



A-PVT – A “SUCCESSOR” TO A-PVP, A NEW PSYCHOACTIVE SUBSTANCE IN BIOLOGICAL MATERIAL. CASE ANALYSIS

Dominika GIL

Institute of Forensic Research, Kraków, Poland

Abstract

α -Pyrrolidinopentiophenone (α -PVT) is a derivative of cathinone, and was first synthesized in the 1960s. It is a so-called designer drug and appeared on the drug market in the second half of 2015, as an analogue of α -pyrrolidinopentiophenone (α -PVP). α -PVT is administered “recreationally” at doses about 20% higher than α -PVP (up to 12 mg). The effects include strong excitation, improvement of well-being, euphoria, sexual arousal, intensification of musical perception, sweating, higher sensitivity of pupils to light, tachycardia, insomnia, and lack of appetite. The effects last up to 2 h. According to information obtained from users, α -PVT is a “more polite” version of α -PVP, as α -PVT does not cause extreme states, varying from euphoria to psychosis, within a short period of time. Screening of blood was performed by immunosorbent assay (ELISA) and targeted analyses for α -PVT were carried out by the LC-MS/MS technique. The author presents the first case of α -PVT determination in biological material. Its concentration in the blood of a driver who caused a traffic accident was 13 ng/ml. There are no reports concerning concentrations of α -PVT in the blood, which is why this work is particularly important in the context of toxicological analysis, especially for judicial purposes.

Key words

α -PVT; Blood, LC-MS.

Received 26 October 2016; accepted 7 December 2016

1. Introduction

α -Pyrrolidinopentiophenone, referred to as α -PVT, is a cathinone derivative synthesized in the 1960s that belongs to the category of so-called designer drugs and new psychoactive substances (NPS) that are produced in clandestine laboratories. It is an analogue of α -pyrrolidinopentiophenone (α -PVP) in which the phenyl group has been substituted with a thiophene group. α -PVP appeared on the drug market in the first half of 2014 as a “legal” substitute for MDPV (Odoardi, Romolo, Strano-Rossi, 2016). On July 1, 2015, it was placed on the list of psychotropic substances of group IV-P, according to the Act of 29 July 2005 on counteracting drug addiction (as amended). Probably as a result of this, in the second

half of 2015, α -PVT was introduced onto the market, and, so far, has not been placed on the list of narcotic drugs and psychotropic substances that are controlled by the abovementioned law, but it is a drug substitute under this law.

α -PVT is usually available in the form of white powder, but it is also sometimes deposited on dried plant material. It is administered “recreationally” in doses which are about 20% higher than those of α -PVP, but which are dependant on the route of administration – orally: 50–80 mg, intranasally: 50–120 mg, or by smoking: 10–35 mg (dopalator.info, hyperreal.info). α -PVT irritates the mucous membranes of the nose and throat. Its effects also include: strong psychophysical stimulation, improvement of well-being, euphoria, sexual arousal, intensification of musical percep-

tion, sweating, sensitivity of pupils to light, tachycardia, insomnia, and lack of appetite. The effects persist for up to 2 hours. According to information obtained from α -PVT users, it is a “milder version” of α -PVP, as α -PVT does not induce (within a short period of time) such extreme effects as α -PVP (ranging from euphoria to psychosis), and the wearing off of effects, or “come-down” is milder. However, scientific reports suggest it has strong cytotoxic action (Wojcieszak, Andrzejczak, Woldan-Tambor, Zawilska, 2016).

Little is known about the toxicokinetics of α -PVT. However, studies on the metabolism of this compound – using cultures of hepatocytes and analyses of urine samples of individuals receiving this substance – have been conducted (Swortwood et al., 2016; Takayama et al., 2014). Seven major metabolites, mono-hydroxylation and glucuronidation products, were identified, of which dihydroxypyrrolidinyl- α -PVT, 2-ketopyrrolidinyl- α -PVT, hydroxythiophenyl- α -PVT and thiophenol- α -PVT were characterized by the highest levels. The concentrations of α -PVT revealed in urine samples of three individuals were 5–724 ng/ml (Concheiroa, Castanetoa, Kronstrand, Huestis, 2015). So far, there is no data in the literature concerning α -PVT concentrations in the blood.

