



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale

In

Biologia Molecolare e Applicata

Sviluppo e validazione di un metodo HPLC-MS/MS per la rilevazione plasmatica di metilone, MDMA e metaboliti dopo somministrazione controllata in 12 volontari sani.

Development and validation of a HPLC-MS/MS method for quantification of methylone, MDMA and metabolites after controlled administration in 12 healthy volunteers.

Tesi di Laurea Magistrale di:

Giorgia Sprega

Relatore:

Chiar.mo Prof.

Francesco Paolo Busardò

Correlatore:

Chiar.mo Prof.

Alfredo Fabrizio Lo Faro

Sessione: Estiva

Anno Accademico: 2021-2022

Sommario

1. INTRODUZIONE	pag. 5
1.1 Disponibilità di droghe durante la pandemia da COVID-19.....	pag. 5
1.2 NPS.....	pag. 7
1.3 Catinoni Sintetici.....	pag. 11
1.4 Controllo delle NPS	pag. 15
1.5 Sistema Nazionale di Allerta Precoce (SNAP)	pag. 17
2. SOSTANZE PSICOATTIVE DI INTERESSE	pag. 20
2.1 METILONE.....	pag. 20
2.2 MDMA	pag. 25
3. STUDIO DELLA FARMACOCINETICA	pag. 29
3.1 Farmacocinetica non lineare dell'MDMA	pag. 29
3.2 Lo studio	pag. 30
4. MATERIALI E METODI	pag. 31
4.1 Sostanze chimiche e reagenti	pag. 31
4.2 Preparazione degli standards, delle soluzioni di calibrazione e dei controlli di qualità ...	pag.32
4.3 Condizioni strumentali	pag 33
4.3.1 Condizioni cromatografiche.....	pag 33
4.3.2 Condizioni di spettroscopia di massa.....	pag 34
4.4 Caratterizzazione delle molecole	pag 35
4.5 Protocollo di estrazione	pag 36
4.6 Validazione del metodo.....	pag 37
4.7 Protocollo di sperimentazione clinica	pag 39
5. RISULTATI	pag 41
5.1 Risultati della Validazione	pag 41
5.1.1 Linearità	pag 41
5.1.2 Precisione e accuratezza.....	pag 42
5.1.3 Carryover, effetto matrice e recupero	pag 42
5.1.4 Integrità	pag 42
5.1.5 Stabilità.....	pag 43
5.2 Risultati dei Campioni reali.....	pag 43
5.2.1 Metilone	pag 43
5.2.2 MDMA	pag 43
5.2.3 Farmacocinetica	pag 45
6. DISCUSSIONE	pag 46
7. CONCLUSIONI	pag 51

1.INTRODUZIONE

1.1 Disponibilità di droghe durante la pandemia da COVID-19

All'inizio del 2020 il mondo è stato colpito duramente dalla rapida diffusione del SARS-CoV-2 e dalle misure di contenimento attuate per cercare di tenere sotto controllo l'emergenza sanitaria. Queste restrizioni hanno influenzato sia negativamente che positivamente l'offerta, la distribuzione e la domanda di droga nelle varie nazioni. Nel complesso, i mercati dei farmaci illegali si sono ampiamente dimostrati resilienti ai cambiamenti legati al COVID-19, in quanto, dopo le interruzioni iniziali all'inizio della pandemia, i gruppi della criminalità organizzata si sono rapidamente adattati alle nuove circostanze e, all'inizio del 2021, il traffico di droga sembrava continuare allo stesso ritmo di prima o addirittura ad un ritmo maggiore. Infatti, dalle indagini effettuate risulta che la pandemia da COVID-19, oltre ad aver portato nuove tendenze nel traffico di droga, ne ha accelerato alcune già esistenti: in molte zone, come Europa, America Latina, Nord Africa e Sud-Est asiatico, è stato osservato un aumento notevole dell'uso delle rotte marittime e d'acqua dolce. Risulta in numero superiore anche l'utilizzo di aeromobili privati per il traffico a livello mondiale, mentre per la distribuzione nazionale e locale sono stati utilizzati servizi di consegna di cibo, servizi postali, droni ed in particolare acquisti effettuati tramite il *clear* e il *dark web* [1].

Oltre ad aver causato cambiamenti nel traffico e nella distribuzione, le restrizioni imposte dalla pandemia potrebbero aver influenzato anche la domanda e quindi la produzione di molte droghe. La produzione di droghe sintetiche utilizzate in contesti ricreativi, come la 2,3-metilendiossimetamfetamina (MDMA), sembrerebbe essere stata influenzata da una riduzione della domanda, causata probabilmente dalla

chiusura di bar e night club e dalla cancellazione dei festival musicali. Secondo i dati del 2020, questa situazione ha causato un calo iniziale dei prezzi all'ingrosso di oltre il 20% nei paesi manifatturieri dell'Europa occidentale e centrale. Entro la fine di quell'anno, i prezzi all'ingrosso hanno però ricominciato ad aumentare in Europa, suggerendo una ripresa della domanda di MDMA [1]. Nonostante le restrizioni l'Europa rimane quindi un'importante fonte di prodotti a base di MDMA che riforniscono il mercato mondiale. Il numero di laboratori di Ecstasy smantellati continua ad aumentare e continuano ad essere individuati prodotti contenenti livelli pericolosi di tale sostanza: da 180 mg nel 2019 a 366 mg nel 2020, con inoltre una maggiore purezza delle polveri (81%) [2].

Accanto alla ripresa della produzione, della domanda e del traffico delle comuni droghe illegali, un altro problema, derivato dalle misure di contenimento durante l'emergenza sanitaria, è sicuramente l'enorme e continua introduzione di NPS (Nuove sostanze psicoattive). La criminalità organizzata si è infatti impegnata per aumentare la distribuzione di nuove sostanze sintetiche. Queste nuove sostanze sono facilmente modificabili, quindi difficili da identificare, ed in grado di dare gli stessi effetti o effetti aumentati rispetto ai comuni psicotropi ricreativi, e per questo motivo i trafficanti riescono ad eludere facilmente le misure di controllo. Nel report annuale della DCSA (Direzione Centrale per i Servizi Antidroga) risulta che nel 2020 in Europa si è verificato un aumento dei sequestri di NPS, in particolare catinoni sintetici, cannabinoidi sintetici, nuovi oppioidi sintetici (NSO), triptamine, arilcicloesilamine e fenetilammine [3]. I problemi di disponibilità delle droghe, anche

se minimi, potrebbero aver portato alcuni consumatori a sostituire la loro droga preferita con le NPS [4].

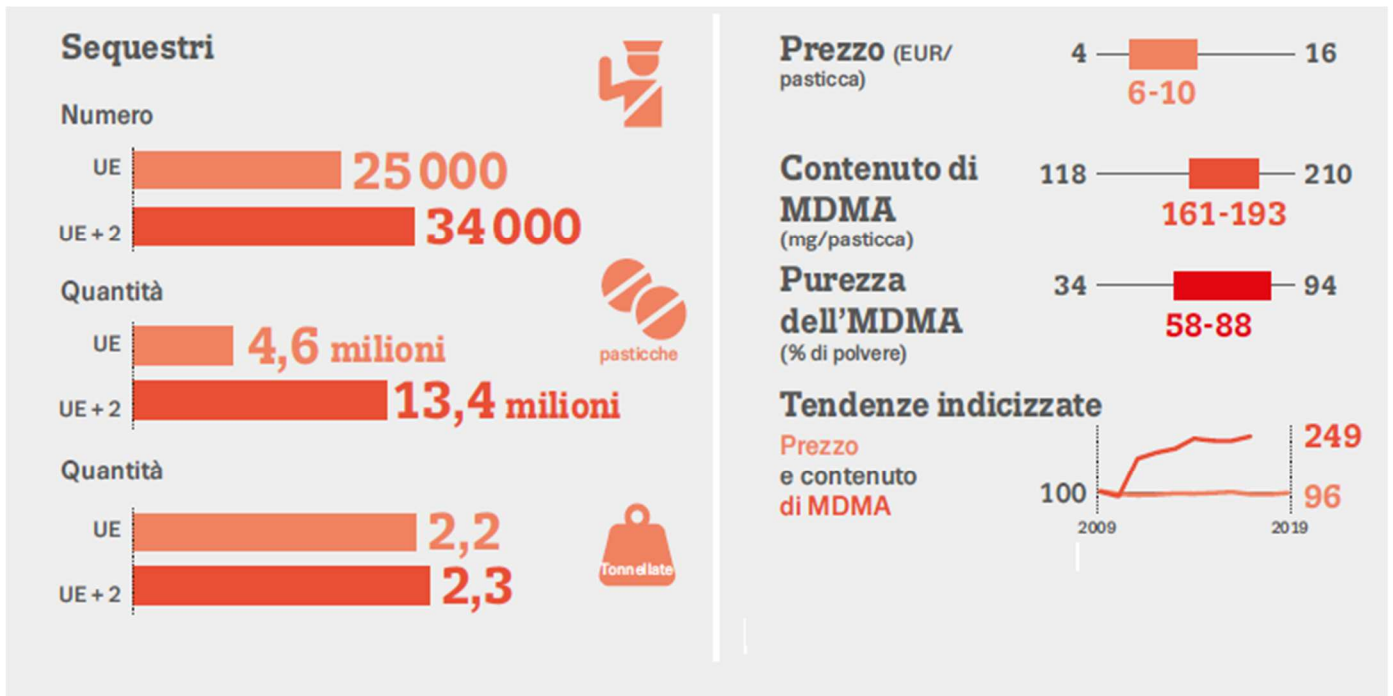


Figura 1: Sequestri di MDMA segnalate al Sistema di Allerta precoce Europeo: numero totale di sequestri (2008-18), prezzo, contenuto e purezza dell'MDMA. EMCDDA. Trends and Development, 2021. UE + 2: Stati membri dell'UE più Turchia e Norvegia. EMCDDA 2021, "European Drug Report".

1.2 NPS

Con la denominazione Nuove sostanze psicoattive (NPS) si fa riferimento ad un gruppo molto ampio ed eterogeneo di molecole, principalmente di natura sintetica, caratterizzate da proprietà farmacologiche e tossicologiche estremamente insidiose per la salute dei consumatori. Sono spesso conosciute come "droghe sintetiche", "droghe di design" o con i termini colloquiali di "Sali da bagno", "prodotti chimici di ricerca" e "droghe legali", in quanto, data la loro continua evoluzione, vengono difficilmente e lentamente sottoposte a controllo internazionale. La maggior parte di

queste sostanze sono vendute come sostituti “legali” delle droghe illecite, mentre altre sono destinate a coloro che vogliono sperimentarne i possibili nuovi effetti [5].

L’Ufficio delle Nazioni Unite contro la droga e il crimine (UNODC) definisce le NPS come “sostanze di abuso, in forma pura o in un preparato, che non sono controllate dalla Convenzione unica sugli stupefacenti del 1961 o dalla Convenzione del 1971 sulle sostanze psicotrope, ma che possono rappresentare una minaccia per la salute pubblica” [5].

Il termine NPS non si riferisce esclusivamente a sostanze illegali sintetizzate per la prima volta, ma anche a sostanze già esistenti, ad esempio i farmaci legali, e che entrano a far parte del mercato illegale come sostanze con effetto psicotropo, anche molti anni dopo la pubblicazione della loro sintesi. Un esempio sono tutte quelle sostanze testate da industrie farmaceutiche come possibili medicinali, ma che non raggiungono il mercato farmaceutico per i troppi effetti collaterali o i pochi effetti farmacologici. Queste sostanze possono entrare successivamente nel mercato delle NPS ed essere vendute illegalmente a causa dei loro effetti psicoattivi pressoché simili a quelli delle droghe comuni, per il loro costo minore, per la loro difficile intercettazione, e perché la loro vendita non è stata espressamente vietata dalla regolamentazione internazionale [6].

Sebbene l’introduzione continua delle NPS nel mercato illegale sia stata notevolmente accelerata dalle continue restrizioni imposte dalla pandemia da COVID-19, il problema era già presente a livello mondiale da molti anni. Dal 2015, ogni anno in Europa vengono individuate circa 400 nuove sostanze psicoattive. Alla

fine del 2019, l'Osservatorio europeo delle droghe e delle tossicodipendenze stava monitorando circa 790 NPS, più del doppio del numero totale di sostanze controllate ai sensi delle Convenzioni delle Nazioni Unite [6].

