



A FATAL CASE OF 3,4-DIMETHYLMETHCATHINONE POISONING

Marzena SYKUTERA, Elżbieta BLOCH-BOGUSŁAWSKA

Chair and Department of Forensic Medicine, Collegium Medicum of Nicolaus Copernicus University, Bydgoszcz, Poland

Abstract

3,4-dimethylmethcathinone (3,4-DMMC) is a psychoactive, synthetic analog of the central nervous system stimulant cathinone. In recent years, 3,4-DMMC has been abused as an alternative to controlled cathinones. As with other synthetic cathinones, the recreational use of 3,4-DMMC can result in death. We present an autopsy case in which the cause of death was judged to be 3,4-DMMC poisoning. Other drugs or poisons that could have caused the death were not detected by our screening using gas-chromatography-mass spectrometry. The deceased was a 31-year-old man with a history of drug abuse. Alkaline liquid-liquid extraction and validated liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry were employed to quantify the drug in whole blood. 3,4-DMMC was found in blood at the concentration of 3.31 µg/ml.

Key words

3,4-dimethylmethcathinone; Fatal poisoning; LC-ESI-MS; Biological material.

Received 30 September 2014; accepted 30 January 2015

1. Introduction

In recent years, a growing number of poisonings and even deaths after use of new psychoactive substances (NPS) – the so-called legal highs – have been observed. The term “legal highs” refers to substitute drugs, which, according to the Drug Addiction Counteraction Act, are “substances of natural or synthetic origin in any physical state or products, plants, or fungi that contain such a substance, which are used instead of narcotic drugs or psychotropic substances or for the same purposes as narcotic drugs or psychotropic substances whose production and marketing is not regulated under separate regulations”. According to the report of the Chief Sanitary Inspector on substitute drugs, 721 suspicions of poisonings with these compounds were reported in 2013. Many of these compounds are not regulated by the Drug Addiction Counteraction Act and can be legally introduced into the market. 3,4-dimethylmethcathinone (3,4-DMMC), which is a psychoactive substance from the group of

synthetic derivatives of cathinone, was also in this group of compounds (at the time of the research that is the subject of this paper) (Figure 1; Kelly, 2011; Locos, Reynolds, 2012). Synthetic cathinones are structural analogs of cathinone (S-(-)-2-amino-1-phenylpropane-1-one), an alkaloid with psychostimulant action that is present in khat (*Catha edulis*, Valente, Guedes de Pincho, Bastos, Carvalho, 2014).

According to the report of the European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), 3,4-DMMC first appeared in Hungary in 2010 (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, 2010). It is commercially available as a white powder in portions of 0.5 g to 200 g, and preparations under the names Vinshu, Puzsan, Daksza, Viol S and LOOP 3. Like other synthetic cathinones, 3,4-DMMC is most frequently administered orally, intranasally or intravenously. At the moment, there are practically no data in the literature concerning the short- and long-term effects of 3,4-DMMC. However, according to descriptions posted on Internet forums, the effect of the

administration of this substance is agitation, increased activity, decreased appetite and anorexia, dry mouth, blurred vision, tingling of the face, jaw clenching, and bouts of cold. 3,4-DMMC at higher doses causes panic attacks and tachycardia. The mechanism of action of 3,4-DMMC involves the inhibition of norepinephrine and dopamine reuptake (Shima, Katagi, Kamata, 2013). The metabolic pathway of this compound runs mainly via reduction of the carbonyl group to β -OH-DMMC, and N-demethylation to 3,4-dimethylcathinone (DMC), which in the next step is converted to β -OH-DMC (Shima, Katagi, Kamata, 2013; Tyrkkö, Pelander, Ketola, 2013).

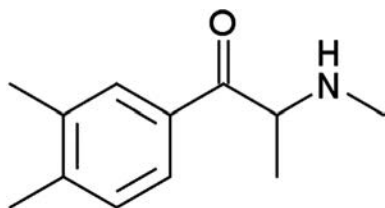


Fig. 1. The structure of 3,4-dimethylmethcathinone (3,4-DMMC).

Cases of deaths after administration of cathinone derivatives, such as mephedrone (Adamowicz, Tokarczyk, Stanaszek, 2013), methedrone (Wikström, Thelander, Nyström, Kronstrand, 2010), MDPV (Adamowicz, Gil, Skulska, Tokarczyk, 2013; Wyman, Lavins, Engelhart, 2013), pentedrone (Sykutera, Cychowska, Bloch-Bogusławska, 2015), and methylone (Cawrse, Levine, Jufer, Fowler, Vorce, et al. 2012; Pearson, Hargraves, Hair, 2012) are described in the literature. There is also limited information on the concentrations of 3,4-DMMC in biological material after administration of narcotic doses (Shima, Katagi, Kamata, 2013; Tóth, Kovács, Árok, Varga, Kereszty, 2013) or doses that may be the cause of death (Usui, Aramaki, Hashiyada, 2014).

Liquid chromatography with tandem mass detection (Shima, Katagi, Kamata, 2013; Usui, Aramaki, Hashiyada, 2014), liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (Tyrkkö, Pelander, Ketola, 2013) and gas chromatography with mass detection (Shima, Katagi, Kamata, 2013; Tóth, Kovács, Árok, Varga, Kereszty, 2013) were used for the determination of 3,4-DMMC. In the present study, liquid chromatography with electrospray ionization mass detection and gas chromatography with mass detection were applied for the determination of 3,4-DMMC.

The aim of this study was to present a case of 3,4-DMMC acute intoxication with fatal outcome.

2. Case history

The corpse of a 31-year-old man was found in the bathroom on the floor. From information obtained, it transpired that the man had been administering “legal high” preparations for a few months, which had been purchased on the Internet. At the scene, police secured a syringe containing a small amount of liquid. Analyses of the contents of the syringe carried out in a police laboratory showed the presence of 3,4-DMMC. At the time of the corpse examination and autopsy, which were conducted outside the local Department of Forensic Medicine (ZMS), traces of intravenous injections in the upper limbs were found, but injuries and lesions explaining the cause of death were not revealed. Biological material for histopathological examination was not secured.

Only a blood sample was secured during the autopsy and sent to the ZMS. Routine toxicological analyses of the blood sample for ethyl alcohol content by gas chromatography with the flame ionization detection method and headspace technique as well as for narcotic and psychotropic substances from the group of cannabinoids, opiates, amphetamines, cocaine, and benzodiazepines by the enzyme-linked immunosorbent assay ELISA with the use of Mahsan tests were carried out. Screening chemical-toxicological analysis was performed by gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-mass spectrometry. The blood sample was also analysed for the presence of 3,4-DMMC.

