



3-FLUOROPHENMETRAZINE – A NEW PSYCHOACTIVE SUBSTANCE ON THE POLISH DRUG MARKET

Piotr ADAMOWICZ, Joanna GIEROŃ

Institute of Forensic Research, Kraków, Poland

Abstract

3-fluorophenmetrazine (3-FPM) is a fluorinated analogue of phenmetrazine that appeared on the European illegal drug market in 2014. It has been sold in Poland since 2015. In February 2016, 3-FPM was detected in biological material for the first time at the Institute of Forensic Research in Kraków. Blood had been collected from a driver involved in a single car incident. A blood screening was performed by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), indicating its suitability for the detection of this compound. Liquid-liquid extraction was applied for the isolation of 3-FPM from the biological matrix. A liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the determination of 3-FPM was developed, validated and successfully used. The analysis was carried out in multiple reaction monitoring (MRM) mode. The presence of 3-FPM at a concentration of 2.77 µg/ml was revealed. Despite the lack of clear symptoms in the above mentioned driver, the high concentration revealed in his blood and its interpretation in the light of recent literature reports suggest that 3-FPM should be treated as a potentially dangerous substance in traffic safety.

Key words

3-fluorophenmetrazine; 3-FPM; New psychoactive substance; LC-MS/MS; Blood analysis.

Received 26 October 2016; accepted 24 November 2016

1. Introduction

3-fluorophenmetrazine (3-FPM; 3F-phenmetrazine; PAL-593; IUPAC: 2-(3-fluorophenyl)-3-methylmorpholine) is a fluorinated derivative of phenmetrazine (Figure 1), which has recently been gaining increasing popularity as a new psychoactive substance (NPS). Phenmetrazine (the active component of the drug Preludin) has been widely used in the pharmacotherapy of obesity since the 1950s. Side effects, such as, inter alia, agitation and anxiety, as well as the abuse of this substance in the 60s and 70s as an amphetamine substitute by persons inducing themselves into a state of intoxication, led to its withdrawal from the market. A patent describing the methods of synthesis and the potential therapeutic use of 3-FPM and other phenylmorpholine analogues was published in 2013 (Blough,

Rothman, Landavazo, Page, Decker, 2013). Patents of this kind are a valuable source of information for manufacturers of new drugs. 3-FPM was detected on the (illegal) drug market for the first time in September 2014 in Hungary. In the same year, it was also identified in the United Kingdom and Sweden, and in the following year in France, Slovenia, Denmark, Lithuania, Croatia, Spain, Germany, Norway, Czech Republic and Romania. 3-FPM is a controlled substance in several countries, including Sweden, the United Kingdom, Switzerland, Hungary, Finland and Estonia¹.

¹ European Database on New Drugs (EDND). <https://ednd.em-cdda.europa.eu/>.

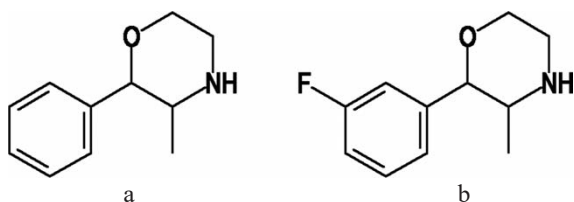


Fig. 1. Chemical structure of phenmetrazine (a) and 3-fluorophenmetrazine (b).

3-FPM is frequently sold in the form of powder or crystals, and sometimes also in the form of pills. This substance can be insufflated through the nose, but due to a burning sensation some users prefer oral ingestion. It can also be taken intravenously or smoked. Threshold doses of 3-FPM reported by users are from 5 to 10 mg, whereas doses that are most often mentioned are in the range from 25 to 50 mg, and high doses are described as ones at the level of 70 mg. Psychoactive effects are of short duration, which means that the repetition of doses is often practiced, leading to administration of up to 500 mg in total in a single session. Repetition of doses for several days can lead to the oral administration of doses as high as 3500 mg of 3-FPM. Tolerance to this substance develops quickly, but it disappears 1–2 weeks after cessation of administration. The action of 3-FPM begins after 10–25 min; the strongest effects occurring up to 2 h, and finishing 3–8 h after administration^{2,3} (Bäckberg, Westerbergh, Beck, Helander, 2016). In controlled studies, after a single 100 mg dose, effects were perceived up to about 5 h (Grumann, Huppertz, Angerer, Auwärter, 2016).

The symptoms caused by 3-FPM are similar to those engendered by phenmetrazine, which increases the release of dopamine and noradrenaline. The effects caused by 3-FPM, described by users on Internet forums, include euphoria, stimulation, empathy, increased libido, improvement of concentration and mood, increase of motivation and energy, talkativeness, insomnia and a different perception of music. The negative effects observed after 3-FPM administration include increased anxiety and sweating, as well as jaw clenching and bruxism. When compared to traditional stimulants (eg. amphetamine, MDMA and cocaine) the action of 3-FPM is referred to as a much weaker and more subtle. 3-FPM only slightly decreases the appetite and accelerates the heart rate. The effects that occur during the so-called comedown (which should be understood as the period after the expected drug action has ended) are referred to as unpleasant

and usually include anxiety, fatigue, depression and irritability. They appear 9–72 h after the last dose and may persist for up to a week. In order to alleviate these symptoms, users often administer benzodiazepines (eg. etizolam)^{4,5,6}.

Bäckberg, Westerbergh, Beck and Helander (2016) described a series of clinical symptoms observed in 3-FPM users, including tachycardia (≥ 100 beats per minute), decreased level of consciousness, agitation, anxiety, delirium, and dilated pupils. More rarely, seizures, hypertension (≥ 140 mmHg), hypotension (≤ 90 mmHg), respiratory failure and rhabdomyolysis were observed. It should be noted, however, that in all subjects, not only 3-FPM, but also other substances (other NPS, conventional drugs and medicines) were detected, the most common of which were pharmaceuticals from the benzodiazepine group (Bäckberg, Westerbergh, Beck, Helander, 2016).

