J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 17, 1979, pp. 85–88

# Zum Nachweis des neuen Analgetikums Tramadol[1]) (Tramal®)[2])

Von *H. Schütz*

*Aus dem Institut für Rechtsmedizin (Leitung: Prof. Dr. Dr. G. Schewe) der Universität Gießen*

(Eingegangen am 15. Juni/6. September 1978)

*Herrn Professor Dr. Dr. h. c. H. Böhme zum 70. Geburtstag in Verehrung gewidmet*

**Zusammenfassung:** Analytische Daten (DC, GLC, UV, IR, MS) des neuen Analgetikums Tramadol werden beschrieben. Weiterhin wird über die Extraktion biologischer Proben und erste Ergebnisse der Untersuchungen zur Biotransformation berichtet.

*Detection of the new analgetic Tramadol (Tramal®)*

**Summary:** Analytical data (TLC, GLC, UV, IR, MS) of the new analgetic, Tramadol are described. Extraction of the material from biological samples and preliminary results on its biotransformation are also reported.

## Einleitung

Nach Nefopam (Ajan®), über dessen Nachweis und Biotransformation wir vor einiger Zeit berichteten (1, 2), wurde kürzlich (3, 12–29) erneut ein starkes Analgetikum eingeführt, das wiederum von beträchtlichem chemisch-toxikologischem Interesse ist (Untersuchungen im Rahmen von Abhängigkeits- und Vergiftungsfällen, verkehrsmedizinische Bedeutung im Hinblick auf die vom Hersteller angegebene Beeinflussungsmöglichkeit des Reaktionsvermögens, insbesondere in Verbindung mit Alkohol (4)).

Es handelt sich hierbei um das Aminomethylcyclohexanolderivat Tramadol (Tramal®)[3]) mit der nachfolgend wiedergegebenen Struktur (Abb. 1):

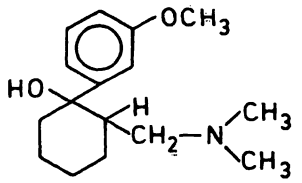


Abb. 1. Formel von Tramadol (Tramal®).

Über die chemischen und physikochemischen Eigenschaften (13, 14), die Pharmakologie (13, 15–18), die Toxikologie (19) und die klinische Wirkung (20–29) von Tramadol wurde ausführlich berichtet, während zur Biotransformation und Pharmakokinetik bislang nur qualitative Angaben veröffentlicht wurden (30). Da sich in der chemisch-toxikologischen Praxis das Problem des Nachweises jedoch bereits kurze Zeit nach der Neueinführung eines Präparates stellt, leiteten wir Untersuchungen zur chemisch-toxikologischen Analytik ein, über deren Ergebnisse nachstehend berichtet werden soll.

Allgemeine Daten für Tramadol

| | |
|---|---|
| Summenformel: | $C_{16}H_{25}NO_2$<br>$C_{16}H_{25}NO_2 \cdot HCl$ |
| Molekulargewicht: | Base: 263,4<br>Hydrochlorid: 299,84 |
| Löslichkeit: | Base: In den meisten organischen Lösungsmitteln gut bis sehr gut löslich |
| | Hydrochlorid: löslich in 30 Teilen Wasser, 35 Teilen 0,1 mol/l HCl und 30 Teilen Methanol. |
| Schmelzpunkt: | Base: Kein definierter Fp.<br>Hydrochlorid: 179–181 °C (unkorr.) |
| Handelsform: | Ampullen: 1 ml Injektionslösung enthält 50 mg Tramadol-Hydrochlorid |
| | Zäpfchen: 100 mg Tramadol-Hydrochlorid |
| Maximale Tagesdosis: | Nur in Ausnahmefällen über 400 mg Tramadol-Hydrochlorid (4). |

## Material und Methoden

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen

*Trägermaterial*

DC-Fertigplatten Kieselgel 60 $F_{254}$ (E. Merck, Darmstadt), aufsteigende Methode, Kammersättigung, keine besondere Aktivierung der DC-Platten.

[1]) = (±)-*trans*-2-(dimethylamino-methyl)-1-(*m*-methoxy-phenyl)-cyclohexanol.
[2]) = (±)-*trans*-2-(dimethylamino-methyl)-1-(*m*-methoxy-phenyl)-cyclohexanol-hydrochlorid.
[3]) Wir danken Herrn Prof. Dr. *Flohé* (Grünenthal GmbH) für die freundliche Überlassung von Substanzmustern.