3. Material and methods

3.1 Biological material

Control blood (free of analytes) used for the development and validation of the method was from LGC Standards (Dziekanów Leśny, Poland). The research material also included ten different blood samples originating from expert examinations routinely carried out at the ZMS. These samples were used to test the selectivity of the method and matrix effects. The blood sample (from the autopsy) submitted for testing was stored at -10°C until the time of analysis.

3.2 Reagents

Standards (3,4-DMMC, pentedrone, 4-methyl-ethylcathinone, 3-methylethylcathinone, naphyrone, buphedrone, butylone, MDPV, mephedrone, methedrone, methylone, α -pvp and amphetamine-d5) were

from Cerilliant (LGC Standards, Dziekanów Leśny, Poland). Methanol, dichloromethane and acetonitrile HPLC grade, and trifluoroacetic acid (TFA, 99%) were purchased from Sigma Aldrich (Poznań, Poland). Sodium hydroxide (pure for analysis) was bought from Avantor (Gliwice, Poland). Inspec[®]-Drogen-EIAs immunoassay kits were from Mahsan (Reinbek, Germany).

3.3 Samples preparation

50 μl of internal standard amphetamine-d5 at a concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ was added to the blood sample (1 ml) in a 7 ml polypropylene test tube. Then, 0.1 ml of 1 M NaOH and 3 ml of dichloromethane were added to the sample. The sample was shaken for 20 min, centrifuged for 5 min, and then the organic phase was transferred to vials and evaporated to dryness under nitrogen at 25°C. The dry residue was dissolved in 200 μl of methanol.

3.4 Qualitative analysis by gas chromatography-mass spectrometry

The analysis was conducted using a Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra gas chromatograph coupled with a mass spectrometer (Kyoto, Japan). The gas chromatograph was equipped with a split/splitless injector maintained at a temperature of 250°C. Injection of samples (1 μl) was performed automatically in splitless mode. Separation was achieved using a ZB-5MS Guarded (30 m \times 0.25 mm, 0.25 μm) capillary column. A gradient temperature program was used in the method. The analysis started at 80°C and this temperature was maintained for 1 min. Then it increased at a rate of 15°C/min to reach 200°C and then 10°C/min up to a temperature of 300°C. The final temperature was maintained for 3 min. Helium flowing through the column at 0.55 ml/min was used as a carrier gas. Electron ionization with energy of 70 eV was used. The mass detector was operated in a total ion current mode (m/z) 40–600 amu. Acquisition was performed using GCMS Solution version 2.72 software.

3.5 Quantitative analysis by liquid chromatography-mass spectrometry with electrospray ionization (LC-ESI-MS)

An Agilent Technologies 1100 Series system (Waldbronn, Germany) consisting of a liquid chromatograph equipped with a binary gradient pump, an autosampler, a thermostat and a mass spectrometer with electrospray ionization was used in the study.

The separation was carried out on an Eclipse XDB-C8 (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm from Agilent Technologies) chromatography column held at 25°C. The mobile phase flowing through the column at a rate of 0.4 ml/min consisted of a mixture of acetonitrile and 0.1% aqueous trifluoroacetic acid solution (70:30, v/v). The volume of injected sample was 10 μl . The mass detector was operating under the following conditions: fragmentor voltage – 70 V, capillary voltage – 4000 V, nebulizing gas (N_2) flow – 12 l/min, nebulizing gas temperature – 250°C, nebulizer pressure – 35 psi. Selected ions were monitored (SIM) at m/z 192 (ion selected for quantitative analysis) and 174 for 3,4-DMMC, and 141 for the internal standard (amphetamine-d5). The retention time of 3,4-DMMC and the internal standard were 8.1 min and 5.6 min, respectively. Data collection and analysis were carried out using ChemStation version A 06.03 (Agilent Technologies) software.

3.6 Validation of the LC-ESI-MS method

Method validation was carried out according to Peters et al. (Peters, Drummer, Musshoff, 2007) and included determination of the following parameters: linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), precision, accuracy and selectivity. Recovery (R) and matrix effects (ME) were also examined.

Methanolic solutions at concentrations of 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ were used for the preparation of the 3,4-DMMC calibration curve in blood. An eight-point calibration curve was obtained by analyzing blood samples to which 3,4-DMMC was added to achieve concentrations of 10, 50, 100, 500, 1000, 2000, 3000 and 4000 ng/ml, respectively. 50 μl of the internal standard solution (amphetamine-d5) at a concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ was also added to each sample. For each concentration level, three replicates were performed. The calibration curve was plotted as the ratio of the analyte peak area to the internal standard peak area vs. analyte concentration. The calibration curve showed a linear course in the tested concentration range (10–4000 ng/ml). The coefficient of correlation r was 0.99. The limit of detection (LOD), determined as the concentration producing a detector signal three times greater than the height of the noise ($S/N = 3$), was 1 ng/ml. The lowest point of the calibration curve, ie. 10 ng/ml, was assumed as the limit of quantification (precision $CV = 5.4\%$, accuracy expressed as relative error = -8.2%). The intraday precision (variation within one day) was calculated from a series of five replicates ($n = 5$) of analyses of blood samples at three concentration levels: 50, 50, and 3000 ng/ml. Interday

precision was calculated on the basis of results of three measurements series, each consisting of five replicates ($n = 3 \times 5$) of analyses of blood samples at three concentration levels: 50, 50, and 3000 ng/ml. The measurement series were analyzed on three different days. The precision was expressed as a percentage coefficient of variation (*CV*). Determined values of precision in the intraday series did not exceed 9.0%, and in the interday series were not higher than 7.9%. Relative error was assumed as a measure of accuracy.

The recovery was determined with the use of 5 different blood samples from expert examinations routinely carried out at the ZMS. The recovery was calculated by comparing: the peak area of the analyte (*A*) obtained by the analysis of blood sample extracts ($n = 5$) to which 3,4-DMMC had been added prior to extraction, with the peak area of the analyte (*B*) obtained by the analysis of blood sample extracts ($n = 5$) to which analyte was added after extraction. The recovery was calculated according to the formula $R [\%] = (A/B) \times 100$. The recovery calculated in this way reflects the real extraction efficiency, free from the influence of biological material.