The aim of this study was to present a method of determination of 3-FPM in the blood and a description of the first case in Poland in which the presence of this substance in biological material was demonstrated.

2. Case report

A 20-year-old man was driving a car and ran into a ditch on the side of a road around midnight. The vehicle got stuck in the mud, while the driver and a passenger did not suffer any injuries. A police patrol arrived on the scene at about 0:50. In view of a suspicion that the driver might be under the influence of drugs, he was searched. 24 bags with zipper closure containing a white powder were found on the man. The driver admitted to having administered the white powder on the evening of the previous day. Blood samples were collected at 2:50. The doctor taking the blood did not record any deviations from the norm on the blood collection form, but he noted that the examined man might be under the influence of narcotic drugs or psychotropic substances.

3. Methods

3.1. Materials and chemicals

3-FPM and mephedrone- D_3 were purchased from LGC Standards (Dziekanów Leśny, Poland). Ace-

² Erowid Experience Vaults. <https://www.erowid.org/>

³ Drugs-forum. <https://drugs-forum.com/>

⁴ Erowid Experience Vaults. <https://www.erowid.org/>

⁵ Drugs-forum. <https://drugs-forum.com/>

⁶ 3-FPM – Psychonautwiki. <https://psychonautwiki.org/wiki/3-FPM>

tonitrile (MeCN), n-butyl chloride and formic acid (98–100%) were from Merck (Warsaw, Poland). Hydrochloric acid (35–39%) was purchased from POCH S.A. (Gliwice, Poland). Neogen's immunoassay test kits were purchased from STI (Poznań, Poland).

Control blood samples (free of analytes) used for the development and validation of the method were from a blood donation centre. Screening analyses of this blood did not reveal the presence of drugs, including 3-FPM and other NPS covered by the applied analytical procedure. Biological material was stored at -20°C .

3.2. Screening analyses

The blood was examined for the presence of narcotic drugs and psychotropic substances from the following groups: amphetamines, benzodiazepines, cannabinoids, opioids and cocaine. These analyses were performed by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using Neogen's tests. As a result of the analyses, a positive reading for amphetamine derivatives was obtained, but a targeted analysis of blood performed by liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS) did not reveal the presence of amphetamine and its common derivatives (including methamphetamine and MDMA). Screening analyses for NPS were carried out by a previously published method (Adamowicz, Tokarczyk, 2015). As a result of these analyses, the presence of 3-FPM in the blood was revealed.

3.3. Determination of 3-FPM

3.3.1. Samples preparation for analyses

Mephedrone- D_3 was added as an internal standard (IS) to the blood samples (0.2 ml) placed in Eppendorf vials, to obtain a final concentration of 100 ng/ml. Next, 200 μl 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 13,000 rpm ($15,682 \times g$), and then the organic layers (800 μl) were transferred to further Eppendorf vials. After addition of 100 μl of 0.025 M HCl, the organic layers were evaporated at 37°C for 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 results of the first analyses indicated a very high concentration of 3-FPM in the evidential blood; therefore, further samples were diluted five times with

control blood, so that the results of determinations were within the range of the calibration curve.

3.3.2. Apparatuses and conditions of analyses

Determinations were carried out by liquid chromatography with tandem mass spectrometry method (LC-MS/MS) using an Agilent Technologies 1200 series liquid chromatograph connected to a 6460 Triple Quad mass spectrometer. The apparatus operated in the positive ion mode (+ESI). Separation was carried out on a Zorbax SB-C18 (2.1×50 mm, $1.8 \mu\text{m}$) column (Agilent Technologies). The mobile phase flowing at a rate of 0.3 ml/min was a mixture of 0.1% formic acid in acetonitrile and water (v/v). The following gradient program was applied (in relation to MeCN content): 0 min – 10%, 6 min – 100%, 7 min – 10%, 14 min – 10%. The total time of analysis was 14 min. The retention time of 3-FPM was 2.8 min (relative retention time 0.875). Selected transitions (MRM) of ions (m/z) were monitored as used in confirmatory and quantitative (underlined) analysis: 196.1 \rightarrow 109.1 (at collision energy 24 V), 196.1 \rightarrow 115.1 (32 V), 196.1 \rightarrow 133.1 (32 V) and 196.1 \rightarrow 135.1 (20 V) for 3-FPM, and 181.1 \rightarrow 148.1 (20 V) and 181.1 \rightarrow 163.1 (8 V) for mephedrone- D_3 . Fragmentor voltages were 25 V for 3-FPM and 87 V for mephedrone- D_3 , while collision cell acceleration was 7 V for both compounds. Other parameters of the mass detector were as follows: capillary voltage 3000 V, gas flow (nitrogen) 11 l/min, gas temperature 325°C , sheath gas flow 10 l/min, sheath gas temperature 325°C , nebulizer pressure 40 psi, dwell time 75 ms. Data collection and result analysis were conducted using MassHunter software by Agilent Technologies (version B.04.01).

