

COMPLEX INTOXICATION WITH *p*-METHOXYAMPHETAMINE (PMA) AND OTHER PHENYLALKYLAMINES

Wojciech LECHOWICZ, Ewa CHUDZIKIEWICZ, Ewa JANOWSKA,
Roman STANASZEK

Institute of Forensic Research, Cracow

ABSTRACT: The paper describes the first cases of fatal intoxication by *p*-methoxyamphetamine (PMA) encountered in the course of routine investigations at the Institute of Forensic Research. Three such cases were noted in total, of which two concerned high concentrations of the drug. Liquid chromatography mass spectrometry atmospheric pressure chemical ionisation was used for identification of amphetamines. Acquisition was performed in selected ion monitoring mode (SIM). Moreover amphetamine and ephedrine were identified in the whole blood and urine. A similar drugs profile (to that of blood) was found in illicit tablets containing PMA investigated at the institute.

KEY WORDS: PMA; Fatal intoxication; Concentration, LC/MS-APCI.

Z Zagadnień Nauk Sądowych, z. XLVIII, 2001, 118–126
Received 26 September 2001; accepted 26 October 2001

INTRODUCTION

The first case concerning fatal intoxication due to *p*-methoxyamphetamine (PMA) was published in Canada in 1974 [2]. Over the past few years fatalities have also been noted in the United States [3, 4], Australia [4] and Spain [6]. The most frequently mentioned reason for the deaths was ingestion of pills bearing the Mitsubishi logo (Figure 2).

A high body temperature, up to 46.1°C, was observed in people in the described cases of fatal poisoning by PMA [1]. This was usually accompanied by intracranial haemorrhage.

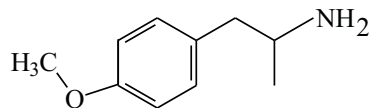


Fig. 1. Chemical structure of PMA.

Investigations in rodents showed that the neurotoxic action of PMA and PMMA (but at higher concentrations of PMMA) was comparable to that of 3,4-methylenedioxymetamphetamine (MDMA) [5]. At the same time, it was ascertained that PMMA exhibits lower

neurotoxicity than MDMA. Mouse brain *in vitro* investigations showed that PMA exhibits twenty times stronger inhibition of monoaminooxidase type A (MAO) than (\pm)amphetamine.

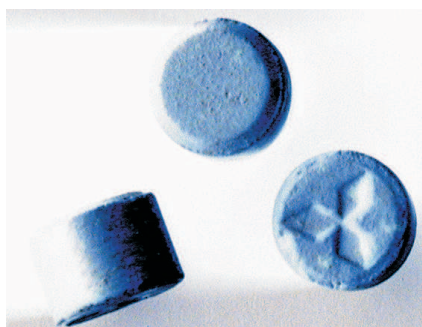


Fig. 2. Illicit tablets containing PMA, amphetamine and ephedrine.

In humans this drug is metabolised mainly through O-demethylation catalysed by CYP2D6 and by oxidation at the side chain [7]. The main metabolites of PMA are 4-hydroxyamphetamine and 4-hydroxynorephedrine [5]. Some publications indicated that there was a possible interaction of PMA with other drugs, for example, fluoxetine [1].

The first case of fatal PMA poisoning noted at the Institute of Forensic Research was at the beginning of 2000.

Two other fatalities were documented over the next several months. Case histories, analysis methodology with emphasis on drug identification, extraction from biological material (whole blood, urine) and, finally, quantitation of PMA and coexisting amphetamines are presented in this work.

CASE HISTORY

Case 1

A 23-year-old female employed in an escort agency had for some time been a regular drugs (ab)user, according to witnesses' testimonies. The main drug used was powdered amphetamine, taken two or three times a day together with drinks. On the critical day, while in the company of a male friend, she took ecstasy pills in addition to amphetamine. According to the frequently changed testimony of the male friend, she may have taken between 3 and 7 pills of the drug during the afternoon and evening in question. The following morning, after waking up, the man, still under the influence of drugs, ascertained that the woman was probably dead and called an ambulance. The doctor who arrived determined that the death most probably occurred at night. The autopsy, conducted at a later time, could not exclude poisoning with substances not causing macroscopic changes in internal organs, including drugs of abuse.

Case 2

The case concerned the death of young woman. There was little information available about the occurrence, but witnesses' statements indicated that before death the woman had taken ecstasy pills.