Solo nel 2020 l'EMCDDA (European Monitoring Centre for Drug and Drug Addiction) monitorava circa 830 NPS, 46 delle quali sono state segnalate in Europa per la prima volta, mentre le altre erano sostanze già conosciute ed entrate recentemente nel mercato illegale, come ad esempio alcuni farmaci legali [2].

Le nuove sostanze psicoattive comprendono un'ampia gamma di molecole tra cui fenilettilamine, oppioidi, triptamine, benzodiazepine, piperazine, arilcicloesilamine, aminoindani, derivati ed estratti di piante e funghi, piperidine, pirrolidine, cannabinoidi sintetici e cationi sintetici. Di queste, i cannabinoidi sintetici ed i cationi sintetici hanno rappresentato quasi il 60 % del numero di sequestri segnalati nel 2019 dagli Stati membri dell'UE, con le arilcicloesilamine (come la chetamina) pari a un ulteriore 10 %. Delle 830 nuove sostanze psicoattive, riportate nel 2020 dal Sistema di Allerta precoce sulle NPS dell'EMCDDA, la maggior parte erano rappresentate da cannabinoidi e cationi sintetici, rispettivamente 209 e 156 [2].

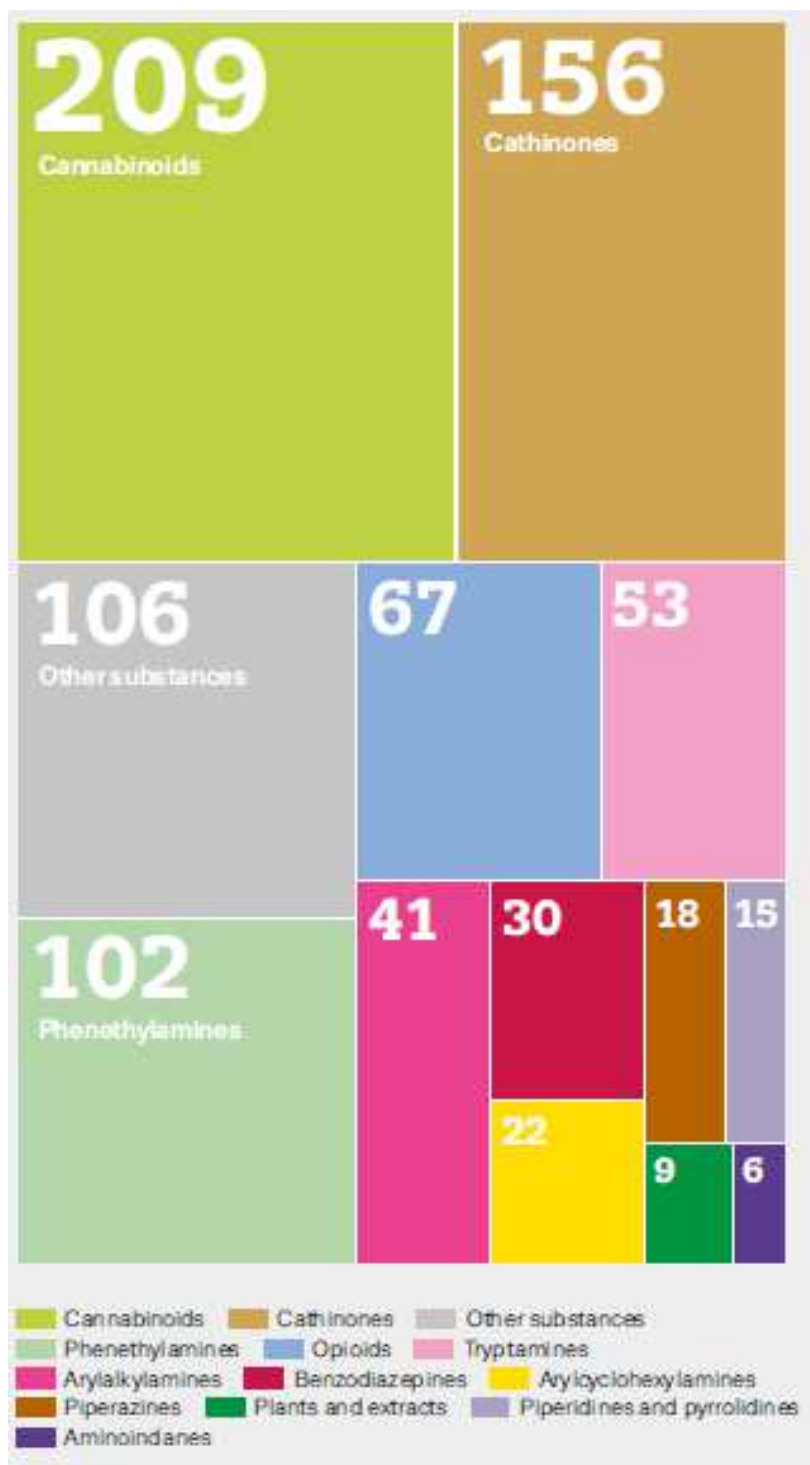


Figura 2: Numero di sostanze monitorate in UE dal Sistema di Allerta Precoce dell'EMCDDA alla fine del 2020.

1.3 Catinoni Sintetici

Il catinone è il principale composto psicoattivo presente nella pianta *Catha edulis* (khat). La struttura chimica di questo stimolante naturale è stata utilizzata come prototipo per lo sviluppo di diversi derivati sintetici, chiamati catinoni sintetici (SCs). Chimicamente, i SCs fanno parte di una vasta famiglia di sostanze, le metilfenetilammine, e sono strutturalmente derivate della fenilalchilammina, che differisce dall'amfetamina solo per la presenza di un gruppo carbonile nella posizione β della catena laterale [7].

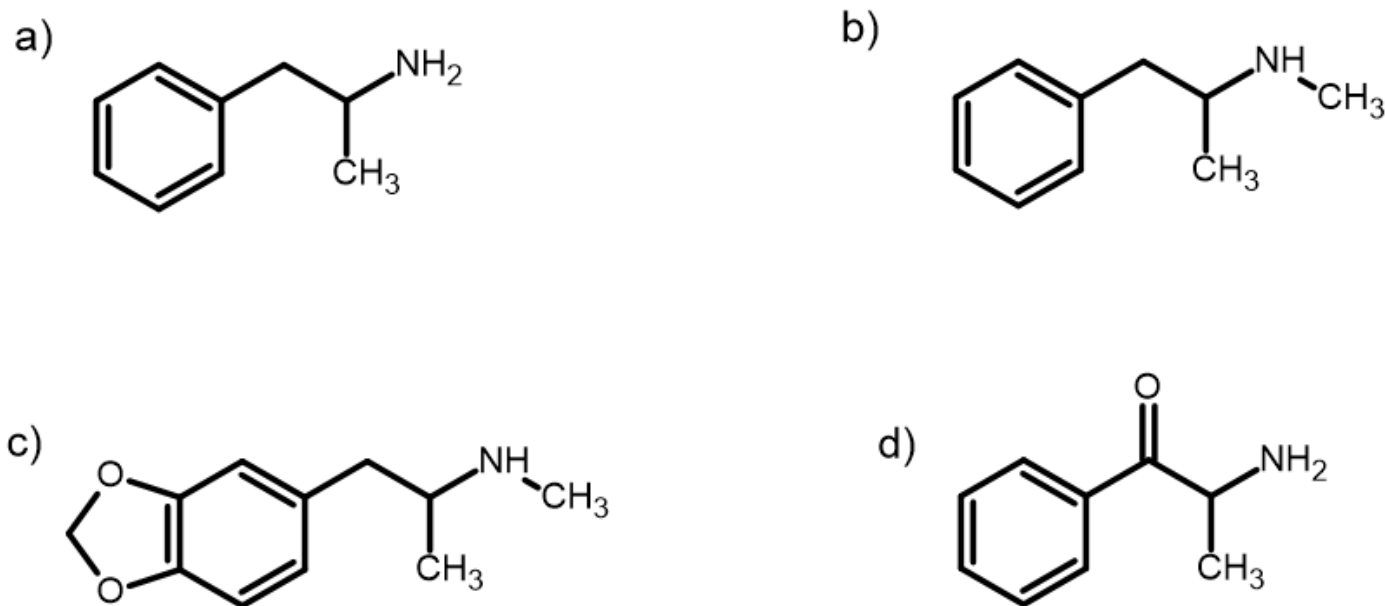


Figura 3: Struttura chimica di: (a) amfetamina; (b) metamfetamina; (c) 3,4-metilenediossimetanfetamina (d) catinone naturale.

Con le amfetamine non condividono solo la struttura chimica, ma anche gli effetti psicostimolanti e allucinogeni, molto simili anche a quelli della cocaina. Infatti, come l'MDMA e la cocaina, i SCs esercitano i loro effetti stimolanti e simpaticomimetici

attraverso l'interazione con i trasportatori di membrana delle monoamine, portando ad un aumento delle concentrazioni sinaptiche di dopamina (DA), noradrenalina (NA) e serotonina (5-HT). I SCs vengono considerati farmacologicamente meno attivi rispetto alle anfetamine a causa della loro maggiore idrofilia, data la presenza del gruppo β -cheto che aumenta la polarità dei cationi sintetici e di conseguenza riduce la loro capacità di attraversare la barriera ematoencefalica, riducendo in questo modo la potenza di questi composti rispetto alle anfetamine [8].

Gli effetti descritti dai consumatori di cationi sintetici sono: buon umore, maggiore fiducia in sé stessi, euforia, facilità di comunicazione interpersonale, maggiore percezione sensuale, apertura nell'esprimere i propri sentimenti, aumento dell'energia, aumento dell'attività psicofisica e funzioni cognitive migliorate come l'aumento della concentrazione, della memoria e sonnolenza ridotta [9].

In generale, le dosi riportate variano da pochi milligrammi a oltre un grammo di polvere. Tuttavia, a causa della purezza sconosciuta degli "sballi legali" e dell'esatta composizione, la dose è difficile da valutare. Infatti, sono state segnalate numerose intossicazioni e casi fatali che coinvolgono il consumo di elevate dosi di SCs, e i sintomi indotti dai loro alti dosaggi includono ipertensione, ipertermia, tachicardia, convulsioni che in alcuni casi culminano in insufficienza multiorgano e conseguente morte [10].

I SCs sono generalmente venduti sotto forma di cristalli o polvere bianca, giallastra o marrone, meno frequentemente come compresse o capsule. Le principali vie di somministrazione sono l'insufflazione nasale e l'ingestione orale. Sono stati riportati

casi di “*bombing*”, in cui la polvere viene avvolta in una carta da sigaretta e ingoiata, iniezioni intramuscolari, iniezioni endovenose, somministrazione rettale, rilascio gengivale ed assorbimento oculare, anche se sono vie di somministrazione meno comuni [8].

La sintesi di tutti i catinoni sintetici parte dalla struttura di base del catinone naturale per subire successivamente svariate modifiche di *design*, portando a una moltitudine di derivati, che possono essere separati in gruppi diversi in base alla sostituzione effettuata [11]. Le possibili modifiche alla struttura del *backbone* del catinone avvengono in quattro diverse posizioni, ovvero l’anello aromatico (R1), la catena laterale alchilica (R2) e il gruppo amminico (R3 e R4), consentendo la sintesi di un numero infinito di derivati. Sulla base di queste modifiche i catinoni sintetici possono essere divisi in 4 classi principali [12]:

- Catinoni 3,4'-metilenediossi-N-alchilati: i catinoni sintetici più comuni vengono sintetizzati aggiungendo un gruppo metilenediossilico all’anello aromatico (R1), ottenendo in questo modo catinoni strutturalmente simili all’MDMA. Il metilone, l’etilone, il butilone e il pentilone sono alcuni esempi di sostanze che appartengono a questo gruppo.
- Catinoni sintetici N-alchilati con o senza sostituenti nell’anello aromatico: a questo gruppo appartengono etcatinone, efedrone, mefedrone e 3,4'-metilmetcatinone.
- Catinoni sintetici N-pirrolidinici con sostituenti nell’anello aromatico: a questo gruppo appartiene ad esempio l’ α -PVP.