The appearance of this new derivative of cathinone in products available on the Polish drug market was a good reason for developing a targeted method for determination of α -PVT in biological material, and, moreover, the increasing numbers of new psychoactive substances mean that the used screening methods require continuous improvement (Adamowicz, Tokarczyk, 2016).

The paper presents the first case of detection of α -PVT in the blood.

2. Case report

A 29-year-old man was driving a car. He performed a left turn at a 3-way intersection (T junction), driving from its base, but did not go into the right lane, resulting in a head-on collision with a truck. The incident took place at 07:40. Police officers who arrived at the scene of the accident carried out a test for ethyl alcohol content in the breath of the perpetrator of the accident, which gave a result of 0.67 mg/l. Then the driver was examined by a doctor and a blood sample was taken at 10:30. The man was 180 cm tall, weighed 80 kg, had a heart rate of 74 bpm, and normal pupils, but reacting slowly to light. Other parameters were normal.

3. Methods

Screening analyses of blood for the presence of narcotic drugs and psychotropic substances were carried out using the immunosorbent (ELISA) method with the accepted thresholds: for amphetamine derivatives (amphetamine 25 ng/ml), methamphetamine derivatives (MDMA 25 ng/ml), cocaine (benzoylecgonine 50 ng/ml), cannabinoids (THCCOOH 5 ng/ml), opioids (morphine 10 ng/ml) and benzodiazepines (clonazepam 10 ng/ml).

Analysis of biological material for the presence of new psychoactive substances was carried out by liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS/MS). An Agilent Technologies 1200 series liquid chromatograph connected to a 6460 Triple Quad mass spectrometer was used for analyses. A deuterated derivative of mephedrone was added as an internal standard (IS) to blood samples (0.2 ml) placed in Eppendorf vials, to obtain a final concentration of 100 ng/ml. Next, 200 μ l of 0.5 M carbonate buffer (pH 12) and 1 ml of n-butyl chloride were added to the blood. The samples were vortexed for 30 s, followed by centrifugation at 15,000 rpm for 5 min, and then the organic layer (800 μ l) was transferred to further Eppendorf vials. 100 μ l of 0.025 M HCl was added to these vials, and then the organic layer was evaporated at 40–45°C, until it reached the level of added acid (average 10–15 min). The remaining aqueous phase (acid) was mixed on a vortex mixer (for about 10 s), and then transferred to autosampler vials.

The following MRM transitions were monitored: 238.1→126.1, 238.1→111.0 and 238.1→97.0 for α -PVT, and 181.1→163.1 and 181.1→148.1 for mephedrone-D₃. The mass detector operated in multiple reaction monitoring (MRM) and positive ion mode, at the following parameters: fragmentor voltage – 85 V, collision energy – 24, 24 and 48 V, nebulizer pressure – 40 psi, drying gas temperature – 325°C, drying gas flow – 10 l/min, sheath gas (nitrogen) temperature – 325°C, sheath gas flow 10 l/min, capillary voltage 3000 V. Cycle time, the time of monitoring of one MRM pair, and the width of the retention time were as follows: 596.5 ms, 96.5 ms and 2 min. Analysis of results was conducted using MassHunter software by Agilent Technologies (version B.04.01). The method was validated. A five-point calibration curve was prepared in the range of 5–100 ng/ml, $R^2 = 0.999$. The limit of detection (LOD with a signal to noise ratio $S/N = 3$) was 0.1 ng/ml, while the lowest point of the calibration curve (5 ng/ml) was assumed as the limit of quantification (LOQ). The specificity was assessed by analyses of α -PVT-free blood samples and blood

samples from expert studies (opinions) in which other substances were revealed. Interferences were not observed.

