

## COMPLEX INTOXICATION BY TRAMADOL AND TIANEPTINE: A CASE REPORT

Wojciech LECHOWICZ

*Institute of Forensic Research, Cracow*

**ABSTRACT:** The appearance of a new product on the pharmaceutical market, especially an antidepressant, may lead in the near future to abuse or use in suicide attempts. A case of a complex poisoning of a middle-aged woman with tramadol and tianeptine is described. Tramadol and tianeptine were identified in the examined biological material. Tianeptine is the only drug in the dibenzothiazepine group that has been synthesized up till now. The concentration of tianeptine in whole blood was 12.5 mg/l, in urine 23 mg/l (total) and 3.2 mg/l (free). Tramadol concentrations were: in blood 5.0 mg/l, and in urine 60 mg/l. The presence of both tramadol and tianeptine have been confirmed in liver and stomach tissue.

**KEY WORDS:** Tianeptine; Tramadol; Blood concentrations; Toxicological analysis.

*Z Zagadnień Nauk Sądowych, z. XLIV, 2000, 130–139*

*Received 17 October 2000; accepted 3 November 2000*

### INTRODUCTION

Tianeptine (7-[(3-chloro-6,11-dihydro-6-methyldibenzo[c,f][1,2]thiazepin-11-yl)amino]heptanoic acid S,S-dioxide) is a tricyclic antidepressant compound of dibenzothiazepine type (Figure 1). It is the only representative of this subgroup. Tianeptine shows serotonergic activity by enhancing the presynaptic reuptake of serotonin [3, 4]. The half-life of tianeptine is 2.5 hours.

Tianeptine has no affinity for  $\alpha 1$  adrenergic and H1 histaminic receptors. Affinity for these receptors is responsible for the sedative properties of other antidepressants. The drug has no affinity for the muscarinic receptors. It does not act anticholinergically either. Clinical trials lead to the conclusion that tianeptine shows similar antidepressant efficacy to imipramine, nortriptyline and amitriptyline in neurotic depressive syndrome treatment [2].

The drug is applied in the treatment of exogenous depression and anxiety in alcohol abstinence syndrome. Adverse effects which may occur during treatment are nausea, vomiting, abdominal pain, tremor, constipation, sleepiness, headache and dizziness. During pregnancy and breast-feeding

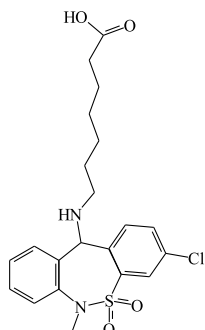


Fig. 1. Chemical structure of tianeptine.  
Compounds' properties: CAS# 66981-73-5;  
 $C_{21}H_{25}ClN_2O_4S$ ; Mw-436.95 (acid);  
 $C_{21}H_{24}ClN_2O_4SNa$ ; Mw-459.93 (sodium salt).

tianeptine treatment is forbidden. The drug exhibits interaction with MAO inhibitors [3].

Coaxil (Servier, France) is the only marketed pharmaceutical product containing tianeptine accepted by the pharmaceutical authorities in Poland. Each pill (30 per package) contains 12.5 mg of tianeptine in sodium salt form.

#### CASE REPORT

The ambulance service was informed that a middle-aged woman had fainted on the street. An ambulance arrived at the scene, help was given and the woman was taken home. The next day she was found dead in her flat. Several drugs were found by the deceased: Coaxil (tianeptine), Majamil (diclofenac), Myolastan (tetrazepam), Ketonal (ketoprofen), Cloranxen (clorazepate) and Tramal (tramadol). This was all the information that was gained in this case. Autopsy materials – femoral blood, urine, liver and stomach tissues – were sent for analysis.

#### MATERIALS AND METHODS

##### Standards

A tianeptine standard was achieved by its extraction from acidic (pH = 3) suspension of Coaxil in water using diisopropyl ether (Merck, Germany). The residue gained after crystallisation was weighed and dissolved in an appropriate amount of methanol (Merck, Germany). The homogeneity and purity of the standard solution was checked by high-pressure liquid chromatography with diode-array detection and gas chromatography mass spectrometry. Tramadol and prazepam standards were purchased from Sigma (USA).

### Autopsy material preparation

Liver and stomach tissues were homogenised and deproteinised using the sulphate-ammonium method according to Borkowski [1]. Both obtained homogenates were extracted by chloroform (POCh, Gliwice) from alkaline solution (pH = 9) and then by diethyl ether from acidic solution (pH = 3).