- Catinoni 3,4'-metilendiossi-N-pirrolidinici: a questo gruppo appartengono catinoni sintetici che possiedono sia la frazione 3,4'-metilediossi che quella pirrolidinica.

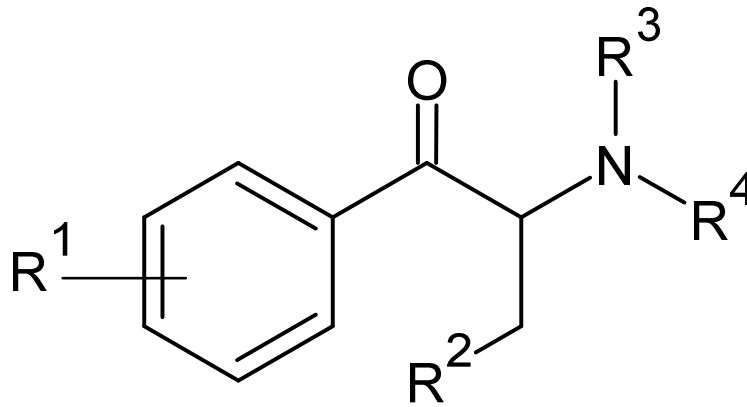


Figura 4: Struttura generica di un catinone sintetico.

La popolarità di queste sostanze, in particolare del mefedrone e del metilone, è aumentata improvvisamente nel 2009, quando è stata osservata una diminuzione senza precedenti della purezza e della disponibilità di MDMA e cocaina [8].

Questo fatto ha portato molti consumatori a passare dai comuni psicotropi ricreativi ai catinoni sintetici, poiché erano più economici e più potenti degli altri stimolanti “tradizionali” disponibili. Negli Stati Uniti nel 2010, di tutti i SCs identificati nelle indagini tossicologiche il metilenediossipirovalerone (MDPV), il mefedrone e il metilone rappresentavano circa il 98%. In Europa tra il 2017 e il 2020, sono stati riportati, nei database dell’EMCDDA, 147 casi di morte dovuta all’assunzione di catinoni sintetici [13].

Generalmente queste NPS vengono prodotte in laboratori clandestini da parte di organizzazioni criminali che sono in grado di cambiare il loro *modus operandi* e di modificare rapidamente la composizione chimica degli SCs, in modo tale da aggirare

le leggi in vigore. Tali cambiamenti risultano essere uno dei principali motivi alla base della difficoltà di controllo della diffusione dei catinoni sintetici, così come quella di moltissime altre NPS [13]. Infatti a seguito dei controlli legislativi sui catinoni sintetici di “prima generazione”, è emersa nel mercato illegale una nuova serie di Scat, come ad esempio il nafirone, apparso nel Regno Unito pochi mesi dopo la criminalizzazione del mefedrone [14].

Attualmente, il numero totale di SCs segnalato all’Ufficio delle Nazioni Unite contro la droga e il crimine è di 148 sostanze [1].

1.4 Controllo delle NPS

Nelle condizioni di un mercato della droga globalizzato, c’è un rischio crescente che nuove sostanze psicoattive potenzialmente dannose possano diffondersi velocemente in più paesi e regioni di tutto il mondo. Quindi, è necessaria una forte risposta globale coordinata per il rilevamento, l’identificazione ed il monitoraggio di queste sostanze.

I problemi maggiori relativi al controllo delle NPS sono i pochissimi, a volte nemmeno disponibili, dati in possesso riguardo la loro tossicità e il loro potenziale cancerogeno. Le informazioni sugli effetti e sui rischi a lungo termine provocati dal consumo di NPS sono in gran parte sconosciuti, così come la purezza e la composizione di prodotti contenenti nuove sostanze psicoattive. Ne consegue che molti consumatori di NPS vengono spesso ricoverati in ospedale con gravi intossicazioni ed effetti collaterali che vanno dalle convulsioni, all’agitazione, all’aggressività, alla psicosi acuta [15].

Dato che le NPS non sono controllate ai sensi delle Convenzioni internazionali sul controllo della droga, il loro stato giuridico varia notevolmente tra i vari Stati.

Alcuni paesi agiscono modificando legislazioni già esistenti per cercare di porre le NPS sotto il controllo giuridico, altri invece utilizzano strumenti giuridici innovativi.

Negli ultimi anni, in molti paesi dove è rapidamente emerso un gran numero di diverse nuove sostanze stupefacenti, è stata introdotta una nuova legislazione per “criminalizzare” più NPS possibili sulla base della “somiglianza chimica” tra queste NPS e sostanze già controllate [16].

I governi di tutte le Nazioni sono assistiti in questa sfida dall'United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), che ha istituito nel 2013 l'*Early Warning Advisory* (EWA) sulle NPS con lo scopo di monitorare, analizzare e riportare le tendenze sulle NPS, come base per risposte politiche efficaci di tutti gli Stati membri.

I dati disponibili fino al 24/01/2022, indicano che le NPS sono diventate, rapidamente ed in maniera allarmante, un fenomeno globale, con ben 135 paesi e territori di tutte le regioni del mondo che hanno segnalato uno o più NPS, arrivando ad un totale di 1.124 nuove sostanze psicoattive disponibili segnalate in tutto il mondo [16].

A causa della crescente e continua introduzione di NPS in tutto il mondo, molti governi hanno iniziato a istituire dei propri sistemi di allerta precoce a livello nazionale. Questi sistemi nazionali sono stati successivamente riuniti sotto sistemi di allerta precoce più ampi. L'esempio più avanzato di meccanismo di allerta precoce regionale è l'EWS dell'Unione europea (EU EWS) che include gli EWS nazionali di 30 paesi europei ed è concepito per aiutare l'Unione Europea a rilevare, valutare e

rispondere rapidamente alle minacce sanitarie e sociali causate dalle nuove sostanze psicoattive. Il sistema è gestito dall'European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) e funziona da oltre 20 anni [17].

1.5 Sistema Nazionale di Allerta Precoce (SNAP)

Nel 2009 in Italia è stato istituzionalizzato il Sistema Nazionale di Allerta Precoce e Risposta Rapida per le Droghe (SNAP), da parte del Dipartimento Politiche Antidroga (DPA).

Lo SNAP collabora con tutti gli Stati Membri dell'Unione Europea ed ha come obiettivo quello di “Individuare tempestivamente e fornire notizie aggiornate di tutte quelle nuove droghe, potenzialmente pericolose per la salute pubblica, circolanti sul territorio (nazionale, europeo e internazionale), ma anche sulle nuove modalità di consumo di sostanze stupefacenti già tabellate, sulla presenza di adulteranti, di additivi pericolosi o di altre sostanze psicoattive o farmacologicamente attive in combinazione con sostanze psicotrope, spesso nascoste in vari tipi di nuovi prodotti in vendita via web o nei cosiddetti *smart-shops*, o elevate concentrazioni di principio attivo di sostanze già tabellate” [18].

Nel 2016 è stato affidato al Centro Nazionale Dipendenze e Doping dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) il compito di coordinare a livello operativo il Sistema d'Allerta, con il supporto di tre unità operative:

- Direzione Centrale per i Servizi Antidroga (DCSA), che ha funzioni di coordinamento delle Forze di Polizia.

- Centro Antiveleni e Centro Nazionale di Informazione Tossicologica, che si occupa degli aspetti clinico-tossicologici.
- L'Unità di Ricerca di Tossicologia Forense del Dipartimento di Scienze Anatomiche Istologiche Medico Legali e dell'Apparato Locomotore (SAIMLAL) dell'Università Sapienza di Roma, che cura gli aspetti bio-tossicologici e analitici.

Un aiuto fondamentale per lo SNAP sono le collaborazioni con il Reparto di Investigazioni Scientifiche dei Carabinieri, con la Polizia Scientifica e con l'Agenzia delle Dogane, oltre alle informazioni provenienti dai Servizi per le Dipendenze, dalle strutture di emergenza, dalle unità mobili e dalle comunità terapeutiche, che sono in grado di fornire un'osservazione diretta sul campo dei consumatori.

Nel 2020 le segnalazioni provenienti dall'Italia e dall'EMCDDA hanno riguardato in totale 103 NPS di cui catinoni sintetici, oppioidi sintetici e cannabinoidi sintetici sono stati i gruppi di sostanze psicoattive più segnalati (26, 14 e 14 rispettivamente).

A questi numeri si aggiungono le segnalazioni per le sostanze d'abuso classiche quali cannabinoidi, oppiacei, cocaina, amfetamine, LSD, psilocibina, dimetiltriptamina, eccetera [19].

Di fronte a questi dati allarmanti è stato lanciato, da parte del Centro Nazionale Dipendenze e Doping dell'ISS, il progetto NPS-LABVEQ con lo scopo di implementare la performance e la capacità metodologica dei laboratori, facenti parte dello SNAP, di mettere a punto metodiche per la determinazione qualitativa e

quantitativa delle NPS, sia in matrici convenzionali come sangue ed urina che in matrici non convenzionali come matrice cheratinica, saliva e sudore [20].

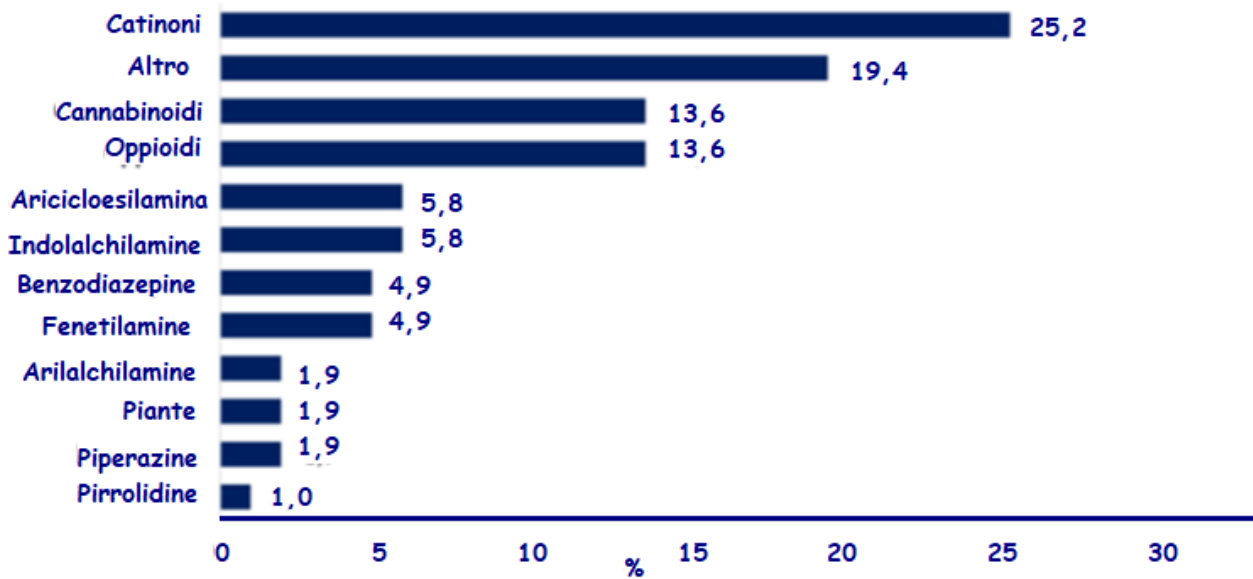
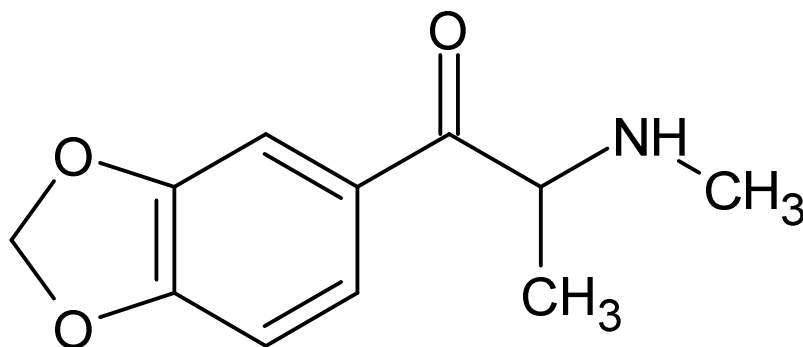


Figura 5: Prevalenza percentuale delle NPS segnalate allo SNAP. Istituto Superiore di Sanità, 2019.

