Toxichem Krimtech 2026;93(2):158

GTFCh-Reisestipendium zur TIAFT Conference 2025

Phase I Metabolismus des neuen Phencyclidin-Derivats 3-Cl-PCP: In-vitro-Studie mit gepoolten humanen Lebermikrosomen und Untersuchung von post-mortem Matrizes

Johannes Kutzler[1-3,*], Tobias Veit[1,2], Thomas Keller[4], Volker Auwärter[1,2]

[1]Institute of Forensic Medicine, Forensic Toxicology, Medical Center – University of Freiburg
[2]Medical Faculty, University of Freiburg, Germany
[3]Hermann Staudinger Graduate School, University of Freiburg, Germany
[4]Institute of Forensic Medicine, Forensic Toxicology, University of Salzburg, Austria
*Korrespondierender Autor: johannes.kutzler@uniklinik-freiburg.de

Abstract

Introduction & Aims: Fatalities linked to novel psychoactive substances (NPS) are difficult to assess due to scarce toxicological data. This study reports a 3-chloro-phencyclidine (3-Cl-PCP)-related fatality and characterizes its phase I metabolism *in vitro* and its phase I and II metabolites in post-mortem samples. **Methods:** Post-mortem bile, urine, blood, gastric content, and syringe residues were analyzed using LC-MS/MS and LC-QTOF-MS. *In vitro* metabolism was studied in pooled human liver microsomes (pHLM). Phase II metabolism was assessed by β-glucuronidase hydrolysis. **Results:** 3-Cl-PCP concentrations were comparable in cardiac and femoral blood (610 and 830 ng/mL) and highest in bile (4,300 ng/mL). Seven phase I metabolites were tentatively identified, mainly hydroxylations of the cyclohexyl (M1-M3) and piperidine rings (M4, M5), as well as two ring-opened metabolites (M6, M7). Extensive glucuronidation of hydroxylated metabolites was observed, especially for M4**. Conclusion:** 3-Cl-PCP accumulates in bile. pHLM incubations reliably predicted phase I metabolites. Urine analysis should target metabolites M3 (hydroxy cyclohexyl), M4 (hydroxyl piperidine), and M6 (carboxy metabolite) after enzymatic cleavage.

Einleitung und Zielsetzung: Todesfälle im Zusammenhang mit neuen psychoaktiven Substanzen (NPS) sind aufgrund begrenzter Verfügbarkeit toxikologischer Daten oftmals schwer zu bewerten. Diese Studie beschreibt einen Todesfall nach Konsum von 3-Chlor-Phencyclidin (3-Cl-PCP) und charakterisiert dessen Phase-I-Metabolismus in vitro sowie Phase-I- und -II-Metaboliten in postmortalen Proben. **Methoden:** Postmortale Proben (Galle, Urin, Herz- und Femoralblut, Mageninhalt) und Spritzenrückstände wurden mittels LC-MS/MS und LC-QTOF-MS analysiert. Die In-vitro-Metabolisierung wurde mittels gepoolter humaner Lebermikrosomen (pHLM) untersucht. Zur Untersuchung des Phase-II-Metabolismus` erfolgte eine β-Glucuronidase-Spaltung. **Ergebnisse:** Die 3-Cl-PCP-Konzentrationen waren in Herz- und Femoralblut ähnlich (610 und 830 ng/mL) und am höchsten in Gallenflüssigkeit (4.300 ng/mL). Es wurden sieben Phase-I-Metaboliten identifiziert, vor allem Hydroxylierungen am Cyclohexylring (M1-M3) und Piperidinring (M4, M5) sowie zwei Ringöffnungsprodukte (M6, M7). Es zeigte sich eine ausgeprägte Glucuronidierung der hydroxylierten Metaboliten, insbesondere von M4. **Schlussfolgerung:** 3-Cl-PCP reichert sich vor allem in der Galle an. pHLM-Inkubationen sagten die Phase-I-Metaboliten zuverlässig voraus. Für die Urinanalyse sollten nach enzymatischer Spaltung die Metaboliten M3 (Hydroxycyclohexyl), M4 (Hydroxypiperidin) und M6 (Carbonsäure-Metabolit) priorisiert werden.

