

## **DETERMINATION OF N-ETHYLHEXEDRONE, A NEW CATHINONE DERIVATIVE, IN BLOOD COLLECTED FROM DRIVERS – ANALYSIS OF THREE CASES**

Anna MIKOŁAJCZYK, Piotr ADAMOWICZ, Bogdan TOKARCZYK, Karolina SEKUŁA, Joanna GIEROŃ, Wioleta WRZESIEN, Roman STANASZEK

*Institute of Forensic Research, Kraków, Poland*

### **Abstract**

N-ethylhexedrone (HEX-EN) is a synthetic cathinone, a hexedrone derivative, which is structurally close to other popular cathinones such as pentedrone and  $\alpha$ -pyrrolidinohexiophenone ( $\alpha$ -PHP). This substance appeared in Europe in October 2015, and it was detected in biological material for the first time at the Institute of Forensic Research in Krakow at the beginning of 2017. The article presents three cases in which the presence of N-ethylhexedrone in the blood of drivers was revealed. The use of liquid chromatography-mass spectrometry with different mass analyzers and in-depth analysis of mass spectra enabled the detection and identification of this compound, which was not covered by previously applied screening method. Liquid-liquid extraction was used for the isolation of N-ethylhexedrone from blood samples. The developed liquid chromatography-linear ion trap-mass spectrometry (LC-LIT-MS) method was successfully applied in the determination of N-ethylhexedrone. Blood concentrations of this compound ranged from 8 to 37 ng/ml. Despite the lack of clear symptoms in the reported driving cases, the N-ethylhexedrone effects reported on the Internet forums suggest that driving under the influence of this substance should be treated as a potential threat to traffic safety.

### **Key words**

N-ethylhexedrone; HEX-EN; New psychoactive substance; LC-MS; Blood sample analysis.

*Received 11 July 2017; accepted 11 August 2017*

### **1. Introduction**

N-ethylhexedrone (2-(ethylamino)-1-phenylhexan-1-one;  $\alpha$ -ethylaminohexanophenone) is a synthetic cathinone, a derivative of hexedrone, in which the methyl group attached to the nitrogen atom is substituted by an ethyl group (Fig. 1). Structurally it is similar to pentedrone, and also  $\alpha$ -pyrrolidinohexiophenone ( $\alpha$ -PHP), from which it differs by the substitution of a pyrrolidine group with an N-ethyl group. It is most commonly referred to as HEX-EN, Ethyl-Hex and NEH by users (internationally), as well as Henio and Henryk by Polish users. N-ethylhexedrone was described for the first time in 1964 together with other

derivatives of aminoketone in a patent by Boehringer Ingelheim (Patent: GB1069797, 1964). This substance appeared in Europe in October 2015 and was frequently detected in the following year (EMCDDA). Its presence in Poland was probably a response to the amendment of the Act of 29 July 2005 on Counteracting Drug Addiction (Journal of Laws 2005 No. 179 item 1485, with later amendments), which entered into force on 1 July 2015. On that date, another 114 new psychoactive substances (NPS) were placed on schedules of controlled substances, amongst them popular cathinones –  $\alpha$ -PVP and pentedrone, as well as hexedrone. NPS that are encompassed by legal control are immediately replaced by their new, uncontrolled de-

rivatives, and that is probably why N-ethylhexedrone – which has recently gained substantial popularity in Poland – came onto the Polish market. This compound is currently on the list of controlled substances in Hungary, and in Denmark and Lithuania it is covered by a generic law (EMCDDA).

N-ethylhexedrone is sold as a so-called research chemical in the form of white, grey or yellow powder (viscous powder) or very fine crystals (needles). It is odourless or has a characteristic, unpleasant smell, tasteless or – contrarily – has an unpleasant, chemical and bitter aftertaste. This substance is most often drawn in through the nose (*sniff*) or inhaled (vaporization). It can also be administered orally, rectally, intravenously, smoked in the form of so-called *maczan-ka* (sop) or in e-cigarettes. Another way of taking it is by *hot rails*, i.e., inhaling through the nose through a heated glass tube. The strongest action is achieved by inhaling (insufflating) through the nose, whilst inhaling vapours results in weaker and shorter effects. The threshold doses of N-ethylhexedrone described on internet forums by users are in the range of 10–20 mg; low doses: 30–40 mg; typical doses: 50–60 mg; high doses: 70–90 mg; and very high doses are described at the level of 100–150 mg, and even 250 mg. Psychotropic effects are short-lived, which makes repetition of doses – about every 1–3 hours – very popular, leading to administration of up to 350 mg in the course of one session. The effect of N-ethylhexedrone begins just 2 minutes after intranasal administration, and the strongest effects are observed after about 20–25 min, last up to 2–3 hours, and finish after about 4–8 hours. After oral administration, action of the drug begins after about 20–25 min, and the strongest effects are observed after about 50–60 minutes. N-ethylhexedrone is sometimes combined with other NPS (<https://hyperreal.info>). This substance primarily acts on dopamine receptors, and the effects that it engenders are sometimes compared by users to those occurring after cocaine. The effect is most similar to, but somewhat weaker than that induced by  $\alpha$ -PVP, but stronger than

that engendered by pentedrone, MDPHP (3,4-methylenedioxy- $\alpha$ -pyrrolidinohexanophenone), hexedrone and N-ethylbuphedrone (NEB). The effects mentioned below are taken from online forums and it should be borne in mind that NPS sellers and users cannot always be certain as to the type of substances that are being sold and consumed. For example, 4-fluoropent-edrone (4-FPD) was present in some preparations sold in Poland and labelled as HEX-EN (<https://sin.org.pl>). The effects caused by N-ethylhexedrone – described by users on internet forums – include the following: euphoria, stimulation, empathy and enhanced sense of well-being; these are especially intense for the first half hour. There is also increased talkativeness, sociability, insomnia, increased creativity, increased libido, increased concentration, thought acceleration, sensory enhancement and altered perception of music. The eyeballs are vitreous (glassy), and the pupils may be slightly dilated. The negative effects include paranoia, trembling hands, convulsions, chest pains, tachycardia, dysrhythmia, fluctuations in blood pressure, elevated (blood) pressure, hypopnea (overly shallow breathing), limb numbness, circulatory problems in the extremities, vasoconstriction, elevated temperature, sweating, dry mouth, lack of appetite, visual disturbances, involuntary mouth movements, bruxism (teeth grinding) and problems with expressing oneself. These effects occur more frequently after large doses (above 150–200 mg). The effects that occur during the so-called “comedown” are described as unpleasant, and usually include strong feelings of fatigue and discouragement, dejection, depressive states, anxiety, irritability, insomnia, delusions, auditory and visual hallucinations. These effects persist for up to about 12 hours after the last dose. In order to get rid of these symptoms, users often take benzodiazepine derivatives, e.g., etizolam, which is not legally controlled (<https://hyperreal.info>).

