

COMMISSION
DES
COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES

Direction Générale de l'Agriculture

VI/H/2

Commission Scientifique Vétérinaire
Sous-groupe II (thyrostatiques)

cl. 67.2

Bruxelles, le 23 février 1976

Conclusion des travaux

de la première réunion du sous-groupe II (thyrostatiques)
de la Commission Scientifique Vétérinaire, tenue le 2.2.76

1. La méthode officielle prévue dans certains Etats membres pour la détermination des résidus de thyrostatiques dans la viande fraîche et portant sur l'examen histologique de la thyroïde ne peut être appliquée au contrôle effectué à l'importation des viandes fraîches en provenance de pays tiers.
2. La méthode à retenir doit être le procédé par fluorescence élaboré par le professeur Verbeke et décrit à l'annexe.
3. Ce procédé permet de constater la présence des substances à effet antihormonal suivantes : tapazol, propylthiouracile, phénylthiouracile, thiouracile et méthylthiouracile.
Sa sensibilité est de 10 ppb.
Le procédé peut être appliqué, de façon monodimensionnelle, sous forme d'épreuve de triage et ensuite, à deux dimensions, en vue de la détermination définitive.
Les expériences ont été effectuées sur plus de 10 000 échantillons dans 5 laboratoires.
Une diminution éventuelle de l'activité en ce qui concerne les viandes réfrigérées depuis trois semaines environ peut être compensée en augmentant la quantité de l'échantillon.

Méthode d'analyse pour la détection de substances
antithyroïdiennes dans la viande fraîche

1. Objet et domaine :

Détection de substances antithyroïdiennes dans la viande fraîche.

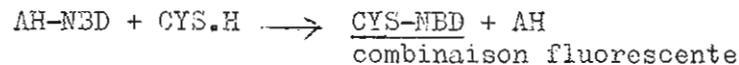
2. Principe :

Les substances à action anti-hormonale, que l'on appelle aussi les anti-hormones (AH), sont extraites des tissus par du méthanol. La graisse est éliminée par extraction à l'éther de pétrole. Les amines et les acides aminés sont éliminés par le passage de l'extrait sur un échangeur d'ions fortement acidifié (p.ex. DOWEX 50 WX8).

Après neutralisation, l'extrait est concentré puis mélangé à une solution-tampon. Les lipides polaires sont extraits par de l'éther diéthylique.

On laisse ensuite les anti-hormones réagir au NBD-Cl (7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3nitrodiazol; Aldrich 16 326-0). Ce produit réagit uniquement aux thiols et amines. Après réaction, les combinaisons AH-NBD formées sont, en milieu acide, extraites par de l'éther diéthylique. Après séchage et évaporation jusqu'au volume désiré, on dépose la fraction d'éther diéthylique sur une plaque à couche mince. Cette plaque est développée bi-dimensionnellement.

Avant d'être vaporisée, cette plaque est contrôlée quant aux spots fluorescents à 366nm. Elle est ensuite vaporisée à l'aide de cystéine alcaline ou d'une solution de cystéamine. Ce faisant, les combinaisons AH-NBD, qui ne sont PAS fluorescentes, sont transformées en combinaisons cystéine-NBD qui sont fortement fluorescentes (seuil de détection < 1 ng).



Les AH donc détectés sous forme de spots qui ne deviennent fluorescents qu'après la vaporisation (ce qui est typique pour ces combinaisons - SH). L'identité des anti-hormones est établie par la comparaison Rf avec des références.

Régénération du Dowex 50 WX8 : sur un filtre Buchner, laver 100 g de résine avec de l'eau distillée jusqu'à réaction neutre à légèrement acide. Ensuite, la résine sur le filtre est successivement traitée par 1 litre de NaOH \pm 2 N, laver à l'eau distillée jusqu'à réaction légèrement alcaline, traitée par 1 litre de HCl \pm 2 N puis laver à l'eau distillée jusqu'à réaction légèrement acide.