0340-067X/79/0017-0085$2.00
© by Walter de Gruyter & Co. · Berlin · New York

Tab. 1. Dünnschichtchromatographie von Tramadol und anderen gebräuchlichen Pharmaka.

| Substanz | $R_f$-Werte in Fließmittel:*) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Essigester 85 ml<br>Methanol 10 ml<br>Ammoniak 5 ml | *iso*-Propanol 95 ml<br>Ammoniak 5 ml | Acetonitril 80 ml<br>Methanol 20 ml<br>Ammoniak 6 ml | Methanol 99 ml<br>Ammoniak 1 ml | Benzol 80 ml<br>*iso*-Propanol 20 ml<br>Ammoniak 1 ml |
| Tramadol | 0,94 | 0,84 | 0,90 | 0,65 | 0,47 |
| Codein | 0,47 | 0,53 | 0,65 | 0,47 | 0,16 |
| Coffein | 0,72 | 0,67 | 0,87 | 0,70 | 0,38 |
| Diphenhydramin | 0,92 | 0,80 | 0,88 | 0,66 | 0,49 |
| Methaqualon | 0,95 | 0,87 | 0,97 | 0,83 | 0,84 |
| Morphin | 0,22 | 0,30 | 0,39 | 0,42 | 0,07 |

Dünnschichtchromatographie von Tramadol und zwei Hauptmetaboliten (Desalkylierungsprodukte)

| Substanz | Benzol 80 ml<br>*iso*-Propanol 20 ml<br>Ammoniak 3 ml | Eine Detektion der Metaboliten ist ebenfalls mit *Dragendorff*-Reagenz (gelbbraun) bzw. Kaliumiodoplatinat (violett) möglich. |
|---|---|---|
| Tramadol | 0,88 | |
| Metabolit I | 0,67 | |
| Metabolit II | 0,31 | |

*) Bei der Angabe der Fließmittelzusammensetzung bedeutet Ammoniak: Ammoniaklösung (250 g/kg)

*Fließmittel*

Vgl. Tabelle 1.

Als Referenzsubstanzen wurden die häufig zu diesem Zweck benutzten Wirkstoffe Codein, Coffein, Diphenhydramin und Methaqualon benutzt. Weiterhin wurde Morphin als starkes Analgetikum vergleichsweise mitgeführt.

*Detektionsmöglichkeiten*

Trocknen der entwickelten DC-Platte bei 50 °C während etwa 10 min.

1. Dragendorff-Reagenz nach Munier und Macheboeuf (vgl. *Stahl* (5), S. 829, Nr. 89): Gelbbraune Farbtönung mit Tramadol.

2. Kaliumiodoplatinat (vgl. *Stahl* (5), S. 837, Nr. 140): Violette Anfärbung mit Tramadol.

3. Folin-Ciaucalteaus-Reagenz (vgl. *Stahl* (5), S. 832, Nr. 108): Blauviolette Farbtönungen insbesondere mit phenolischen Metaboliten.

Die Trennergebnisse sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

Gaschromatographische Untersuchungen

Gerät: Varian Aerograph Series 2100 mit FID; OT 190 °C, ET 220 °C, FID-Zuleitung 250 °C; Säule: Etwa 1,5 m Glas, 2 mm ID mit 3% OV-17 bzw. 3% SE-30 jeweils auf Chromosorb G, AW/DMCS (80/100 mesh); Trägergas: Stickstoff ($p_{N_2}$ = etwa 98 kPa).

UV-Photometrie

Gerät: Unicam S. P. 800 (Kalibrierung mit Holmium, Quarzküvetten mit d = 1 cm, p. a. Reinheitsgrade der Lösungsmittel).

Substanzkonzentrationen: Etwa 20 mg/l.

IR-Spektroskopie

Gerät: Perkin Elmer Typ 337, Standard-Preßling für Base und Hydrochlorid, etwa 1 mg Substanz pro 300 mg KBr (UVASOL). Mittlere Registriergeschwindigkeit, Slit = N.