The purpose of this paper is to present methods of detection and determination of N-ethylhexedrone in blood and to present cases in which the presence of

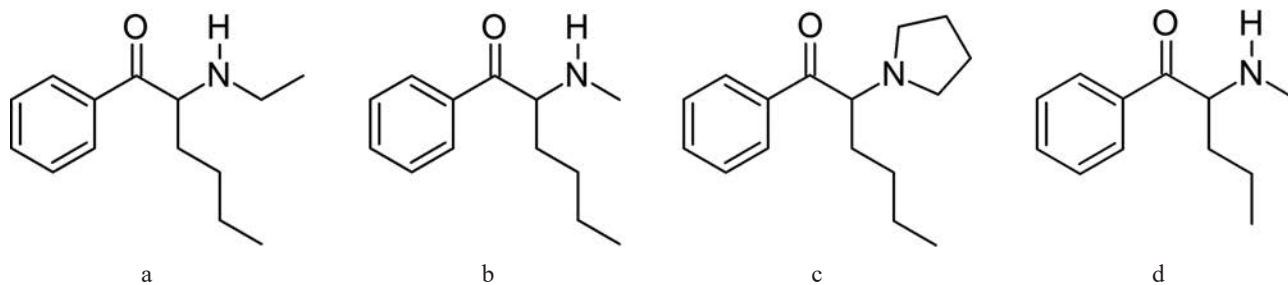


Fig. 1. Chemical structure of N-ethylhexedrone (a), hexedrone (b),  $\alpha$ -PHP (c) and pentedrone (d).

this substance in the blood of drivers has been demonstrated.

## 2. Case descriptions

### 2.1. Case 1

A 25-year-old man driving a car did not stop for a road check. After a brief chase, he was stopped. This took place at about 4:50 p.m. Police officers noticed unnatural behaviour on the part of the driver, who was stimulated, cheerful and had blurred speech. A breathalyser test for alcohol was negative. The driver admitted to having taken mephedrone. As a result of searching the car, two ziplock bags containing white powder were revealed. Blood specimens were collected for analysis from the driver at 5:10 p.m. due to suspicion of driving under the influence of intoxicating drugs. The medical doctor collecting the blood did not note down anything unusual in the blood collection record (clear speech, steady gait, normal pupils, and normal pupillary reaction to light; Romberg's test and finger-nose test negative).

### 2.2. Case 2

A 27-year-old man was involved in a road accident. The man died as a result of injuries.

### 2.3. Case 3

An 18-year-old man was suspected of driving a vehicle under the influence of intoxicating substances.

## 3. Methods

### 3.1. Materials and reagents

*N*-ethylhexedrone was purchased from Cayman Chemical Company, and MDMA-D<sub>5</sub> from LGC Standards (Dziekanów Leśny, Poland). Acetonitrile, *n*-butyl chloride and formic acid (98–100%) were purchased from Merck (Warsaw, Poland), and hydrochloric acid (35–39%) from POCH S.A. (Gliwice, Poland), whereas ammonium formate was purchased from Sigma-Aldrich (Poznań, Poland).

Analyte-free blood used for developing and validating the method originated from a blood donation station. Screening of this blood did not reveal the presence of drugs, including *N*-ethylhexedrone and other NPS encompassed by the applied analytical procedure.

The biological material was stored at a temperature of -20°C up to the time of analysis.

### 3.2. Screening Analyses

#### 3.2.1. Routine screening analysis by the ELISA method

Blood was tested for the presence of narcotic drugs and psychotropic substances from the following groups: amphetamines, benzodiazepines, cannabinoids, opioids and cocaine. These tests were performed by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using Neogen tests.

#### 3.2.2. Blood analyses for the presence of NPS by the LC-QqQ-MS method

Screening for a broad group of NPS was carried out by the previously published LC-QqQ-MS method (Adamowicz, Tokarczyk, 2016).

#### 3.2.3. Screening by the LC-QTOF-MS method

Blood analysis was also performed by the method of liquid chromatography-hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF-MS) using a 1200 series chromatograph and 6520 Accurate-Mass QTOFMS (detector) by Agilent Technologies (Santa Clara, CA). Separation was carried out on an Ascentis Express C18 column (7.5 cm x 2.1 mm; 2.7 μm) by Supelco thermostatically controlled at 35°C. The mobile phase flowing through the column in a phase composition gradient system at a rate of 0.3 ml/min was a mixture of 0.1% formic acid in water (A, v/v) and acetonitrile (B, v/v). The following gradient programme was used (in relation to component B): 0 min – 5%, 11 min – 33%, 15 min – 37%, 15.2 min – 5%, 21 min – 5%. The ionisation method applied was electrospray ionisation with positive ion monitoring. Nitrogen at a temperature of 300°C and a flow rate of 10 l/min was used as a drying gas and as a nebulizing gas at 45 psi. The capillary voltage was 3000 V, and that of the skimmer 65 V. The quadrupole worked in two modes: MS and MS/MS with a tolerance of the *m/z* value of the selected ion of  $\Delta m/z = 1.3$ . The fragmentor voltage was 100 V, and the collision energy – 15 eV. In order to minimize the mass determination error, in the course of analysis, spectra were automatically corrected by measurement of a reference mixture containing two compounds: purine ( $[M+H]^+ = 121.0509$  Da) and HP-921 – hexakis(1H,1H,3H-tetrafluoropropoxy)phosphazine ( $[M+H]^+ = 922.0098$  Da). Data acquisition and

analysis were carried out using MassHunter software from Agilent Technologies (version B.06.00).

