

NOTE TECHNIQUE

## MÉTHODE DE RECHERCHE DE LA XYLAZINE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

D. COURTOT

avec la collaboration de Édith BLANCHARD et Nelly FISCHER

*Laboratoire de Pharmacie-Toxicologie, I. N. R. A.,  
École nationale vétérinaire,  
69337 Lyon Cedex*

---

### RÉSUMÉ

L'auteur présente une méthode de détection de la xylazine (2-(2,6-xylidino)-5,6-dihydro-4-H-1,3-thiazine) par chromatographie en phase gazeuse. Les phases OV 1 et OV 17 conviennent bien pour l'analyse qualitative et quantitative de ce composé.

Cette méthode de détection associée à une technique d'extraction par l'éther, à partir de solution basique, permet de déceler 0,1 p.p.m. de xylazine dans les liquides biologiques.

Cette sensibilité laisse entrevoir la possibilité d'utiliser cette méthode pour d'éventuels contrôles antidopage chez le Cheval de sport.

---

### INTRODUCTION

L'abus des tranquillisants ne se rencontre plus seulement chez les insomniaques ou les hypernerveux ; il a fait dernièrement son apparition dans le domaine des sports équestres comme dopage, en particulier lors des concours de dressage.

Parmi les substances tranquillisantes la xylazine ou 2-(2,6-xylidino)-5,6-dihydro-4-H-1,3-thiazine, récemment apparue sur le marché des médicaments vétérinaires, a été utilisée par TRONICKE et VOCKE (1971) comme sédatif pour la manipulation des chevaux rétifs et nerveux. Ces auteurs soulignent qu'en particulier la xylazine affaiblit nettement les réactions de peur et de fuite chez le Cheval. Selon AITKEN et SANFORD (1972), la xylazine permet également d'éviter l'augmentation du rythme cardiaque produite par une décharge d'adrénaline et ce contrairement à l'acépromazine. Par conséquent, la xylazine peut être recommandée en tant que tranquillisant comme prévention des situations de stress chez le Cheval.

Les méthodes de détection relevées dans la littérature sont peu nombreuses ; à notre connaissance seules figurent les techniques fournies par le fabricant <sup>(1)</sup>.

Le dosage est basé sur une titration par l'acide perchlorique de la teneur en principe actif, après extraction préalable à l'éther à partir d'un milieu alcalin.

Une méthode de séparation par chromatographie sur couche mince permet d'obtenir une plus grande spécificité. Le dosage par mesure spectrophotométrique à 269 nm est effectué après élution.

Ces méthodes sont surtout utilisées pour effectuer le contrôle pharmaceutique. Cependant elles sont peu sensibles. Pour atteindre le but fixé, pour un contrôle antidopage, nous devons disposer d'une méthode à la fois sensible et spécifique. Nous avons donc recherché si la xylazine pouvait être dosée par chromatographie en phase gazeuse.

Dans cette note technique, nous décrivons la méthode de dosage qui, par la suite, nous a permis de définir les conditions les meilleures pour l'extraction. Les résultats de son application à la détection de la xylazine dans les liquides biologiques du Cheval de sport seront décrits ultérieurement.

## MATÉRIEL, ET MÉTHODES

### A. — Méthode de dosage

#### 1. Paramètres chromatographiques.

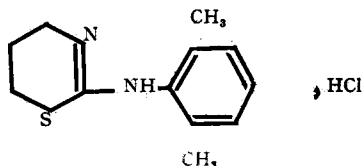
Les appareils utilisés sont des chromatographes Packard-Becker type 417 équipés de détecteur à ionisation de flamme à quartz.

- Colonnes en verre de longueur 2 mètres et 3 mm de diamètre intérieur.
- Phase : apolaire OV1 ;  
polaire OV17.

Ces phases silicones sont les plus couramment utilisées pour la recherche de substances médicamenteuses.

- pourcentage d'imprégnation : 3 p. 100 ;
- support : supelcoport 100/120 mesh (Supelco and Cie, Packard France) ;
- gaz vecteur : azote U ;
- débit : 45 ml/mn avec la phase OV17 ;  
60 ml/mn avec la phase OV1 ;
- températures : four « colonne OV1 », programmation 175 à 190°C ;  
avec une vitesse linéaire de 2,5°C/mn ;  
four « colonne OV17 », 210°C ;
- injection : 280°C ;
- détection : 280°C ;
- débit air : 300 ml/mn ;
- débit hydrogène : 50 ml/mn (fig. 1).