3.9. TLC Fertigplatten Kieselgel 60 sans indicateur de fluorescence (Merck art. 5721)

3.10. Indicateur au bleu de bromothymol : 0,05 % de bleu de bromothymol (Merck 3026) dans de l'eau-éthanol 50 %

3.11. KOH méthanolique : dissoudre 6 g de KOH dans 100 ml de méthanol.

- 3.12. Liquide de vaporisation : - solution I : mélanger 50 ml d'alcool dénaturé et 50 ml d'isopropanol. Ajouter 2 ml d'ammoniaque 25 %
- solution II : dissoudre 0,6 g d'hydrochlorure de cystéine (ou de 2-mercaptoéthylamine) dans 20 ml d'eau. Conserver cette solution au réfrigérateur à \pm 5° C (la solution doit être remplacée si un dépôt se forme pendant la conservation).
- réactif à vaporiser : mélanger journellement, immédiatement avant la vaporisation, 2 ml de solution II et 100 ml de la solution I.

3.13. Références :

Les AH utilisés comme références sont repris au tableau ci-dessous. A partir de ces références, préparer des solutions-mères renfermant 20 ml de AH par 100 ml de méthanol. Pour le MTU, il faut ajouter de l'eau distillée et une trace de HCl pour que le produit se dissolve. Le PhTU est dissous dans un mélange de benzène-méthanol (8 : 92, V/V).

Références utilisées

Symbole	Produit
TAP	tapazole (2-mercapto-1-méthylimidazole)
PTU	4(6)propyl-2-thiouracil (4-hydroxy-2-mercapto-6-propyl pyrimidine)
PhTU	4(6)-phényl-2-thiouracil (4-hydroxy-2-mercapto-6-phénylpyrimidine)
TU	2-thiouracil (4-hydroxy-2-mercaptopyrimidine)
MTU	4(6)méthyl-2-thiouracil (4-hydroxy-6-méthyl-2-mercaptopyrimidine)

- 5.5. Verser la phase méthanol/eau (5.3.) dans l'ampoule. Placer un tube d'extraction sous la colonne et percoler la solution à travers la colonne à un débit de ca 2 ml/min. Lorsque le liquide a pratiquement pénétré entièrement dans la résine, laver la colonne à l'aide de 5 ml de méthanol 75 %. Laisser la colonne se vider. (Rassembler la résine de ces colonnes dans un récipient fermé en présence de HCl 1 N ; voir régénération du Dowex 50 ; 3.8.).
- 5.6. Titrer l'éluat de la colonne avec du KOH méthanolique (3.11.) en présence de bleu de bromothymol jusqu'à coloration bleu-vert.
- 5.7. Réduire l'éluat sur un évaporateur rotatif jusqu'à ca 1 ml, à 40° C.
- 5.8. Mélanger l'éluat réduit et 5 ml de tampon pH = 8 (voir 3.6.).
Contrôler le pH à l'aide d'un pH-mètre et l'ajuster éventuellement à 8. Transférer (éventuellement) le mélange dans un plus petit tube d'extraction d'une contenance d'environ 20 ml.
- 5.9. Eliminer les lipides polaires en extrayant la phase-tampon par 4, 3 et 3 ml d'éther diéthylique (voir 3.4.).
- 5.10. Eliminer, sous un courant de N₂, l'éther subsistant dans la phase-tampon.