### 3.3. Determination of N-ethylhexedrone by LC-LIT-MS

#### 3.3.1. Preparation of samples for analyses

MDMA-D<sub>5</sub> was added as an internal standard (IS) to samples of blood (0.2 ml) in Eppendorf vials, in order to obtain a concentration of 100 ng/ml. Then, 200  $\mu$ l 0.5 M carbonate buffer (pH 12) and 1 ml n-butyl chloride were added. The samples were shaken for 30 s, and then centrifuged for 5 min at 13 000 rpm (15.682 x g), and then the organic phase (800  $\mu$ l) was transferred to successive Eppendorf vials. After adding 100  $\mu$ l 0.025 M HCl to these vials, the organic phase was evaporated at a temperature of 37°C (for 10–15 min). The water phase remaining in the vials was mixed on a vortex (about 10 s), and then transferred to inserts for autosampler vials.

#### 3.3.2. Apparatus and conditions of analysis

Determinations were carried out by the liquid chromatography-quadrupole linear ion trap mass spectrometry method (LC-LIT-MS) using an Eksigent UltraLC 110 liquid chromatograph coupled with a SCIEX 3200 QTRAP mass spectrometer. The instrument worked in positive ionisation mode (+ESI) using conditional data acquisition (MRM + EPI; Enhanced Product Ion). Chromatographic separation was carried out on a Kinetex 2.6  $\mu$ m C18 column (100 x 4.6 mm) produced by Phenomenex. The mobile phase, flowing through the column at a rate of 0.5 ml/min, was a solution of ammonium formate (1%, v/v) in water (phase A) and a mixture of methanol : acetonitrile (1:1, phase B). The following gradient programme was used (in relation to phase B content): 0 min – 2%, 1 min – 2%, 10 min – 100%, 13 min – 100%, 13.06 min – 2%, 17 min – 2%. The total time of analysis was 17 minutes. N-ethylhexedrone retention time was 10.3 min (relative retention time 1.27). Selected fragmentation reactions were monitored (MRM), which were applied in quantitative analysis (underlined) and as confirmatory ions ( $m/z$ ): 220.3 $\rightarrow$ 91.2 (at collision energy 33 V), 220.3 $\rightarrow$ 130.2 (37 V), 220.3 $\rightarrow$ 146.3 (23 V) and 220.3 $\rightarrow$ 202.4 (19 V), for N-ethylhexedrone and 199 $\rightarrow$ 165 (20 V) for MDMA-D<sub>5</sub>. MRM transitions of N-ethylhexedrone were recorded with the following parameters: DP (declustering potential): 36 V, EP (entrance potential): 7.5 V, whilst for MDMA-D<sub>5</sub> these values were 40 V and 10 V, respectively. The remaining parameters

of the mass detector operating in MRM mode were as follows: source temperature: 650°C, source voltage: 5000 V, spray gas pressure: GS1 – 40 psi and GS2 – 70 psi, curtain gas pressure: 50 psi. The parameters of the mass detector working in ion trap mode were as follows: curtain gas pressure: 50 psi, DP 40 V, EP 10 V, CE (collision energy) 25  $\pm$ 10 V. The range of recorded masses was 50–400 ( $m/z$ ). Data collection and their qualitative analysis were carried out with the help of SCIEX Analyst 1.6.2 software. Quantitative analysis was performed using SCIEX MultiQuant™ 3.0 software. The developed method was linear in the tested range (5–200 ng/ml), and the determination coefficients R<sup>2</sup> defined for the calibration curves drawn up for all MRM transitions were in the range 0.9977–0.9997. Limits of detection (LOD) for particular MRM pairs were 0.08–0.15 ng/ml, and the limit of quantitation (LOQ) was 5 ng/ml.

## 4. Results

As a result of analyses of the studied blood samples carried out by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), positive readings were obtained for derivatives of amphetamine (or methamphetamine) in all three studied cases, but targeted analyses carried out by liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS) did not reveal the presence of amphetamine and its popular derivatives (including methamphetamine and MDMA).

Screening of the driver's blood from Case 1 targeted towards NPS by a previously published method (Adamowicz, Tokarczyk, 2016) did not reveal the presence of compounds encompassed by the applied procedure. However, as a result of these analyses, the presence of a substance was revealed, which was identified with the help of LC-QTOF-MS. This method is characterised by high accuracy of mass determination ( $\Delta m$ ), of the order of 2–5 ppm, depending on the mode of operation of the spectrometer. Thanks to readings taken in the MS mode at low fragmentor voltage, a protonated molecule (ion  $[M+H]^+$ ) with an  $m/z$  value of 220.1695 was observed on the spectrum. The mass of the studied compound was determined on this basis, i.e., 219.1622. This value is consistent with the molecular mass of N-ethylhexedrone, which is 219.1623 ( $\Delta m = -0.5$ ). The presence of N-ethylhexedrone was confirmed by analysis of a standard of this substance. Moreover, measurements were performed in MS mode at higher fragmentor voltage and in MS/MS mode using collision energy, during which it was confirmed that the way of fragmentation of the compound



in the studied sample was consistent with the way of fragmentation of *N*-ethylhexedrone. Blood analyses in Cases 2 and 3 were conducted after subjecting *N*-ethylhexedrone to screening method, and so its presence was demonstrated by the LC-QqQ-MS method.

Quantitative analyses of *N*-ethylhexedrone in blood were conducted by the LC-LIT-MS method, and the obtained results have been presented in Table 1. A chromatogram and mass spectrum of *N*-ethylhexedrone obtained by the LC-LIT-MS method in one of the discussed cases has been presented in Fig. 2.

Table 1  
Concentrations of *N*-ethylhexedrone and other drugs in blood determined in the described cases

|        | Compound   | Concentration [ng/mL] |
|--------|--|-----------------------|
| Case 1 | <i>N</i> -ethylhexedrone                         | 34                    |
| Case 2 | <i>N</i> -ethylhexedrone                         | 37                    |
|        | 3-fluorophenmetrazine                            | 9                     |
| Case 3 | <i>N</i> -ethylhexedrone                         | 8                     |
|        | $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol                 | 1.6                   |
|        | 11-Nor- $\Delta^9$ -carboxy-tetrahydrocannabinol | 8.7                   |

## 5. Discussion

*N*-ethylhexedrone is a new psychoactive substance present on the Polish drug market. At the beginning of 2017, the first cases of detection of this substance in biological material were noted at the Institute of Forensic Research. This compound was present in blood samples taken from vehicle drivers, including one who died in a road accident.