1. Einleitung

In den letzten Jahrzehnten hat die Zahl und Vielfalt neuer psychoaktiver Substanzen (NPS) auf dem illegalen Drogenmarkt stark zugenommen. [1] Die Drogenagentur der Europäischen Union (EUDA) überwacht derzeit rund 1.000 NPS, die in den vergangenen 20 Jahren aufgetreten sind, wobei jährlich mehr als 300 verschiedene, meist bereits zuvor bekannte Verbindungen nachgewiesen werden. Weltweit stieg die Anzahl der gemeldeten NPS von 162 im Jahr 2010 auf 527 im Jahr 2023. [2]

Phencyclidin (PCP) wurde ursprünglich 1956 als dissoziatives Anästhetikum entwickelt, aber aufgrund schwerer Nebenwirkungen schon bald durch Ketamin ersetzt (reaktive Metaboliten und irreversible Proteinbindung gelten als Ursache für die Toxizität von PCP). [3-5] Angetrieben durch den steigenden Online-Vertrieb von „Legal Highs“ tauchen seit den 2010er-Jahren neue Struktur-Analoga wie 3-Cl-PCP [6], Tilmetamin [7], 3-Me-PCE [1,8] oder Fluorexetamin [9] auf, die regulatorische Lücken ausnutzen und durch strukturelle Vielfalt und fehlende Referenzstandards analytische Herausforderungen bergen.

Die Metabolismusaufklärung neu auftretender NPS ist essentiell für deren Detektion in der Fallarbeit. Gepoolte humane Lebermikrosomen (pHLMs) dienen dabei als günstiges, leicht handhabares, ethisch unproblematisches In-vitro-Modell zur Unterstützung der Metabolismusaufklärung, wie Studien zu 3-MeO-PCP [10] und 3-HO-PCP [11] zeigen. Die Erkenntnisse aus solchen Studien sind für die forensische Toxikologie unabdingbar, um beispielsweise stabile Metaboliten neuer NPS für einen Langzeitnachweis zu identifizieren.

Diese Arbeit untersucht den Metabolismus des neuartigen PCP-Derivats 3-Cl-PCP in einem Todesfall. Dabei wurden mögliche Metaboliten in postmortal gewonnenen Proben (Herzblut, Femoralblut, Galle, Urin, Mageninhalt) und einem pHLM-Assay mit hochaufgelöster Tandemmassenspektrometrie (LC-QTOF/MS) vorläufig identifiziert. Es wurden außerdem drei Spritzen untersucht, die im Zusammenhang mit dem Todesfall standen. Die Quantifizierung von 3-Cl-PCP erfolgte mit der Standardadditionsmethode mittels Flüssigchromatographie gekoppelt mit Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS).

2. Material und Methoden

Untersucht wurde eine tödliche Intoxikation mit 3-Chlor-Phencyclidin (3-Cl-PCP). Analysiert wurden Galle, Urin, Herz- und Oberschenkelblut, Mageninhalt sowie drei Spritzen. Für die pHLM-Assays wurden das NADPH-System, β-Glucuronidase und der Referenzstandard von 3-Cl-PCP eingesetzt. Ammoniumformiatpuffer, Methanol und Acetonitril dienten der Probenaufarbeitung, PCP-d_5 war der interne Standard. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 60 min ohne Zugabe von UDP-Glycosyltransferase, daher wurden Phase-II-Metaboliten nur in den postmortal gewonnenen Proben betrachtet. Die Inkubation wurde durch Zugabe von eiskaltem Acetonitril gestoppt, zentrifugiert und der Überstand für die LC-MS/MS-Analysen verwendet. Biologische Proben wurden nach etablierten Verfahren auf 3-Cl-PCP untersucht. Vor der Urinanalyse erfolgte ggf. eine Inkubation mit β-Glucuronidase bei 45 °C für 120 min zur Glucuronidspaltung. Probenvorbereitung und Festphasenextraktion erfolgten automatisiert, jeweils unter Zugabe des internen Standards und von Phosphatpuffer. Die analytische Bestimmung erfolgte mittels LC-QTOF/MS (Bruker Impact II, ESI+) auf einer Biphenylsäule. Zur Datenerfassung und Auswertung wurde die Herstellersoftware genutzt. Die vorläufige Metabolitenidentifikation erfolgte über die Massengenauigkeit (< 5 ppm), das Signal-Rausch-Verhältnis (> 3:1), die Fragmenttoleranz (± 10 ppm) und über charakteristische MS/MS-Fragmente.