3.3.3. Method validation

Validation of the method of determination of 3-FPM in blood included, among others, determination of the limit of detection (LOD), the limit of quantification (LOQ), the range of linearity, precision, accuracy, recovery and matrix effect (ME). An eight-point calibration curve for the blood was prepared in the concentration range of 5–1000 ng/ml. The LOD was calculated using MassHunter software for a concentration producing a detector signal (S) three times greater than the noise level (N), that is $S/N = 3$ for the least intense MRM transition (m/z 196.1 \rightarrow 133.1). The lowest point of the calibration curve was assumed as the LOQ. The method specificity was assessed by analyses of 3-FPM-free blood samples collected from five persons, as well as blood samples from real expert studies, in which other substances, including NPS,

were revealed. Extraction recovery was calculated at a concentration of 100 ng/ml by comparing the signal (analyte area/IS area) from 3-FPM extracted from blood with the signal from 3-FPM added to previously extracted blood. *ME* at a concentration of 100 ng/ml was calculated by comparing the signals from unextracted 3-FPM (set A) with those from blood spiked with 3-FPM after extraction (set B). The following formula was used for calculations: $ME [\%] = B/A \times 100$. The precision and accuracy of determinations within-day and between-days were calculated at a concentration of 100 ng/ml, and measurements were carried out for three consecutive days.

4. Results

The method of determination of 3-FPM in blood was validated. The calibration curve was linear over the entire range (5–1000 ng/ml), and the coefficient of determination R^2 was 0.9996. The *LOD* was 0.7 ng/ml and the *LOQ* was equal to 5 ng/ml. The method was selective; interferences were not observed. The extraction recovery was 92.4%, and the matrix effect was 51.6%. The determined value of precision did not exceed 6.8%, and accuracy 9.5% (relative error).

The determined concentration of 3-FPM in analysed blood was 2.77 µg/ml. MRM ion chromatograms for 3-FPM and mephedrone- D_3 obtained for analysed blood are shown in Figure 2. The conducted analyses did not reveal any other substances in the blood (including conventional drugs and other NPS).

5. Discussion

3-FPM is a new psychoactive substance that has appeared on the drug market recently. It was first detected in Europe in late 2014 and has been present in Poland since 2015. These data are consistent with the interest in this substance (number of Google searches) which can be observed on the Internet (Figure 3), and, in particular, with the interest shown on Internet forums dedicated to psychoactive substances⁷.

The first case of detection of 3-FPM in biological material was reported at the Institute of Forensic Research at the end of February 2016, as described above. This compound was present in the blood sample collected from the driver who had caused the road collision. Screening analyses of blood were performed by ELISA immunosorbent assay. Kits for detection of

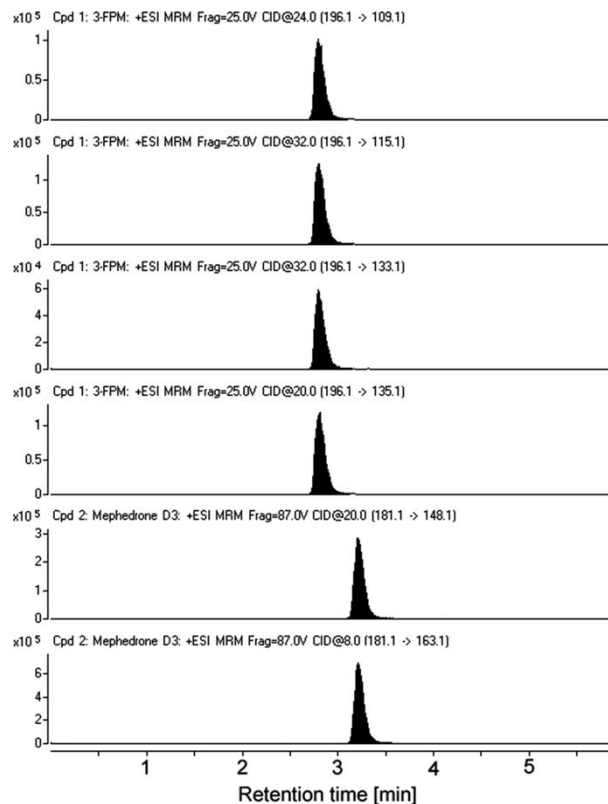


Fig. 2. MRM chromatograms of 3-FPM and IS (mephedrone- D_3) in the analysed blood sample (diluted 5 times).

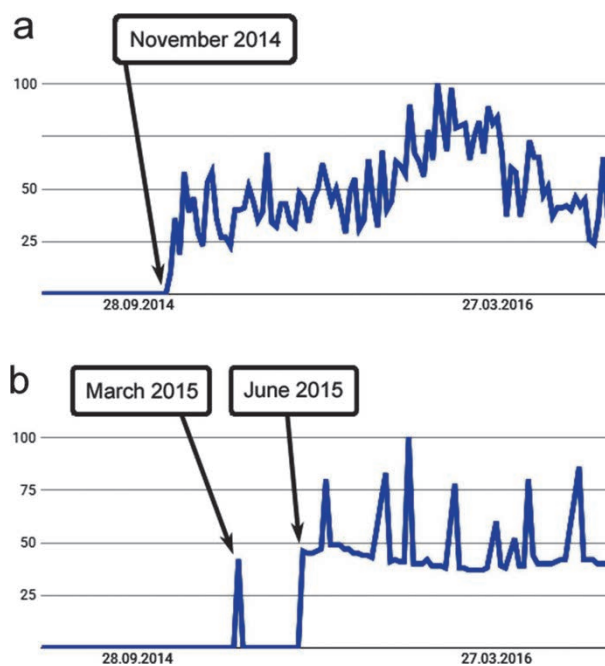


Fig. 3. Interest in the term “3-FPM” over time in the world (a) and in Poland (b) (Google Trends).

⁷ Google Trends. <https://www.google.com/trends>

amphetamines, MDMA, opiates, cocaine, benzodiazepines and cannabinoids were used in the analyses. The result obtained for amphetamines required verification by a specific method. Targeted analyses carried out by LC-MS did not, however, reveal most often used amphetamine derivatives. Screening analysis for NPS showed the presence of 3-FPM. As a result of targeted analyses, 3-FPM was found in blood at a concentration of 2.77 µg/ml.