Identification of cathinones, due to their structural similarity, is rather problematic. Correct identification of a compound present in evidential material is extremely important, especially in the light of possible penalisation. The identification of mephedrone and its isomers can serve as an example (Zuba, Adamowicz, 2017). Nor is it a trivial matter in the case of *N*-ethylhexedrone. This substance can easily be confused with its isomer, i.e., *N*-ethyl-4'-methylnorpentedrone (4-MEAP), especially in cases where both substances are present in the studied material.

The presence of metabolites in the analysed biological material which may be easily confused with other compounds of a similar structure may constitute an additional problem that hinders identification. Assuming that *N*-ethylhexedrone is metabolized in a similar way

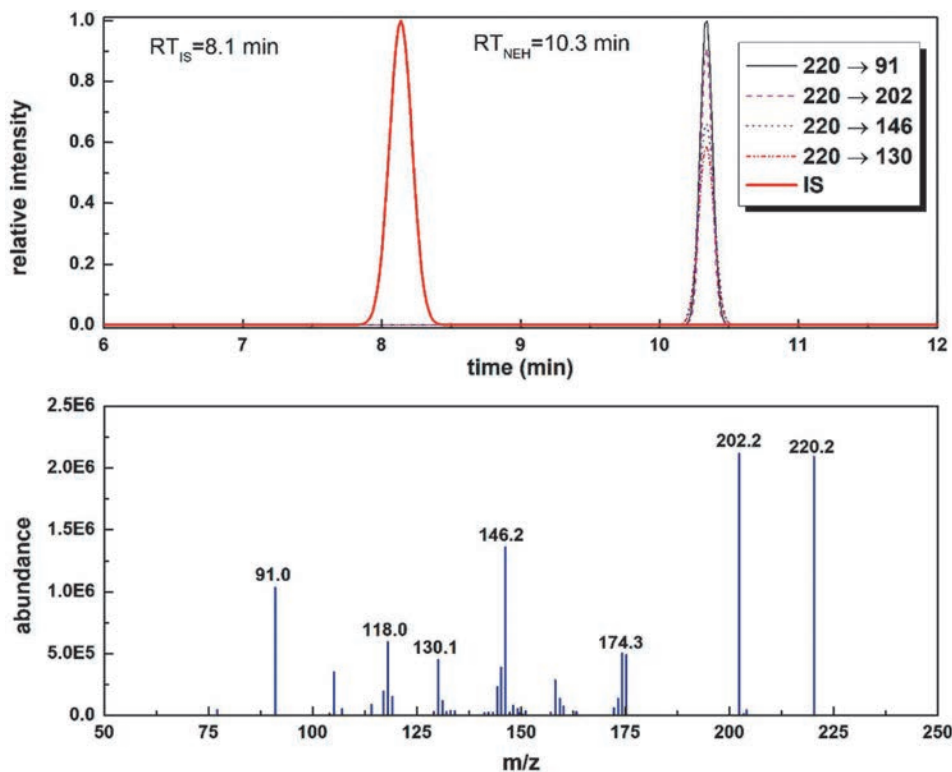


Fig. 2. MRM chromatograms of *N*-ethylhexedrone (NEH) and IS (MDMA- $D_5$ ), and mass spectra of *N*-ethylhexedrone in one of the analysed blood samples obtained by the LC-LIT-MS method.

to other cathinones (Helfer et al., 2015; Lewin, Seltzman, Carroll, Mascarella, Reddy, 2014), i.e., through N-dealkylation and/or reduction of the carbonyl group followed by N-dealkylation (Fig. 3), it can be predicted that some of its metabolites will be isomers of other cathinones present on the drug market. For example, the product of N-dealkylation of N-ethylhexedrone is an isomer of such compounds as: pentedrone, 4-ethylmethcathinone (4-EMC), 3-ethylmethcathinone (3-EMC), 3,4-dimethylmethcathinone (3,4-DMMC), NEB, or 4-methylbuphedrone (4-MeMABP).

That is another reason why the application of several analytical techniques (LC-QTOF-MS, LC-LIT-MS, LC-QqQ-MS, and GC-MS) as well as incisive analysis of mass spectra is advisable in the analytical process.

To date, no papers have been published discussing the concentration of N-ethylhexedrone in biological material. The concentrations of N-ethylhexedrone determined in blood samples originating from the three discussed cases were in the range from 8 to 37 ng/ml. The obtained results can be compared to concentrations of  $\alpha$ -PVP and pentedrone. The concentrations of  $\alpha$ -PVP and pentedrone in blood were in the ranges of 6.4–99 ng/ml and <1–216 ng/ml, respectively. The average concentrations of these compounds revealed in 28 and 7 drivers were 38.3 ng/ml and 36.0 ng/ml, respectively. In drivers who had taken  $\alpha$ -PVP in whom effects were observed that could be a threat to safe vehicle driving concentrations of this compound were in the range 8.2–68 ng/ml (Adamowicz et al., 2016; Adamowicz et al., 2016).

## 6. Conclusions

Three cases have been presented in the article in which the presence of N-ethylhexedrone was demonstrated in the blood of drivers. The developed LC-LIT-MS method for the determination of N-ethylhexedrone was successfully applied in analyses. The con-

centrations revealed in the blood samples were in the range of 8 to 37 ng/ml. In spite of a lack of clear-cut symptoms in the subjects, the presented cases and the effects engendered by N-ethylhexedrone described by users suggest that driving after taking this substance may potentially be a threat to road traffic safety.