2.SOSTANZE PSICOATTIVE DI INTERESSE

2.1 METILONE



Formula molecolare: $C_{11}H_{13}NO_3$

Massa molare: 207,2 g/mol

Figura 6: Struttura chimica del 3,4-Metilendiossimetcatinone.

Il 3,4-Metilenediossimetcatinone, più comunemente noto come metilone o MDMC, è un catinone sintetico 3,4'-metilenidiosi-N-alchilato. Viene anche definito beta-keto MDMA (o più brevemente bk-MDMA) in quanto l'unica differenza strutturale del metilone rispetto a MDMA è la sostituzione di due atomi di idrogeno con un atomo di ossigeno nella posizione β del nucleo della feniletilamina, formando un gruppo chetonico [21].

Nel 1996, il metilone è stato sintetizzato per la prima volta ed è stato brevettato come agente antidepressivo e anti-parkinsonismo, ma non è mai stato commercializzato come farmaco a causa della sua forza psicostimolante, strettamente correlata all'MDMA. Intorno al 2004, il metilone è emerso nel mercato illegale giapponese ed europeo con il nome commerciale di "Explosion" ed ha subito acquistato popolarità come sostituto alla tradizionale MDMA [22].

Il metilone condivide con l'MDMA non solo la struttura chimica ma anche il meccanismo d'azione. È infatti un substrato dei trasportatori delle monoamine (SERT, DAT, NET) che lo trasportano all'interno del neurone dove agisce sia come inibitore che come agonista. L'inibizione del trasportatore vescicolare per le monoamine di tipo 2 (VMAT2) blocca il trasporto dei neurotrasmettitori serotonina, noradrenalina e dopamina all'interno delle vescicole plasmatiche, aumentando di conseguenza la loro concentrazione nel citosol. Invece, l'azione agonista nei confronti del recettore associato alle monoamine (TAAR) attiva le protein chinasi A e protein chinasi C che portano alla fosforilazione dei trasportatori e provocano l'inversione del trasporto delle monoamine, che vengono prelevate dal citosol e immesse nel vallo sinaptico. L'elevato e rapido aumento della concentrazione nel vallo sinaptico, in particolare della serotonina, è responsabile degli effetti psicoattivi del composto [23].

Il metilone viene venduto sotto forma di una polvere bianca cristallina o come un liquido dalla colorazione gialla. La dose media comunemente assunta dai consumatori abituali varia da 75 mg a 125 mg (singola dose), come per l'MDMA, la durata degli effetti varia dalle 3 alle 5 ore e presenta effetti meno forti, ma più costanti rispetto all'Ecstasy [23]. Gli effetti più blandi ma prolungati del metilone rispetto alle anfetamine sono causati, come per i catinoni sintetici in generale, dalla presenza del gruppo β -cheto che aumenta la polarità e di conseguenza riduce la capacità di attraversare la barriera ematoencefalica [8].

Le modalità di assunzione più comuni sono tramite ingerimento, aspirazione o respirazione dei fumi provocati dalla sua combustione. Gli effetti ricercati del metilone sono simili a quelli di altri catinoni sintetici e di altri stimolanti e possono includere aumento di energia, miglioramento dell'umore, euforia ed effetti psicoattivi [24]. Gli effetti avversi, riportati dai consumatori, includono attacchi di panico, tremori, depressione e psicosi e sono anche associati a sintomi neurologici, cardiovascolari e psicopatologici come tachicardia, allucinazioni, deliri, violenza, tendenze aggressive e morte [25].

Il metilone viene principalmente metabolizzato nel fegato ed il *pathway* attraverso cui il composto viene metabolizzato più frequentemente consiste in tre fasi principali:

- N-demetilazione;
- O-demetilazione;
- O-metilazione.

La N-demetilazione del metilone è regolata dal CYP2D6 e dà origine al 3,4-metilendiossicatinone (MDC) a partire dal composto progenitore. Il composto progenitore può essere poi O-demetilato a 3,4-diidrossi-N-metilcathinone (HHMC) e quest'ultimo viene successivamente O-metilato dall'enzima catecol-O-metiltransferasi (COMT) dando origine al 4-idrossi-3-metossi-N-metilcathinone (HMMC). Lo schema del principale *pathway* metabolico è riportato nella Figura 7. Come per i metaboliti dell'MDMA, sia HHMC che HMMC, non vengono ritrovati nel plasma e nelle urine nella loro forma libera ma principalmente come loro

coniugati glucuronidi e solfati. Questo fatto rende necessaria l'idrolisi enzimatica/acida dei campioni di plasma per la loro determinazione [26].

In uno studio sul metabolismo del metilone nell'uomo e nei ratti, HMMC è risultato il metabolita più abbondante in entrambi i campioni analizzati. La quantità di HMMC urinario escreto entro le prime 48 ore nei ratti era di circa il 26% della dose iniziale (singola somministrazione intraperitoneale di 5 mg/kg-1) e la quantità del metilone originario non era superiore al 3%. Gli stessi risultati sono stati ottenuti nell'uomo [27].

Similmente alle fenetilammine, anche i derivati del catinone si presentano in due forme stereoisomeriche e questi enantiomeri possono differire in termini di attività biologica e tossicologia. Studi farmacologici indicano che la potenza degli enantiomeri S è quasi tre volte maggiore di quella delle loro forme R [28].

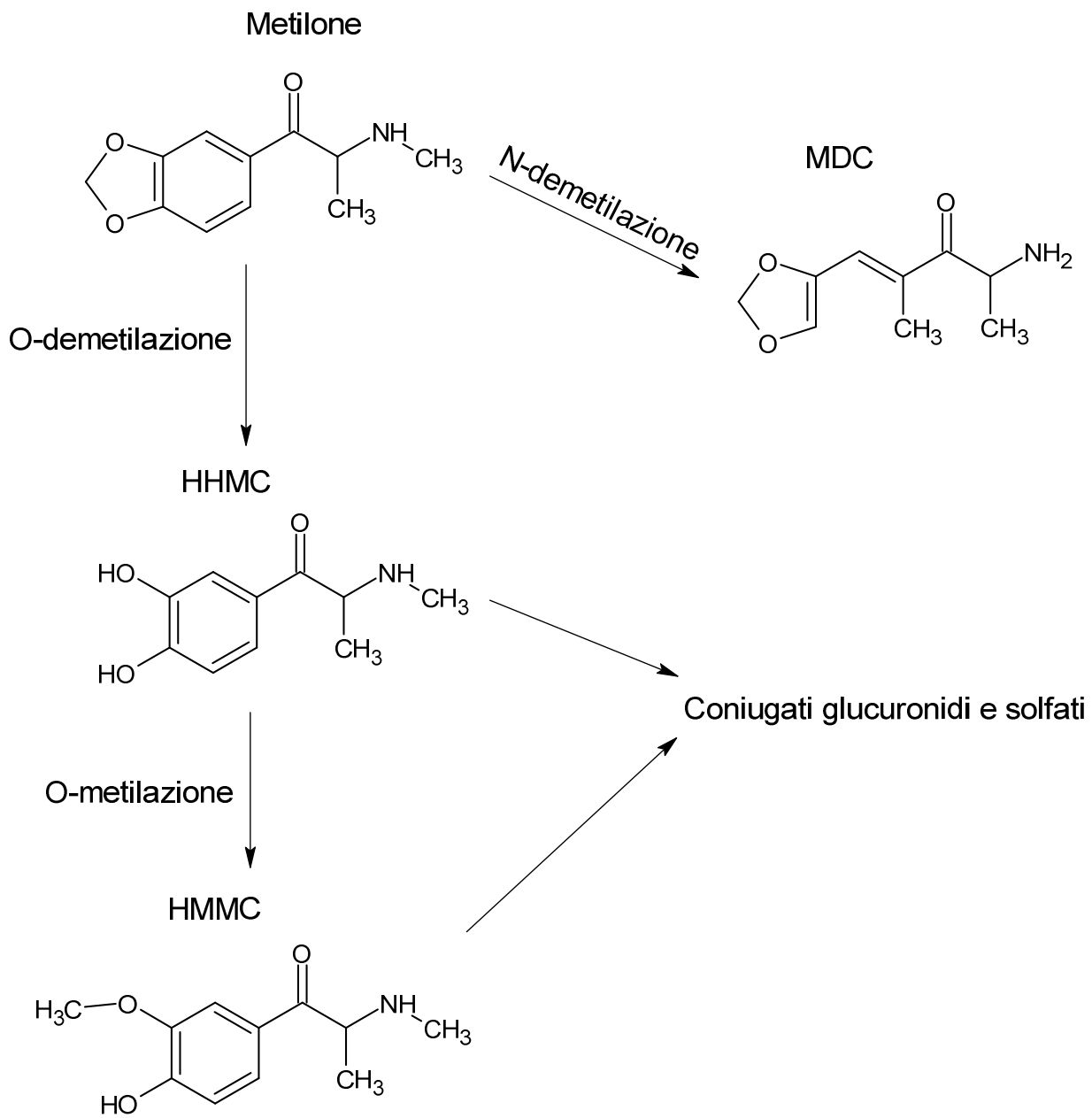
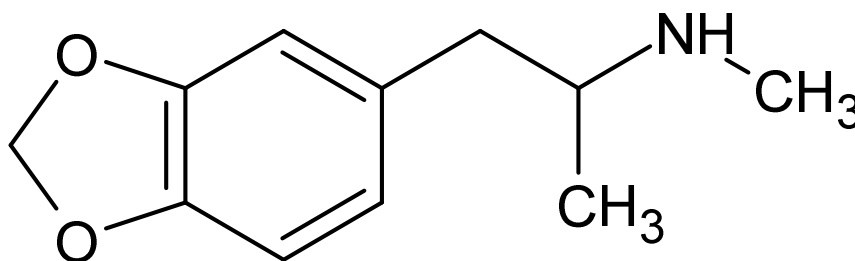


Figura 7: Principale pathway metabolico del 3,4-Metilendiossimetcatinone.

2.2 MDMA



Formula molecolare: $C_{11}H_{15}NO_2$

Massa molare: 193.2 g/mol

Figura 8: Struttura chimica della 2,3-Metilendioossimetamfetamina.

La 3,4-metilendioossimetamfetamina, più comunemente nota come MDMA o Ecstasy, è una sostanza psicoattiva semisintetica, appartenente alla classe delle feniletilamine, illegale e controllata al pari di altri stupefacenti. Il composto è ottenuto comunemente a partire dal safrolo, uno degli olii essenziali presenti nel sassofrasso, nella noce moscata, nella vaniglia, nella radice di acoro, e in diverse altre spezie vegetali.

L'MDMA possiede spiccati effetti stimolanti ed entactogeni, anche se non propriamente psichedelici in quanto agisce come potente *releaser* delle monoamine serotonina, noradrenalina e dopamina. Esattamente come il metilone, l'MDMA funge da substrato dei trasportatori delle monoamine, inducendo l'inversione o inibendo l'attività dei trasportatori delle monoamine. Queste azioni sul sistema monoaminergico provocano un aumento dei livelli cerebrali extracellulari di monoamine, principalmente di serotonina [29].

L'MDMA viene assunta generalmente sotto forma di pastiglie o cristalli, disciolti in liquidi o meno comunemente fumati. La dose comunemente assunta dai consumatori

abituale varia da 75mg a 125mg (singola dose). L'abuso può comportare enormi rischi per la salute psicofisica dei consumatori. Gli effetti riscontrati più frequentemente dopo la somministrazione di MDMA sono euforia, benessere, felicità, aumento di energia, maggiore empatia, aumento della socialità, lievi disturbi percettivi, alterata percezione dei colori e dei suoni, aumento della pressione sanguigna e aumento della frequenza cardiaca [30].

Quando assunta per via orale, i primi effetti cominciano a manifestarsi dopo circa 40 minuti e la massima concentrazione plasmatica viene raggiunta in 1-3 ore circa.

Gli effetti durano qualche ora, fino a quando non vengono esaurite le riserve cellulari di serotonina. I livelli di serotonina tendono a ristabilirsi, nel consumatore occasionale, nel giro di qualche giorno. L'emivita del composto è di circa 8-9 ore.