<sup>(1)</sup> La xylazine est commercialisée sous forme de chlorhydrate sous le nom de Rompun. (Marque déposée de Bayer AG, Leverkusen). Sa formule est la suivante :



Nous remercions la firme Bayer pour les échantillons de produits purs qui nous ont permis de mener à bien notre étude.

### 2. Identification.

L'identification du pic de xylazine se fait par rapport à son index de rétention. Cet index défini par KOWATS en 1958 est une grandeur physique mieux reproductible que le temps de rétention.

Dans nos conditions expérimentales, les index de rétention sont les suivants :

sur OV17 : 2 360 ; sur OV1 : 1 950.

Nous avons utilisé 2 phases de polarité distinctes afin d'augmenter encore la sûreté de l'identification et par conséquent la spécificité de notre méthode.

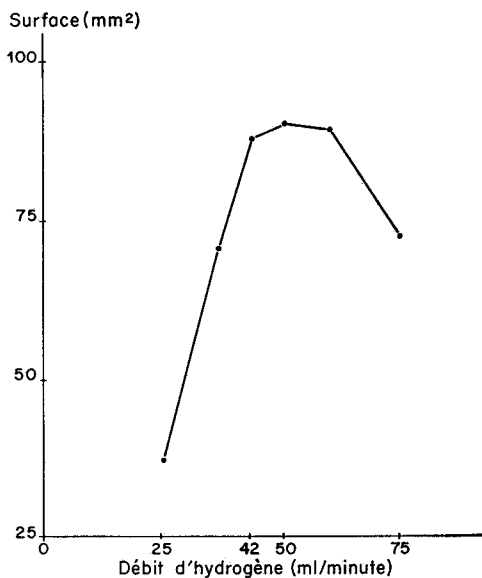


FIG. 1. — Influence du débit d'hydrogène sur la réponse de la détection  
*Hydrogen flow incidence on detection curve*

### 3. Étalonnage.

Nous avons procédé à cet étalonnage afin d'établir les limites entre lesquelles la réponse de l'appareil est linéaire et de vérifier qu'entre ces limites cette réponse est reproductible.

Pour réaliser cet étalonnage nous avons employé des solutions alcooliques de chlorhydrate de xylazine. La réponse de l'appareil est linéaire pour des quantités injectées comprises entre 3 à 3 000 nanogrammes. La corrélation entre la surface des pics (estimée par triangulation) et la quantité injectée est très bonne ( $r = 0,998$ ) (fig. 2).

Sur le tableau 1, figurent les surfaces des pics correspondant à 7 injections de la même solution de xylazine. La reproductibilité de la réponse, qui tient compte à la fois de la technique d'injection et de la réponse du détecteur, peut être considérée comme satisfaisante puisque le coefficient de variation est de 0,45 p. 100.

En résumé, notre technique de dosage nous permet de détecter au minimum 3 ng de chlorhydrate de xylazine soit 2,5 ng de base.

L'utilisation des phases OV17 et OV1 se justifie donc pour des études quantitatives concernant la xylazine. Le chlorhydrate de xylazine peut très bien être utilisé pour l'étalonnage puisque les pics obtenus sont symétriques, mis à part une très légère trainée due à une faible adsorption sur la phase OV17.

Cette technique de dosage nous a permis d'étudier divers paramètres qui peuvent agir sur le résultat de l'extraction de la xylazine à partir de solution aqueuse ou de prélèvements biologiques.

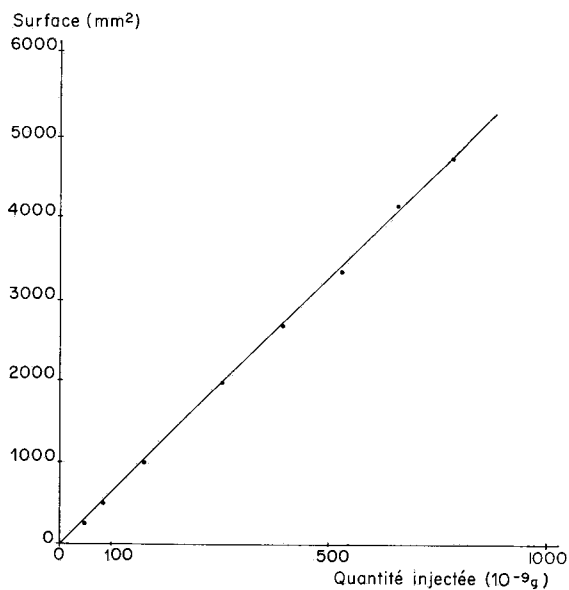


FIG. 2. — *Courbe d'étalonnage du chlorhydrate de xylazine*  
*Calibration curve with xylazine chlorhydrate*