## References

1. Adamowicz, P., Gieroń, J., Gil D., Lechowicz, W., Skulska, A., Tokarczyk, B. (2016). The prevalence of new psychoactive substances in biological material – a three-year review of casework in Poland. *Drug Testing and Analysis*, 8, 64–71.
2. Adamowicz, P., Gieroń, J., Gil, D., Lechowicz, W., Skulska, A., Tokarczyk, B., Zuba, D. (2016). Blood concentrations of  $\alpha$ -pyrrolidinovalerophenone ( $\alpha$ -PVP) determined in 66 forensic samples. *Forensic Toxicology*, 34, 227–234.
3. 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, 652–67.
4. EMCDDA. European Database on New Drugs (EDND). <https://ednd.emcdda.europa.eu/> (accessed 20 October 2017).
5. Helfer, A. G., Turcant, A., Boels, D., Ferec, S., Lelièvre, B., Welter, J., Meyer, M. R., Maurer, H. H. (2015). Elucidation of the metabolites of the novel psychoactive substance 4-methyl-N-ethyl-cathinone (4-MEC) in human urine and pooled liver microsomes by GC-MS and LC-HR-MS/MS techniques and of its detectability by GC-MS or LC-MS(n) standard screening approaches. *Drug Testing and Analysis*, 7(5), 368–375.
6. Lewin, A. H., Seltzman, H. H., Carroll, F. I., Mascarella, S. W., Reddy, P. A. (2014). Emergence and properties of spice and bath salts: a medicinal chemistry perspective. *Life Sciences*, 97(1), 9–19.
7. Patent: GB1069797, 1964 (1968). *Chemical Abstracts*, 68, # 95537w.

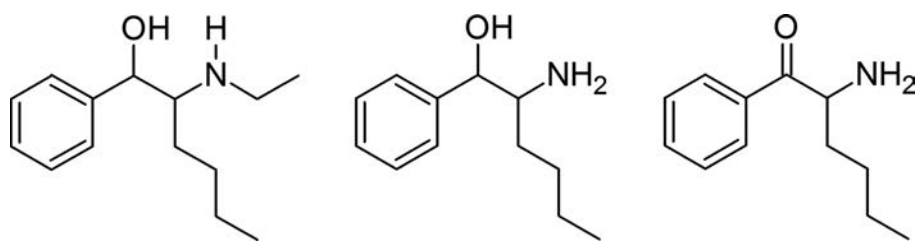


Fig. 3. Proposed structures of N-ethylhexedrone metabolites.

8. Zuba, D., Adamowicz, P. (2017). Distinction of constitutional isomers of mephedrone by chromatographic and spectrometric methods. *Australian Journal of Forensic Sciences*, 49(6), 637–649.
9. <https://hyperreal.info/> (accessed 20 October 2017).
10. <https://sin.org.pl/pl/wyszukiwarka-skladu-dopalaczy/> (accessed 20 October 2017).

---

**Corresponding author**

Dr hab. Piotr Adamowicz  
Institute of Forensic Research  
ul. Westerplatte 9  
PL 31-033 Kraków  
e-mail: padamowicz@ies.gov.pl

---

## OZNACZANIE N-ETYLOHEKSEDRONU, NOWEJ POCHODNEJ KATYNONU, WE KRWI POBRANEJ OD KIEROWCÓW – ANALIZA TRZECH PRZYPADKÓW

### 1. Wprowadzenie

N-etyloheksedron (2-(etyloamino)-1-fenylheksan-1-on;  $\alpha$ -etyloaminoheksanofenon) jest syntetycznym katynonem, pochodną heksedronu, w której grupa metylowa przy atomie azotu jest zastąpiona grupą etylową (rysunek 1). Strukturalnie jest zbliżony do pentedronu i  $\alpha$ -pirolidynoheksosofenonu ( $\alpha$ -PHP), od którego różni się podstawieniem grupy pirolidynowej grupą N-etylową. Przez użytkowników jest określany najczęściej jako HEX-EN oraz Ethyl-Hex, NEH, Henio i Henryk. N-etyloheksedron został po raz pierwszy opisany w 1964 roku wraz z innymi pochodnymi aminoketonu w patencie firmy Boehringer Ingelheim (Patent: GB1069797, 1964). Substancja ta pojawiła się w Europie w październiku 2015 roku i była często wykrywana w kolejnym roku (EMCDDA). Jej obecność w Polsce była prawdopodobnie odpowiedzią na nowelizację Ustawy z dnia 29 lipca 2005 roku o przeciwdziałaniu narkomanii (Dz.U. 2005 Nr 179 poz. 1485, z późn. zm.), która weszła w życie 1 lipca 2015 roku. Wtedy to na listach substancji kontrolowanych pojawiło się kolejnych 114 nowych substancji psychoaktywnych (NSP), a wśród nich popularne katynony –  $\alpha$ -PVP i pentedron, a także heksedron. NSP objęte kontrolą prawną są natychmiast zastępowane przez ich nowe, niekontrolowane pochodne i zapewne dlatego na rynek trafił N-etyloheksedron, który w ostatnim czasie zdobył w Polsce dużą popularność. Związek ten obecnie znajduje się na liście substancji kontrolowanych na Węgrzech, a w Danii i na Litwie obejmuje go prawo generyczne (EMCDDA).

N-etyloheksedron jest sprzedawany jako tzw. *research chemicals* w formie białego, szarego lub żółtego proszku (lepkiego pudru) lub bardzo drobnych kryształków (igiełek). Jest bezwonny lub o charakterystycznym, nieprzyjemnym zapachu, bez smaku lub przeciwnie – o nieprzyjemnym, chemicznym i gorzkim posmaku. Substancja ta jest najczęściej wciągana przez nos (tzw. *sniff*) lub wdychana (tzw. waporyzacja). Może być także przyjmowana doustnie, doodbytniczo, dożylnie, palona w formie tzw. maczanki lub e-papierosa. Innym sposobem przyjmowania jest tzw. *hot rails*, czyli wciąganie przez nos poprzez podgrzaną szklaną rurkę. Najsilniejsze działanie jest uzyskiwane poprzez wciąganie przez nos, wdychanie oparów skutkuje słabszymi i krótszymi efektami. Dawki progowe N-etyloheksedronu opisywane na forach internetowych przez użytkowników zawierają się w zakresach 10–20 mg, niskie 30–40 mg, typowe 50–60 mg, wysokie 70–90 mg, a bardzo wyso-