4. Results and discussion

Analysis of blood for the presence of narcotic drugs and psychotropic substances (amphetamines, benzodiazepines, cannabinoids, cocaine and opioids) gave a negative result. α -PVT was revealed in blood at a concentration of 13 ng/ml (Figure 1).

The increasing popularity of so-called legal highs – which are especially used by young people as a legal alternative to narcotic drugs and psychotropic substances controlled by the Act on counteracting drug addiction – means that new psychoactive substances are appearing on the drug market. They are most commonly analogues of compounds that have already been on the drug market, and their effects are “tested” by users of this type of substance, who reach for new preparations in order to reduce the adverse consequences for themselves linked with possible conflicts with the law. Since α -PVP and α -PVT have a similar structure (Figure 2), it is likely that these substances have similar psychoactive properties, as confirmed by their users.

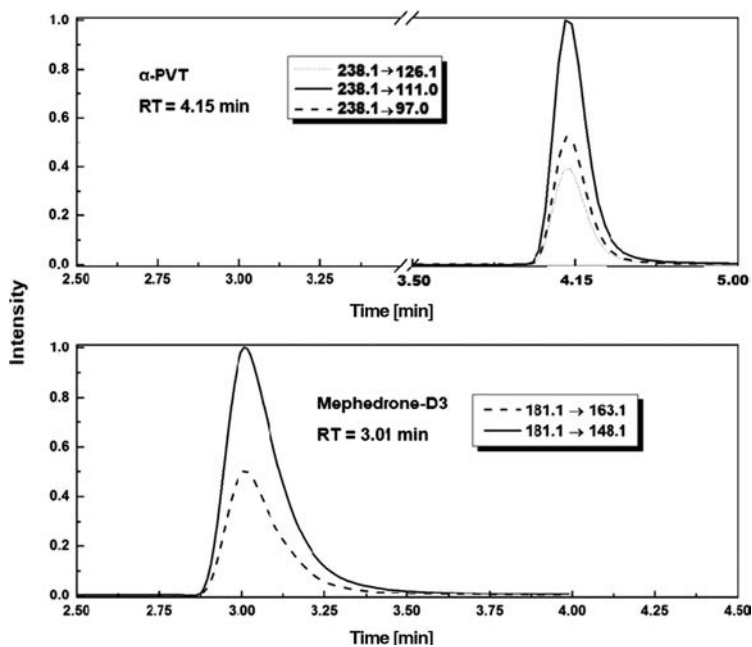
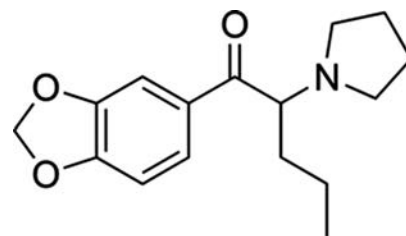
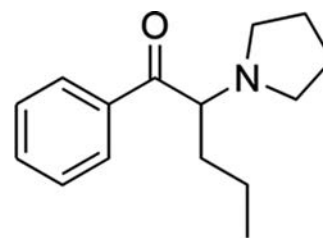


Fig. 1. Chromatogram of α -PVT in the blood.

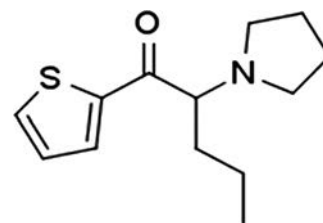
In cases studied at the Institute of Forensic Research, the concentrations of α -PVP determined in the blood of drivers were in the range of 6–99 ng/ml. The impairment of psychomotor performance of drivers was most commonly observed at concentrations of α -PVP in the blood that were higher than 40 ng/ml (Adamowicz et al., 2016). Similar concentration ranges of α -PVP were demonstrated in the blood of persons apprehended in connection with the possession of controlled substances. The concentration of α -PVT determined in the analysed case was in this range, and during the course of the incident was certainly not lower, as 2 h and 50 min had passed (since the incident) before the blood was sampled. The simultaneous administration of ethyl alcohol and α -PVT can further impair the psychomotor performance of a driver of a motor vehicle.