The matrix effect was studied according to Matuszewski et al. (Matuszewski, Constanzer, Chavez-Eng, 2003). For this purpose, 5 different blood samples originating from expert examinations routinely carried out at the ZMS were used. The matrix effect was calculated by comparing the peak area of the analyte (*B*) obtained by the analysis of blood sample extracts ($n = 5$) to which analyte was added after extraction with the peak area of the analyte (*C*) obtained by the analysis of the methanolic solution of the analyte ($n = 5$). The matrix effect was calculated according to the formula $ME (\%) = (B/C) \times 100$. There was no matrix effect influencing the determination of 3,4-DMMC in blood.

Ten different extracts of control blood samples (originating from expert examinations routinely carried out at the ZMS) without the addition of the analyte and the internal standard were analyzed in order to evaluate the method selectivity. There was no in-

fluence of biological matrix on the analytical signal intensity in the elution areas of the analyte and the internal standard. The analysis also encompassed samples enriched with compounds likely to interfere with 3,4-DMMC, including pentedrone, 4-methylethylcathinone, 3-methylethylcathinone, naphyrone, buphedrone, butylone, MDPV, mephedrone, methedrone, methylone, and α -pvp. Retention times and ions (*m/z*) of the above compounds are shown in Table 1. There was no influence of the presence of these compounds on the 3,4-DMMC determination.

The validation parameters of the presented method of determination of 3,4-DMMC are presented in Table 2. The obtained values of the validation parameters confirmed the usefulness of this method for the determination of 3,4-DMMC in blood.

Table 1
Retention times and monitored ions (*m/z*) of compounds potentially interfering with 3,4-DMMC

Compound	Ion [<i>m/z</i>]	Retention time [min]
Amphetamine (IS)	141	5.6
3,4-DMMC	192, 174	8.1
Pentedrone	192, 174	7.4
3-methyl-N-ethylcathinone (3-MEC)	192, 174	7.3
4-methyl-N-ethylcathinone (4-MEC)	192, 174	7.1
Mephedrone	178, 160	6.3
Buphedrone	178, 160	5.7
α -Pyrrolidinopentiophenone (α -PVP)	232, 222	9.5
Butylone	222, 204	5.8
Methylone	208, 190	5.4
Methedrone	194, 176	5.7
Naphyrone	282	26.1
3,4-methylenedioxypyrovalerone (MDPV)	276	9.8

Table 2
Precision, accuracy, extraction efficiency and matrix effects data for 3,4-DMMC studied in blood

Spiked concentration [ng/ml]	Precision [<i>RSD</i> %]		Accuracy [<i>RE</i> %]		Extraction efficiency <i>R</i> [%]	Matrix effects <i>ME</i> [%]
	Intraday ($n = 5$)	Interday ($n = 15$)	Intraday ($n = 5$)	Interday ($n = 15$)		
50	9.0	7.9	-4.8	-4.7	80.9	107.3
500	2.7	7.9	8.8	10.1	95.3	101.8
3000	1.8	3.3	-0.5	1.1	98.0	102.1

4. Results and discussion

The presence of 3,4-DMMC in the blood was revealed as a result of studies conducted by the gas chromatography-mass spectrometry method. A chromatogram (Figure 2a) in which the chromatographic peak at the retention time of 8.75 min corresponds to a mass spectrum (Figure 2b) with major ions m/z 58, 77, 133, 105 and 103 was obtained using the GC/MS method. The identification of the compound was performed by comparing the retention time and the mass spectrum of the obtained peak with the retention time and mass spectrum of the 3,4-DMMC standard solution.

The concentration of 3,4-DMMC in the blood was determined by liquid chromatography-mass spectrometry with the electrospray ionization method. In the blood sample submitted for analysis, the presence of 3,4-DMMC at a concentration of 3.31 $\mu\text{g/ml}$ was revealed. The chromatogram obtained as a result of the analysis of the blood sample is presented in Figure 3.

The presence of ethyl alcohol as well as narcotic drugs and psychotropic substances from the group of cannabinoids, opiates, amphetamines, cocaine and benzodiazepines was excluded in the analyzed blood sample.

Due to the limited amount of data on concentration ranges in cases of poisonings with new psychoactive

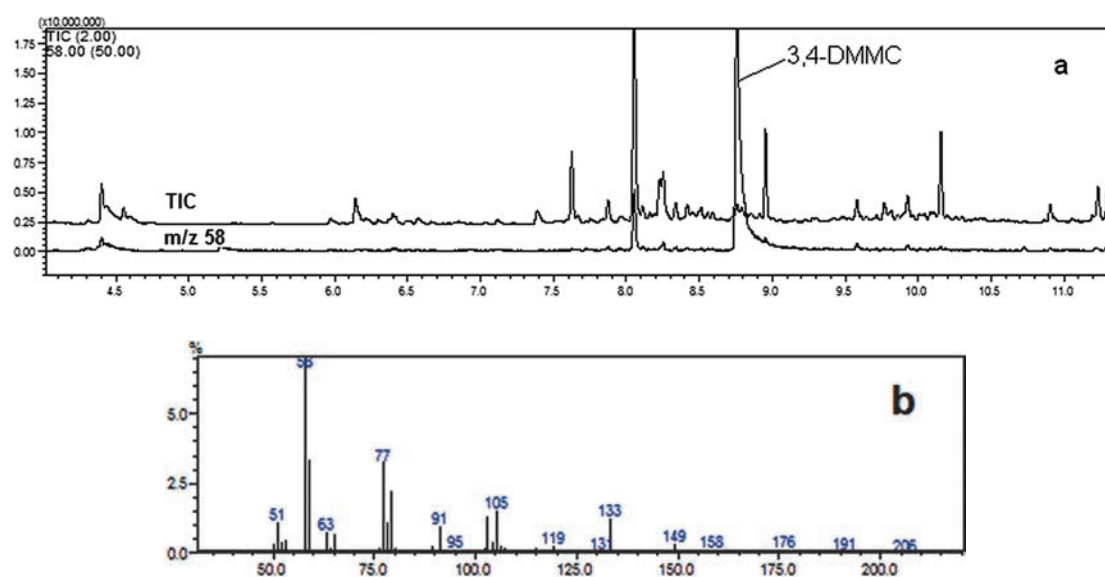


Fig. 2. GC/MS chromatogram (a) and mass spectrum of 3,4-DMMC (b) extracted from the decedent's blood.