kie są określane na poziomie 100–150 mg, a nawet 250 mg. Efekty psychotropowe są krótkotrwałe, co sprawia, że powtarzanie dawek co około 1–3 godziny jest bardzo popularne i prowadzi do przyjęcia do 350 mg w ciągu jednej sesji. Działanie N-etyloheksedronu rozpoczyna się już po 2 minutach od przyjęcia donosowego, najsilniejsze efekty obserwowane są po około 20–25 min, trwają do 2–3 godzin, a kończą się po około 4–8 godzinach. Po przyjęciu doustnym działanie rozpoczyna się po około 20–25 min, a najsilniejsze efekty są obserwowane po około 50–60 minutach. N-etyloheksedron bywa łączony z innymi NSP (<https://hyperreal.info>). Substancja ta działa głównie na receptory dopaminowe, a efekty, które wywołuje, bywają przez użytkowników porównywane do tych występujących po kokainie. Działanie jest najbardziej zbliżone, ale nieco słabsze niż wywoływane przez  $\alpha$ -PVP oraz mocniejsze niż wywoływane przez pentedron, MDPHP (3,4-metylenodioksy- $\alpha$ -pirolidynoheksosofenon), heksedron i N-etylobufedron (NEB). Poniżej przytoczone efekty są zaczerpnięte z forów internetowych i należy mieć na uwadze, że sprzedawcy i użytkownicy NSP nie zawsze mogą być pewni co do rodzaju sprzedawanych i przyjmowanych substancji. Dla przykładu – w niektórych preparatach sprzedawanych w Polsce i oznaczanych jako HEX-EN obecny był 4-fluoropentedron (4-FPD) (<https://sin.org.pl>). Do efektów wywoływanych przez N-etyloheksedron, opisywanych przez użytkowników na forach internetowych, należy zaliczyć euforię, pobudzenie, empatię i poprawę samopoczucia, które są szczególnie intensywne przez pierwsze pół godziny. Występują także wzmożona gadatliwość, towarzyskość, bezsenność, podwyższona kreatywność, podwyższone libido, zwiększona koncentracja, potok myśli, wyczulenienie zmysłów i odmienna percepcja muzyki. Gałki oczne są szkliste, a źrenice mogą być delikatnie powiększone. Do negatywnych efektów należą m.in. paranoje, drżenia rąk, drgawki, bóle w klatce piersiowej, tachykardia, dysrytmia, wahania ciśnienia, podwyższone ciśnienie, splotenie oddechu, drętwienie kończyn, problemy krążeniowe w kończynach, wazokonstrykcja, podwyższona temperatura, pocenie się, suchość w ustach, brak łaknienia, zaburzenia widzenia, mimowolne ruchy ust, bruksizm i problemy z wystawianiem się. Działania te częściej występują po dużych dawkach (powyżej 150–200 mg). Efekty, które występują podczas tzw. „zejścia”, są określane jako nieprzyjemne i zazwyczaj obejmują silne uczucie zmęczenia, zniechęcenia, przygnębienie, stany depresyjne, lęki, drażliwość, bezsenność, urojenia, omamy słuchowe i halucynacje. Objawy te utrzymują się



do około 12 godzin od ostatniej dawki. W celu zniesienia tych objawów użytkownicy często przyjmują pochodne benzodiazepiny, np. niekontrolowany etizolam (<https://hyperreal.info>).

Celem niniejszej pracy było zaprezentowanie metod wykrywania i oznaczania N-etyloheksedronu we krwi oraz przedstawienie przypadków, w którym wykazano obecność tej substancji we krwi kierowców.

## 2. Opisy przypadków

### 2.1. Przypadek 1

25-letni mężczyzna kierujący samochodem nie zatrzymał się do kontroli drogowej. Po krótkim pościgu został zatrzymany. Miało to miejsce około godziny 16.50. Policjanci zauważyli nienaturalne zachowanie kierującego, który był pobudzony i wesoły, miał także niewyraźną mowę. Badanie powietrza wydychanego w kierunku alkoholu etylowego dało wynik ujemny. Kierujący przyznał się do przyjęcia mefedronu. W wyniku przeszukania samochodu ujawniono dwa woreczki foliowe z zapięciem strunowym zawierające biały proszek. W związku z podejrzeniem prowadzenia pojazdu pod wpływem środków odurzających od kierowcy pobrano krew do badań o godz. 17.10. Lekarz pobierający krew nie zanotował w protokole pobrania krwi żadnych odstępstw od normy (mowa wyraźna, chód pewny, źrenice normalne, reakcja źrenic na światło prawidłowa, objaw Romberga i próba palec-nos ujemne).

### 2.2. Przypadek 2

27-letni mężczyzna uczestniczył w wypadku drogowym. W wyniku poniesionych obrażeń mężczyzna zmarł.

### 2.3. Przypadek 3

18-letni mężczyzna podejrzany o prowadzenie pojazdu pod wpływem środków odurzających.

## 3. Metody

### 3.1. Materiały i odczynniki

N-etyloheksedron pochodził z firmy Cayman Chemical Company, a MDMA-D<sub>5</sub> z firmy LGC Standards (Dziekanów Leśny, Polska). Acetonitryl, chlorek n-butylu i kwas mrówkowy (98-100%) zakupiono w firmie Merck (Warszawa, Polska), kwas solny (35-39%) w firmie POCH S.A. (Gliwice, Polska), natomiast mrówczan amonu w firmie Sigma-Aldrich (Poznań, Polska).

Próbki krwi wolnej od analitów stosowane do opracowania i walidacji metody pochodziły ze stacji krwiodawstwa. Badania przesiewowe tej krwi nie ujawniły obecności środków odurzających, w tym N-etyloheksedronu i innych NSP objętych zastosowaną procedurą analityczną. Materiał biologiczny do czasu analizy był przechowywany w temperaturze -20°C.

### 3.2. Analizy przesiewowe

#### 3.2.1. Rutynowa analiza przesiewowa metodą ELISA

Krew badano na obecność środków odurzających i substancji psychotropowych z grup amfetamin, benzodiazepin, kannabinoli, opioidów i kokainy. Powyższe badania wykonano metodą immunoenzymosorpcyjną (ELISA) z zastosowaniem testów firmy Neogen.

#### 3.2.2. Badanie krwi na obecność NSP metodą LC-QqQ-MS

Badania przesiewowe w kierunku szerokiej grupy NSP prowadzono wcześniej opublikowaną metodą (Adamowicz, Tokarczyk, 2016).

