylindrique, précédemment saturée par un mélange de chloroforme/méthanol (4/1).

Lorsque la séparation chromatographique est terminée, on fait sécher la plaque en plein air et ensuite on projette le mélange révélateur.

DISCUSSION ET CONCLUSION

La méthode proposée permet d'extraire du miel aussi bien le sulfathiazole que le sulfathiazole sodique, mais la séparation des deux substances n'est pas réalisable par chromatographie.

Dans la plaque traitée par le mélange révélateur, en plus de la tache jaune caractéristique, on relève deux autres taches, l'une jaune et l'autre violette, localisées respectivement au-dessous (3 cm environ) et au-dessus (1,5 cm environ) de celle de sulfathiazole. On attribue leur formation aux produits chimiques utilisés pour l'analyse, comme on a pu l'établir en faisant une épreuve à blanc.

Pour deux raisons on n'a pas jugé bon de poursuivre les recherches sur leur origine : 1^o / on ne disposait pas de réactifs produits par d'autres maisons, 2^o / leur présence n'altérerait pas du tout les résultats des analyses.

La méthode décrite se montre très utile, car elle permet de repérer d'une manière simple et sans possibilité d'interférences des quantités très petites de sulfathiazole (sensibilité 0,1 ppm.).

Reçu pour publication en décembre 1974

Eingegangen im December 1974

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine Methode zur Bestimmung von Sulfathiazol im Honig vorgelegt.

Methode : Dreimal 20 g Honig werden jeweils mit 30 ml Azeton extrahiert. Die auf ein Volumen von etwa 5 ml konzentrierten Auszüge werden mit 15 ml Azeton (5 : 1), die für das Auswaschen benutzt wurden, in eine Chromatographensäule von 10 mm Innendurchmesser,

die 10 g basisches Aluminiumoxyd (Aktivität Brockman III) enthält, gebracht. Dann wird mit 30 ml Chloroform, einer Lösung von 5 ml saurem Azeton, 1,5 ml HCl 2N und 60 ml Azeton eluiert. Das letzte Eluat wird, im Gegensatz zu den übrigen, aufgenommen, getrocknet und mit 1,5 ml Azeton erneut aufgenommen.

Die Lösung wird in unterschiedlichen Mengen (zwischen 1 μ l und 10 μ l) auf eine 20 \times 5 cm grosse Glasplatte, die 25 mm dick mit Silicium Gel Merck, suspendiert in H₂O (1 : 2,8), beschichtet wurde, aufgetragen und danach an der Luft getrocknet.

Die aufsteigende Chromatographie wird in einer zylindrischen Wanne durchgeführt, die zuvor mit Chloroform-Methanol (4 : 1) gesättigt wurde.

Wenn die Entwicklung beendet ist, lässt man die Platte an der Luft trocknen. Danach wird sie besprüht. Das Sprühmittel besteht aus 1 g p-Dimethylaminobenzaldehyd, das in 100 ml Aethanol unter Zugabe von 1 ml konzentrierter HCl gelöst wurde.

Ergebnisse : Die vorgeschlagene Methode erlaubt es, aus Honig sowohl Sulfathiazol als auch Natriumsulfathiazol zu extrahieren, die jedoch chromatographisch nicht getrennt werden. Ausser den Sulfathiazolflecken entdeckt man noch — über und unter diesen — zwei andere Flecken, die aber die Resultate nicht beeinträchtigen und deren Vorhandensein auf die benutzten Chemikalien zurückgeführt wird.

Der Wert der vorgelegten Methode wird zudem durch ihre Empfindlichkeit, die 0,1 ppm beträgt, bestätigt.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BEGLIOMINI A., FRAVOLINI A., 1971. — Identificazione per cromatografia su strato sottile di sulfamidici nei mangimi. *Archivio Veterinario Italiano*, 22 (5), 273-278.
- CIERI U.R., 1969. — Thin-Layer Chromatography and Ultraviolet Spectrophotometry of Sulfonamide Mixtures. A study of the absolute recoveries. *J. Chromatogr.*, 45, 421-431.
- LELAND R.A., STANLEY E. R., 1965. — Qualitative Determination of Sulfa Drugs in Medicated Feeds by Thin-Layer Chromatography. *J. Assoc. Offic. Agr. Chemist.*, 48, 278-279.
- SZALKOWSKI C. R., 1973. — Determination of Sulfaquinolaxaline in Feeds : Collaborative Study. *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists.*, 56, 758-761.