In letteratura è riportato che una dose di tale composto, dopo 40 minuti dalla somministrazione, è stata in grado di aumentare del 900% i livelli extracellulari di serotonina [30].

Come altre anfetamine, l'MDMA è formata da un centro chirale con una coppia di enantiomeri (la miscela racemica è quella che viene assunta maggiormente) che mostrano diverse attività farmacologiche, metabolismo stereoselettivo e diversa disposizione corporea. L'isomero S dell'MDMA è responsabile degli effetti psicostimolanti ed empatici, rispetto alle proprietà di tipo allucinogeno dell'isomero R [31].

L'MDMA nell'uomo è principalmente metabolizzato dal fegato ed il *pathway* metabolico prevede le stesse tre fasi principali del metilone: La N-demetilazione

dell'MDMA è regolata dal citocromo p450 (CYP450) e dà origine alla 3,4-metilendiossiamfetamina (MDA). Il composto progenitore e l'MDA sono ulteriormente O-demetilati a 3,4-diidrossimetamfetamina (HHMA) e 3,4-diidrossiamfetamina (HHA), rispettivamente. Sia HHMA che HHA vengono successivamente O-metilati dall'enzima catecol-O-metiltransferasi (COMT) a 4-idrossi-3 metossimetamfetamina (HMMA) e 4-idrossi-3-metossiamfetamina (HMA), rispettivamente. Questi metaboliti sono presenti principalmente nel plasma e nelle urine come loro coniugati glucuronidi e solfati [32].

Lo schema del principale *pathway* metabolico della 3,4-metilendiossimetamfetamina è riportato nella Figura 4.

L'MDA sembra essere un metabolita minore e rappresenta l'8-9% delle concentrazioni di MDMA. HHMA e HMMA sono i principali metaboliti dell'MDMA sia nel plasma che nelle urine e non si trovano nella loro forma libera, ma sotto forma di coniugati con acido glucuronico o solfato, che rendono necessaria l'idrolisi enzimatica/acida dei campioni di plasma per la loro determinazione.

L'HMA è un metabolita minore dell'MDMA, come lo è per l'MDA, il suo precursore metabolico [33].

L'MDMA ed i suoi metaboliti possono essere facilmente rilevati in matrici biologiche diverse da urina e plasma. Sono stati condotti studi che ne mostrano la rilevazione e la cinetica nella saliva nel sudore e nei capelli [34–37].

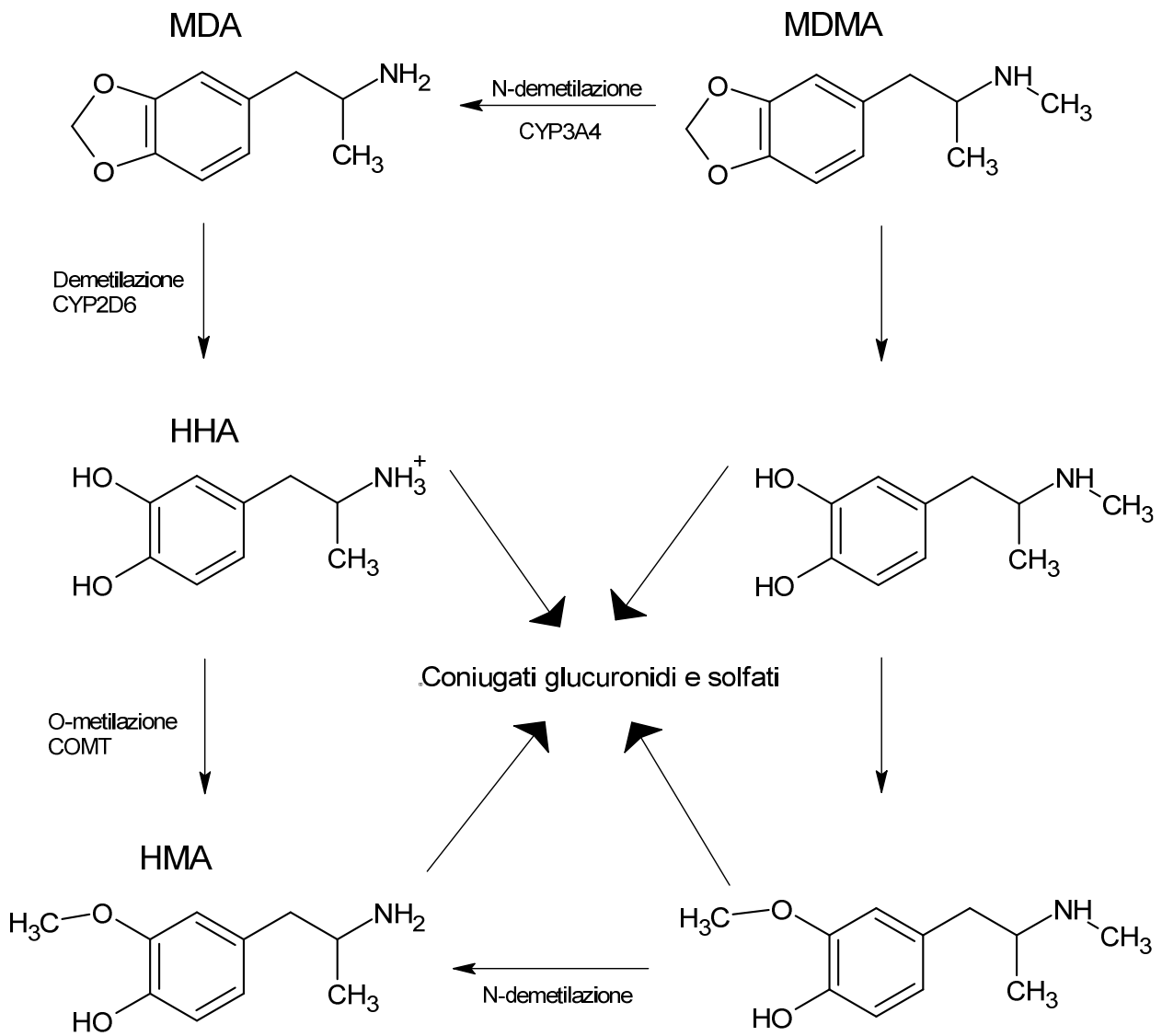


Figura 9: Principale pathway metabolico della 2,3-Metilendirossimetamfetamina.

3. STUDIO DELLA FARMACOCINETICA

3.1 Farmacocinetica non lineare dell'MDMA

In uno studio, tramite somministrazione controllata di farmaci, 14 volontari sani hanno assunto dosi differenti di MDMA (75-125 mg) e sono stati successivamente analizzati i campioni di sangue e urina. I risultati di questo studio hanno mostrato che, sebbene l'HMMA fosse il prodotto principale nel plasma dopo la somministrazione di 50, 75 e 100 mg, la situazione era opposta quando venivano somministrate dosi più elevate, con l'MDMA predominante [38].

Dose mg (μmol)	Numero	Recupero urinario (μmol)				Dose estratta (%)
		MDMA	MDA	HMMA	HMA	
50 (259)	2	20.7-40.9	1.4-1.0	152.0-89.2	4.7-4.2	69.1-38.3
75 (388)	8	71.2 \pm 13.7	3.5 \pm 0.9	128.3 \pm 21.8	5.4 \pm 0.4	53.7 \pm 11.4
100 (518)	2	232.6-74.7	1.4-15.6	59.8-124.0	2.9-6.8	57.3-40.7
125 (647)	8	169.6 \pm 69.5	6.4 \pm 2.7	148.3 \pm 102.8	6.2 \pm 3.7	51.0 \pm 16.2
150 (776)	2	160.3-333.3	2.6-4.7	122.2-82.4	4.1-3.7	37.3-54.7

Figura 10: Escrezione urinaria dell'MDMA e relativi metaboliti a diverse concentrazioni del farmaco somministrato. R. de la Torre et al. 2000, "Non-linear pharmacokinetics of MDMA ('ecstasy') in humans".

Questi risultati indicano che le concentrazioni urinarie di MDMA non aumentano proporzionalmente alla dose assunta. Il farmaco presenta quindi una farmacocinetica non lineare, probabilmente mediata dalla formazione di un complesso CYP2D6-metabolita. In particolare, si pensa che il gruppo metilendiossi, presente nella struttura chimica dell'MDMA, sia responsabile dell'autoinibizione del suo metabolismo, principalmente della sua O-demetilazione a HHMA [33].

Dato che i consumatori di ecstasy assumono spesso più di una dose per sessione, l'autoinibizione del metabolismo dell'MDMA potrebbe avere gravi implicazioni per la tossicità acuta e a medio-lungo termine. In uno studio condotto su 9 soggetti sani, l'MDMA (100 mg) o il placebo sono stati somministrati in 2 dosi successive separate da un intervallo di 24 ore. Dalle analisi si è visto che dopo la seconda dose l'aumento della concentrazione plasmatica di MDMA è maggiore di quella attesa dal semplice accumulo. I risultati di questo studio supportano il concetto di farmacocinetica non lineare dell'MDMA e suggeriscono che l'inibizione del CYP2D6 dura almeno 24 ore [39].

3.2 Lo studio

Le conseguenze tossicologiche della farmacocinetica non lineare non si conoscono a fondo ed i soggetti che consumano MDMA non sono consapevoli che molto tempo dopo la sua assunzione, l'enzima CYP2D6 viene inibito. Inoltre i substrati di questo enzima (MDMA e MDA) potrebbero essere responsabili di interazioni farmacocinetiche che portano ad effetti tossici e neurotossici acuti.

Partendo da questi presupposti, risultano fondamentali sia ulteriori studi sul metabolismo dell'MDMA e dei relativi metaboliti, che nuovi studi approfonditi sulla farmacocinetica dei catinoni sintetici nell'uomo.

Come detto in precedenza esistono molteplici somiglianze tra il metilone e l'MDMA: l'unica differenza strutturale è la sostituzione di due atomi di idrogeno con un atomo di ossigeno nella posizione β del nucleo della feniletilamina, agiscono entrambi come substrato dei trasportatori delle monoamine e presentano lo stesso *pathway*

metabolico principale. Dato che CYP2D6, enzima inibito nella farmacocinetica non lineare dell'MDMA, è responsabile della O-demetilazione sia dell'MDMA che del metilone, è facile ipotizzare che anche il 3,4-metilenediossimetcatinone presenti una farmacocinetica non lineare.

Ad oggi, esistono pochissimi studi, alcuni dei quali *in vitro* (mediante incubazione di epatociti e vari enzimi ricombinanti) ed altri *in vivo*, sulla farmacocinetica del metilone, ma nessuno di questi è stato effettuato su matrici biologiche umane [26-40].

Questo lavoro si pone come obiettivo quello di studiare la farmacocinetica del metilone nell'uomo, confrontando i dati ottenuti con quelli relativi alla farmacocinetica dell'MDMA e valutando se anche il 3,4-metilenediossimetcatinone presenta una farmacocinetica non lineare. Per questo scopo è stato sviluppato nuovo metodo di cromatografia liquida ad alta prestazione, accoppiata con una spettrometria di massa in tandem (HPLC-MS/MS).

I campioni reali di plasma sono stati ottenuti mediante la collaborazione con l'Universitat Autònoma de Barcelona e sono stati prelevati da volontari sani a cui sono state somministrate differenti dosi di metilone, MDMA o placebo in un trial clinico, approvato dal comitato etico locale (CEI-HUGTiP ref. PI17/163).

4. MATERIALI E METODI

4.1 Sostanze chimiche e reagenti

Gli standard puri (MDMA, MDA, HMMA, HMA, HMMC e metilone) sono stati acquistati dall'azienda Cerilliant Analytical Reference Standards (Texas, USA).

Gli standard interni deuterati (ISs) erano MDMA-d₅, MDA-d₅ e metilone-d₃ e sono stati acquistati dall'azienda Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA).

Gli standard interni, gli standard puri e le relative soluzioni madre in metanolo, sono state conservate a -20°C fino al momento dell'analisi.

Metanolo, acetonitrile, acqua, acido formico (di grado analitico LC-MS), etil-acetato e cloroformio sono stati acquistati dalla Carlo Erba (Cornaredo, Italia).