TABLEAU I

*Répétabilité de la réponse à la suite d'injections d'un volume identique  
d'une même solution de xylazine*

*Repeatability of peak surface measurement with injections of identical volume  
of the same xylazine solution*

N° d'ordre	Volume injecté (μl)	Surface (mm <sup>2</sup> )
1	3,5	134
2	3,5	135,5
3	3,5	134
4	3,5	134
5	3,5	134,5
6	3,5	135
7	3,5	135
		$\bar{x} = 134,5$

B. — *Technique d'extraction*1. *Mise au point et discussion.*

De nos essais préliminaires avec plusieurs solvants organiques (éther, chloroforme, heptane additionné de 1,5 p. 100 d'alcool isoamylique) il ressort que l'éther éthylique peut être considéré comme un bon solvant d'extraction.

Afin de définir le pH optimum, d'une part pour l'extraction, d'autre part pour une éventuelle purification, nous avons étudié le partage de la xylazine entre l'éther et des solutions de pH différents.

Pour cela, 50 ml d'une solution aqueuse de chlorhydrate de xylazine à 4 mg/l sont ajustés à un pH donné à l'aide soit de soude 0,2 N, soit d'acide chlorhydrique 0,2 N.

Cette solution est ensuite agitée pendant 5 minutes avec 3 fois 50 ml d'éther bidistillé. Les phases étherées sont réunies et évaporées à sec. Le résidu d'évaporation est repris par 0,2 ml d'alcool éthylique bidistillé. Ainsi la solution initiale de xylazine est concentrée 250 fois. Le pourcentage de récupération est calculé en comparant la surface du pic correspondant à l'extrait à celle du pic d'une solution alcoolique de chlorhydrate de xylazine à 1 g/l, injectée dans les mêmes conditions dans le chromatographe. Il faut introduire de plus un facteur de correction de 1,166 afin de tenir compte du rapport des poids moléculaires du chlorhydrate et de la base.

Pour chaque pH nous avons effectué 5 essais afin de préciser les variations du pourcentage de récupération.

Ces résultats sont notés sur la figure 3. Il est intéressant de signaler que si le pourcentage de récupération augmente avec le pH, par contre le coefficient de variation de ce pourcentage diminue. Il existe une zone optimum de pH comprise entre le pH 9 et pH 11 pour laquelle le

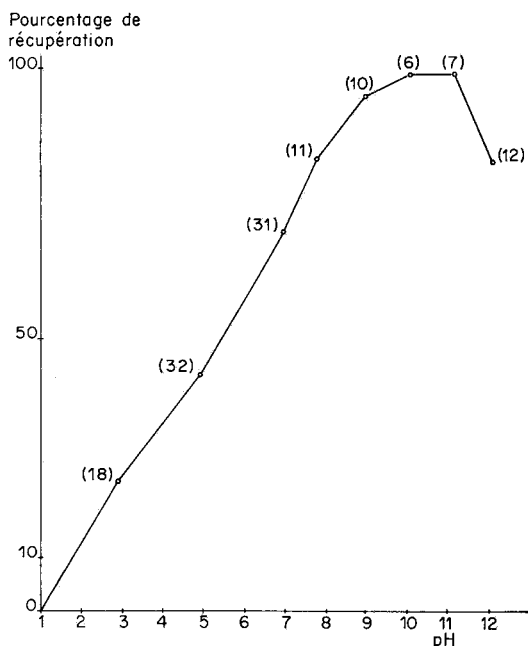


FIG. 3. — *Évolution du pourcentage de récupération en fonction du pH*

Les chiffres mentionnés entre parenthèses indiquent le coefficient de variation de ce pourcentage

$$\left( C_v = \frac{\text{écart type de la moyenne}}{\text{moyenne}} \times 100 \right)$$