Case 3

At about 3.30 pm a young female was drinking alcoholic drinks in the company of four men. Witnesses testified that, together with the drinks, she took 1–4 pills, which she referred to as “ecstasy”. Between 4.00–4.30 am next day she started to “behave strangely” and then lost consciousness. An ambulance was called, and the doctor pronounced her dead. During the scene inspection and autopsy no body injuries were revealed. Analysis of blood and urine samples gave negative results for alcohol.

MATERIALS AND METHODS

In two described cases (no. 1 and 2) only whole blood samples were submitted for analysis, but in one case (no. 3) both whole blood and urine were supplied. Amphetamines quantitation was performed using a Hewlett-Packard HP-1100 liquid chromatograph mass spectrometer (LC/MS). An atmospheric pressure chemical ionisation chamber was applied. The main parameters of the mass spectrometer are presented in Table I.

TABLE I. MAIN MS PARAMETERS APPLIED DURING SCREENING AND QUANTITATION OF AMPHETAMINE DERIVATIVES

Parameter	Value
Fragmenter voltage	60 V
Capillary voltage	4200 V
Vaporizer temperature	320°C
Drying gas temperature	320°C
Gas flow	5 l/min
Gas pressure	50 psi
Corona current	3 μ A

Separation was performed using a Merck LiChroCART 125 4 Purospher RP 18e. The mobile phase consisted of a mixture of acetonitril (B) and water (A) with formic acid addition at 1 ml per 1l of mobile phase. Its composition was programmed as follows: 0 min – 0% B, 15 min – 50% B.

Data acquisition was performed in selected ion monitoring mode (SIM): $m/z = 122; 136; 150; 152; 166; 180; 194; 208$. This allowed us to detect phenylethylamine (PEA), amphetamine (A), metamphetamine (MA), phenylpropanoamine (PPA), *p*-methoxyamphetamine (PMA), ephedrine (E), *p*-methoxymetamphetamine (PMMA), 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA), 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA), 3,4-methylenedioxyethylamphetamine (MDEA) at a limit of detection not greater than 5 ng/ml.

The extraction of amphetamines from the submitted whole blood and urine was conducted the same way. 0.2 ml volume of each sample was taken and after alkylation to $\text{pH} = 14$, was extracted with 1ml *n*-butyl chloride. Phenylpropanolamine (PPA) at concentration 1000 ng/ml was used as the internal standard. Just before evaporation of organic phase, 100 μl of 0.025 M HCl was added. The injection volume was 20 μl .

TABLE II. PMA, AMPHETAMINE AND EPHEDRINE CONCENTRATIONS IN EXAMINED CASES

Case	Material	PMA [$\mu\text{g/ml}$]	Amphetamine [$\mu\text{g/ml}$]	Ephedrine [$\mu\text{g/ml}$]
1	Whole blood	20.2	3.57	4.65
2	Whole blood	1.68	0.12	0.34
3	Whole blood	10.1	0.29	4.60
	Urine	12.0	2.64	28.2

RESULTS

Obtained results of biological material analysis (Table II) show that the concentration of PMA was higher than that of all the other identified substances. Ephedrine concentration was found to be several times lower, and amphetamine even lower. According to literature data [4], documented fatalities have occurred at PMA concentrations of the order of several micrograms per millilitre of whole blood. A similar concentration was obtained in one case (no. 2); however, in the two others concentrations were much higher, which confirms witness testimonies about the multiple taking of ecstasy pills to get high.

The results of the blood analysis in case 3 have been presented in the form of chromatograms of pseudomolecular extracted ions of amphetamine derivatives in Figure 3. As can be seen, use of liquid chromatography mass spectrometry allowed us to perform easy analytes identification and their quantitation.