So far one work has been published (Bäckberg, Westerbergh, Beck, Helander, 2016), in which the concentrations of 3-FPM in biological material have been described. Concentrations of 3-FPM found in the serum of 15 individuals were in the range from 2.7 to 1416 ng/ml (mean 303 ng/ml, median 77 ng/ml) and were thus lower than in the blood of the driver from the discussed case. In 14 urine samples from the above mentioned research the concentrations of 3-FPM were 8.2–30,857 ng/ml (mean 7431 ng/ml, median 1867 ng/ml). Grumann, Huppertz, Angerer and Auwärter (2016) presented the results of pharmacokinetic studies obtained after administration of a single dose (100 mg) of 3-FPM to a man (45 years, 73 kg). A maximum concentration of 210 ng/ml was observed 2.5 h after administration. 3-FPM was detected in serum, urine and saliva respectively for 60, 260 and 55 hours.

The obtained result can, however, be compared to concentrations of phenmetrazine. Doses of this compound are similar (12–75 mg) and biological half-lives are the same: 8.5 hours (Baselt, 2014; Grumann, Huppertz, Angerer, Auwärter, 2016). The therapeutic concentration range of phenmetrazine is determined to be 0.02–0.25 µg/ml of serum. Concentrations higher than 0.5 µg/ml are considered toxic, while those encountered in fatal cases exceed 4 µg/ml (Moffat, Osselton, Widdop, Watts, 2011; Schulz, Iwersen-Bergmann, Andersen, Schmoldt, 2012). The administration of this compound at a dose of 75 mg to 5 individuals resulted in plasma concentrations in the range of 51–238 ng/ml (mean 140 ng/ml), observed after two hours, which declined to a mean of 102 ng/ml after five hours and 54 ng/ml after 12 hours. In turn, among seven drivers, phenmetrazine was shown in blood at concentrations of 0.5–4.0 µg/ml and in urine at concentrations of 56–290 µg/ml. Similar concentrations were demonstrated in fatal cases: 0.1–4.9 µg/ml in the blood and 0.1–90 µg/ml in urine (Baselt, 2014).

As a part of the present research, analyses by the ELISA method were also performed to check for the possible presence of cross reactivity of amphetamine antibodies with 3-FPM. The results obtained for amphetamines in an evidential blood sample, and for control samples with the addition of 3-FPM (at con-

Table 1

Readings obtained by the ELISA method for amphetamine derivatives in the evidence blood sample and control samples fortified with 3-FPM and amphetamine

Sample	Absorbance value
Analysed case	0.296
Negative control	1.714
Positive amphetamine control 25 ng/ml	0.840
Positive 3-FPM control 25 ng/ml	1.583
Positive 3-FPM control 100 ng/ml	1.226
Positive 3-FPM control 1000 ng/ml	0.433
Positive 3-FPM control 2500 ng/ml	0.364

centrations of 25, 100, 1000 and 2500 ng/ml) and amphetamine (at a concentration of 25 ng/ml) are shown in Table 1. Significant absorbance changes for blood samples with the addition of 3-FPM can be seen on the obtained readings. In accordance with the applied procedures, a result that is less than or equal to the absorbance value of the positive control is considered as a positive result in the applied immunosorbent assay, as is a result that is less than or equal to half of the absorbance value of the negative control. Taking into account the discussed case and the data in the table, results with values less than 0.840 would be classified as positive. Assuming that the ELISA test is used routinely for amphetamines screening, concentrations of 3-FPM in blood at a level of about 0.4–0.5 µg/ml would result in a positive reading. It is therefore clear that it is possible to detect 3-FPM with the application of the standard tests (Neogen) used in the screening analysis for the presence of amphetamines. However, this statement refers to cases of high concentrations of 3-FPM, bearing in mind that among the 15 cases analysed by Bäckberg et al. (Bäckberg, Westerbergh, Beck, Helander, 2016) only in five were the determined concentrations higher than 0.4 µg/ml. In summary, in the case of a positive reading for amphetamines using ELISA, and a negative result of analysis for the presence of amphetamines and its most popular derivatives by the specific method, it seems advisable to carry out screening for NPS, including 3-FPM.

6. Conclusions

The article discusses the first case in Poland in which the presence of 3-FPM in blood was demonstrated. The developed method of determination of 3-FPM

was successfully used in the described analysis. The concentration of 3-FPM revealed in the driver's blood was 2.77 µg/ml. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) used in the routine analysis for amphetamine derivatives allows the detection of 3-FPM. Despite the lack of clear symptoms in the examined man, the presented case and the recent literature reports suggest that 3-FPM can be treated as a substance that is potentially dangerous for traffic safety.

References

1. Adamowicz, P., Tokarczyk, B. (2015). Simple and rapid screening procedure for 143 new psychoactive substances by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Testing and Analysis*, doi: 10.1002/dta.1815.
2. Bäckberg, M., Westerbergh, J., Beck, O., Helander, A. (2016). Adverse events related to the new psychoactive substance 3-fluorophenmetrazine – results from the Swedish STRIDA project. *Clinical Toxicology (Philadelphia)*, 5, 1–7.
3. Baselt, R. C. (2014). *Disposition of toxic drugs and chemicals in man. Tenth edition*. Seal Beach: Biomedical Publications.
4. Blough, B. E., Rothman R., Landavazo, A., Page, K. M., Decker, A. M. (2013). *Phenylmorpholines and analogues thereof 2011. Patent No. US20130203752 A1*. Research Triangle Institute, USA. (Website) <http://www.google.com/patents/US20130203752>.
5. Grumann, C., Huppertz, L. M., Angerer, V., Auwärter, V. (2016). *Pharmacokinetic studies on the new designer stimulant 3-fluorophenmetrazine*. (Oral presentation at 54th The International Association of Forensic Toxicologists meeting 2016, Brisbane, Australia, August 28th – September 1th, 2016).
6. Moffat, A. C., Osselton, M. D., Widdop B., Watts, J. (2011). *Clarke's analysis of drugs and poisons*. London: Pharmaceutical Press.
7. Schulz, M., Iwersen-Bergmann, S., Andersen, H., Schmoldt, A. (2012). Therapeutic and toxic blood concentrations of nearly 1,000 drugs and other xenobiotics. *Critical Care*, 16, R136.