Massenspektrum

Gerät: Varian MAT 101 (Direkteinlaß, Ionenquelle 66 °C, Ionisierungsenergie 70 eV).

Extraktion des Harnes

Jeweils 100 ml eines 12-Stunden Sammelharnes wurden bei pH 11 mit Chloroform (Verhältnis Urin zu Extraktionsmittel 1 + 1) ausgeschüttelt.

Zur Konjugatspaltung wurde bei pH 5,5 und 37 °C etwa 18 Stunden mit Arylsulfatase/β-Glucuronidase (5 ml/l Urin) inkubiert. Anschließend erfolgten Extraktionen bei pH 9 mit Chloroform/*iso*-Propanol (Volumina 40 ml + 10 ml). Die Extrakte wurden im Vakuumrotationsverdampfer bei 30 °C schonend eingeengt und bis zur Analyse tiefgefroren aufbewahrt.

## Ergebnisse und Diskussion

### Dünnschichtchromatographische Untersuchungen

Die Trennergebnisse sind in Tabelle 1 wiedergegeben. Die Detektion erfolgte mit den beschriebenen Detektionsmitteln (zur Indizierung von Coffein wurde die Fluoreszenzminderung bei 254 nm herangezogen).

### Gaschromatographische Untersuchungen

*Trennergebnisse*

| Substanz | Nettoretentionszeit | Retentionsindex (8, 9, 10) |
|---|---|---|
| OV-17 | | |
| Tramadol | 227 s | 2230 |
| Diphenhydramin | 151 s | 2155 |
| SE-30 | | |
| Tramadol | 160 s | 1945 |
| Diphenhydramin | 123 s | 1880 |

### UV-Photometrie

Die UV-Spektren sind in Abbildung 2 wiedergegeben.
Daten:
In Ethanol abs.:
Maxima bei 273 nm und 279 nm, Minimum bei 242 nm
in 0,1 mol/l HCl:
Maxima bei 272 nm und 277 nm, Minimum bei 242 nm
0,1 mol/l NaOH:
Maxima bei 272 nm und 277 nm, Minimum bei 240 nm.

### IR-Spektren

Die IR-Spektren sind in Abbildung 3 (Tramadol-Hydrochlorid) bzw. Abbildung 4 (Tramadol-Base) wiedergegeben.

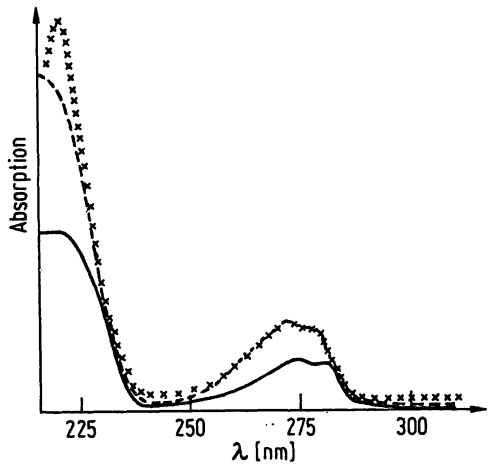


Abb. 2. UV-Spektren von Tramadol (Tramal®).
——— = in Ethanol abs.,
– – – – = in 0,1 mol/l HCl,
×××× = in 0,1 mol/l NaOH.
UNICAM S. P. 800 (Kalibrierung mit Holmium).

## Massenspektrum[4])

Das Massenspektrum von Tramadol ist in Abbildung 5 wiedergegeben.

### *Interpretationsmöglichkeiten*

Beachtenswert ist der stark ausgeprägte Peak für das Molekülion. Für die Interpretation der übrigen Peaks bieten sich (vorbehaltlich einer Absicherung durch Hochauflösungswerte) folgende Möglichkeiten an: m/e = 218: Verlust von Dimethylamin. m/e = 200: $H_2O$-Abspaltung aus m/e = 218. m/e = 188: Verlust von Formaldehyd. m/e = 173: anschließende Abspaltung von Methyl, bzw. m/e = 160: anschließende Abspaltung von Ethylen. m/e = 135: *m*-Methoxybenzoylkation (häufig bei Benzylalkoholen). m/e = 84: $CH_2=CH-CH\overset{+}{N}<^{CH_3}_{CH_3}$. m/e = 77: $C_6H_5^+$. m/e = 107: Methoxyphenyl.