3,4-methylenedioxypropylvalerone (MDPV)



α -Pyrrolidinopentiophenone (α -PVP)



α -Pyrrolidinopentiothiophenone (α -PVT)

Fig. 2. Structural formulas of pyrovalerone derivatives: MDPV, α -PVP and α -PVT.

5. Conclusions

α -PVT is yet another NPS on the Polish drug market which affects psychomotor performance, creating an increased hazard to road traffic. In the discussed case, the relatively low concentration of α -PVT was accompanied by the presence of ethyl alcohol, which – bearing in mind the symptoms occurring in the perpetrator and the effects of the incident – provides grounds for assumptions about their interaction in the context of safe driving. The introduction of new substances, uncharacterized in terms of toxicity, and the withdrawal of existing – already controlled – substances inclines the author to favour a review of road safety policy in the area of roadside checks. The above described determination of the concentration of α -PVT in the blood of the driver is a contribution to the possible establishment of a threshold for driver testing (Driving Under the Influence of Drugs – DUID), which is particularly important for judicial purposes.

References

1. Adamowicz, P., Gieroń, J., Gil, D., Lechowicz, W., Skulska, A., Tokarczyk, B., Zuba, D. (2016). Blood concentrations of α -pyrrolidinovalerophenone (α -PVP) determined in 66 forensic samples. *Forensic Toxicology*, 34, 227–234.
2. Adamowicz, P., Tokarczyk, B. (2016). Simple and rapid screening procedure for 143 new psychoactive substances by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Testing and Analysis*, 8, 652–667.
3. Concheiroa, M., Castanetoa, M., Kronstrand, R. R., Huestis, M. A. (2015). Simultaneous determination of 40 novel psychoactive stimulants in urine by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry and library matching. *Journal of Chromatography A*, 1397(5), 32–42.
4. Odoardi, S., Romolo, F.S., Strano-Rossi, S. (2016). A snapshot on NPS in Italy: Distribution of drugs in seized materials analysed in an Italian forensic laboratory in the period 2013–2015. *Forensic Science International*, 265, 116–120.
5. Swortwood, M. J., Carlier, J., Ellefsen, K. N., Wohlfarth, A., Diao, X., Concheiro-Guisan, M., Kronstrand, R., Huestis, M. A. (2016). In vitro, in vivo and in silico metabolic profiling of α -pyrrolidinopentiothiophenone, a novel thiophene stimulant. *Bioanalysis*, 8, 65–82.
6. Takayama, T., Suzuki, M., Todoroki, K., Inoue, K., Min, J. Z., Kikura-Hanajiri, R., Goda, Y., Toyooka, T. (2014). UPLC/ESI-MS/MS-based determination of metabolism of several new illicit drugs, ADB-FUBINACA, AB-FUBINACA, AB-PINACA, QUPIC, 5F-QUPIC and α -PVT, by human liver microsome. *Biomedical Chromatography*, 28, 831–838.
7. Wojcieszak, J., Andrzejczak, D., Woldan-Tambor, A., Zawilska, J. B. (2016). Cytotoxic activity of pyrovalerone derivatives, an emerging group of psychostimulant designer cathinones. *Neurotoxicity Research*, 30, 239–250.