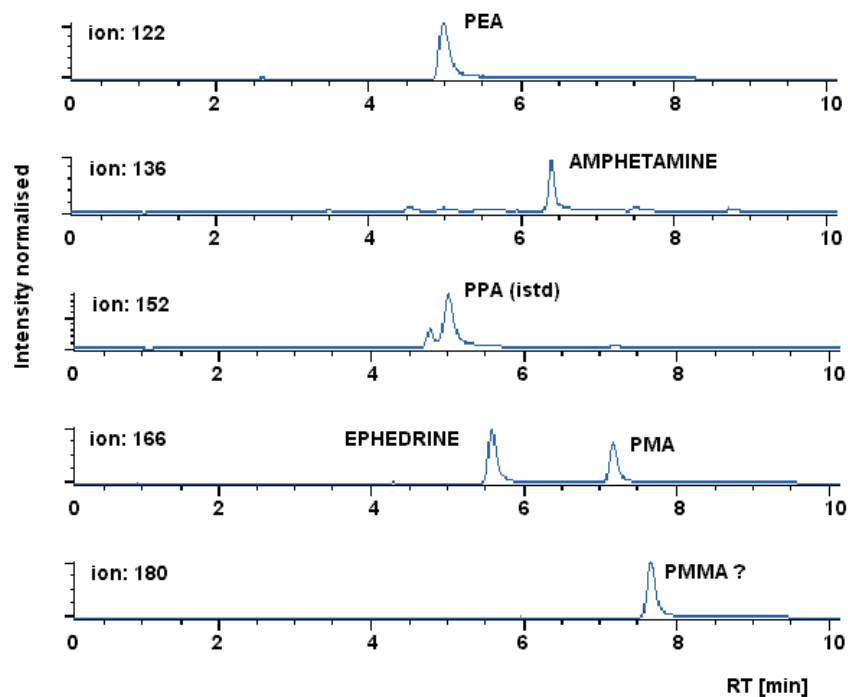


Fig. 3. Extracted ion chromatograms from blood analysis (case no. 3).

DISCUSSION

p-Methoxyamphetamine, amphetamine and ephedrine were identified in autopsy material obtained from described cases. Moreover, p-methoxymetamphetamine (PMMA) was also identified but not quantified because of a lack of an appropriate standard. Nevertheless, bearing in mind the similarity of its chemical structure to PMA, it can probably be concluded that both compound concentrations were at the same level in the examined blood samples. Bearing this in mind and also the fact that the two compounds act in a similar way, it is reasonable to suppose that the toxic effect comes from both PMA and PMMA.

Information gained from the witnesses' testimonies indicates that the composition of the popular drug "ecstasy" has changed yet again. The most frequently used amphetamine derivative in this drug was MDMA. The obtained results suggest that the new, changed, ecstasy pills may also contain other active components such as PMA, PMMA, amphetamine and ephed-

rine. These suppositions were confirmed in later analysis of ecstasy tablets bearing the Mitsubishi and “E” logo.

In the first described case, the concentrations of all amphetamines were very high. Obtained results confirm the statements of witnesses about the multiple taking of ecstasy pills by persons before their deaths – pills containing, amongst other ingredients, PMA. This drug takes longer to act in comparison to MDMA, which may lead to unintended overdoses and serious harm or even death.

References:

1. Byard R. W., Gilbert J., James R. [et al.], Amphetamine derivative fatalities in South Australia: Is “ecstasy” the culprit?, *American Journal of Forensic Medicine and Pathology* 1998, vol. 19, pp. 261–265.
2. Cimbura G., PMA deaths in Ontario, *Canadian Medical Association Journal* 1974, vol. 110, pp. 1263–1267.
3. Erowid, <http://www.erowid.org/chemicals/pma/pma.shtml>.
4. Felgate H. E., Felgate P. D., James R. A. [et al.], Recent paramethoxyamphetamine death, *Journal of Analytical Toxicology* 1998, vol. 22, pp. 169–172.
5. London Toxicology Group, <http://www.ramidy.sghms.ac.uk/~ltg/pma.htm>.
6. Lora-Tamayo C., Tena T., Rodriguez A., Amphetamine derivative related deaths, *Forensic Science International* 1997, vol. 85, pp. 149–157.
7. Wu D., Otton S.V., Inaba T. [et al.], Interactions of amphetamine analogues with human liver CYP2D6, *Biochemical Pharmacology* 1997, vol. 53, pp. 1605–1612.

PRZYPADKI ZŁOŻONYCH ZATRUĆ p-METOKSYAMFETAMINĄ (PMA) ORAZ INNYMI FENYLOALKILOAMINAMI

Wojciech LECHOWICZ, Ewa CHUDZIKIEWICZ, Ewa JANOWSKA,
Roman STANASZEK

WSTĘP

Pierwsze doniesienia o śmiertelnych zatruciach p-metoksyamfetaminą (PMA) opublikowano w Kanadzie w 1974 roku [2]. W ostatnich kilku latach ponownie przypadki zatruc zanolowano w Stanach Zjednoczonych [3, 4], Australii [4] oraz Hiszpanii [6]. Najczęściej podawaną przyczyną zgonu było przyjęcie tabletek z logo Mitsubishi (rycina 2).