Corresponding author

Dr hab. Piotr Adamowicz
Instytut Ekspertyz Sądowych
ul. Westerplatte 9
PL 31-033 Kraków
e-mail: padamowicz@ies.gov.pl

3-FLUOROFENMETRAZYNA – NOWA SUBSTANCJA PSYCHOAKTYWNA NA POLSKIM RYNKU NARKOTYKOWYM

1. Wprowadzenie

3-fluorofenmetrazyna (3-FPM; 3F-fenmetrazyna; PAL-593; IUPAC: 2-(3-fluorofenilo)-3-metylmorfolina) jest fluorowaną pochodną fenmetrazyny (rysunek 1), która w ostatnim czasie zdobywa coraz większą popularność jako nowa substancja psychoaktywna (NSP). Fenmetrazyna (składnik leku Preludin) była szeroko stosowana w farmakoterapii otyłości od lat 50. ubiegłego wieku. Efekty uboczne takie, jak m.in. pobudzenie i niepokój, a także nadużywanie tej substancji w latach 60. i 70. jako zamiennika amfetaminy przez osoby wprowadzające się w stan odurzenia, doprowadziło do wycofania jej ze sprzedaży. Patent opisujący metody syntez oraz potencjalne lecznicze zastosowania 3-FPM i innych analogów fenylo-morfoliny został opublikowany w 2013 roku (Blough, Rothman, Landavazo, Page, Decker, 2013). Tego typu patenty są cennym źródłem informacji dla producentów nowych narkotyków. 3-FPM została po raz pierwszy wykryta na rynku narkotykowym we wrześniu 2014 roku na Węgrzech. W tym samym roku zidentyfikowano ją jeszcze w Wielkiej Brytanii i Szwecji, a w kolejnym roku we Francji, Słowenii, Danii, Litwie, Chorwacji, Hiszpanii, Niemczech, Norwegii, Czechach i Rumunii. 3-FPM jest kontrolowane w kilku krajach, m.in. w Szwecji, Wielkiej Brytanii, Szwajcarii, Węgrzech, Finlandii i Estonii¹.

3-FPM jest najczęściej sprzedawana w formie proszku lub kryształów, a czasem także w postaci pigułek. Substancja ta jest wciągana przez nos, ale ze względu na uczucie pieczenia, niektórzy użytkownicy preferują przyjmowanie doustne. Może być także przyjmowana dożylnie lub palona. Dawki progowe 3-FPM opisywane przez użytkowników wynoszą od 5 do 10 mg, najczęściej wymieniane mieszczą się w zakresie od 25 do 50 mg, a jako wysokie są określane na poziomie 70 mg. Psychoaktywne efekty są krótkotrwałe, co sprawia, że powtarzanie dawek jest często praktykowane, prowadząc do przyjęcia do 500 mg w ciągu jednej sesji. Powtarzanie dawek przez kilka dni może prowadzić do przyjęcia doustnie nawet 3500 mg 3-FPM. Tolerancja na ten związek rozwija się szybko, ale zanika po 1–2 tygodniach od zaprzestania stosowania. Działanie 3-FPM rozpoczyna się po 10–25 min, najsilniejsze efekty występują do 2 h, a kończą się po około 3–8 h od podania^{2,3} (Bäckberg, Westerbergh, Beck, Helander, 2016). W kontrolowanych ba-

daniach po przyjęciu jednorazowej dawki 100 mg efekty działania były odczuwalne do około 5 h (Grumann, Huppertz, Angerer, Auwärter, 2016).

Objawy działania wywoływane przez 3-FPM są zbliżone do wywoływanych przez fenmetrazynę, która powoduje zwiększenie uwalniania dopaminy i noradrenaliny. Do efektów wywoływanych przez 3-FPM, opisywanych przez użytkowników na forach internetowych, należy zaliczyć euforię, pobudzenie, empatię, podwyższone libido, poprawę koncentracji i nastroju, zwiększenie motywacji i energii, gadatliwość, bezsensowność oraz odmienną percepcję muzyki. Do negatywnych efektów obserwowanych po przyjęciu 3-FPM należą zwiększony niepokój, potliwość oraz szczękocisk i bruksizm. W porównaniu do tradycyjnych stymulantów (np. amfetaminy, MDMA i kokainy) działanie 3-FPM jest określane jako znacznie słabsze i subtelniejsze. 3-FPM tylko nieznacznie obniża łaknienie i przyspiesza akcję serca. Efekty, które występują podczas tzw. zejścia (co należy rozumieć jako czas po zakończeniu oczekiwanego działania) są określane jako nieprzyjemne i zazwyczaj obejmują lęki, zmęczenie, depresję i rozdrażnienie. Pojawiają się one po 9–72 h od przyjęcia ostatniej dawki i mogą się utrzymywać przez okres do tygodnia. W celu zniesienia tych objawów użytkownicy często przyjmują pochodne benzodiazepiny (np. etizolam)^{4,5,6}.

Bäckberg, Westerbergh, Beck i Helander (2016) opisali szereg klinicznych objawów zaobserwowanych u użytkowników 3-FPM, m.in. tachykardię (≥ 100 uderzeń na minutę), obniżony poziom świadomości, pobudzenie, niepokój, delirium, rozszerzone źrenice. Rzadziej obserwowano drgawki, nadciśnienie (≥ 140 mmHg), hipotensję (≤ 90 mmHg), niewydolność oddechową i rhabdomyolizę. Należy jednak zauważyć, że u wszystkich badanych wykazano nie tylko 3-FPM, ale również inne substancje (inne NSP, konwencjonalne narkotyki i leki), z których najpopularniejsze były środki lecznicze z grupy pochodnych benzodiazepiny (Bäckberg, Westerbergh, Beck, Helander, 2016).