To free any tianeptine from its conjugates with glucuronic acid, hydrolysis of urine samples using  $\beta$ -glucuronidase and arylsulphatase (Merck, Germany) was performed. For this purpose 1 ml of urine was spiked with 40  $\mu$ l of the enzyme and 200  $\mu$ l of acetate buffer (pH = 5.5). Hydrolysis was performed for 45 min at a temperature of 55°C.

### Drug screening

Drug screening of material supplied for analysis was performed using a gas chromatograph linked with a mass-spectrometer (GC-MS) with ion trap detector (ITD) made by Varian/Finnigan MAT (Magnum). An HP-5MS capillary column (Hewlett-Packard) was applied for separation purposes. A gradient temperature program consisting of two segments:  $t$  (0 min) – 75°C,  $t$  (5 min) – 75°C,  $\Delta t$  (5–20 min) – 25°C/min. Acquisition was carried out in ion scanning mode (TIC) in a mass-to-charge range of 45–600.

Liver and stomach tissue extracts were examined using thin layer chromatography (TLC) on G-60 (Merck) silica plates. Separation of components was accomplished using the following organic solvent systems: benzene : diethyl ether (1:1), chloroform : acetone (9:1), methanol : 25% ammonia (98:2), chloroform : methanol : 25% ammonia (90:10:1), cyclohexane : benzene : diethylamine (67:2:4).

TABLE I. THE MAIN PARAMETERS OF THE MASS SPECTROMETER IN THE LC-MS TECHNIQUE

Parameter	Value
Fragmentor voltage	70 V
Capillary voltage	4000 V
Vaporizer temperature	300°C
Drying gas temperature	300°C
Drying gas flow	10 l/min
Drying gas pressure	50 psi
Corona current	4 $\mu$ A

Tianeptine and tramadol quantitation was performed using an HP-1100 liquid chromatograph coupled with a LC-MS (Hewlett-Packard) mass-spec-

trometer. Ionisation was carried out in an atmospheric-pressure chemical ionisation chamber (APCI). The fundamental parameters of the mass-spectrometer are displayed in the table below (Table I).

A LiChroCART 125x4 Purospher RP-18e (Merck) column was applied for drug separation. The mobile phase consisted of acetonitril and water with addition of 0.1 ml/l acetic acid.

## RESULTS

For the identification of tianeptine and tramadol, the best results were achieved using methanol : 25% ammonia (98:2) developing solution. The following reagents sequence coloured drugs to yellow-orange, and then brown (Dragendorff reagent, ferrum chloride, potassium iodoplatinate).

The retention index,  $R_f$ , of tianeptine in the developing system was 0.65. Identification of tramadol by mass spectrum was not a great problem. However, identification of tianeptine was difficult, as the Mass spectra library (NIST, USA), with more than 65 thousand compounds, does not contain tianeptine's mass spectrum. Therefore search results only indicated another compound with similar fragmentation to tianeptine, but not tianeptine itself. An appropriate match result was only obtained after introducing the mass spectrum of tianeptine into the library (Figure 2).

Both tianeptine and tramadol quantitation by the LC-MS technique was not difficult thanks to selectivity and relatively high concentrations (Figure 3). Concentrations of tianeptine and tramadol are shown in Table II.

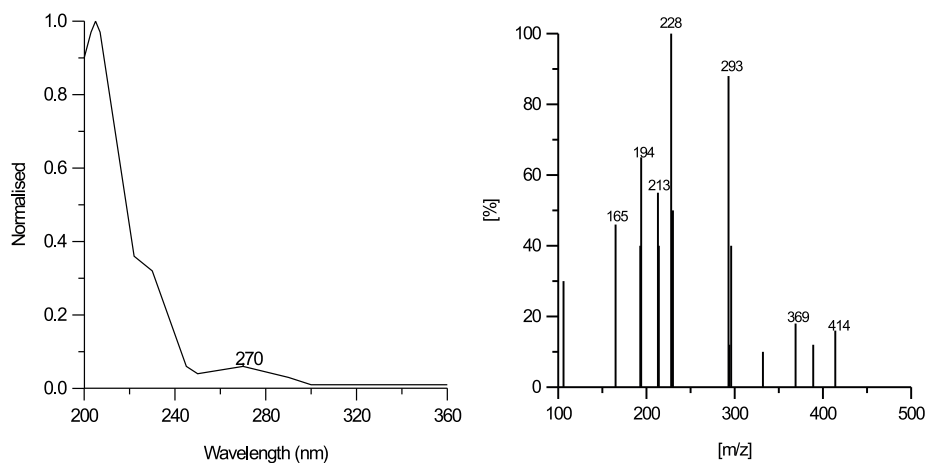


Fig. 2. Spectrophotometric and mass spectra of tianeptine. UV – maximum at 205, 270 nm; MS (70 eV) – 228, 293, 194, 213, 165 m/z.