3. Ergebnisse

Die vorläufige Identifikation der Phase-I-Metaboliten erfolgte mittels LC-QTOF/MS nach Inkubation mit pHLMs. Es konnten insgesamt fünf monooxygenierte Metaboliten (M1–M5) detektiert werden: Drei Hydroxycyclohexyl-Derivate (M1-M3) und zwei Hydroxypiperidin-Derivate (M4, M5). Die Zuordnung erfolgte anhand charakteristischer Fragmentionen; Hydroxylierungen waren entweder am Cyclohexan- oder am Piperidinring zu beobachten. Zudem wurden zwei Metaboliten mit vermutlich geöffnetem Piperidinring identifiziert (M6, M7). Es handelt sich dabei um einen carboxylierten (M6) sowie einen alkoholischen Metaboliten (M7), wobei

die spezifischen Fragmente jeweils auf Ringöffnung und Modifikation der Seitenkette hindeuten. Für die In-vivo-Analyse wurden die post mortem gewonnenen Proben Urin, Galle, Herz- und Oberschenkelblut sowie Mageninhalt mittels LC-MS/MS untersucht. Sämtliche zuvor in vitro identifizierten Metaboliten konnten auch in den untersuchten biologischen Matrizes nachgewiesen werden.

Die 3-Cl-PCP-Konzentrationen der postmortal gewonnenen Proben wurden mit der Standardadditionsmethode bestimmt: Herzblut 610 ng/ml, Femoralblut 830 ng/ml, Magensaft 840 ng/ml, Urin 1.200 ng/ml und Galle 4.300 ng/ml. In allen untersuchten Spritzen wurde ebenfalls 3-Cl-PCP nachgewiesen.

4. Diskussion

Es konnten sieben Metaboliten mittels pHLM-Ansatz vorläufig identifiziert und auch in allen post mortem gewonnenen Proben nachgewiesen werden. In Bezug auf die strukturelle Vielfalt der Metaboliten sind drei verschiedene Hydroxylierungspositionen am Piperidinring möglich, es wurden allerdings nur zwei dieser Metaboliten vorläufig identifiziert (M4 und M5). Insbesondere kann das 2-Hydroxypiperidin aber durch Tautomerie zu einer Ringöffnung unter Bildung des entsprechenden Amins und offenkettigen Aldehyds führen. [12] Aldehyde, als metabolische Zwischenprodukte, sind aufgrund ihrer Reaktivität selten direkt nachweisbar. Daher erscheint eine anschließende Verstoffwechselung zur entsprechenden offenkettigen Carbonsäure (M6) bzw. dem Alkohol (M7) plausibel. Eine ähnliche Biotransformation wurde für das Methadon-Analogon Dipyanon vorhergesagt. [12] Eine alternative Dehydratisierung zum Dehydropiperidin wurde im Rahmen dieser Studie nicht gefunden.

5. Schlußfolgerung

Durch die vorliegende Arbeit wurde der Metabolismus von 3-Cl-PCP umfassend charakterisiert und sieben Metaboliten sowohl im pHLM-Modell als auch in postmortal gewonnenen Proben nachgewiesen. Besonders auffällig ist die Anreicherung von 3-Cl-PCP in der Galle. Die pHLM-Inkubationen ermöglichten in dieser Studie eine zuverlässige Vorhersage der Phase-I-Metaboliten und lieferten damit eine solide Modellgrundlage für zukünftige toxikologische Analysen strukturverwandter Substanzen. Für die Urinanalytik sollten insbesondere die Metaboliten M3 (Hydroxycyclohexyl), M4 (Hydroxypiperidin) und M6 (Piperidin-ringgeöffnete Carbonsäure) nach Glucuronidspaltung priorisiert werden. Die Resultate stärken die forensisch-toxikologische Routineanalytik, da spezifische Metaboliten identifiziert wurden und damit bspw. eine Detektion eines 3-Cl-PCP-Missbrauchs im Rahmen von Abstinenzkontrollen über ein größeres Zeitfenster hinweg möglich erscheint.