#### 3.2.3. Badania przesiewowe metodą LC-QTOF-MS

Analizę krwi prowadzono także metodą chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas z połączeniem hybrydowym kwadrupola i analizatora czasu przelotu (LC-QTOF-MS) z użyciem aparatu serii 1200 (chromatograf) oraz 6520 Accurate-Mass QTOFMS (detektor) firmy Agilent Technologies (Santa Clara, CA). Rozdział prowadzono na kolumnie Ascentis Express C18 (7,5 cm x 2,1 mm; 2,7 μm) firmy Supelco termostatowanej w temperaturze 35°C. Fazę ruchomą, przepływającą przez kolumnę w systemie gradientu składu fazy z szybkością 0,3 ml/min, stanowiła mieszanina 0,1% kwasu mrówkowego w wodzie (A, v/v) i acetonitrylu (B, v/v). Użyto następującego programu gradientowego (w odniesieniu do składnika B): 0 min – 5%, 11 min – 33%, 15 min – 37%, 15,2 min – 5%, 21 min – 5%. Zastosowaną metodą jonizacji było elektrorozpylanie z monitorowaniem dodatnich jonów. Azot o temperaturze 300°C i natężeniu przepływu 10 l/min został użyty jako gaz osuszający oraz jako gaz nebulizujący o ciśnieniu 45 psi. Napięcie kapilary wynosiło 3000 V, a skimmera 65 V. Kwadrupol pracował w dwóch trybach: MS oraz MS/MS z tolerancją wartości  $m/z$  wybranego jonu  $\Delta m/z = 1,3$ . Napięcie fragmentora wynosiło 100 V, a energia kolizji – 15 eV. W celu zminimalizowania błędu wyznaczenia masy w trakcie analizy widma były automatycznie korygowane przez pomiar mieszaniny referencyjnej zawierającej dwa związki: purynę ( $[M+H]^+ = 121,0509$  Da) oraz HP-921 – heksakis(1H,1H,3H-tetrafluoropropoksy)fosfazen

( $[M+H]^+ = 922,0098$  Da). Zbieranie i analizę danych prowadzono za pomocą oprogramowania MassHunter firmy Agilent Technologies (wersja B.06.00).

### 3.3. Oznaczanie N-etyloheksedronu metodą LC-LIT-MS

#### 3.3.1. Przygotowanie próbek do badań

Do próbek krwi (0,2 ml) umieszczonych we fiolkach Eppendorfa dodawano jako wzorzec wewnętrzny (IS) MDMA- $D_5$ , aby osiągnąć stężenie 100 ng/ml. Następnie dodawano 200  $\mu$ l 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 obr./min (15,682 x g), po czym fazę organiczną (800  $\mu$ l) przenoszono do kolejnych fiolek Eppendorfa. Po dodaniu do tych fiolek po 100  $\mu$ l 0,025 M HCl fazę organiczną odparowywano w temperaturze 37°C (przez 10–15 min). Pozostałą we fiolkach fazę wodną mieszano na wstrząsarce (około 10 s), a następnie przenoszono do wkładek fiolek do automatycznego podajnika próbek.

#### 3.3.2. Aparatura i warunki analizy

Do oznaczeń metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrią mas z analizatorem w postaci kwadrupola sprzężonego z liniową pułapką jonową (LC-LIT-MS) zastosowano chromatograf cieczowy Eksigent UltraLC 110 połączony ze spektrometrem mas 3200 QTRAP firmy SCIEX. Aparat pracował w trybie jonizacji dodatniej (+ESI) z zastosowaniem warunkowej akwizycji danych (MRM + EPI; Enhanced Product Ion). Rozdzielanie chromatograficzne prowadzono na kolumnie Kinetex 2,6  $\mu$ m C18 (100 x 4,6 mm) firmy Phenomenex. Fazę ruchomą, przepływającą przez kolumnę z szybkością 0,5 ml/min, stanowił roztwór mrówczanu amonu (1%, v/v) w wodzie (faza A) oraz mieszanina metanol : acetonitryl (1:1, faza B). Zastosowano następujący program gradientowy (w odniesieniu do zawartości fazy B): 0 min – 2%, 1 min – 2%, 10 min – 100%, 13 min – 100%, 13,06 min – 2%, 17 min – 2%. Całkowity czas analizy wynosił 17 minut. Czas retencji N-etyloheksedronu wynosił 10,3 min (względny czas retencji 1,27). Monitorowano wybrane reakcje fragmentacji (MRM), które stosowano w analizie ilościowej (podkreślone) oraz jako jony potwierdzające ( $m/z$ ): 220,3 $\rightarrow$ 91,2 (przy energii kolizji 33 V), 220,3 $\rightarrow$ 130,2 (37 V), 220,3 $\rightarrow$ 146,3 (23 V) i 220,3 $\rightarrow$ 202,4 (19 V), dla N-etyloheksedronu oraz 199 $\rightarrow$ 165 (20 V) dla MDMA- $D_5$ . Przejścia MRM N-etyloheksedronu zarejestrowano przy następujących parametrach: DP (potencjał rozproszenia): 36 V, EP (potencjał wejścia): 7,5 V, natomiast dla MDMA- $D_5$  wartości te wynosiły odpowiednio: 40 V oraz 10 V. Pozostałe parametry detektora mas pracującego w trybie MRM były następujące: temperatura źródła:

650°C, napięcie w źródle: 5000 V, ciśnienie gazu rozpylającego: GS1 – 40 psi oraz GS2 – 70 psi, ciśnienie gazu kurtynowego: 50 psi. Parametry detektora mas pracującego w trybie pułapki jonowej przedstawiały się następująco: ciśnienie gazu kurtynowego: 50 psi, DP 40 V, EP 10 V, CE (energia kolizji) 25  $\pm$  10 V. Zakres rejestrowanych mas wynosił 50–400 ( $m/z$ ). Zbieranie danych i ich analizę jakościową prowadzono za pomocą oprogramowania Analyst 1.6.2 firmy SCIEX. Analizę ilościową przeprowadzono za pomocą programu MultiQuant<sup>TM</sup> 3.0 firmy SCIEX. Opracowana metoda była liniowa w testowanym zakresie (5–200 ng/ml), a współczynniki determinacji  $R^2$  określone dla krzywych kalibracyjnych sporządzonych dla wszystkich przejść MRM mieściły się w zakresie 0,9977–0,9997. Granice detekcji (LOD) dla poszczególnych par MRM wynosiły 0,08–0,15 ng/ml, a granica oznaczalności (LOQ) była równa 5 ng/ml.