[4]) Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. *G. Spiteller* für seine Unterstützung bei der Abfassung dieses Abschnittes.

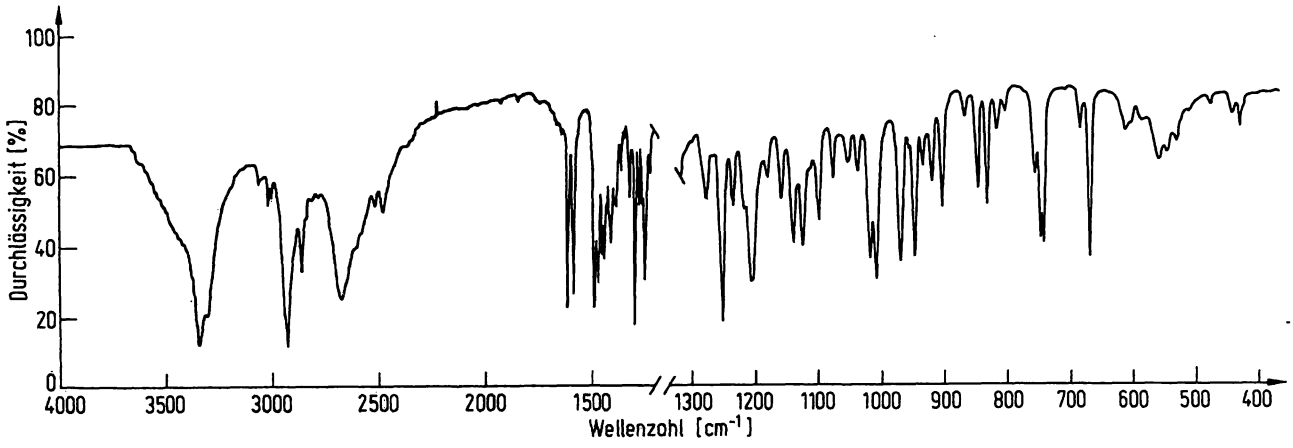


Abb. 3. IR-Spektrum von Tramadol-Hydrochlorid PERKINELMER 337 (KBr-Technik). Einige wichtige Bandenzuordnungen lauten:

3340 $cm^{-1}$: ν– OH
ca. 2900 $cm^{-1}$: $\nu_{as.}$–$CH_2$– bzw. –$CH_3$
ca. 2680 $cm^{-1}$: ν $HN^+$–$CH_2$–
ca. 1600 $cm^{-1}$: ν –C=C– (arom.)
ca. 1240 $cm^{-1}$: $\nu_{as.}$–C–O–$CH_3$
ca. 1040 $cm^{-1}$: ν –C–O–$CH_3$
ca. 700–800 $cm^{-1}$ δ –C–H (Benzolring)

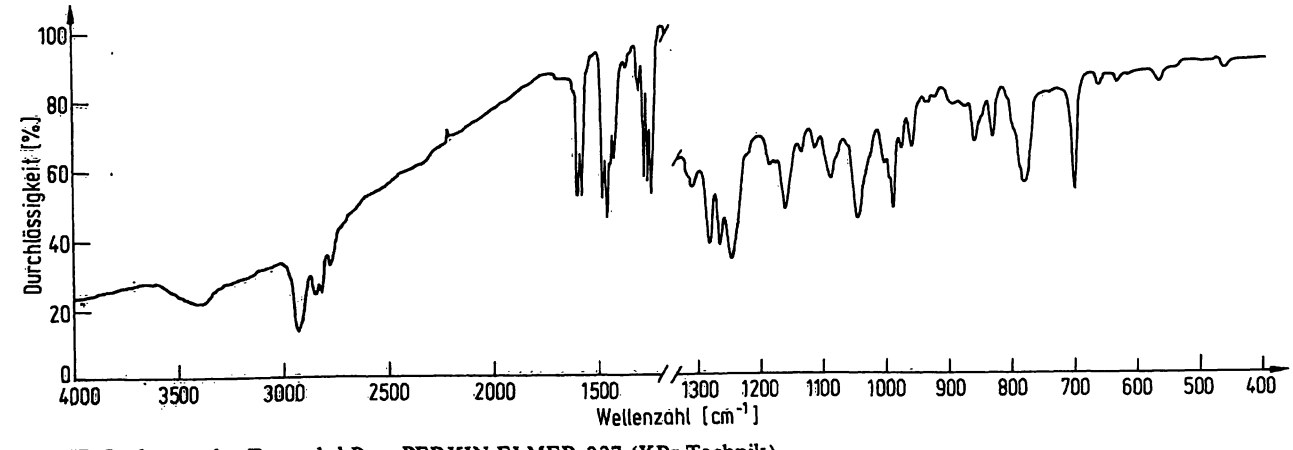


Abb. 4. IR-Spektrum der Tramadol-Base PERKIN ELMER 337 (KBr-Technik).