Celem niniejszej pracy było przedstawienie metody oznaczania 3-FPM we krwi oraz opis pierwszego w Polsce przypadku, w którym wykazano obecność tej substancji w materiale biologicznym.

¹ European Database on New Drugs (EDND). <https://ednd.emcdda.europa.eu/>

² Erowid Experience Vaults. <https://www.erowid.org/>

³ Drugs-forum. <https://drugs-forum.com/>

⁴ Erowid Experience Vaults. <https://www.erowid.org/>

⁵ Drugs-forum. <https://drugs-forum.com/>

⁶ 3-FPM – Psychonautwiki. <https://psychonautwiki.org/wiki/3-FPM>

2. Opis przypadku

20-letni mężczyzna, kierując samochodem, około północy wjechał do rowu na poboczu jezdni. Pojazd ugrzązł w błocie, natomiast kierowca i pasażer nie ponieśli żadnych obrażeń. Około godziny 0:50 na miejsce zdarzenia przyjechał patrol policyjny. W związku z podejrzeniem, że kierujący może być pod działaniem środków odurzających, dokonano przeszukania kierowcy, u którego ujawniono 24 woreczki z zapieczętowanym z zawartością białego proszku. Kierowca przyznał się także do przyjęcia białego proszku w godzinach wieczornych dnia poprzedniego. Krew do badań pobrano o godzinie 2:50. Lekarz pobierający krew, nie odnotował w protokole pobrania krwi żadnych odstępstw od normy, niemniej zaznaczył, że badany może być pod wpływem substancji odurzających lub psychotropowych.

3. Metody

3.1. Materiały i odczynniki

3-FPM i mefedron- D_3 zakupiono w firmie LGC Standards (Dziekanów Leśny, Polska). Acetonitryl (MeCN), chlorek n-butylu i kwas mrówkowy (98–100%) pochodziły z firmy Merck (Warszawa, Polska). Kwas solny (35–39%) zakupiono w firmie POCH S.A. (Gliwice, Polska). Testy immunoenzymatyczne firmy Neogen zakupiono w firmie STI (Poznań, Polska).

Próby krwi kontrolnej (wolnej od analitów) stosowane do opracowania i walidacji metody pochodziły ze stacji krwiodawstwa. Badania przesiewowe tej krwi nie ujawniły obecności środków odurzających, w tym 3-FPM i innych NSP objętych zastosowaną procedurą analityczną. Materiał biologiczny przechowywano w temperaturze -20°C .

3.2. Analizy przesiewowe

Krew badano na obecność środków odurzających i substancji psychotropowych z grup amfetamin, benzodiazepin, kannabinoli, opioidów i kokainy. Badania te wykonano metodą immunoenzymosorbcyjną (ELISA) z zastosowaniem testów firmy Neogen. W wyniku analiz uzyskano dodatni odczyt dla pochodnych amfetaminy, niemniej analiza ukierunkowana krwi przeprowadzona metodą chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrią mas (LC-MS) nie ujawniła obecności amfetaminy i jej popularnych pochodnych (w tym metamfetaminy i MDMA). Badania przesiewowe w kierunku NSP prowadzono wcześniej opublikowaną metodą (Adamowicz, Tokarczyk, 2016). W wyniku tych analiz we krwi wykazano obecność 3-FPM.

3.3. Oznaczanie 3-FPM

3.3.1. Przygotowanie próbek do badań

Do prób krwi (0,2 ml) umieszczonych we fiolkach Eppendorfa dodawano jako wzorzec wewnętrzny (IS) mefedron- D_3 , aby osiągnąć stężenie 100 ng/ml. Następnie do krwi dodawano 200 μl 0,5 M buforu węglanowego (pH 12) oraz 1 ml chlorku n-butylu. Próby wytrząsano przez 30 s, a następnie wirowano przez 5 min przy 13 000 rpm ($15,682 \times g$), po czym fazę organiczną (800 μl) przenoszono do kolejnych fiolek Eppendorfa. Po dodaniu do tych fiolek po 100 μl 0,025 M HCl, fazę organiczną odparowywano w temperaturze 37°C przez 10–15 min. Pozostałą we fiolkach fazę wodną (kwas) mieszano na wstrząsarce (około 10 s), a następnie przenoszono do fiolek do automatycznego podajnika próbek.

Wyniki pierwszych analiz wskazywały bardzo wysokie stężenie 3-FPM w dowodowej krwi, dlatego kolejne próbki zostały pięciokrotnie rozcieńczone krwią kontrolną, aby wyniki oznaczeń znajdowały się w zakresie krzywej kalibracyjnej.