L'idrossido di ammonio (purezza del 25%) e l'acido cloridrico (purezza del 37%) sono stati acquistati dall'azienda Honeywell Fluka™ (Morristown, USA).

4.2 Preparazione degli standards e delle soluzioni di calibrazione e dei controlli di qualità

Una soluzione *stock* di standard interno a 100 ng/mL è stata preparata aggiungendo 100 µL di ogni IS (MDMA d₅, MDA d₅ e metilone d₃) a 700 µL di metanolo.

Una soluzione *stock* a 100 ng/mL e una soluzione *stock* a 1 µg/mL sono state preparate in metanolo a partire da ogni standard puro.

Sulla base di un'iniziale analisi semiquantitativa dei campioni di plasma autentici, sono stati scelti un totale di 6 calibratori (0.5-5-25-50-250-500 ng/mL) per la costruzione della curva di calibrazione per metilone ed MDMA. Si è deciso di utilizzare punti di calibrazione più alti rispetto a quelli normalmente usati per le

amfetamine, che normalmente arrivano fino a 100 ng/mL, dato che le concentrazioni di metilone risultavano essere notevolmente maggiori, come riscontrato da analisi quantitative precedenti e come suggerito dalle informazioni ottenute in bibliografia [24]. Altri 6 calibratori (0,1-1-5-10-25-50 ng/mL) sono stati utilizzati per costruire una curva con punti di calibrazione per i metaboliti delle sostanze di interesse.

Infine, per quanto riguarda i controlli di qualità (QC), le *working solutions low, medium e high* sono state preparate a partire 5 campioni di plasma differenti e contenevano rispettivamente 1,5-150-350 ng/mL (per metilone ed MDMA) e 0,3-15-35 ng/mL (per i metaboliti).

4.3 Condizioni strumentali

La separazione degli analiti è stata ottenuta tramite HPLC 1290 Infinity II (Agilent Technologies Italia S.p.a.) accoppiato ad uno spettrometro di massa in tandem (6470A Triple Quadrupole LC-MS) dotato di una sorgente di ionizzazione elettrospray, operante in modalità ionica positiva (ESI+).

I dati sono stati acquisiti con il *software* MassHunter® Workstation Quantitative Analysis 10.0 (Agilent).

4.3.1 Condizioni cromatografiche

Per la separazione cromatografica del metilone, dell'MDMA e dei relativi metaboliti è stata utilizzata una colonna cromatografica Phenyl-Hexyl 100, fornita da Phenomenex® (Torrance, California, Stati Uniti) di lunghezza: 100 mm, diametro interno: 2,1 mm, dimensione delle particelle: 2,6 µm). Il tempo necessario alla corsa è stato di 6 minuti, con un gradiente di fasi mobili composto da 0.1% di acido formico in acqua (fase mobile A) ed acetonitrile (fase mobile B) ad una portata di 0.4 e 0.5

mL/min. Le condizioni iniziali erano 5% di fase mobile B, tenuta per 1 minuto, incrementata gradualmente prima a 50% entro 2 minuti, poi a 95% entro 4 minuti ed infine decrementata a 5% e tenuta fino a fine corsa.

Il volume di iniezione del campione era di 1 µL. I dettagli delle composizioni delle fasi mobili e del gradiente cromatografico sono riportati in Tabella 1. La colonna è stata mantenuta ad una temperatura di 37°C mentre l'Autosampler è stato mantenuto a 10°C.

Tabella 1: Composizioni delle fasi mobili e gradiente cromatografico.

Tempo	Fase mobile A %	Fase mobile B %	Portata (mL/min)	Limite massimo di pressione (bar)
0	95	5	0.4	1300
1	95	5	0.5	1300
3	50	50	0.5	1300
3.1	5	95	0.5	1300
4	5	95	0.5	1300
4.1	95	5	0.5	1300
6	95	5	0.5	1300

4.3.2 Condizioni dello spettrometro di massa

Per lo spettrometro di massa è stata utilizzata la modalità *multiple reaction monitoring* (MRM) con una transizione quantitativa e una qualitativa per ciascun analita e ciascun internal standards.

Le condizioni della sorgente erano:

- Voltaggio capillare: 3500 V;
- Temperatura del gas: 300°C;
- Portata del gas: 10 l/min;
- Portata del gas di desolvatazione: 12 L/min.

4.4 Caratterizzazione delle molecole

Prima dell'analisi vera e propria, le molecole di interesse sono state caratterizzate. Il processo di caratterizzazione è stato condotto automaticamente utilizzando lo strumento "MassHunter Optimizer" fornito da Agilent.

1 µl di ogni soluzione alla concentrazione di 100 ng/ml degli standard puri (MDMA, MDA, HMMA, HMA, metilone e HMMC) e degli standard interni (MDMA-d₅, MDA-d₅ e metilone-d₃) in metanolo, è stato iniettato nello strumento HPLC-MS/MS.

La caratterizzazione è stata testata sia in modalità di ionizzazione positiva che negativa, ma in quest'ultima modalità non è stato rilevato alcun segnale.

Per ogni molecola di interesse è stata quindi scelta una transizione qualitativa ed una transizione quantitativa, sulla base delle abbondanze ottenute. Le transizioni scelte ed i relativi tempi di ritenzione sono riportati nella Tabella 2.

Tabella 2: Parametri di spettrometria di massa.

Composto	Massa molecolare (g/mol)	Ione precursore (m/z)	Ione prodotto (m/z)	Tempo di ritenzione (min)	Energia di collisione	Frammentatore	Polarità
MDMA	193.25	194.25	105 163	2.319 2.319	25 9	110	Positiva
MDMA-d5	198.25	199.25	107.1 165.1	2.315 2.315	29 13	110	Positiva
MDA	179.22	180.22	77.1 105.1	2.165 2.165	45 25	90	Positiva
MDA-d5	198,27	199,27	110.1 168.1	2.140 2.160	24 8	104	Positiva
HMMA	231.7	232.7	165 105.1	1.314 1.314	8 25	118	Positiva
HMA	181	182	105.1 165.1	0.378 0.738	24 8	94	Positiva
Methylone	207.23	208.23	132.1 160.1	2.092 2.092	29 17	30	Positiva
Methylone-d3	212.23	213.23	163	2.087	16	136	Positiva
HMMC	209.24	210.24	192.1 160.1	1.266 1.266	12 16	102	Positiva

Legenda: MDMA, 2,3-Metilendiossimetamfetamina; MDA, 3,4-Metilenediossiamfetamina; HMMA, 4-Idrossi-3-metossimetamfetamina; HMA, 4-idrossi-3-metossiamfetamina; HMMC, 4-idrossi-3-metossimetcatinone.

4.5 Protocollo di estrazione

A 100 μL di campione reale sono stati aggiunti 2 μL di una soluzione 2% di NH_2 in H_2O , fino ad arrivare ad un pH di 9, che è stato controllato per ogni campione con le cartine al tornasole.

Una volta basificato il campione sono stati aggiunti 10 μL della mix di standards interni alla concentrazione di 100 ng/mL ed il campione è stato vortexato.

Sono stati poi aggiunti 2 mL di una soluzione di cloroformio ed etil-acetato 9:1 (v:v).

Il campione è stato posto per 10 minuti in un *roller mix*, seguito da una centrifugazione per 5 minuti a 3500 rpm.

Il sovranatante è stato raccolto e trasferito in provette pulite, addizionato con 100 µL di una soluzione contenente metanolo acidificato (1% HCl), vortexato e posto ad evaporare a temperatura ambiente sotto un flusso di azoto.

Ottenuta la completa evaporazione, il campione è stato ricostituito con 100 µL di fase mobile A e fase mobile B rapporto 95:5 (v:v) e trasferito in una *vial* con l'inserto. Le *vials* sono state caricate nell'autocampionatore e 1 µL di ogni campione è stato infine iniettato nel sistema cromatografico.

4.6 Validazione del metodo

Durante la convalida del metodo sono stati valutati parametri quali accuratezza, imprecisione, limite di detezione (LOD), limite di quantificazione (LOQ), linearità, carryover, effetto matrice (EM), recupero (RE) e integrità della diluizione seguendo il protocollo raccomandato dall'Organizzazione Comitati di area (OSAC) per la scienza forense [41].

Linearità

I range di calibrazione sono stati scelti tra 0.5-500 ng/mL per metilone ed MDMA e 0.1-50 ng/mL per i relativi metaboliti. La linearità è stata stabilita preparando una curva di calibrazione in cinque giorni consecutivi. Il LOD, concentrazione più bassa che può essere rilevata in modo affidabile con un determinato metodo analitico, ed il LOQ, la concentrazione più bassa che può essere quantificata con un dato metodo analitico con adeguata accuratezza e precisione, sono stati valutati in replicati, utilizzando 5 campioni di plasma fortificati con gli analiti di interesse.

Precisione e accuratezza

La precisione e l'accuratezza sono state determinate utilizzando tre replicati a tre diverse concentrazioni per ciascun analita, durante cinque diverse analisi. Le concentrazioni target per i campioni di QC *low, medium e high* nel plasma sono stati: 1.5, 150, 350 ng/mL per metilone ed MDMA, 0.3, 15, 35 ng/mL per i metaboliti. Se i campioni si trovavano entro $\pm 20\%$ della concentrazione prevista, la precisione e l'accuratezza era considerata accettabile.

Carryover, effetto matrice e recupero

Il *carryover* è stato valutato per tutti i composti analizzando cinque campioni bianchi di plasma umano, estratti dopo il calibratore più alto. Il recupero è stato valutato confrontando le concentrazioni finali dei campioni di QC (*low, medium e high*) pre e post analisi. L'effetto matrice è stato valutato utilizzando 5 campioni bianchi di plasma umano per ciascun *quality control*.

Integrità

L'integrità dei campioni dopo diluizione è stata valutata analizzando campioni di plasma bianco umano addizionati con metilone, MDMA e relativi metaboliti a quattro diverse diluizioni, 1:2, 1:5, 1:10 e 1:20 in cinque replicati ciascuna. Se i campioni risultavano quantificati entro $\pm 20\%$ della concentrazione prevista, l'integrità della diluizione era considerata accettabile.

Stabilità

La stabilità a breve termine degli analiti è stata valutata fortificando campioni bianchi di plasma con tutti gli analiti a concentrazioni QC *low, medium e high*. I campioni

sono stati analizzati in tre diverse condizioni: temperatura ambiente per 24 ore, refrigerazione (4°C) per 24 ore e 3 cicli di congelamento/scongelo (-20°C). La stabilità dei campioni processati è stata valutata analizzando campioni di QC *low*, *medium* e *high*, lasciati per 24 ore nell'*autosampler*, prima della nuova analisi. Gli analiti sono stati considerati stabili se le concentrazioni osservate risultavano entro il 20% del target.

4.7 Protocollo di sperimentazione clinica

I campioni sono stati raccolti da 12 volontari sani di sesso maschile, di età compresa tra 18 e 45 anni e con un peso corporeo compreso tra 50 e 90 kg, che hanno partecipato ad uno studio farmacologico effettuato dall'Universitat Autònoma de Barcelona. Lo studio della durata di 7 settimane prevedeva una somministrazione controllata, per via orale, di MDMA, metilone e placebo, sotto forma di capsule della stessa dimensione, colore e forma. I 12 volontari sono stati divisi in 4 gruppi di studio ed ogni soggetto anonimo è stato sottoposto a 3 sessioni di somministrazione, effettuate a distanza di almeno 5/7 giorni. Le capsule di MDMA contenevano ciascuna 100 mg del farmaco, le capsule di placebo contenevano lattosio mentre le capsule di metilone contenevano 50 o 100 mg di farmaco. Per il metilone soltanto sono state somministrate più capsule fino a raggiungere le concentrazioni volute di farmaco (ad esempio 150, 200, 250 mg). Per ogni sessione sono stati raccolti 13 campioni di plasma a diversi intervalli di tempo: basale e 0.15, 0.30, 0.45, 1, 1.30, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 24 ore post-somministrazione. Tutti i campioni di plasma raccolti sono stati analizzati con lo stesso protocollo di estrazione precedentemente validato.

Il protocollo di sperimentazione clinica è riportato in Tabella 3.