Corresponding author

Dr inż. Dominika Gil
Instytut Ekspertyz Sądowych
ul. Westerplatte 9
PL 31-033 Kraków
e-mail: dgil@ies.gov.pl

A-PVT – „NASTĘPCA” A-PVP, NOWA SUBSTANCJA PSYCHOAKTYWNA W MATERIALE BIOLOGICZNYM. ANALIZA PRZYPADKU

1. Wstęp

α -Pirolidynopentiotiofenon, określane jako α -PVT, stanowi pochodną katynonu zsyntetyzowaną w latach 60. XX wieku, zaliczaną do tzw. designer drugs, nowych substancji psychoaktywnych (NSP) produkowanych w nielegalnych laboratoriach. Jest analogiem α -pirolidynopentiofenonu (α -PVP), w którym zastąpiono grupę fenylową, tiofenową. α -PVP pojawił się na rynku narkotykowym w pierwszej połowie 2014 roku jako „legalny” zamiennik MDPV (Odoardi, Romolo, Strano-Rossi, 2016). W dniu 1 lipca 2015 roku został umieszczony na liście substancji psychotropowych grupy IV-P, zgodnie z Ustawą o przeciwdziałaniu narkomanii z dnia 29 lipca 2005 roku, z późniejszymi zmianami. Prawdopodobnie w następstwie tego, w drugiej połowie 2015 roku na rynek wprowadzono α -PVT, który, jak dotąd, nie znajduje się na liście środków odurzających i substancji psychotropowych kontrolowanych przez wzmiankowaną ustawę, jednak w jej myśl jest środkiem zastępczym.

α -PVT jest dostępny najczęściej w postaci proszku o barwie białej, ale bywa także nanoszony na susz roślinny. Przyjmowany jest „rekreacyjnie” w dawkach o około 20% wyższych niż α -PVP i uzależnionych od drogi podania: *per os*: 50–80 mg, donosowo: 50–120 mg albo poprzez palenie: 10–35 mg (dopalator.info, hyperreal.info). α -PVT podrażnia śluzówkę nosa i gardła. Jego działanie obejmuje również silne pobudzenie psychofizyczne, poprawę samopoczucia, euforię, podniecenie seksualne, intensyfikację odbioru muzyki, potliwość, nadwrażliwość źrenic na światło, tachykardię, bezsenność oraz brak apetytu. Efekty działania utrzymują się do 2 godzin. Zgodnie z informacjami uzyskiwanymi od użytkowników, α -PVT jest „łagodniejszą wersją” α -PVP, która nie wywołuje (w krótkim czasie) tak skrajnych stanów wahających się od euforii do psychozy i jest łagodniejsza podczas ustępowania efektów działania, czyli „zejścia”. Niemniej jednak doniesienia naukowe wskazują na jego silne działanie cytotoksyczne (Wojcieszak, Andrzejczak, Woldan-Tambor, Zawilska, 2016).

Niewiele wiadomo na temat toksykokinetyki α -PVT. Przeprowadzono natomiast badania metabolizmu tego związku, przy użyciu kultur hepatocytów oraz analiz prób moczu osób przyjmujących ten związek (Swortwood i in., 2016; Takayama i in., 2014). Zidentyfikowano siedem głównych metabolitów, produktów monohydroksylacji i glukuronidacji, spośród których dihydroksypirolidynyl- α -PVT, 2-ketopirolidynyl- α -PVT, hydroksy-

tiofenyl- α -PVT i tiofenol- α -PVT charakteryzowały się najwyższymi poziomami. Stężenia α -PVT stwierdzone w próbach moczu trzech osób wynosiły 5–724 ng/ml (Concheiroa, Castanetoa, Kronstrandd, Huestis, 2015). Jak dotąd, nie ma danych w piśmiennictwie dotyczących stężeń α -PVT we krwi.

Pojawianie się nowej pochodnej katynonu w produktach dostępnych na polskim rynku narkotykowym stanowiło przyczynek do opracowania ukierunkowanej metody oznaczania α -PVT w materiale biologicznym, a coraz większa liczba nowych substancji psychoaktywnych powoduje, że stosowane metody przesiewowe wymagają ciągłego rozszerzania (Adamowicz, Tokarczyk, 2016).