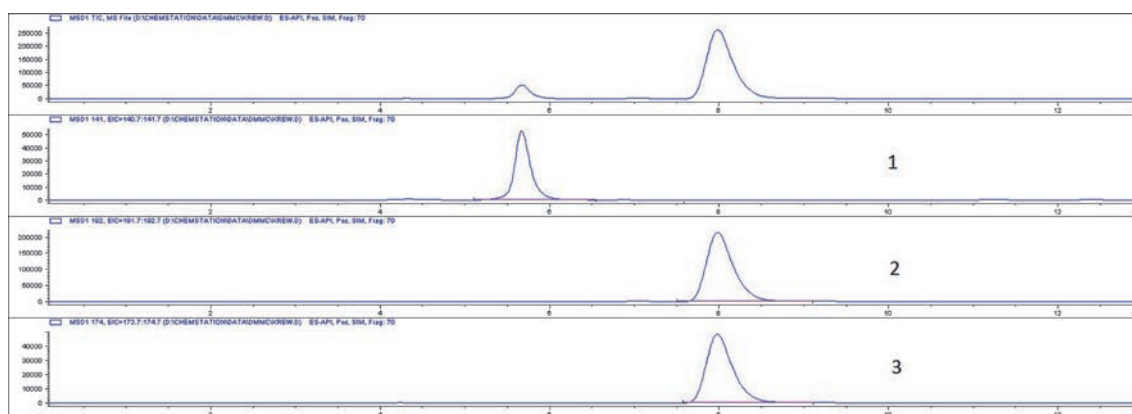


Fig. 3. Selected ion monitoring chromatograms by LC-MS for 3,4-DMMC extracted from the decedent's blood sample. The ions monitored were: m/z 141 for IS (1), m/z 192 (2) and 174 (3) for 3,4-DMMC.

substances, the interpretation of obtained results can be difficult. As indicated in the literature, the concentrations of these compounds in deaths are within wide ranges. For example, in cases of death after the administration of methedrone, the determined blood concentrations of this compound were in the range of 9.6–13.2 µg/ml (Wikström, Thelander, Nyström, Kronstrand, 2010), and after the administration of methylone, the concentrations of this compound in the blood were from 0.56 to 3.3 µg/ml (Cawrse, Levine, Jufer, Fowler, Vorce et al.; Pearson, Hargraves, Hair, 2012).

In the case of the death of a man reported by Usui et al. (Usui, Aramaki, Hashiyada, 2014) the concentration of 3,4-DMMC in the blood was 27 µg/ml, and it was almost ten fold higher than in the case described in this paper. The concentration of this compound in the urine was also determined, and it was 7 µg/ml. Shima et al. (Shima, Katagi, Kamata, 2013) determined a concentration of 4.41 µg/ml in urine collected from an individual using 3,4-DMMC. Tóth et al. (Tóth, Kovács, Árok, Varga, Kereszty, 2013) detected the presence of 3,4-DMMC in the blood and urine of a driver who was killed in a car accident. The concentrations were 53.2 ng/ml in blood and 199 ng/ml in the urine. In this case, the concentration of 3,4-DMMC in the blood was almost 70 times lower than the concentration determined in the blood in the present study. Bearing in mind the above data, it was assumed that in the presented case, the cause of death of the man was poisoning with 3,4-DMMC. Descriptions of possible symptoms of poisoning with particular cathinone derivatives (Zawilska, Słomiak, Wasiak, Woźniak, Massalski, 2013) were presented in the literature. The similarity of the mechanism of action of these toxic substances is pointed out.

According to the available data, it can be assumed that in the present case the administration of 3,4-DMMC may have led to rapid fluctuations in blood pressure and respiratory disorders. Available sources indicate that synthetic cathinones in high doses cause increased blood pressure, followed by myocardial hypoxia and arrhythmia (cardiotoxic action), and can lead to circulatory collapse (Dawson, Moffatt, 2012; Zawilska, Słomiak, Wasiak, Woźniak, Massalski, 2013). The mechanism of death accepted by the medical examiner – described as acute circulatory failure – is the logical consequence of such a course of acute poisoning.

Histopathological findings are also important for the confirmation of death by poisoning with new psychoactive substances, including cathinone derivatives. Literature data show the presence of pathology in the myocardium within cardiomyocytes in the case of

poisoning with cathinone derivatives (Sykutera, Cy-chowska, Bloch-Bogusławska, 2015; Tóth, Kovács, Árok, Varga, Kereszty, 2013). Unfortunately, in the case described in this paper, biological material for histopathological examination was not secured.

5. Summary

In the described case the concentration of 3,4-DMMC determined in the blood was 3.31 µg/ml and indicated poisoning with a fatal outcome.

The application of gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-mass spectrometry allowed the unequivocal identification of 3,4-DMMC in the blood based on retention times and mass spectra.

The developed method for the determination of 3,4-DMMC can be successfully used for routine analysis of blood samples collected from individuals who are suspected of administration of this substance.

References

1. Adamowicz, P., Gil, D., Skulska, A., Tokarczyk, B. (2013). Analysis of MDPV in blood-determination and interpretation. *Journal of Analytical Toxicology*, 37, 308–312.
2. Adamowicz, P., Tokarczyk, B., Stanaszek, R. (2013). Fatal mephedrone intoxication – A case report. *Journal of Analytical Toxicology*, 37, 37–42.
3. Cawrse, B. M., Levine, B., Jufer, R. A., Fowler, D. R., Vorce, S. P., Dickson, A. J., Holler, J. M. (2012). Distribution of methylone in four postmortem cases. *Journal of Analytical Toxicology*, 36, 434–439.
4. Dawson, P., Moffatt, J. D. (2012). Cardiovascular toxicity of novel psychoactive drugs: Lessons from the past. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 39, 244–252.
5. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (2010). *EMCDDA Europol 2010 annual report on the implementation of council decision 20015/387/JH*.
6. Kelly, J. P. (2011). Cathinone derivatives: a review of their chemistry, pharmacology and toxicology. *Drug Testing and Analysis*, 3, 439–453.
7. Locos, O., Reynolds, D. (2012). The characterization of 3,4-dimethylmethcathinone (3,4-DMMC). *Journal of Forensic Sciences*, 57, 1303–1306.
8. Matuszewski, B. K., Constanzer, M. L., Chavez-Eng, C. M. (2003). Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry*, 75, 3019–3030.