Tabella 3: Protocollo di sperimentazione clinica sul “Potencial de abuso y farmacología humana de la metilona”, Universitat Autònoma de Barcelona, 2022.

Numero di volontari	Condizioni di trattamento		
	Sessione 1	Sessione 2	Sessione 3
1	Metilone 50 mg	Metilone 100 mg	Placebo
2	Placebo	Metilone 50 mg	Metilone 100 mg
3	Metilone 50 mg	Placebo	Metilone 100 mg
4	Metilone 100 mg	Metilone 150 mg	Placebo
5	Placebo	Metilone 100 mg	Metilone 150 mg
6	Metilone 100 mg	Metilone 150 mg	Placebo
7	Metilone 200 mg	Placebo	Metilone 200 mg
8	Metilone 200 mg	Placebo	Metilone 150 mg
9	Metilone 150 mg	Metilone 200 mg	Placebo
10	Metilone 200 mg	Placebo	MDMA 100 mg
11	Placebo	MDMA 100 mg	Metilone 200 mg
12	MDMA 100 mg	Metilone 200 mg	Placebo

4 RISULTATI

5.1 Risultati della Validazione

5.1.1 Linearità

I range di calibrazione sono stati scelti tra 0.5-500 ng/mL per metilone ed MDMA, mentre per i relativi metaboliti sono stati scelti tra 0.1-50 ng/mL. Il metodo validato si è dimostrato lineare per tutti gli analiti negli intervalli di calibrazione scelti (Figura 11).

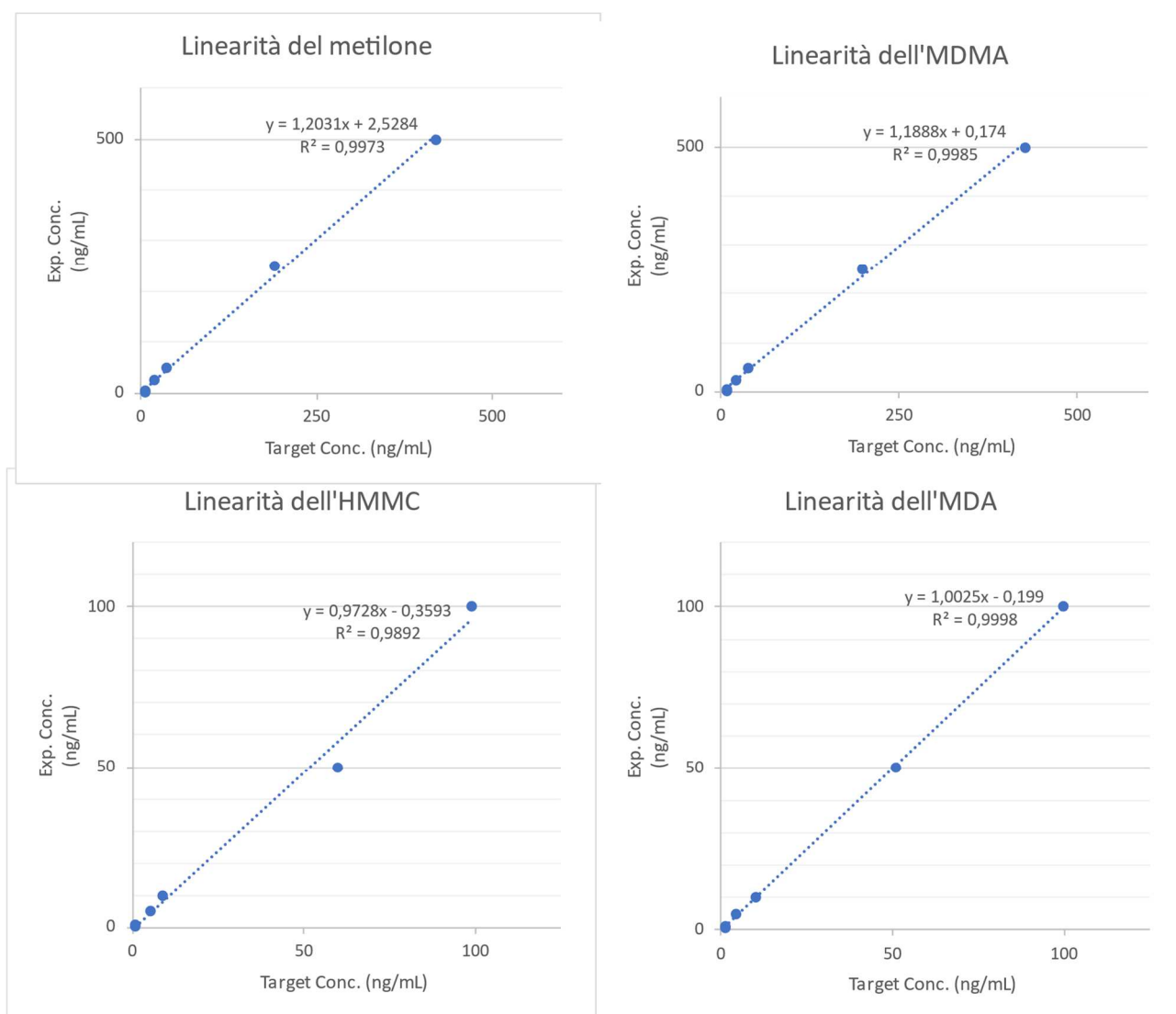


Figura 11: Rette di calibrazione per metilone, MDMA, HMMC e MDA.

5.1.2 Precisione e accuratezza

L'accuratezza e la precisione sono risultate inferiori a $\pm 20\%$ del target. I risultati sono mostrati in Tabella 4.

Tabella 4: Risultati dell'analisi sulla precisione e sull'accuratezza del metodo.

	Concentrazione QC (ng/ml)			Accuratezza (ng/ml)			Precisione Intra-day CV (%)			Precisione inter-day CV (%)		
	LQC	MQC	HQC	LQC	MQC	HQC	LQC	MQC	HQC	LQC	MQC	HQC
MDMA	1.5	150	350	1.2	123,7	346,1	5.1	2.5	7.9	13.4	4.6	11.7
Metilone	1.5	150	350	1.3	137,2	353	14	4.8	2.8	18.3	4.7	14.8
MDA	0.3	15	35	0.4	17,4	37,7	3.3	10.9	3.8	18.6	13.7	13.3
HMMC	0.3	15	35	0.5	14,6	33,2	6.4	9.3	5.1	14.7	19.4	15.3

Legenda: MDMA, 2,3-Metilendioossimetamfetamina; MDA, 3,4-Metilenediossiamfetamina; HMMA, 4-Idrossi-3-metossimetamfetamina; HMA, 4-idrossi-3-metossiamfetamina; HMMC, 4-idrossi-3-metossimetcatinone.

5.1.3 Carryover, effetto matrice e recupero

L'effetto matrice era entro $\pm 20\%$ per tutti gli analiti testati e non è stato osservato alcun *carryover* con nessun analita. I risultati del recupero e dell'effetto matrice sono mostrati in Tabella 5.

Tabella 5: Risultati del recupero e dell'effetto matrice.

	Recupero (%)			Effetto Matrice (%)		
	LQC	MQC	HQC	LQC	MQC	HQC
MDMA	98.9	95.7	92.4	12.1	14.4	13.7
Metilone	94.6	99.3	94.6	13.7	18.9	19.8
MDA	93.6	95.6	98.1	15.7	18.6	13.3
HMMC	95.8	94.3	96.2	16.3	14.7	15.9

Legenda: MDMA, 2,3-Metilendioossimetamfetamina; MDA, 3,4-Metilenediossiamfetamina; HMMA, 4-Idrossi-3-metossimetamfetamina; HMA, 4-idrossi-3-metossiamfetamina; HMMC, 4-idrossi-3-metossimetcatinone.

5.1.4 Integrità

Le concentrazioni dei replicati (n=5) per tutti i campioni diluiti erano entro $\pm 20\%$ del target per tutti i composti.

5.1.4 Stabilità

Tutti gli analiti a basse, medie e alte concentrazioni di QC sono risultati

abbastanza stabili se lasciati a temperatura ambiente per 24 ore, refrigerati (4°C),

dopo tre cicli di congelamento/scongelo, estratte e lasciate

nell'autocampionatore per 24 ore.

5.2 Risultati dei campioni reali

5.2.1 Metilone

Nella Tabella 6 sono riportate le medie delle concentrazioni plasmatiche di metilone (ng/mL) riscontrate ad ogni intervallo di tempo in cui è stato prelevato ed analizzato il campione. Il picco della concentrazione plasmatica viene raggiunto intorno alle 2 ore post-somministrazione per le dosi alte, mentre per la dose bassa (50 mg) viene raggiunto ad 1 ora post-somministrazione.

Tabella 6: Medie delle concentrazioni plasmatiche di metilone riscontrate a diversi intervalli di tempo dopo la somministrazione di 50, 100, 150 e 200 mg del farmaco.

Ora	Metilone 50 mg			Metilone 100 mg			Metilone 150 mg			Metilone 200 mg		
	Media	SD	N°	Media	SD	N°	Media	SD	N°	Media	SD	N°
Basale	0	0	3	0	0	6	0	0	6	0	0	5
0,25	5,62	6,397205	3	3,27	4,995917	6	6,52	10,70006	6	1,849833	2,417197	5
0,5	136,64	105,7828	3	82,45	94,61822	6	90,91	76,22934	6	236,3667	124,0097	5
0,75	241,46	107,6847	3	191,96	212,7947	6	212,45	114,6927	6	394,9822	146,0091	5
1	214,4	96,37695	3	193,35	103,4924	6	316,82	142,01	6	455,3351	147,3233	5
1,5	165,8	56,34108	3	216,61	23,09724	6	310,49	82,21677	6	492,2034	136,7881	5
2	169,37	78,24093	3	243,43	49,34323	6	320,09	93,03112	6	530,2649	198,0292	5
3	137,52	72,54861	3	224,49	34,27045	6	306,59	87,68373	6	465,9292	49,80998	5
4	131,2	74,37857	3	180,27	61,7439	6	284,33	103,1049	6	426,6917	52,91195	5
6	94,61	62,53863	3	162,27	36,4354	6	228,17	62,98326	6	326,0219	64,97481	5
8	73,15	47,12087	3	121,05	26,81094	6	168,48	61,49858	6	276,1592	79,25265	5
10	57,98	43,77338	3	101,89	30,36011	6	134,83	69,88144	6	219,2424	67,92548	5
24	10,52	6,616142	3	18,82	5,69904	6	36,43	24,7729	6	51,828	25,03343	5

Legenda: in rosso sono riportati i picchi delle concentrazioni plasmatiche per ogni dose somministrata. SD, deviazione standard.

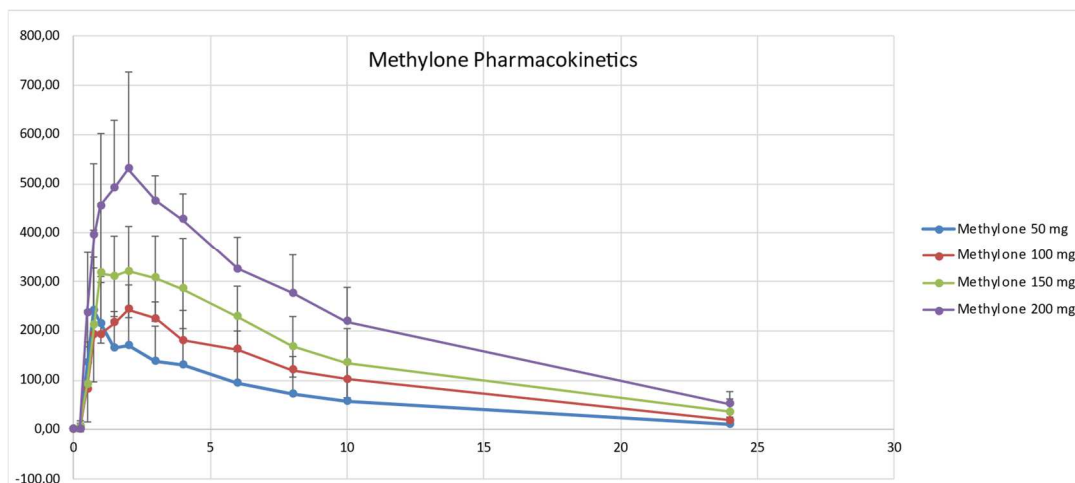


Figura 12: Farmacocinetica del metilone dopo somministrazione di 50-100-150-200 mg.