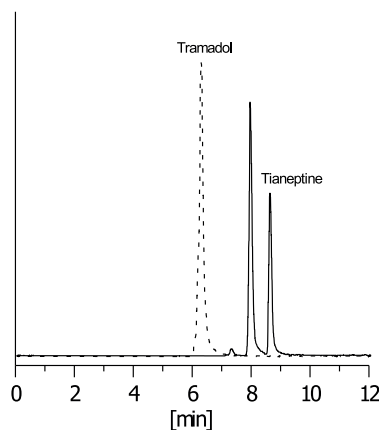


Fig. 3. Extracted ions chromatogram of tianeptine and tramadol obtained during blood analysis of a dead woman.

TABLE II. CONCENTRATIONS OF TIANEPTINE AND TRAMADOL IN ANALYSED AUTOPSY SAMPLES

Compound	Whole blood	Urine (non-hydrolysed)	Urine (enzymatic hydrolysis)	Liver	Stomach
Tianeptine	12.5 µg/ml	3.2 µg/ml	23 µg/ml	+	+
Tramadol	5.0 µg/ml	60 µg/ml	+	+	+

(+) – positive analysis, not quantitated.

## DISCUSSION

Therapeutic concentrations of tramadol and tianeptine in whole blood according to available data are 0.1–0.8 µg/ml and 0.3–0.7 µg/ml respectively. The tramadol concentration in the whole blood of the dead woman was 5 µg/ml, so it significantly exceeded the highest therapeutic levels for the drug. It should be noted that tramadol plasma levels in reported fatal cases are about 2 µg/ml. A very high concentration of tramadol in urine confirms ingestion of a lethal dose. A simultaneous high concentration of tianeptine, exceeding the highest therapeutic levels by more than ten times, may, however, be difficult to interpret, for two reasons: firstly, there are no available publications concerning fatal tianeptine poisonings, and, secondly, clinical trials have shown that very high doses of tianeptine are tolerated (337.5 mg = 27 pills).

The lack of papers concerning fatal tianeptine cases may indicate that use of this drug is safe. Nevertheless, tianeptine overdoses do occur and so publicising of such cases seems to be advisable.

## CONCLUSIONS

Both tianeptine identification in autopsy material and interpretation of the obtained results may cause some problems, due to a lack of physico-chemical data and unknown toxic and lethal (if any) concentrations in cases of poisoning.

Conducted analyses of autopsy material showed that about 15% of all tianeptine occurs in urine in free form (unconjugated with glucuronic acid). Therefore screening analysis may require the hydrolysis of glucuronic and sulphate conjugates of tianeptine. A very high concentration of tramadol in whole blood and urine may indicate a fatal poisoning. The situation is similar for tianeptine, but in the described case results obtained in clinical trials suggest non-fatal poisoning.

## References:

1. Borkowski T., Metody wyosabniania trucizn organicznych z materiału biologicznego, *Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii* 1968, t. XVIII, s. 95–100.
2. Martindale the complete drug reference, edition 32, Parfitt K. [ed.], Pharmaceutical Press, London 1999.
3. Podlewski J. K., Chwalibogowska-Podlowska A., *Leki współczesnej terapii*, PZWL, Warszawa 1994.
4. Wilde M. I., Benfield P., Tianeptine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in depression and coexisting anxiety and depression, <http://biopsychiatry.com/tianeptine.htm>

## PRZYPADEK ZŁOŻONEGO ZATRUCIA TRAMADOLEM I TIANEPTYNĄ

Wojciech LECHOWICZ

### WSTĘP

Tianeptyna (S,S-ditlenek kwasu 7-[(3-chloro-6,11-dihydro-6-metylodibenzo[c,f][1,2] tiazepin-11-ylo)-amino]-heptanowego) jest lekiem przeciwdepresyjnym, jedyną pochodną z grupy dibenzotiazepiny (rycina 1). Posiada ona działanie serotonergiczne, zwiększając wychwytywanie serotoniny w przestrzeni presynaptycznej [3, 4]. Jej czas półtrwania wynosi 2,5 godziny.

Tianeptyna nie wykazuje powinowactwa do receptorów adrenargicznych  $\alpha_1$  oraz histaminowych H1. W przypadku innych leków przeciwdepresyjnych posiadających takie powinowactwo występuje dodatkowo efekt uspakajający. Tianeptyna nie wykazuje ponadto powinowactwa do receptorów muskarynowych oraz nie działa antycholinergicznie. Jej podobieństwo do imipraminy, nomifenzyny oraz amitriptyliny pod względem działania przeciwdepresyjnego zostało wykazane w badaniach klinicznych syndromu depresji neurotycznej [2].