## 4. Wyniki

W wyniku analiz badanych próbek krwi przeprowadzonych metodą immunoenzymosorpcyjną (ELISA) uzyskano we wszystkich trzech rozpatrywanych przypadkach dodatnie odczyty dla pochodnych amfetaminy (lub metamfetaminy), jednakże analizy ukierunkowane przeprowadzone metodą chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrią mas (LC-MS) nie ujawniły obecności amfetaminy i jej popularnych pochodnych (w tym metamfetaminy i MDMA).

Badania przesiewowe krwi kierowcy opisanego jako Przypadek 1 prowadzone w kierunku NSP wcześniej opublikowaną metodą (Adamowicz, Tokarczyk, 2016) nie ujawniły obecności związków objętych zastosowaną procedurą. W wyniku tych analiz wykazano jednak obecność substancji, którą udało się zidentyfikować za pomocą metody LC-QTOF-MS. Metoda ta charakteryzuje się dużą dokładnością wyznaczenia masy ( $\Delta m$ ), rzędu 2–5 ppm, w zależności od trybu pracy spektrometru. Dzięki pomiarom prowadzonym w trybie MS przy niskim napięciu fragmentatora zaobserwowano na widmie protonowaną cząsteczkę (jon  $[M+H]^+$ ) o wartości  $m/z$  wynoszącej 220,1695. Na tej podstawie wyznaczono masę badanego związku, tj. 219,1622. Wartość ta jest zgodna z masą cząsteczkową N-etyloheksedronu, wynoszącą 219,1623 ( $\Delta m = -0,5$ ). Obecność N-etyloheksedronu potwierdzono poprzez analizę wzorca tej substancji. Ponadto przeprowadzono pomiary w trybie MS przy wyższym napięciu fragmentatora oraz w trybie MS/MS w użyciu energii kolizji, podczas których potwierdzono, że sposób fragmentacji związku w badanej próbce był zgodny ze sposobem fragmentacji N-etyloheksedronu. Badania krwi, które odnosiły się do przypadków nr 2 i 3 przebiegały już po wprowadzeniu tego związku do

metody przesiewowej, dlatego też jego obecność wykazano metodą LC-QqQ-MS.

Badania ilościowe N-etyloheksedronu we krwi prowadzono metodą LC-LIT-MS, a uzyskane wyniki przedstawiono w Tabeli I. Na rysunku 2 przedstawiono chromatogram i widmo mas N-etyloheksedronu uzyskane metodą LC-LIT-MS w jednym z omawianych przypadków.

## 5. Dyskusja

N-etyloheksedron jest nową substancją psychoaktywną obecną na polskim rynku narkotykowym. Na początku 2017 roku odnotowano w Instytucie Ekspertyz Sądowych pierwsze przypadki wykrycia tej substancji w materiale biologicznym. Związek ten był obecny w próbach krwi pobranych od kierowców prowadzących pojazdy, w tym jednego, który poniósł śmierć w wypadku drogowym.

Identyfikacja katynonów ze względu na ich podobieństwo strukturalne niesie ze sobą spore trudności. Poprawna identyfikacja związku obecnego w materiale dowodowym jest nader istotna, zwłaszcza w świetle ewentualnej penalizacji. Jako przykład może posłużyć problem identyfikacji mefedronu i jego izomerów (Zuba, Adamowicz, 2017). Również w przypadku N-etyloheksedronu nie jest to sprawa trywialna. Substancja ta może być łatwo pomyłona ze swoim izomerem, czyli N-etylo-4'-metylonorpentedronem (4-MEAP), zwłaszcza w przypadku, gdy obie substancje obecne są w badanym materiale. Dodatkowy problem utrudniający identyfikację może stanowić obecność metabolitów w analizowanym materiale biologicznym – mogą one zostać łatwo pomyłone z innymi związkami o podobnej strukturze. Zakładając, że N-etyloheksedron metabolizuje podobnie jak inne katynony (Helfer i in., 2015; Lewin, Seltzman, Carroll, Mascarella i Reddy, 2014), czyli poprzez N-dealkilację i/lub redukcję grupy karbonylowej, po której następuje N-dealkilacja (rysunek 3), można przewidzieć, że jego niektóre metabolity będą izomerami innych obecnych na rynku narkotykowym katynonów. Przykładowo – produkt N-dealkilacji N-etyloheksedronu jest izomerem takich związków, jak: pentedron, 4-etylometkatynon (4-EMC), 3-etylometkatynon (3-EMC), 3,4-dimetylometkatynon (3,4-DMMC), NEB czy 4-metylobufedron (4-MeMABP). Z powyższych względów zatem zastosowanie kilku technik analitycznych (LC-QTOF-MS, LC-LIT-MS, LC-QqQ-MS, GC-MS) oraz wnikliwa analiza widm masowych są niezbędne w procesie analitycznym.

Jak dotychczas nie opublikowano żadnych prac omawiających stężenia N-etyloheksedronu w materiale biologicznym. Wykazane w próbkach krwi pochodzących z trzech omawianych przypadków stężenia N-etyloheksedronu mieściły się w zakresie od 8 do 37 ng/ml. Uży-

skane wyniki można porównać do stężeń  $\alpha$ -PVP i pentedronu. Stężenia  $\alpha$ -PVP i pentedronu we krwi mieściły się w zakresach odpowiednio 6,4–99 ng/ml i <1–216 ng/ml. Średnie stężenia tych związków wykazane u odpowiednio 28 i 7 kierowców wynosiły 38,3 ng/ml i 36,0 ng/ml. U kierowców po przyjęciu  $\alpha$ -PVP, u których zaobserwowano efekty mogące zagrażać bezpiecznemu prowadzeniu pojazdów, stężenia tego związku mieściły się w zakresie 8,2–68 ng/ml (Adamowicz i in., 2016; Adamowicz i in., 2016).

## 6. Wnioski

W artykule przedstawiono trzy przypadki, w których wykazano obecność N-etyloheksedronu we krwi kierowców. Opracowana metoda LC-LIT-MS oznaczania N-etyloheksedronu została z powodzeniem zastosowana w przedmiotowej analizie. Wykazane w próbkach krwi stężenia mieściły się w zakresie od 8 do 37 ng/ml. Pomimo braku jednoznacznych objawów u badanych przedstawione przypadki oraz efekty wywoływane przez N-etyloheksedron opisywane przez użytkowników sugerują, że kierowanie pojazdem po przyjęciu tej substancji może potencjalnie zagrażać bezpieczeństwu ruchu drogowego.