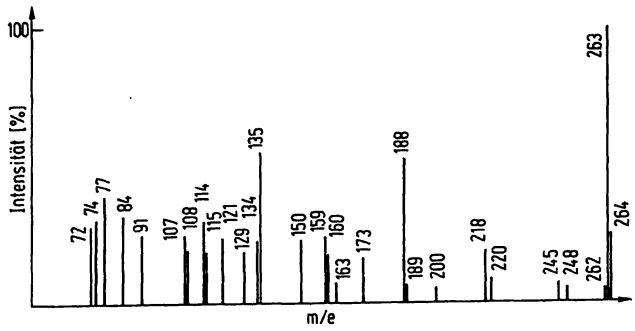


Abb. 5. Massenspektrum von Tramadol (Tramal®). VARIAN MAT 101 (Direkteinlaß, Ionenquelle 66 °C, 70 eV).

## Ergebnisse der Untersuchungen zur Biotransformation und Ausscheidung im Harn

In der vorliegenden Arbeit soll das Hauptgewicht auf der analytischen Seite liegen, um Daten zum Nachweis von Tramadol zur Verfügung stellen zu können. Die ausführliche Darstellung der noch nicht abgeschlossenen Untersuchungen zur Biotransformation und Pharmakokinetik bleibt einer späteren Publikation vorbehalten. Dennoch sollen nachstehend einige vorläufige Ergebnisse zu diesen Fragestellungen mitgeteilt werden:

1. Nach einer einmaligen Applikation von 100 mg Tramadol-Hydrochlorid (= Tramal$^R$) als Zäpfchen konnte in 100 ml des ersten 12-Stunden-Sammelurins unverändertes Tramadol in einer Größenordnung von 500–1000 µg/100 ml gaschromatographisch nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck wurde der bei pH 11 mit Chloroform gewonnene Basenextrakt (vgl. Methodik) untersucht. Die beschriebene Methodik ist hinreichend empfindlich, um noch 100 Stunden nach der Applikation unveränderten Wirkstoff (Größenordnung 500–1000 ng/100 ml) zu identifizieren.

Diese Befunde entsprechen den vorläufigen Angaben des Herstellers (30) zur Ausscheidungskinetik von Tramadol.

2. Die Untersuchung des Basenextraktes lieferte weiterhin Hinweise auf die renale Ausscheidung von zwei Metaboliten (vgl. Tab. 1). Nach ersten spektroskopischen Ergebnissen handelt es sich dabei um ein Mono- bzw. Didesalkylierungsprodukt von Tramadol.

Die Richtigkeit dieser Vermutung wurde uns zwischenzeitlich bestätigt (11). Nach Auskunft des Herstellers konnten die Metabolite O-Desmethyl-, N-Desmethyl- und O,N-Bisdesmethyl-Tramadol nachgewiesen werden (11, 30).

3. Im Phenolbasenextrakt nach der enzymatischen Hydrolyse traten ferner zahlreiche phenolische Metaboliten auf, die sich mit *Folin-Ciaucalteaus*-Reagenz (aber auch mit *Dragendorff*-Reagenz und Kaliumiodoplatinat) anfärben ließen. Diese Substanzen konnten erst nach der Konjugatspaltung extrahiert werden, lagen vorher demnach offensichtlich als Glucuronide oder Sulfate vor. Eine Strukturaufklärung ist eingeleitet, aber noch nicht abgeschlossen.