W opisanych przypadkach zatruc śmiertelnych u osób, które przyjęły PMA, obserwowano wysoką temperaturę ciała sięgającą nawet 46,1°C [1]. Zazwyczaj towarzyszyły jej krwotoki.

Badania prowadzone na szczurach wskazywały na podobne do 3,4-metylenodioksymetamfetaminy (MDMA) działanie neurotoksyczne PMA oraz p-metoksymetamfetaminy (PMMA), jednak przy jej większych dawkach [5]. Równocześnie stwierdzono, że PMMA wykazuje mniejszą neurotoksyczność niż MDMA. Badania *in vitro* na mózгах myszy wykazały, że PMA jest dwudziestokrotnie mocniejszym inhibitorem monoaminooksydazy (MAO) typu A niż (±)amfetamina.

U ludzi związek ten ulega metabolizmowi głównie na drodze O-demetylacji przy udziale CYP2D6 oraz poprzez utlenianie w łańcuchu bocznym [7]. Głównymi metabolitami PMA są 4-hydroksyamfetamina oraz 4-hydroksynorefedryna [5].

Nieliczne doniesienia wskazują na możliwość interakcji PMA z niektórymi lekami, np. fluoksetyną [1].

W praktyce Instytutu Ekspertyz Sądowych pierwszy przypadek śmiertelnego zatrucia PMA odnotowano na początku 2000 roku. W okresie kilku następnych miesięcy zanolowano jeszcze dwa przypadki zgonu po przyjęciu tego związku. W niniejszej pracy przedstawiono opis tych przypadków, zastosowaną metodykę ze szczególnym zwróceniem uwagi na metodę identyfikacji, wyosobnienia z materiału biologicznego (krew, mocz) oraz analizę ilościową PMA i współobecnych amfetamin.

OPIS PRZYPADKÓW

Przypadek 1

Zatrudniona w agencji towarzyskiej 23-letnia kobieta, jak wynikało z zeznań świadków, od pewnego czasu regularnie przyjmowała narkotyki. Była to głównie amfetamina w proszku, którą przyjmowała z napojami, przeciętnie dwa do trzech razy dziennie. W krytycznym dniu, będąc w towarzystwie znajomego, oprócz amfetaminy przyjęła tabletki „ecstasy”. Jak wynikało z wielokrotnie zmienianych zeznań mężczyzny, mogła ona w ciągu popołudnia i wieczora przyjąć od 3 do 7 tabletek tego nar-

kotyku. Rano po przebudzeniu mężczyzna, będący pod działaniem narkotyków, stwierdził, że przypuszczalnie kobieta nie żyje i powiadomił pogotowie ratunkowe. Przybyły na miejsce zdarzenia lekarz ustalił, że zgon nastąpił prawdopodobnie w nocy. Przeprowadzona w późniejszym czasie sekcja zwłok nie wykluczyła zatrucia substancjami nie powodującymi zmian makroskopowych w obrębie narządów wewnętrznych, w tym narkotykami.

Przypadek 2

Niniejszy przypadek dotyczył zgonu młodej kobiety. Informacje na temat zdarzenia były bardzo skąpe, a z relacji świadków wynikało, że przed śmiercią kobieta przyjmowała tabletki o nazwie „ecstasy”.

Przypadek 3

Okolo godziny 15.30 młoda kobieta spożywała w towarzystwie czterech mężczyzn alkohol. Z relacji świadków wynika, że przyjęła ona równocześnie 1–4 tabletek, które nazywała „ekstazą”. Następnego dnia między godziną 4.00 a 4.30 zaczęła się „dziwnie zachowywać”, po czym utraciła przytomność. Wezwano karetkę pogotowia, a przybyły lekarz stwierdził zgon kobiety. W toku prowadzonych oględzin i sekcji zwłok nie ujawniono obrażeń ciała. W pobranych próbach krwi i moczu nie stwierdzono obecności alkoholu.

MATERIAŁ I METODY

W dwóch opisanych przypadkach (przypadek 1 i 2) do badań dostarczono próbę krwi, a w jednym (przypadek 3) krew i mocz denatki. Oznaczenie pochodnych amfetaminy prowadzono przy użyciu chromatografu cieczowego sprzężonego ze spektrometrem mas HP-1100 firmy Hewlett-Packard (LC/MS). Zastosowano komorę do chemicznej jonizacji pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI). Podstawowe parametry spektrometru mas zamieszczono w tabeli I.