Réaction :

- 5.11. Ajouter, à la phase-tampon 0,1 ml de solution NBD-Cl (3.7.) et 0,5 ml de méthanol. Placer, pendant 1 heure, la cuve à réaction dans un bain-marie fermé, à 40° C. (La réaction s'opère dans l'obscurité).
- 5.12. Après refroidissement, ajouter 3 ml d'éther diéthylique (3.4.).
Ajuster le pH entre 3 et 4 par l'adjonction de 1 ml de HCl 1 N.
Après agitation et décantation, transférer la phase supérieure (éther), qui renferme le AHdérivé dans un deuxième tube à extraction (éventuellement un tube pour centrifugation gradué).
Ensuite, extraire encore à deux reprises la phase aqueuse à l'aide de 2 ml d'éther diéthylique.
- 5.13. Ajouter du Na₂ SO₄ anhydre (0,5 - 1 g) aux phases combinées d'éther diéthylique. Agiter-le mélanger et décanter la phase étherée dans un tube pour centrifugation gradué.
- 5.14. Evaporer la phase étherée (5.13.) sous un courant de N₂ jusqu'à 0,5 ml (= glande thyroïde) ou 0,2 ml (= viande, foie rein). Si un système à deux phases se produit pendant l'évaporation, ajouter du méthanol jusqu'à obtention d'une phase homogène.

6.8. En les comparant avec la distance de migration (valeur Rf) des références, examiner si les échantillons analysés renferment des taches suspectes. Si un couloir de migration ne contient pas de taches suspectes, considérer que l'échantillon correspondant est négatif. Si la valeur Rf d'une des taches suspectes correspond à celle obtenue à l'aide de l'une des références AH, il faut confirmer l'identité du AH par la chromatographie bi-dimensionnelle.

Développement bi-dimensionnel (6.9. - 6.16.)

6.9. Diviser une plaque de gel de silice activé (6.1.) comme l'indique la fig. 2.

6.10. Sur cette plaque, déposer au point de départ S (fig. 2) 50 à 100µl de l'extrait concentré (5.14.). Seuls les AH, dont la présence est présumée après l'analyse monodimensionnelle, sont déposés sur la plaque au titre de référence.

(NOTE : lorsqu'il ne faut analyser qu'un seul échantillon, on peut immédiatement pratiquer le développement bi-dimensionnel et diviser la plaque comme l'indique la fig. 2).

6.11. Le chromatogramme est développé suivant le premier sens de migration, à l'aide de chloroforme-éthanol (95 : 5, V/V) dans une cuve non saturée.

6.12. Après développement jusqu'à la hauteur désirée, retirer la plaque et la sécher soigneusement sous un courant d'air.

6.13. Si nécessaire, déposer au point de départ (5) de l'échantillon, 5 à 10µl du ou des AH présumé(s) présent(s). Ce mode opératoire peut être utile comme comparaison Rf supplémentaire entre une tache inconnue et la référence, après le deuxième développement.

6.14. Ensuite, développer la plaque, perpendiculairement au premier sens de migration, à l'aide de chloroforme-acide propionique (95 : 5, V/V). Après développement, sécher soigneusement la plaque (éliminer l'acide propionique avant de vaporiser des réactifs alcalins !) sous courant d'air.

6.15. Examiner les chromatogrammes à 366 nm, marquer et vaporiser les taches fluorescentes (et éventuellement les taches absorbantes) selon 6.6. et 6.7.

6.16. Etablir l'identité des anti-hormones par comparaison des Rf et des références dans le premier et le second sens de migration.