Tianeptyna jest stosowana w leczeniu depresji egzogennych, a także w stanach lękowych występujących podczas choroby alkoholowej w okresach abstynencji. Działanie niepożądane, które może pojawić się podczas przyjmowania leku, to nudności, wymioty, bóle brzucha, drżenia mięśniowe, zaparcia, senność, brak łaknienia, bóle i zawroty głowy. Tianeptyny nie należy przyjmować podczas ciąży oraz karmienia piersią. Lek ten wykazuje interakcje z inhibitorami MAO [3].

Na rynku polskim znajduje się tylko jeden lek dopuszczony do obrotu farmaceutycznego, którego składnikiem jest tianeptyna – Coaxil firmy Servier (Francja). Każda z tabletek (30 sztuk w opakowaniu) zawiera 12,5 mg tianeptyny w postaci soli sodowej.

### OPIS PRZYPADKU

Pogotowie ratunkowe otrzymało zgłoszenie o załabnięciu na ulicy kobiety w średnim wieku. Po przybyciu na miejsce zdarzenia i udzieleniu niezbędnej pomocy odwieziono ją do domu. W następnym dniu kobietę znaleziono martwą w jej mieszkaniu. Przy denatce zabezpieczono następujące preparaty: Coaxil (tianeptyna), Majamil (diklofenak), Myolastan (tetrazepam), Ketonal (ketoprofen), Cloranxen (klozaprat) oraz Tramal (tramadol). Powyższe informacje były jedynymi, które uzyskano w niniejszej sprawie.

Do analizy dostarczono krew, mocz oraz wycinki tkanki wątroby i żołądka denatki.

## MATERIAŁ I METODY

**Substancje wzorcowe**

Wzorzec tianeptyny uzyskano przez ekstrakcję eterem diizopropylowym (Merck, Niemcy) wodnej zawiesiny leku Coaxil (Servier, Francja) zakwaszonej kwasem solnym do odczynu  $\text{pH} = 3,0$ . Uzyskany po krystalizacji osad odważono i rozpuszczono w odpowiedniej ilości metanolu (Merck, Niemcy). Czystość roztworu wzorcowego badano metodą wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej z detekcją diodową oraz metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią masową.

Wzorzec tramadolu zakupiono w firmie Sigma, Stany Zjednoczone.

**Przygotowanie materiału do badań**

Tkankę wątroby oraz żołądka oddzielnie homogenizowano, a następnie odbiałczano metodą siarczanowo-amoniową wg Borkowskiego [1]. Uzyskane homogenaty poddano ekstrakcji ciągłej chloroformem (POCh, Gliwice) ze środowiska alkalicznego o  $\text{pH} = 9$  oraz eterem dietylowym (POCh, Gliwice) ze środowiska kwaśnego o  $\text{pH} = 3$ .

W celu uwolnienia tianeptyny z połączenia z kwasem glukuronowym wykonano hydrolizę moczu przy użyciu  $\beta$ -glukuronidazy z arylosulfatazą (Merck, Niemcy). W tym celu do 1 ml moczu dodano 40  $\mu\text{l}$  enzymu oraz 200  $\mu\text{l}$  buforu octanowego o  $\text{pH} = 5,5$ . Hydrolizę prowadzono przez 45 minut w temperaturze  $55^\circ\text{C}$ .

**Analiza skryningowa**

Do badań skryningowych dostarczonego materiału dowodowego użyto chromatografu gazowego sprzężonego ze spektrometrem masowym (GC-MS) z detektorem w postaci pułapki jonowej (ITD) firm Varian/Finnigan MAT w wersji Magnum. Rozdział w tej technice odbywał się przy użyciu kolumny kapilarnej HP-5MS firmy Hewlett-Packard. Zastosowano gradient temperatury termostatowania kolumny  $t$  (0 min) –  $75^\circ\text{C}$ ,  $t$  (5–20 min) –  $75^\circ\text{C}$ ,  $\Delta t$  (5–20 min) –  $25^\circ\text{C}/\text{min}$ .

Akwizycji dokonywano w trybie skanowania jonów w zakresie  $m/z$  wynoszącym 45–600.

Równolegle ekstrakty uzyskane z tkanki wątroby oraz żołądka badano metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) na płytkach pokrytych ręcznie żelem krzemionkowym G-60 firmy Merck. Rozdział dokonywano w kilku układach rozpuszczalników – benzen : eter etylowy (1:1), chloroform : aceton (9:1), metanol : 25% amoniak (98:2), chloroform : metanol : 25% amoniak (90:10:1), cykloheksan : benzen : dietyloamina (67:2:4).