9. Pearson, J. M., Hargraves, T. F., Hair, L. S. (2012). Three fatal intoxications due to methyldone. *Journal of Analytical Toxicology*, 36, 444–451.
10. Peters, F. T., Drummer, O. H. Musshoff, F. (2007). Validation of new methods. *Forensic Science International*, 165, 216–224.
11. Shima, N., Katagi, M., Kamata H. (2013). Urinary excretion and metabolism of the newly encountered designer drug 3,4-dimethylmethcathinone in humans. *Forensic Toxicology*, 31, 101–112.
12. Sykutera, M., Cychowska M., Bloch-Bogusławska, E. (2015). A fatal case of pentedrone and α -pyrrolidinovalerophenone poisoning. *Journal of Analytical Toxicology*, 39, 324–329.
13. Tóth, A. R., Kovács, K., Árok, Z. Varga, T., Kereszty, E. (2013). The role of stimulant designer drug consumption in three fatal cases in South-East Hungary in 2011. *Romanian Journal of Legal Medicine*, 21, 275–280.
14. Tyrkkö, E., Pelander, A., Ketola, R. A. (2013). In silico and in vitro metabolism studies support identification of designer drugs in human urine by liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405, 6697–6709.
15. Usui, K., Aramaki, T., Hashiyada, M. (2014). Quantitative analysis of 3,4-dimethylmethcathinone in blood and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in a fatal case. *Legal Medicine*, 16, 222–226.
16. Valente, M. J., Guedes de Pincho, P., Bastos, L., Carvalho, F. (2014). Khat and synthetic cathinones: a review. *Archives of Toxicology*, 88, 15–45.
17. Wikström, M., Thelander, G., Nyström, I., Kronstrand, R. (2010). Two fatal intoxications with the new designer drug methedrone (4-methoxymethcathinone). *Journal of Analytical Toxicology*, 34, 594–598.
18. Wyman, J. F., Lavins, E. F., Engelhart, D. (2013). Post-mortem tissue distribution of mdpv following lethal intoxication by “bath salts”. *Journal of Analytical Toxicology*, 37, 182–185.
19. Zawilska, J. B., Słomiak, K., Wasiak, M. Woźniak, P., Massalski, M., Krupa, E., Wojcieszak, J. Ł. (2013). Pochodne β -katynonu – nowa generacja niebezpiecznych związków psychostymulujących z grupy „dopalaczy”. *Przegląd Lekarski*, 70, 386–391.

Corresponding author

Marzena Sykutera
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera
w Bydgoszczy
ul. Marii Skłodowskiej-Curie 9
85-094 Bydgoszcz
e-mail: marzenasykutera@wp.pl

ZATRUCIE 3,4-DIMETYLOMETKATYNONEM ZE SKUTKIEM ŚMIERTELNYM

1. Wstęp

W ostatnich latach obserwowana jest rosnąca liczba zatruc, a nawet zgonów, po zażyciu nowych substancji psychoaktywnych (NSP), tzw. „dopalaczy”. Terminem dopalacze określane są środki zastępcze, które, jak wynika z Ustawy o przeciwdziałaniu narkomanii, są „substancjami pochodzenia naturalnego lub syntetycznego w każdym stanie fizycznym lub produktami, roślinami, grzybami, zawierającymi taką substancję, używanymi zamiast środków odurzających lub substancji psychotropowych lub w takich samych celach jak środki odurzające lub substancje psychotropowe, których wytwarzanie i wprowadzanie do obrotu nie jest regulowane na podstawie przepisów odrębnych”. Z raportu Głównego Inspektora Sanitarnego w sprawie środków zastępczych wynika, że w 2013 roku odnotowano 721 podejrzeń zatruc tymi związkami. Wiele z tych związków nie jest kontrolowanych przez Ustawę o przeciwdziałaniu narkomanii i może być legalnie wprowadzane na rynek. W tej grupie związków (w chwili prowadzenia badań będących tematem niniejszej pracy) znajdował się również 3,4-dimetylometkatynon (3,4-DMMC), który jest substancją psychoaktywną z grupy syntetycznych pochodnych katynonu (rysunek 1; Kelly, 2011; Locos, Reynolds, 2012). Syntetyczne katynony to strukturalne analogi katynonu (S-(-)-2-amino-1-fenylpropan-1-on), alkaloidu o działaniu psychostymulującym, który występuje w czuwalicze jadalnej (*Catha edulis*; Valente, Guedes de Pincho, Bastos, Carvalho, 2014).

Jak wynika z raportu Europejskiego Centrum Monitorowania Narkotyków i Narkomanii (EMCDDA), 3,4-DMMC po raz pierwszy pojawił się na Węgrzech w 2010 roku (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, 2010). Jest dostępny na rynku w postaci białego proszku w porcjach od 0,5 g do 200 g oraz jako preparaty pod nazwami Vinshu, Puzsan, Daksza, Viol S, LOOP 3. Podobnie jak inne syntetyczne katynony, 3,4-DMMC najczęściej przyjmowany jest doustnie, donosowo lub dożylnie. W chwili obecnej praktycznie nie ma danych literaturowych odnośnie krótko- i długoterminowych skutków działania 3,4-DMMC. Natomiast według opisów zamieszczonych na forach internetowych, efektem przyjęcia tej substancji jest pobudzenie, zwiększenie aktywności, zmniejszenie łaknienia i jadłowstręt, suchość w jamie ustnej, zaburzenia widzenia, mrowienie twarzy, szczykościsk, napady zimna. W większych dawkach 3,4-DMMC powoduje napady paniki oraz tachykardię. Mechanizm działania 3,4-DMMC polega na hamowaniu zwrotnego wychwytu noradrenaliny i dopaminy

(Shima, Katagi, Kamata, 2013). Szlak metaboliczny tego związku przebiega głównie poprzez redukcję grupy ketonowej do β -OH-DMMC, N-demetylację do 3,4-dimetylokatynonu (DMC), który w kolejnym etapie ulega przemianie do β -OH-DMC (Shima, Katagi, Kamata, 2013; Tyrkkö, Pelander, Ketola, 2013).