W pracy przedstawiono pierwszy przypadek stwierdzenia obecności we krwi α -PVT.

2. Opis przypadku

Mężczyzna w wieku 29 lat, kierując samochodem osobowym, w trakcie wykonywania manewru skręcania w lewo na skrzyżowaniu w kształcie litery „T”, jadąc od jej podstawy, nie zajął właściwego pasa ruchu, wskutek czego zderzył się czołowo z pojazdem ciężarowym. Zdarzenie miało miejsce o godzinie 7:40. Funkcjonariusze policji, którzy przyjechali na miejsce wypadku, przeprowadzili u sprawcy badanie na zawartość alkoholu etylowego w wydychanym powietrzu, które dało wynik 0,67 mg/l. Następnie kierowca został zbadany przez lekarza i pobrano od niego próbę krwi o godzinie 10:30. Mężczyzna mierzący 180 cm, o wadze 80 kg, miał miarowe tętno 74 uderzenia/min, źrenice normalne, ale wolno reagujące na światło. Pozostałe parametry nie odbiegały od normy.

3. Metody

Badania przesiewowe krwi na obecność środków odurzających i substancji psychotropowych prowadzono przy użyciu metody immunoenzymosorpcyjnej (ELISA) z przyjętymi progami: dla pochodnych amfetaminy (amfetamina 25 ng/ml), pochodnych metamfetaminy (MDMA 25 ng/ml), kokainy (benzoilokgonina 50 ng/ml), kannabinoli (THCCOOH 5 ng/ml), opioidów (morfina 10 ng/ml) i benzodiazepin (klonazepam 10 ng/ml).

Analizę materiału biologicznego w kierunku nowych substancji psychoaktywnych wykonano przy użyciu metody chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS/MS). Do analiz zastosowano chromatograf cieczowy serii 1200 połączony ze spektrometrem mas 6460 Triple Quad firmy Agilent Technologies. Do prób krwi (0,2 ml) umieszczonych we fiolkach Eppendorfa dodawano jako wzorzec wewnętrzny deuterową pochodną mefedronu, aby osiągnąć stężenie wynoszące 100 ng/ml. Następnie do krwi dodawano 200 µl 0,5 M buforu węglanowego (pH 12) oraz 1 ml chlorku n-butylu. Próby wstrząsano przez 30 s, a następnie wirowano przez 5 min przy 15 000 rpm, po czym fazę organiczną (800 ml) przenoszono do kolejnych fiolek Eppendorfa. Do fiolek tych dodawano 100 µl 0,025 M HCl, po czym fazę organiczną odparowywano w temperaturze 40–45°C do momentu osiągnięcia poziomu dodanego kwasu (przeciętnie 10–15 min). Pozostałości mieszało na wstrząsarce (około 10 s), a następnie przenoszono do fiolek automatycznego podajnika próbek.

Monitorowano następujące przejścia MRM: 238,1→126,1, 238,1→111,0 i 238,1→97,0 dla α-PVT oraz 181,1→163,1 i 181,1→148,1, dla mefedronu-D₃. Detektor masowy pracował w trybie monitorowania wielu reakcji (MRM), w jonizacji dodatniej, przy następujących parametrach: napięcie fragmentatora – 85 V, energia kolizji – 24, 24 i 48 V, ciśnienie rozpylacza – 40 psi, temperatura gazu osuszającego – 325°C, przepływ gazu osuszającego – 10 l/min, temperatura gazu rozpraszającego (azot) – 325°C, przepływ gazu rozpraszającego – 10 l/min, napięcie kapilary 3000 V. Czas cyklu, czas monitorowania jednej pary MRM i szerokość czasu retencji wynosiły odpowiednio: 596,5 ms, 96,5 ms i 2 min. Analiza wyników była prowadzona przy użyciu oprogramowania MassHunter firmy Agilent Technologies (wersja B.04.01). Metoda została zwalidowana. Wykonano pięciopunktową linię kalibracyjną w zakresie 5–100 ng/ml, $R^2 = 0,999$. Granica wykrywalności (LOD przy stosunku sygnału do szumu $S/N = 3$) wynosiła 0,1 ng/ml, zaś jako granicę oznaczalności (LOQ) przyjęto najniższy punkt krzywej kalibracyjnej (5 ng/ml). Specyficzność określano analizując próby krwi wolne od α-PVT i krew z ekspertyz, w której wykryto inne środki psychoaktywne. Nie obserwowano żadnych interferencji.