FIG 1 : Développement monodimensionnel

Screening de quelques échantillons de glande thyroïde

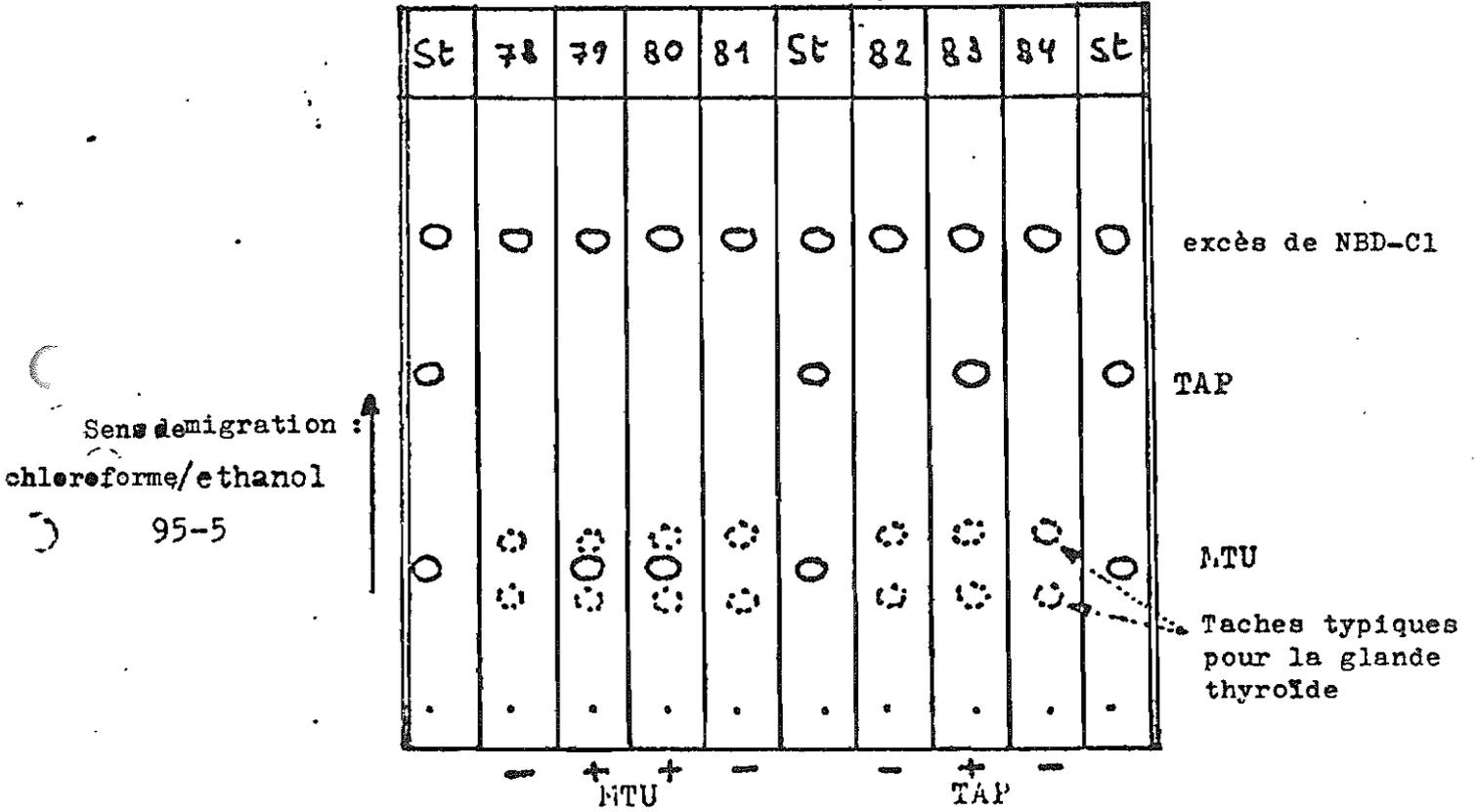
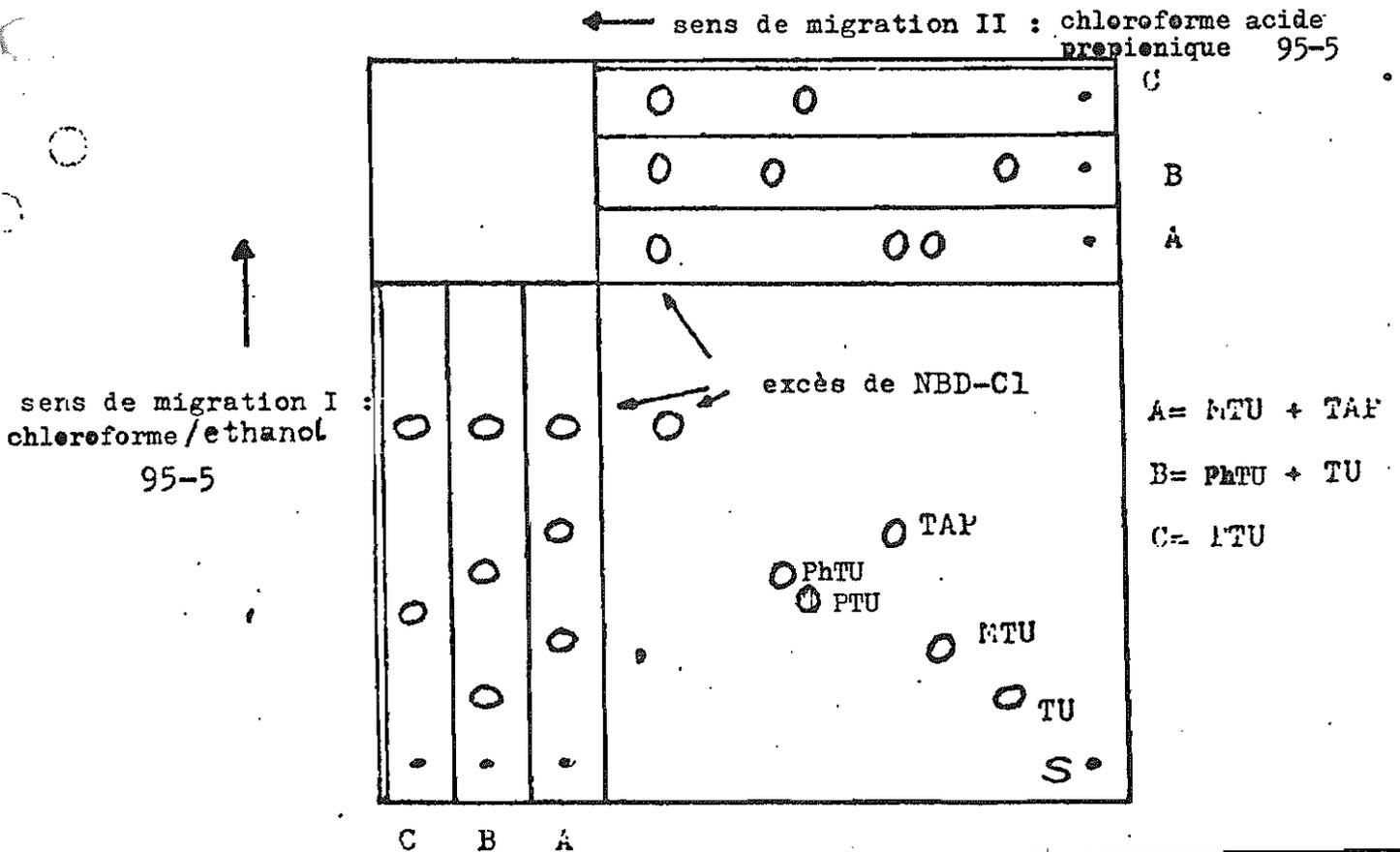


FIG 2 : Développement bidimensionnel



Cl. 67.2

Liste des participants

lère réunion restreinte sous-groupe II (Thyréostatique)
de la Commission Scientifique Vétérinaire (le 2.2.76)

Prof. VERBEKIE R. Rijksuniversiteit Gent,
Faculteit Diergeneeskunde,
Casinoplein 21,
9000 GENT
Tél. 091/26.37.84

DR. STEPHANY R.W. Rijks Instituut v.d. Volksgezondheid,
P.O. Box 1,
BILTHOVEN
Tél. 030-78.91.11 ext. 386

COMMISSION WOLF DG VI/H/2
 MME DORMAL DG VI/H/3