6. Danksagung

Johannes Kutzler dankt der GTFCh für das Reisestipendium zum TIAFT Meeting 2025 in Auckland, Neuseeland.

7. Literatur

[1] European Union Drugs Agency (2025) European drug report 2025. Publications Office, Luxemberg

[2] United Nations Office on Drugs and Crime (2025) World Drug Report 2025. United Nations, Vienna

[3] Morris H, Wallach J (2014) From PCP to MXE: a comprehensive review of the non-medical use of dissociative drugs. Drug Testing and Analysis 6:614-632. https://doi.org/10.1002/dta.1620

[4] Ho JH, Dargan PI (2018) Arylcyclohexamines: Ketamine, Phencyclidine, and Analogues. In: Critical Care Toxicology. Springer, Cham, pp 1-47

[5] Bolleddula J, DeMent K, Driscoll JP, Worboys P, Brassil PJ, Bourdet DL (2014) Biotransformation and bioactivation reactions of alicyclic amines in drug molecules. Drug Metabolism Reviews 46:379-419. https://doi.org/10.3109/03602532.2014.924962

[6] EMCDDA (2021) Formal notification of 1-[1-(3-chlorophenyl)cyclohexyl]piperidine (3-Cl-PCP) by Slovenia as a new psychoactive substance under the terms of Regulation (EU) 2017/2101. EMCDDA, Lisbon

[7] EUDA (2025) Formal notification of 2-(methylamino)-2-(thiophen-2-yl)cyclohexan-1-one (tilmetamine) by Finland as a new psychoactive substance under the terms of Regulation (EU) No 2023/1322 and Council Framework Decision 2004/757/JHA. EUDA, Lisbon

[8] Wallach J, Colestock T, Cicali B, Elliott SP, Kavanagh PV, Adejare A, Dempster NM, Brandt SD (2016) Syntheses and analytical characterizations of N-alkyl-arylcyclohexylamines. Drug Testing and Analysis 8:801-815. https://doi.org/10.1002/dta.1861

[9] EMCDDA (2022) Formal notification of 2-(ethylamino)-2-(3-fluorophenyl)cyclohexan-1-one (fluorexetamine) by Belgium as a new psychoactive substance under the terms of Regulation (EC) No 1920/2006 and Council Framework Decision 2004/757/JHA. EMCDDA, Lisbon

[10] Michely JAA, Manier SK, Caspar AT, Brandt SD, Wallach J, Maurer HH New Psychoactive Substances 3-Methoxyphencyclidine (3-MeO-PCP) and 3-Methoxyrolicyclidine (3-MeO-PCPy): Metabolic Fate Elucidated with Rat Urine and Human Liver Preparations and their Detectability in Urine by GC-MS, "LC-(High Resolution)-MSn" and "LC-(High Resolution)-MS/MS." Current Neuropharmacology 15:692-712. https://doi.org/10.2174/1570159X14666161018151716

[11] Davidsen AB, Mardal M, Johansen SS, Dalsgaard PW, Linnet K (2020) In vitro and in vivo metabolism and detection of 3-HO-PCP, a synthetic phencyclidine, in human samples and pooled human hepatocytes using high resolution mass spectrometry. Drug Testing and Analysis 12:987-993. https://doi.org/10.1002/dta.2807

[12] Berardinelli D, Kutzler J, Taoussi O, Zaami S, Pichini S, Basile G, Busardò FP, Auwärter V, Carlier J (2025) Dipyanone, a new methadone-like synthetic opioid: In vitro and in vivo human metabolism and pharmacological profiling. Arch Toxicol 99:2339-2353. https://doi.org/10.1007/s00204-025-04023-1