*Variation of the percentage of recovery with the pH*

Figures between brackets indicate the ratio of variation of this recovery

$$\left( C_v = \frac{\text{standard deviation}}{\text{mean}} \times 100 \right)$$

pourcentage de récupération est proche de 100 p. 100. Pour le pH 12 ce pourcentage diminue. Cette diminution peut s'expliquer par une labilité de la xylazine en milieu trop alcalin. Pour les pH acides et plus particulièrement pour le pH 1 le pourcentage de récupération est nul, autrement dit la totalité de la xylazine est restée dans la phase aqueuse. Par conséquent, il est possible d'envisager, sans risque de perte, une purification par transfert dans les solutions aqueuses très acides de la xylazine extraite des milieux biologiques par l'éther. Cependant, nous n'avons pas utilisé cette éventualité car aucune interférence ne vient gêner l'interprétation des chromatogrammes obtenus.

Avec ce procédé d'extraction sélectif de la xylazine, nous pouvons aisément détecter des concentrations de l'ordre de 0,1 p.p.m. (fig. 4) à partir de solution biologique.

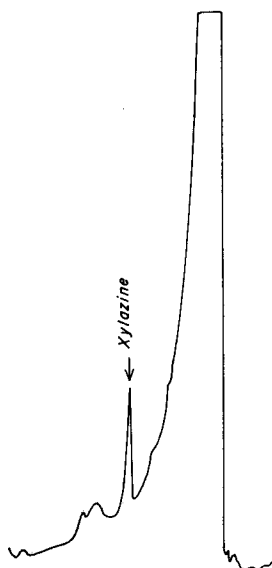


FIG. 4. — Chromatogramme d'un extrait de salive surchargée de 0,1 p.p.m. de xylazine avant extraction

*Chromatogram of saliva extract fortified with 0,1 p.p.m. xylazine before extraction*

## 2. Mode opératoire retenu.

Les extractions sont conduites dans des ampoules à décanter de 250 ml. 50 ml du liquide à analyser (salive ou urine) sont amenés à pH 9 par addition de NaOH 0,2 N. Cette solution alcaline est ensuite agitée pendant 5 minutes avec 3 fois 50 ml d'éther bidistillé.

Les phases étherées sont réunies, évaporées à sec. Le résidu est repris par 0,2 ml d'alcool bidistillé. 3  $\mu$ l sont ensuite injectés dans le chromatographe.

## CONCLUSION

Ce travail nous permet de disposer d'une méthode d'extraction à haut rendement pour la xylazine qui, couplée à la chromatographie en phase gazeuse, rend possible le dosage de ce nouveau tranquillisant avec sensibilité et spécificité dans les prélèvements biologiques.

Cette méthode peut donc être envisageable pour les contrôles antidopage lors des compétitions équestres.

*Reçu pour publication en novembre 1973.*

## SUMMARY

## A METHOD OF ESTIMATING XYLAZINE BY GAS CHROMATOGRAPHY

The author presents a method of detecting xylazine (2-(2,6 xylidino)-5,6-dihydro-4-H-1,3-thiazine) by gas chromatography. The phases OV1 and OV17 are suitable for the qualitative and quantitative analysis of this compound.

The method, after ether extraction from the original biological fluid, permits the detection of 0.1 p.p.m. of xylazine.

This degree of sensitivity raises the possibility of utilising the method for the eventual control of doping in racehorses.

## РЕЗЮМЕ

Метод исследования ксилазина путем хроматографии в газовой фазе.

Автор описывает метод распознавания ксилазина (2-(2,6-ксилидино)-5,6-дигидро-4-Н-1,3-тиазин) путем хроматографии в газовой фазе. Фазы ov1 и ov17 хорошо подходят, для качественного и количественного анализа этого состава.

Этот метод обнаружения в сочетании с извлечением при помощи эфира, исходя от щелочного раствора, позволяет обнаружить 0,1 ч. на миллион ксилазина в биологических растворах.

Эта чувствительность дает возможность смутно предвидеть использование данного метода, в случаях надобности проверок, когда подозревают введение спортивной лошади возбуждающих веществ.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AITKEN M. M., SANFORD J., 1972. Effects of tranquillizers on tachycardia induced by adrenaline in the horse. *Brit. veter. J.*, **128**, 3, VII-IX.
- KOWATS E., 1958. Gaschromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. *Helv. Chim. Acta*, **41**, 1915-1932.
- TRONICKE R., VOCKE G., 1970. Contribution à l'emploi du Rompun (®) comme sédatif et pour la pré-médication du cheval. *Inform. Méd. vétér.*, **4**, 231-238.
-