## Literatur


1. Ebel, S. & Schütz, H. (1977), Arch. Toxicol. *38*, 239–250.
2. Ebel, S. & Schütz, H. (1978), Arch. Pharm. (Weinheim Ger.) *311*, 547–551.
3. Pharmazeutische Stoffliste, 4. Aufl., 61. Erg. Lfg., S. 1599, bearb. u. hrsg. vom Arzneimittelbüro der ABDA, Werbe- und Vertriebsgesellschaft Deutscher Apotheker mbH, Frankfurt/M.
4. Beipackzettel zu Tramadol (Tramal®), Fa. Grünenthal GmbH, Stolberg.
5. Stahl, E. (1967), Dünnschichtchromatographie, 2. Aufl., Springer-Verlag, Berlin–Heidelberg–New York.
6. Geldmacher-von Mallinckrodt, M. (1976), Einfache Untersuchungen auf Gifte im klinisch-chemischen Laboratorium, Thieme, Stuttgart, S. 157.
7. Schütz, H. W. (1971), Beitr. Gerichtl. Med. *28*, 354–358.
8. Kováts, E. (1958), Helv. Chim. Acta *41*, 1915.
9. Kaiser, R. E. (1974), Chromatographia *7*, 251–257.
10. Post, D. (1976), Beitr. Gerichtl. Med. *34*, 219–227.
11. Dr. Lintz, Grünenthal GmbH, Stolberg (pers. Mitteilung).
12. Flohé, L. & Friderichs, E. (1978), Arzneim. Forsch. (Drug Res.) *28*, 99–106.
13. Flick, K., Frankus, E. & Friderichs, E. (1978), Arzneim. Forsch. (Drug Res.) *28*, 107–113.
14. Frankus, E., Friderichs, E., Kim, S. M. & Osterloh, G. (1978), Arzneim. Forsch. (Drug Res.) *28*, 114–121.
15. Friderichs, E., Felgenhauer, F., Jongschaap, P. & Osterloh, G. (1978), Arzneim. Forsch. (Drug Res.) *28*, 122–134.
16. Osterloh, G., Friderichs, E., Felgenhauer, F., Günzler, W. A., Henmi, Z., Kitano, K., Nakamura, M., Hayashi, H. & Ishii, I. (1978), Arzneim. Forsch. (Drug Res.) *28*, 135–151.
17. Murano, T., Yamamoto, T., Endo, N., Kudo, Y., Okada, N., Masuda, Y. & Yano, I. (1978), Arzneim. Forsch. (Drug Res.) *28*, 152–158.
18. Yanagita, T. (1978), Arzneim. Forsch. (Drug Res.) *28*, 158–163.
19. Lagler, F., Helm, F., Etzel, V. & Kiel, H. (1978), Arzneim. Forsch. (Drug Res.) *28*, 164–172.
20. Krueger, H. & Fazel-Madjlessi, A. (1978), Arzneim. Forsch. (Drug Res.) *28*, 173–176.
21. Krueger, H. & Müller-Limmroth, W. (1978), Arzneim. Forsch. (Drug Res.) *28*, 176–178.
22. Müller-Limmroth, W. & Krueger, H. (1978), Arzneim. Forsch. (Drug Res.) *28*, 179–180.
23. Rost, A. & Schenck, E. G. (1978), Arzneim. Forsch. (Drug Res.) *28*, 181–183.
24. Vogel, W., Burchardi, H., Sihler, K. & Valič, L. (1978), Arzneim. Forsch. (Drug Res.) *28*, 183–186.
25. Friedel, B. (1978), Arzneim. Forsch. (Drug Res.) *28*, 187–189.
26. Huber, H. P. (1978), Arzneim. Forsch. (Drug Res.) *28*, 189–191.
27. Arend, I., von Arnim, B., Nijssen, J. & Scheele, J. (1978), Arzneim. Forsch. (Drug Res.) *28*, 199–208.
28. Schenck, E. G. & Arend, I. (1978), Arzneim. Forsch. (Drug Res.) *28*, 209–212.
29. Flohé, L., Arend, I., Cogal, A., Richter, W. & Simon, W. (1978), Arzneim. Forsch. (Drug Res.) *28*, 213–217.
30. Informationsschrift der Grünenthal GmbH: Tramal$^R$; stark wirksames Analgetikum, Stolberg, 1978.


Dr. rer. nat. Harald Schütz
Institut für Rechtsmedizin
der Justus Liebig-Universität
Frankfurter Straße 58
D-6300 Gießen