W piśmiennictwie opisano przypadki zgonów po przyjęciu pochodnych katynonów, takich jak mefedron (Adamowicz, Tokarczyk, Stanaszek, 2013), metedron (Wikström, Thelander, Nyström, Kronstrand, 2010), MDPV (Adamowicz, Gil, Skulska, Tokarczyk, 2013; Wyman, Lavins, Engelhart, 2013), pentedron (Sykutera, Cychowska, Bloch-Bogusławska, 2015), metylon (Cawse, Levine, Jufer, Fowler, Vorce i in., 2012; Pearson, Hargraves, Hair, 2012). Dostępne są również nieliczne informacje o stężeniach 3,4-DMMC w materiale biologicznym po przyjęciu dawek odurzających (Shima, Katagi, Kamata, 2013; Tóth, Kovács, Árok, Varga, Kereszty, 2013) czy dawek mogących być przyczyną zgonu (Usui, Aramaki, Hashiyada, 2014).

Do oznaczenia 3,4-DMMC stosowano metodę chromatografii cieczowej z tandemową detekcją mas (Shima, Katagi, Kamata, 2013; Usui, Aramaki, Hashiyada, 2014), metodę chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas opartą na pomiarze czasu przelotu jonów (Tyrkkö, Pelander, Ketola, 2013) oraz metodę chromatografii gazowej z detekcją mas (Shima, Katagi, Kamata, 2013; Tóth, Kovács, Árok, Varga, Kereszty, 2013). W niniejszej pracy do oznaczenia 3,4-DMMC wykorzystano metodę chromatografii cieczowej z detekcją mas z jonizacją przez elektrorozpylanie oraz metodę chromatografii gazowej z detekcją mas.

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie przypadku ostrego zatrucia 3,4-DMMC ze skutkiem śmiertelnym.

2. Opis przypadku

Zwłoki 31-letniego mężczyzny znaleziono w łazience na podłodze. Z uzyskanych informacji wynikało, że mężczyzna od kilku miesięcy przyjmował preparaty typu „dopalacze” zakupione przez internet. Na miejscu zdarzenia policja zabezpieczyła strzykawkę zawierającą niewielką ilość płynu. Badania zawartości strzykawki przeprowadzone w laboratorium policyjnym wykazały obecność 3,4-DMMC. W czasie oględzin i sekcji zwłok przeprowadzonej poza tutejszym Zakładem Medycyny Sądowej (ZMS), stwierdzono ślady po iniekcjach dożylnych w obrębie kończyn górnych, nie wykazano jednak obrażeń i zmian chorobowych tłumaczących przyczynę

zgonu. Nie zabezpieczono materiału biologicznego do badań histopatologicznych. W czasie sekcji zwłok zabezpieczono jedynie próbę krwi, którą przesłano do ZMS. Przeprowadzono rutynowe badania toksykologiczne próby krwi na zawartość alkoholu etylowego metodą chromatografii gazowej z detekcją płomieniowo-jonizacyjną, techniką analizy fazy nadpowierzchniowej (ang. head space) oraz substancji odurzających i psychotropowych z grupy kannabinoli, opiatów, amfetaminy, kokainy, benzodiazepiny przy użyciu immunoenzymosorpcyjnej metody ELISA z wykorzystaniem testów firmy Mahsan. Przesiewową analizę chemiczno-toksykologiczną przeprowadzono metodą chromatografii gazowej ze spektrometrią mas oraz metodą chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas. Próbę krwi poddano również badaniom ukierunkowanym na obecność 3,4-DMMC.

3. Materiał i metody

3.1 Materiał biologiczny

Próba krwi kontrolnej (wolnej od analitów) stosowana do opracowania i walidacji metody pochodziła z firmy LGC Standards (Dziekanów Leśny, Polska). Materiał do badań stanowiło również dziesięć różnych prób krwi pochodzących z ekspertyz rutynowo opracowywanych w ZMS w celu sprawdzenia selektywności metody i efektów matrycowych. Próba krwi przekazana do badań do czasu wykonania analizy była przechowywana w temperaturze -10°C .

3.2 Odczynniki

Substancje wzorcowe (3,4-DMMC, pentedron, 4-metyloetylokatynon, 3-metyloetylokatynon, nafyron, bufedron, butylon, MDPV, mefedron, metedron, metylon, α -pvp oraz amfetamina-d5) pochodziły z firmy Cerilliant (LGC Standards, Dziekanów Leśny, Polska). Metanol, dichlorometan oraz acetonitryl czystości gradientowej do HPLC, kwas trifluoroctowy (TFA, 99%) zostały zakupione w firmie Sigma Aldrich (Poznań, Polska). Wodorotlenek sodu (czysty do analiz) zakupiono w firmie Avantor (Gliwice, Polska). Testy immunoenzymatyczne Inspec[®]-Drogen-EIAs zakupiono w firmie Mahsan (Reinbek, Niemcy).

3.3 Przygotowanie próbek do badań

Do próby krwi (1 ml) umieszczonej w polipropylenowej probówce o pojemności 7 ml dodawano jako wzorzec wewnętrzny 50 μl amfetaminy-d5 o stężeniu 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Następnie do próbki dodawano 0,1 ml 1 M NaOH i 3 ml dichlorometanu. Próbę wytrząsano przez 20 min, następnie wirowano przez 5 min, po czym fazę

organiczną przenoszono do fiolek i odparowywano do sucha w atmosferze azotu w temperaturze 25°C . Suchą pozostałość rozpuszczono w 200 μl metanolu.

3.4 Analiza jakościowa metodą chromatografii gazowej ze spektrometrią mas

Analizę przeprowadzono z wykorzystaniem chromatografu gazowego sprzężonego ze spektrometrem mas GCMS-QP2010 Ultra firmy Shimadzu (Kyoto, Japan). Chromatograf gazowy posiadał dozownik typu z podziałem/bez podziału (ang. split/splitless) utrzymywany w temperaturze 250°C . Nastrzyk próbek (1 μl) dokonywano automatycznie w systemie bez podziału. Rozdział prowadzono z użyciem kolumny kapilarnej ZB-5MS Guarded (30 m \times 0,25 mm, 0,25 μm). W metodzie zastosowano gradientowy program temperaturowy. Analiza rozpoczynała się przy 80°C i ta temperatura była utrzymywana przez 1 min. Potem wzrastała z szybkością $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$ do wartości 200°C , a następnie $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ do temperatury 300°C . Temperatura końcowa była utrzymywana przez 3 min. Gazem nośnym był hel, którego przepływ przez kolumnę wynosił 0,55 ml/min. Zastosowano jonizację elektronową o energii 70 eV. Detektor mas pracował w trybie całkowitego prądu jonowego (m/z) 40–600 amu. Akwizycja odbywała się przy zastosowaniu oprogramowania GCMS Solution w wersji 2.72.