Oznaczenia tianeptyny oraz tramadolu prowadzono przy użyciu chromatografu cieczowego sprzężonego ze spektrometrem masowym HP-1100 firmy Hewlett-Packard (LC-MS). Zastosowano komorę do chemicznej jonizacji pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI). Podstawowe parametry spektrometru masowego zamieszczono w tabeli I.

Rozdział prowadzono na kolumnie LiChroCART 125 x 4 z wypełnieniem Purospher RP-18e firmy Merck. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina acetonitrylu oraz wody z dodatkiem 0,1 ml/l kwasu octowego.

## WYNIKI

Podczas identyfikacji tramadolu oraz tianeptyny układem, w którym uzyskano najlepszy rozdział, okazała się mieszanina metanol : 25% amoniak (98:2). Zastosowane w podanej kolejności odczynniki wybarwiały wymienione leki na kolor żółto-pomarańczowy, a następnie brązowy (odczynnik Dragendorffa, chlorek żelaza (III), jodoplatynian potasu). Współczynnik retencji  $R_t$  tianeptyny w tym układzie wynosił 0,65.

Identyfikacja tramadolu na podstawie widma masowego nie przedstawiała większych problemów. Natomiast identyfikacja tianeptyny była utrudniona, gdyż posiadana biblioteka widm masowych (NIST, Stany Zjednoczone) nie zawierała jej widma. Wynik poszukiwania wskazywał więc na inny związek o podobnej do tianeptyny fragmentacji. Poprawne dopasowanie uzyskano dopiero po wprowadzeniu do biblioteki widma masowego wzorca tianeptyny (rycina 2).

Oznaczenie zarówno tramadolu, jak i tianeptyny techniką LC-MS z powodu jej dużej selektywności oraz wysokich stężeń również nie nastroczało kłopotów (rycina 3). Wyznaczone stężenia tianeptyny oraz tramadolu zamieszczono w tabeli II.

## OMÓWIENIE WYNIKÓW

W przypadku terapeutycznego stosowania tramadolu oraz tianeptyny stężenia tych leków we krwi (wg dostępnej literatury) wynoszą odpowiednio 0,1–0,8  $\mu\text{g/ml}$  oraz 0,3–0,7  $\mu\text{g/ml}$ . Wyznaczone stężenie tramadolu we krwi zmarłej kobiety wynosiło 5,0  $\mu\text{g/ml}$ , znacznie więc przekraczało najwyższe stężenie terapeutyczne. Dość należy, iż podawane w literaturze stężenia tramadolu zanotowane w przypadkach śmiertelnych wynoszą około 2  $\mu\text{g/ml}$  w surowicy krwi. Bardzo wysokie stężenie tramadolu w moczu potwierdza przyjęcie śmiertelnej dawki leku. Problemem natury interpretacyjnej może być równoczesne wysokie stężenie tianeptyny, kilkunastokrotnie przewyższające terapeutyczny poziom tego leku. Wspomniany problem wynika z dwóch przyczyn: po pierwsze, brakuje dostępnych publikacji dotyczących zatruc śmiertelnych tianeptyną; po drugie informacje pochodzące z badań klinicznych wskazują, iż bardzo wysokie dawki tego leku (337,5 mg = 27 tabletek) są tolerowane.

Brak w literaturze specjalistycznej doniesień o przypadkach zatruc tianeptyną może świadczyć o tym, że stosowanie tego leku jest bezpieczne. Jednak przypadki przedawkowania tianeptyny występują, a więc celowe jest prezentowanie wyników analiz toksykologicznych dotyczących podobnych zdarzeń.

## PODSUMOWANIE

Identyfikacja tianeptyny w materiale biologicznym oraz interpretacja uzyskanych wyników mogą sprawiać trudności z powodu braku danych dotyczących jej właściwości fizykochemicznych oraz zakresów stężeń w przypadkach zatruc tym lekiem. Jak wynika z danych uzyskanych podczas analizy, około 15% tianeptyny występuje w moczu w postaci niezwiązanej. W przypadku skryningu leków istotnym może więc być etap hydrolizy połączeń glukuronowych oraz sulfonowych tianeptyny. Wysokie stężenie tramadolu we krwi oraz moczu mogą wskazywać na śmiertelne za-

trucie tym lekiem. Podobna sytuacja ma miejsce w przypadku tianeptyny, lecz w opisanym przypadku dane uzyskane z badań klinicznych sugerują zatrucie nie prowadzące do zgonu.