Rozdział prowadzono na kolumnie LiChroCART 125 × 4 z wypełnieniem Purospher RP-18e firmy Merck. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina acetonitrylu (B) i wody (A) z dodatkiem kwasu mrówkowego w ilości 1 ml/l fazy przepływająca w warunkach gradientowych: 0 min – 0% B, 15 min – 50% B.

Rejestrację danych dokonywano w trybie monitorowania wybranych jonów (SIM): $m/z = 122; 136; 150, 152; 166; 180; 194; 208$. Umożliwiło to wykrycie przy granicy detekcji nie wyższej niż 5 ng/ml takich substancji, jak fenyloetyloamina (PEA), amfetamina (A), metamfetamina (MA), fenylopropanoloamina (PPA), p-metoksyamfetamina (PMA), efedryna (E), p-metoksymetamfetamina (PMMA), 3,4-metylenodioksyamfetamina (MDA), 3,4-metylenodioksymetamfetamina (MDMA), 3,4-metylenodioksyetyloamfetamina (MDEA).

Tok postępowania w przypadku wyosabniania pochodnych amfetaminy był jednakowy w przypadku krwi i moczu. Do wyosabniania pobrano po 0,2 ml materiału, który po zalkalizowaniu do $pH = 14$ ekstrahowano 1 ml chlorku n-butyłu. Jako standard wewnętrzny zastosowano fenylopropanoloaminę (PPA) o stężeniu 1000 ng/ml. Bezpośrednio przed odparowaniem fazy organicznej dodano do niej 100 μ l 0,025 M HCl. Objętość nastrzyku wynosiła 20 μ l.

WYNIKI

Uzyskane wyniki analiz (tabela II) nadesłanego do badań materiału wskazują, iż największe stężenie spośród zidentyfikowanych substancji posiadała PMA. Kilkakrotnie niższe stężenie zanotowano dla efedryny, a jeszcze niższe dla amfetaminy. Opierając się na danych zawartych w literaturze [4] można przyjąć, iż przypadki śmiertelne występowały przy stężeniach PMA rzędu kilku mikrogramów w mililitrze krwi. Porównywalne stężenie uzyskano w jednym przypadku (przypadek 2), natomiast w dwóch innych stężenia były dużo większe, co potwierdza relacje świadków o przyjmowaniu przez kilku tabletek „ecstasy” w celu odurzenia.

Dla zobrazowania wyników analizy krwi z przypadku 3 przedstawiono (rycina 3) chromatogramy dla ekstrahowanych jonów pseudomolekularnych, pochodnych amfetaminy. Stosowanie techniki chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas umożliwiło łatwą identyfikację analitów oraz wykonanie analizy ilościowej.

DYSKUSJA

W opisanych przypadkach w materiale biologicznym wykryto p-metoksyamfetaminę a także amfetaminę i efedrynę. Wykryto również p-metoksymetamfetaminę, której jednak nie oznaczono ze względu na brak wzorca ilościowego. Biorąc pod uwagę podobieństwo jej struktury chemicznej do PMA, można z dużym prawdopodobieństwem stwierdzić, że stężenia obu substancji były w badanych próbkach krwi podobne. Mając to na uwadze oraz podobieństwo ich działania, należy przypuszczać, że wywołwany efekt toksyczny pochodzi zarówno od PMA jak i PMMA.

Z informacji zawartych w relacjach świadków (przypadek 1–3) wynika, iż po raz kolejny skład popularnego środka „ecstasy” został zmieniony. Najczęściej stosowaną w tym środku pochodną amfetaminy jest MDMA. Uzyskane wyniki dają podstawę do przypuszczeń, że w skład zmienionych tabletek „ecstasy” mogą wchodzić również inne substancje aktywne, np. PMA, PMMA, amfetamina oraz efedryna. Przypuszczenia te potwierdzono w badaniach dotyczących składu tabletek „ecstasy” z logo Mitsubishi oraz „E”.

W pierwszym opisanym przypadku zatrucia stężenia wszystkich amfetamin były bardzo wysokie. Uzyskane wyniki potwierdzają więc relacje świadków o wielokrotnym przyjmowaniu przez osoby zmarłe tabletek „ecstasy” zawierającej m.in. PMA. PMA wykazuje późniejsze działanie w porównaniu np. z MDMA, co może powodować niezamierzone przedawkowania i poważne zaburzenia prowadzące nawet do śmierci.