3.3.2. Aparatura i warunki analizy

Do oznaczeń metodą chromatografii cieczowej połączonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS) zastosowano chromatograf cieczowy serii 1200 połączony ze spektrometrem mas 6460 Triple Quad firmy Agilent Technologies. Aparat pracował w trybie jonizacji pozytywnej (+ESI). Rozdział prowadzono na kolumnie Zorbax SB-C18 (2,1 \times 50 mm, 1,8 μm) firmy Agilent Technologies. Fazę ruchomą, przepływającą przez kolumnę z szybkością 0,3 ml/min, stanowiła mieszanina 0,1% kwasu mrówkowego w acetonitrylu i wodzie (v/v). Zastosowano następujący program gradientowy (w odniesieniu do zawartości MeCN): 0 min – 10%, 6 min – 100%, 7 min – 10%, 14 min – 10%. Całkowity czas analizy wynosił 14 min. Czas retencji 3-FPM wynosił 2,8 min (względny czas retencji 0,875). Monitorowano wybrane przejścia (MRM) jonów (m/z) jako stosowane w analizie potwierdzającej oraz ilościowej (podkreślone): 196,1 \rightarrow 109,1 (przy energii kolizji 24 V), 196,1 \rightarrow 115,1 (32 V), 196,1 \rightarrow 133,1 (32 V) i 196,1 \rightarrow 135,1 (20 V) dla 3-FPM oraz 181,1 \rightarrow 148,1 (20 V) i 181,1 \rightarrow 163,1 (8 V) dla mefedronu- D_3 . Napięcie fragmentora wynosiło 25 V dla 3-FPM i 87 V dla mefedronu- D_3 , natomiast napięcie przyspieszenia w komorze kolizyjnej 7 V dla obu związków. Pozostałe parametry detektora masowego były następujące: napięcie kapilary 3000 V, przepływ gazu (azotu) 11 l/min, temperatura gazu 325 $^{\circ}\text{C}$, przepływ gazu osłonowego 10 l/min, temperatura gazu osłonowego 325 $^{\circ}\text{C}$, ciśnienie rozpylacza 40 psi, czas monitorowania jednej pary MRM 75 ms. Zbieranie i analizę danych prowadzono za pomocą oprogramowania MassHunter firmy Agilent Technologies (wersja B.04.01).

3.3.3. Walidacja metody

Walidacja metody oznaczania 3-FPM we krwi obejmowała m.in. określenie granicy detekcji (*LOD*), granicy oznaczalności (*LOQ*), zakresu liniowości, precyzji, dokładności, odzysku i efektu matrycy (*ME*). Ośmiopunktowa krzywa kalibracyjna została przygotowana dla krwi w zakresie stężeń 5–1000 ng/ml. *LOD* została obliczona przy zastosowaniu oprogramowania MassHunter dla stężenia wywołującego sygnał detektora (*S*) trzykrotnie większy niż wysokość szumów (*N*), czyli dla $S/N = 3$, dla najmniej intensywnego przejścia *MRM* (m/z 196,1→133,1). Jako *LOQ* przyjęto najniższy punkt krzywej kalibracyjnej. Specyficzność metody określono, analizując próby krwi od pięciu osób nieprzyjmujących 3-FPM, a także próby krwi pochodzące z autentycznych ekspertyz, w których wykazano inne substancje, w tym NSP. Wydajność ekstrakcji obliczono przy stężeniu 100 ng/ml poprzez porównanie sygnału (pole powierzchni analitu/pole powierzchni IS) 3-FPM ekstrahowanego z krwi z sygnałem pochodzącym od 3-FPM dodanego do uprzednio przeekstrahowanej krwi. *ME* przy stężeniu 100 ng/ml obliczono poprzez porównanie sygnałów nieekstrahowanego 3-FPM (zestaw A) z pochodzącym od dodanego do uprzednio przeekstrahowanej krwi 3-FPM (zestaw B). Do obliczeń zastosowano następujący wzór $ME [\%] = B/A \times 100$. Precyzja i dokładność oznaczeń w ciągu dnia oraz między dniami obliczono dla stężenia 100 ng/ml, a pomiary prowadzono przez trzy kolejne dni.

4. Wyniki

Metoda oznaczania 3-FPM we krwi została zwalidowana. Krzywa kalibracyjna była liniowa w całym zakresie (5–1000 ng/ml), a współczynnik determinacji R^2 wyniósł 0,9996. *LOD* wynosiła 0,7 ng/ml, a *LOQ* było równe 5 ng/ml. Metoda była selektywna; nie zaobserwowano żadnych interferencji. Wydajność ekstrakcji wynosiła 92,4%, natomiast efekt matrycy 51,6%. Wyznaczone wartości precyzji nie przekraczały 6,8%, a dokładności 9,5% (błąd względny).

Wykazane w badanej krwi stężenie 3-FPM wynosiło 2,77 µg/ml. Chromatogramy *MRM* jonów dla 3-FPM i mefedronu- D_3 uzyskane dla badanej krwi przedstawiono na rysunku 2. Przeprowadzone analizy nie ujawniły we krwi żadnych innych substancji (w tym klasycznych narkotyków i innych NSP).

5. Dyskusja

3-FPM jest nową substancją psychoaktywną obecną na rynku narkotykowym od niedawna. Po raz pierwszy została wykryta w Europie pod koniec 2014 roku,

a w Polsce jest obecna od 2015 roku. Dane te są zgodne z zainteresowaniem tą substancją (liczba wyszukiwań przez stronę Google), które można zaobserwować w internecie (rysunek 3), a w szczególności na forach internetowych poświęconych substancjom psychoaktywnym⁷.

Pod koniec lutego 2016 roku odnotowano w Instytucie Ekspertyz Sądowych pierwszy przypadek wykrycia 3-FPM w materiale biologicznym. Związek ten był obecny w próbce krwi pobranej od kierowcy, który spowodował kolizję drogową. Badania przesiewowe krwi przeprowadzono metodą immunoenzymosorbcyjną ELISA. Do analiz stosowano testy do wykrywania amfetamin, MDMA, opiatów, kokainy, pochodnych benzodiazepiny i kannabinoli. Wynik uzyskany dla pochodnych amfetaminy wymagał weryfikacji metodą specyficzną. Analizy ukierunkowane wykonane metodą LC-MS nie ujawniły jednak najczęściej przyjmowanych pochodnych amfetaminy. Analiza przesiewowa w kierunku NSP wykazała obecność 3-FPM. W wyniku przeprowadzonych analiz ukierunkowanych stwierdzono we krwi 3-FPM w stężeniu 2,77 µg/ml.