3.5 Analiza ilościowa metodą chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas z jonizacją przez elektrorozpylanie (LC-ESI-MS)

Do badań użyto zestaw firmy Agilent Technologies 1100 Series (Waldbronn, Niemcy) składający się z chromatografu cieczowego wyposażonego w binarną pompę gradientową, autosampler, termostat oraz spektrometr mas z jonizacją przez elektrorozpylanie. Rozdział dokonano w kolumnie chromatograficznej Eclipse XDB-C8 (150 mm \times 4,6 mm; 5 μm firmy Agilent Technologies) utrzymywanej w temperaturze 25°C . Fazę ruchomą przepływającą przez kolumnę z natężeniem przepływu 0,4 ml/min stanowiła mieszanina acetonitrylu i 0,1% wodnego roztworu kwasu trifluoroctowego (70:30, v/v). Objętość dozowanej próbki wynosiła 10 μl . Detektor mas pracował w następujących warunkach: napięcie na fragmentorze – 70 V, napięcie kapilary – 4000 V, przepływ gazu rozpylającego (N_2) – 12 l/min, temperatura gazu rozpylającego – 250°C , ciśnienie nebulizera – 35 psi. Monitorowano wybrane jony (SIM) o m/z 192 (jon wybrany do analizy ilościowej) i 174 dla 3,4-DMMC oraz 141 dla wzorca wewnętrznego (amfetamina-d5). Czas retencji 3,4-DMMC wynosił 8,1 min, a wzorca wewnętrznego 5,6 min. Zbieranie i analiza danych odbywała się przy zastosowaniu programu ChemStation w wersji A 06.03 (Agilent Technologies).

3.6 Walidacja metody LC-ESI-MS

Walidacja metody została przeprowadzona według Petersa i in. (Peters, Drummer, Musshoff, 2007) i obejmowała wyznaczenie następujących parametrów: liniowości, granicy wykrywalności (*LOD*), granicy oznaczalności (*LOQ*), precyzji, dokładności i selektywności. Zbadano również odzysk (*R*) i efekty matrycowe (*ME*).

Do przygotowania krzywej wzorcowej 3,4-DMMC we krwi użyto metanolowych roztworów o stężeniach 100 µg/ml, 10 µg/ml oraz 1 µg/ml. Ośmiopunktową krzywą kalibracyjną otrzymano w wyniku analizy próbek krwi, do których dodano 3,4-DMMC w takich ilościach, aby otrzymać roztwory o stężeniu odpowiednio 10, 50, 100, 500, 1000, 2000, 3000 i 4000 ng/ml. Do każdej próbki dodawano również 50 µl roztworu wzorca wewnętrznego (amfetamina-d5) o stężeniu 10 µg/ml. Dla każdego poziomu stężeń wykonano po trzy powtórzenia. Krzywą kalibracyjną wykreślono jako zależność stosunku powierzchni piku analitu do powierzchni piku wzorca wewnętrznego od stężenia analitu. Krzywa kalibracyjna wykazywała liniowy przebieg w badanym zakresie stężeń (10–4000 ng/ml). Współczynnik korelacji *r* wyniósł 0,99. Granica wykrywalności (*LOD*) oznaczona jako stężenie wywołujące sygnał detektora trzykrotnie większy niż wysokość szumów (*S/N* = 3) wynosiła 1 ng/ml. Jako granicę oznaczalności przyjęto najniższy punkt krzywej kalibracyjnej, tj. 10 ng/ml (precyzja *CV* = 5,4%, dokładność wyrażona jako błąd względny = -8,2%). Precyzję wewnątrzgrupową (zmiennosc w ciągu jednego dnia) obliczono na podstawie serii pięciu powtórzeń (*n* = 5) analiz prób krwi na trzech poziomach stężeń: 50, 50 i 3000 ng/ml. Precyzja międzygrupowa została obliczona na podstawie wyników otrzymanych z trzech serii pomiarowych, każda po pięć powtórzeń (*n* = 3 × 5) analiz prób krwi na trzech poziomach stężeń: 50, 50 i 3000 ng/ml. Serie pomiarowe analizowano w trzech różnych dniach. Precyzje wyrażono procentowym współczynnikiem zmienności (*CV*). Wyznaczone wartości precyzji w seriach wewnątrzgrupowych nie przekraczały 9,0%, a w seriach międzygrupowych nie były wyższe niż 7,9%. Jako miarę dokładności przyjęto błąd względny.

Do wyznaczenia odzysku wykorzystano 5 różnych próbek krwi pochodzących z ekspertyz rutynowo opracowywanych w ZMS. Odzysk obliczono poprzez porównanie pola powierzchni piku analitu (*A*) otrzymanego w wyniku analizy ekstraktów próbek krwi (*n* = 5), do których dodano 3,4-DMMC przed ekstrakcją, z polem powierzchni piku analitu (*B*) otrzymanego w wyniku analizy ekstraktów próbek krwi (*n* = 5), do których dodano analit po ekstrakcji. Odzysk obliczono wg wzoru $R [\%] = (A/B) \times 100$. Obliczony w ten sposób odzysk odzwierciedlał rzeczywistą wydajność ekstrakcji, wolną od wpływu materiału biologicznego.

Badania efektu matrycowego przeprowadzono wg Matuszewskiego i in. (Matuszewski, Constanzer, Chavez-Eng, 2003). Do tego celu wykorzystano 5 różnych próbek krwi pochodzących z ekspertyz rutynowo opracowywanych w ZMS. Efekt matrycowy obliczono poprzez porównanie pola powierzchni piku analitu (*B*) otrzymanego w wyniku analizy ekstraktów próbek krwi (*n* = 5), do których dodano analit po ekstrakcji, z polem powierzchni piku analitu (*C*) otrzymanym w wyniku analizy metanolowego roztworu analitu (*n* = 5). Efekt matrycowy obliczono według wzoru $ME [\%] = (B/C) \times 100$. Nie wykazano wpływu matrycy na oznaczanie 3,4-DMMC we krwi.