4. Wyniki i dyskusja

Przeprowadzone badanie krwi w kierunku środków odurzających i substancji psychotropowych (amfetamin, benzodiazepin, kannabinoli, kokainy i opioidów) dało wynik ujemny. We krwi wykazano α-PVT w stężeniu 13 ng/ml (rysunek 1).

Wzrastająca popularność tzw. dopalaczy, traktowanych zwłaszcza przez młodych ludzi, jako legalna alter-

natywa dla środków odurzających i substancji psychotropowych kontrolowanych Ustawą o przeciwdziałaniu narkomanii powoduje, że na rynku narkotykowym pojawiają się nowe substancje psychoaktywne. Najczęściej są to analogi związków wcześniej wprowadzonych do obrotu, a testowanie ich działania odbywa się przez użytkowników tego typu substancji, którzy sięgają po nowe preparaty w celu zmniejszenia niekorzystnych dla siebie skutków przy ewentualnym wejściu w konflikt z prawem. Ponieważ α-PVP i α-PVT mają zbliżoną strukturę (rysunek 2), to prawdopodobnie substancje te posiadają podobne właściwości psychoaktywne, co potwierdzają ich użytkownicy.

W przypadkach opracowywanych w Instytucie Ekspertyz Sądowych wyznaczone we krwi kierowców stężenia α-PVP mieściły się w zakresie 6–99 ng/ml. Upośledzenie sprawności psychomotorycznej kierowców było najczęściej obserwowane przy stężeniach α-PVP we krwi wyższych niż 40 ng/ml (Adamowicz i in., 2016). Podobne zakresy stężeń α-PVP wykazywano we krwi osób zatrzymanych w związku z posiadaniem środków objętych kontrolą prawną. Stężenie α-PVT wyznaczone w analizowanym przypadku mieściło się tym zakresie, a które w trakcie zdarzenia z pewnością nie było niższe, gdyż do momentu pobrania próby krwi minęły 2 godziny i 50 minut. Jednoczesne przyjęcie alkoholu etylowego i α-PVT może dodatkowo niekorzystnie wpływać na sprawność psychomotoryczną kierującego pojazdem mechanicznym.

5. Wnioski

α-PVT jest kolejnym NSP na polskim rynku narkotykowym, który wpływa na sprawność psychomotoryczną, zwiększając zagrożenie w ruchu drogowym. W omawianym przypadku stosunkowo niskiemu stężeniu α-PVT towarzyszyła obecność alkoholu etylowego, co uwzględniając objawy występujące u sprawcy oraz skutki zdarzenia, daje podstawy do przypuszczeń o ich interakcji w kontekście bezpiecznego prowadzenia pojazdu. Wprowadzanie nowych substancji, niescharakteryzowanych pod względem toksyczności i wycofywanie istniejących, a już kontrolowanych, skłania do weryfikacji polityki bezpieczeństwa ruchu drogowego w zakresie kontroli drogowej. Wyznaczenie stężenia α-PVT we krwi kierowcy stanowi przyczynek do ewentualnego określenia progu przy testowaniu kierowców (Driving Under the Influence of Drugs – DUI), co jest szczególnie istotne dla potrzeb sądowych.