Jak dotychczas opublikowano jedną pracę (Bäckberg, Westerbergh, Beck, Helander, 2016), w której opisano stężenia 3-FPM w materiale biologicznym. Wykazane w surowicy 15 osób stężenia 3-FPM mieściły się w zakresie od 2,7 do 1416 ng/ml (średnia 303 ng/ml, mediana 77 ng/ml), a więc były niższe niż we krwi kierowcy z omawianego przypadku. W 14 próbach moczu z powyższej publikacji stężenia 3-FPM wynosiły 8,2–30 857 ng/ml (średnia 7431 ng/ml, mediana 1867 ng/ml). Grumann, Huppertz, Angerer i Auwärter (2016) zaprezentowali wyniki badań farmakokinetycznych uzyskane po podaniu mężczyźnie (45 lat, 73 kg) jednorazowej dawki (100 mg) 3-FPM. Maksymalne stężenie wynoszące 210 ng/ml zaobserwowano po 2,5 godzinach od podania. 3-FPM wykrywano w surowicy, moczu i ślinie odpowiednio przez 60, 260 i 55 godzin.

Uzyskany wynik można jednak porównać do stężeń fenmetrazyny. Dawki tego związku są zbliżone (12–75 mg), a biologiczne okresy półtrwania identyczne, wynoszące 8,5 godziny (Baselt, 2014; Grumann, Huppertz, Angerer, Auwärter, 2016). Zakres stężeń terapeutycznych fenmetrazyny określany jest na 0,02–0,25 µg/ml surowicy. Jako stężenia toksyczne uznawane są wyższe niż 0,5 µg/ml, natomiast spotykane w przypadkach śmiertelnych przekraczają 4 µg/ml (Moffat, Osselton, Widdop, Watts, 2011; Schulz, Iwersen-Bergmann, Andersen, Schmoldt, 2012). Przyjęcie tego związku w dawce 75 mg przez 5 osób skutkowało stężeniami w osoczu w zakresie 51–238 ng/ml (średnia 140 ng/ml) obserwowanymi po dwóch godzinach, które obniżały się do średnio 102 ng/ml po pięciu godzinach i 54 ng/ml po 12 godzinach. Z kolei u siedmiu kierowców wykazano fenmetrazynę we krwi w stężeniach 0,5–4,0 µg/ml i w moczu

⁷ Google Trends. <https://www.google.com/trends>

w stężeniach 56–290 µg/ml. Podobne stężenia wykazywano w przypadkach śmiertelnych: 0,1–4,9 µg/ml we krwi i 0,1–90 µg/ml w moczu (Baselt, 2014).

W ramach niniejszych badań wykonano także analizy metodą ELISA mające na celu sprawdzenie ewentualnego występowania reakcji krzyżowych przeciwciał dla amfetaminy z 3-FPM. Wyniki uzyskane dla amfetaminy w dowodowej próbie krwi oraz kontrolnych z dodatkiem 3-FPM (w stężeniu 25, 100, 1000 i 2500 ng/ml) i amfetaminy (w stężeniu 25 ng/ml) przedstawiono w tabeli 1. Na uzyskanych odczytach można zauważyć istotne zmiany absorbancji dla próbek krwi z dodatkiem 3-FPM. Zgodnie z stosowanymi procedurami, jako wynik dodatni w zastosowanej metodzie immunoenzymosorpcyjnej uznaje się wynik mniejszy lub równy wartości absorbancji dla kontroli pozytywnej, jak również wynik mniejszy lub równy połowie absorbancji dla kontroli negatywnej. Biorąc pod uwagę omawiany przypadek i dane zamieszczone w tabeli, jako pozytywne wyniki zakwalifikowano by takie, których wartości byłyby mniejsze od 0,840. Przyjmując, że test ELISA jest stosowany rutynowo w poszukiwaniu pochodnych amfetaminy, to zapewne stężenia 3-FPM we krwi na poziomie około 0,4–0,5 µg/ml skutkowałyby pozytywnym odczytem. Należy więc stwierdzić, że przy zastosowaniu standardowych testów (firmy Neogen) używanych podczas analizy przesiewowej na obecność pochodnych amfetaminy jest możliwe wykrycie 3-FPM. Niemniej stwierdzenie to odnosi się do przypadków wyższych stężeń 3-FPM, biorąc pod uwagę, że wśród 15 przypadków analizowanych przez Bäckberga i innych (Bäckberg, Westerbergh, Beck, Helander, 2016), tylko w pięciu wyznaczone stężenia były wyższe niż 0,4 µg/ml. Podsumowując, w przypadku uzyskania dodatniego odczytu w kierunku pochodnych amfetaminy przy zastosowaniu testów ELISA i przy ujemnym wyniku analizy wykonanej metodą specyficzną na obecność amfetaminy i jej najpopularniejszych pochodnych, wydaje się celowe przeprowadzenie badań przesiewowych w kierunku NSP, w tym 3-FPM.

może być rozpatrywana jako substancja potencjalnie niebezpieczna dla bezpieczeństwa ruchu drogowego.

6. Wnioski

W artykule omówiono pierwszy na terenie Polski przypadek, w którym wykazano obecność 3-FPM we krwi. Opracowana metoda oznaczania 3-FPM została z powodzeniem zastosowana w przedmiotowej analizie. Wykazane we krwi kierowcy stężenie 3-FPM wynosiło 2,77 µg/ml. Przesiewowa metoda immunoenzymosorpcyjna ELISA stosowana w rutynowych badaniach w kierunku pochodnych amfetaminy umożliwia wykrycie 3-FPM. Pomimo braku jednoznacznych objawów u badanego, przedstawiony przypadek oraz ostatnie doniesienia zawarte w literaturze przedmiotu sugerują, że 3-FPM