Do oceny selektywności metody analizie poddano ekstrakty dziesięciu różnych próbek krwi kontrolnych (pochodzących z ekspertyz rutynowo opracowywanych w ZMS) bez dodatku analitu i wzorca wewnętrznego. Nie stwierdzono wpływu matrycy biologicznej na intensywność sygnału analitycznego w obszarach elucji badanego analitu oraz wzorca wewnętrznego. Analizie poddano również próbki wzbogacone w związki mogące interferować z 3,4-DMMC w tym pentedron, 4-metyloetylokatynon, 3-metyloetylokatynon, nafyron, bufedron, butylon, MDPV, mefedron, metedron, metylon, α-pvp. Czasy retencji oraz jony (*m/z*) powyższych związków przedstawiono w tabeli 1. Nie stwierdzono wpływu obecności tych związków na oznaczenie 3,4-DMMC.

Parametry walidacyjne prezentowanej metody oznaczania 3,4-DMMC przedstawiono w tabeli 2. Uzyskane wartości parametrów walidacyjnych potwierdziły przydatność opracowanej metody do oznaczania 3,4-DMMC we krwi.

4. Wyniki i dyskusja

W wyniku przeprowadzonych badań metodą chromatografii gazowej ze spektrometrią mas we krwi stwierdzono obecność 3,4-DMMC. Przy zastosowaniu metody GC/MS uzyskano chromatogram (rysunek 2a), na którym pikowi chromatograficznemu przy czasie retencji 8,75 min odpowiadało widmo mas (rysunek 2b) z głównymi jonami *m/z* 58, 77, 133, 105 i 103. Identyfikację związku przeprowadzono, porównując czas retencji i widmo mas uzyskanego piku z czasem retencji i widmem mas wzorcowego roztworu 3,4-DMMC.

Stężenie 3,4-DMMC we krwi wyznaczono metodą chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas z jonizacją przez elektrorozpylanie. W nadesłanej do badań próbce krwi stwierdzono obecność 3,4-DMMC w stężeniu 3,31 µg/ml. Chromatogram otrzymany w wyniku analizy próbki krwi przedstawiono na rysunku 3.

W analizowanej próbce krwi nie stwierdzono obecności alkoholu etylowego oraz substancji odurzających

i psychotropowych z grupy kannabinoli, opiatów, amfetaminy, kokainy oraz benzodiazepiny.

Z powodu niewielkiej liczby danych dotyczących zakresów stężeń w przypadkach zatruc nowymi substancjami psychoaktywnymi interpretacja uzyskanych wyników może sprawiać trudności. Jak wskazują dane literaturowe, stężenia tych związków w przypadkach zgonów mieszczą się w szerokich przedziałach. Na przykład w przypadkach zgonów po przyjęciu metedronu we krwi stwierdzano stężenie tego związku w granicach 9,6–13,2 µg/ml (Wikström, Thelander, Nyström, Kronstrand, 2010), a po przyjęciu metylonu stężenie tego związku we krwi wynosiło od 0,56 do 3,3 µg/ml (Cawrse, Levine, Jufer, Fowler, Vorce i in.; Pearson, Hargraves, Hair, 2012).

W opisanym przez Usui i in. (Usui, Aramaki, Hashiyada, 2014) przypadku zgonu mężczyzny stężenie 3,4-DMMC we krwi było prawie dziesięciokrotnie wyższe niż w przypadku opisanym w niniejszej pracy i wynosiło 27 µg/ml. Oznaczono również stężenie tego związku w moczu, które wynosiło 7 µg/ml. Shima i in. (Shima, Katagi, Kamata, 2013) w moczu pobranym od osoby przyjmującej 3,4-DMMC oznaczyli stężenie 4,41 µg/ml. Tóth i in. (Tóth, Kovács, Árok, Varga, Kereszty, 2013) wykryli obecność 3,4-DMMC we krwi i w moczu kierowcy, który zginął w wypadku samochodowym. Stężenie we krwi wynosiło 53,2 ng/ml, a w moczu 199 ng/ml. W tym przypadku stężenie 3,4-DMMC we krwi było prawie 70 razy niższe od stężenia we krwi stwierdzonego w prezentowanej pracy. Mając na uwadze powyższe dane, przyjęto, że w niniejszym przypadku przyczyną zgonu mężczyzny było zatrucie 3,4-DMMC. W literaturze przedmiotu znane są opisy możliwych objawów zatrucia poszczególnymi pochodnymi katynonów (Zawilska, Słomiak, Wasiak, Woźniak, Massalski, 2013). Wskazuje się na podobieństwo mechanizmu działania wymienionych substancji toksycznych.

Na podstawie dostępnych danych można przypuszczać, że w rozważanym przypadku przyjęcie 3,4-DMMC mogło doprowadzić do wystąpienia gwałtownych wahań ciśnienia tętniczego i zaburzeń oddychania. Dostępne źródła informują, że syntetyczne katynony w wysokich dawkach, wywołując zwiększone ciśnienie krwi, a następnie przez niedotlenienie mięśnia sercowego i arytmie (działanie kardi toksyczne), mogą prowadzić do zapaści krążeniowej (Dawson, Moffatt, 2012; Zawilska, Słomiak, Wasiak, Woźniak, Massalski, 2013). Mechanizm zgonu przyjęty przez lekarza sądowego określony jako ostra niewydolność krążenia stanowi logiczną konsekwencję takiego przebiegu ostrego zatrucia.

Istotne znaczenie dla potwierdzenia zgonu w wyniku zatrucia nowymi substancjami psychoaktywnymi, w tym pochodnymi katynonów, mają również wyniki badań histopatologicznych. Z danych literaturowych wynika, iż w przypadku zatrucia pochodnymi katynonów stwierdzano obecność patologii w mięśniu sercowym w obrę-

bie kardiomiocytów (Sykutera, Cychowska, Bloch-Bogusławska, 2015; Tóth, Kovács, Árok, Varga, Kereszty, 2013). Niestety w opisanym w niniejszej pracy przypadku nie zabezpieczono materiału biologicznego do badań histopatologicznych.

5. Podsumowanie

W opisanym przypadku oznaczone we krwi stężenie 3,4-DMMC wynosiło 3,31 µg/ml i wskazywało na zatrucie ze skutkiem śmiertelnym.

Zastosowanie chromatografii gazowej ze spektrometrią mas oraz chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas pozwoliło na jednoznaczny identyfikację 3,4-DMMC we krwi w oparciu o czasy retencji i na podstawie widm masowych.

Opracowana metoda oznaczania 3,4-DMMC może być z powodzeniem stosowana do rutynowych analiz prób krwi pobranych od osób, u których zachodzi podejrzenie przyjęcia tego związku.