5.2.2 MDMA

Nella Tabella 7 sono riportate le medie delle concentrazioni plasmatiche di MDMA (ng/mL) riscontrate ad ogni intervallo di tempo in cui è stato prelevato ed analizzato il campione. Il picco della concentrazione plasmatica viene raggiunto tra 1 e 3 ore post-somministrazione concordando con i dati riportati in letteratura^[29].

Tabella 7: Medie delle concentrazioni plasmatiche di MDMA riscontrate a diversi intervalli di tempo dopo la somministrazione di 100 mg del farmaco.

Ore	MDMA 100 mg		
	Media	SD	N°
0	0	0	3
0,25	9,45	0,020598	3
0,5	33,42	12,40368	3
0,75	51,33	17,61772	3
1	66,98	19,4988	3
1,5	79,2	26,09158	3
2	83,75	31,31011	3
3	74,43	33,84022	3
4	55,64	30,48061	3
6	50,75	27,26659	3
8	42,45	30,27868	3
10	42,29	30,51269	3
24	14,2	8,781674	3

Legenda: in rosso sono riportati i picchi delle concentrazioni plasmatiche. SD, deviazione standard.

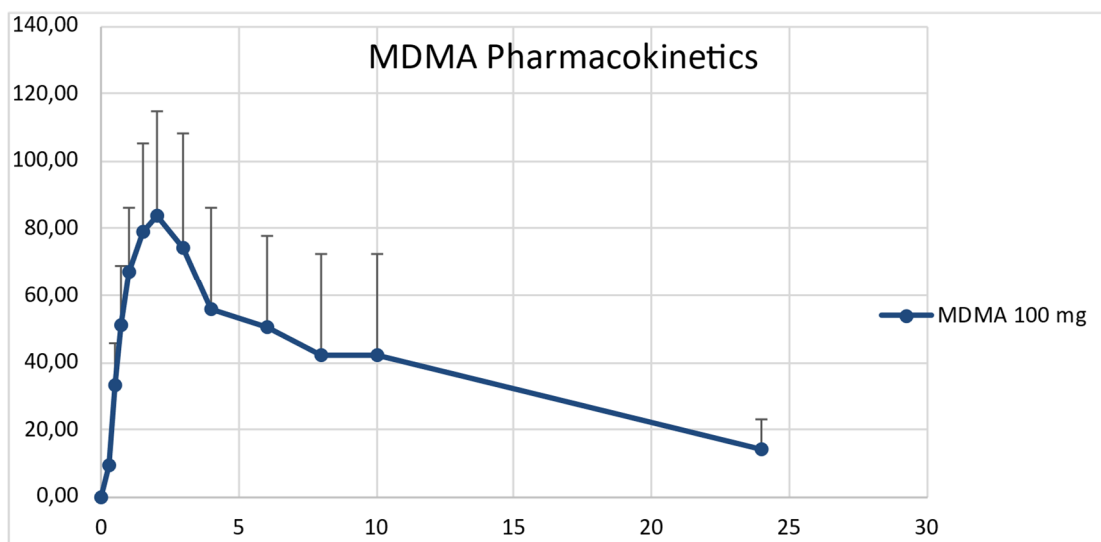


Figura 13: Farmacocinetica dell'MDMA dopo somministrazione di 100 mg del farmaco.

5.2.3 Farmacocinetica del metilone

Nelle Tabelle 8 e 9 sono riportati i parametri farmacocinetici del metilone e del suo metabolita HMMC. Per entrambi gli analiti le concentrazioni del farmaco dopo la dose da 100 mg erano approssimativamente raddoppiate rispetto alla dose da 50 mg. Allo stesso modo le concentrazioni dopo la dose da 200 mg erano circa quattro volte superiori alla dose più bassa (entro $\pm 20\%$), suggerendo una farmacocinetica lineare sia per il metilone che per HMMC.

Tabella 8: Parametri farmacocinetici del metilone, ottenuti dal plasma di volontari sani trattati con diverse concentrazioni di metilone.

	METHYLONE			
	C_{max} µg/L	AUC min x µg/L	T_{max} h	C_{last} at 24 h µg/L
50 mg	138	1065	0.75	10.52
100 mg	243	2486	2	18.82
150 mg	320	3511	2	36.43
200 mg	530	5489	2	51.828

Legenda: C_{max} , concentrazione massima rilevata; AUC, area sotto la curva; T_{max} , tempo in cui viene rilevata la concentrazione massima; C_{last} , ultima concentrazione rilevata.

Tabella 9: Parametri farmacocinetici del metabolita HMMC, ottenuti dal plasma di volontari sani trattati con diverse concentrazioni di metilone.

	HMMC			
	C_{max} $\mu\text{g/L}$	AUC min x $\mu\text{g/L}$	T_{max} h	C_{last} at 24 h $\mu\text{g/L}$
50 mg	6.6	36.85	1	0.47
100 mg	16.92	90.1	0.75	0.39
150 mg	26.67	129.4	1	1.29
200 mg	32.72	172.9	0.75	0.81

Legenda: C_{max} , concentrazione massima rilevata; AUC, area sotto la curva; T_{max} , tempo in cui viene rilevata la concentrazione massima; C_{last} , ultima concentrazione rilevata.

6 DISCUSSIONE

Il metodo è stato sviluppato e pienamente validato nel plasma, secondo i criteri internazionali stabiliti [41] e si è dimostrato lineare per tutti gli analiti nell'intervallo di calibrazione. Non è stato osservato nessun *carryover* con alcun analita. L'accuratezza era inferiore a $\pm 20\%$ del target. Non sono stati rilevati picchi interferenti nei *pool* di matrici biologiche analizzati. Le concentrazioni dei replicati ($n=5$) per tutti i campioni diluiti erano entro $\pm 20\%$ del target per tutti i composti. Tutti gli analiti a basse, medie e alte concentrazioni di QC sono risultati stabili se lasciati a temperatura ambiente per 24 ore, refrigerati (4°C), dopo tre cicli di congelamento/scongelo ed estratte, lasciate sull'autocampionatore raffreddato (10°C) e processate dopo 24 ore. L'effetto matrice era entro $\pm 20\%$ per tutti gli analiti testati.

Per quanto riguarda i campioni reali sono stati analizzati un totale di 468 campioni di plasma mediante HPLC-MS/MS, per la determinazione qualitativa e quantitativa degli analiti di interesse (metilone, MDMA e relativi metaboliti). Il metodo validato ha consentito la quantificazione degli analiti in un tempo di esecuzione di 6 minuti, dopo una preparazione del campione di 1 ora circa, utilizzando bassi volumi di campione ($100\ \mu\text{L}$ di campione).

La concentrazione degli analiti è stata determinata per ogni intervallo di tempo in cui è stato prelevato il campione di plasma.

Sulla base dei risultati ottenuti, per ogni soggetto partecipante allo studio, è stato individuato il tipo di farmaco (metilone, MDMA o placebo) assunto in ogni sessione ed è stata calcolata la relativa dose.

Per quanto riguarda il metilone in 3 sessioni sono stati assunti 50 mg (pazienti 1, 2 e 3), 100 mg sono stati somministrati in 6 sessioni (pazienti da 1 a 6), in altre 6 sessioni sono stati somministrati 150 mg di metilone (pazienti da 4 a 9) ed in 5 sessioni sono stati assunti 200 mg (pazienti da 7 a 12). L'MDMA (100 mg) è stato assunto in sole 3 sessioni (pazienti 10, 11 e 12) ed in 12 sessioni è stato somministrato il placebo (una sessione per ogni paziente).

Successivamente, per ogni dose somministrata, è stata calcolata la media delle concentrazioni (ng/mL) riscontrate ad ogni intervallo di tempo, in modo tale da poter studiare la farmacocinetica dell'analita.

Nel *trial* definitivo dello studio, il metilone è stato somministrato almeno in una sessione per ogni paziente, a differenti dosi (50, 100, 150 e 200 mg). Il picco della concentrazione plasmatica viene raggiunto intorno alle 2 ore post-somministrazione per le dosi alte (100-150-200 mg), mentre per la dose bassa (50 mg) viene raggiunto ad 1 ora post-somministrazione (Tabella 6) e successivamente diminuisce fino a raggiungere quasi i valori basali entro le 24 ore.

Le testimonianze dei consumatori abituali riportate in letteratura suggeriscono che la dose comunemente assunta si aggira intorno a 100 mg e dopo la somministrazione orale l'inizio degli effetti si verifica tra i 15 e i 60 minuti, con effetti di picco tra i 60 e i 90 minuti, e una durata totale degli effetti di 3/5 ore [26]. I risultati dello studio mostrano quindi che le concentrazioni di metilone nel plasma cambiano nel tempo seguendo lo stesso schema del decorso temporale degli effetti acuti, con un picco a 2 ore dopo la somministrazione (Figura 11).

Successivamente sono stati calcolati i parametri farmacocinetici sia per il metilone che per il suo metabolita HMMC. La concentrazione massima rilevata nel plasma (C_{max}) del metilone è stata rispettivamente di 138, 243, 320 e 530 $\mu\text{g/l}$ dopo le dosi da 50, 100, 150 e 200 mg, mentre l'area sotto la curva corrispondente (AUC) ha raggiunto valori di 1065, 2486, 3511 e 5489 $\text{min} \times \mu\text{g/l}$. Il tempo in cui è stata rilevata la concentrazione massima (T_{max}) di metilone è stato 0.75 ore per la dose più bassa (50 mg) e di 2 ore per le dosi rimanenti (100, 150, 200 mg). Le ultime concentrazioni di metilone rilevate a 24 ore (C_{last}) erano 10.52, 18.82, 36.43 e 51.828 $\mu\text{g/l}$ (rispettivamente per 50, 100, 150 e 200 mg).

Per il metabolita del metilone, HMMC, i valori di C_{max} riscontrati erano 6.6, 16.92, 26.67 e 32.72 $\mu\text{g/l}$, mentre l'AUC era 36.9, 90.1, 129 e 173 $\text{min} \times \mu\text{g/l}$. Rispetto al farmaco progenitore, il metabolita HMMC ha mostrato una cinetica più rapida, con una T_{max} di 1 ora circa per tutte le dosi (Tabella 9). Per quanto riguarda C_{last} , le concentrazioni di HMMC erano 0.47, 0.39, 1.29 e 0.81 $\mu\text{g/l}$ (rispettivamente per 50, 100, 150 e 200 mg), 24 ore dopo la somministrazione del farmaco progenitore.

I dati ottenuti da questo studio sembrano suggerire che il metilone non presenta una farmacocinetica non lineare come l'MDMA, bensì una farmacocinetica lineare. Gli stessi risultati sono stati ottenuti analizzando le concentrazioni plasmatiche del metabolita principale del metilone, HMMC.

Per entrambi gli analiti le concentrazioni del farmaco dopo la dose da 100 mg erano approssimativamente raddoppiate rispetto alla dose da 50 mg. Allo stesso modo le concentrazioni dopo la dose da 200 mg erano circa quattro volte superiori alla dose

più bassa (entro $\pm 20\%$), suggerendo una farmacocinetica lineare sia per il metilone che per HMMC.

Per quanto riguarda l'MDMA, le fonti bibliografiche suggeriscono che, quando il farmaco viene assunto per via orale, i primi effetti cominciano a manifestarsi dopo circa 40 minuti e la massima concentrazione plasmatica viene raggiunta tra 1 e 3 ore circa [29]. I risultati ottenuti da questo studio mostrano il picco della concentrazione plasmatica di MDMA intorno a 2 ore dalla somministrazione (100 mg), risultando coerenti con i dati già pubblicati in letteratura (Tabella 7).

Il recupero plasmatico di MDA in tutti gli intervalli di tempo è molto minore rispetto al recupero del suo precursore metabolico, confermando che l'analita è un metabolita minore dell'MDMA. Inoltre, rispetto al farmaco progenitore, il metabolita MDA ha mostrato una cinetica molto più lenta, con una T_{max} di 4-6 h per la dose di 100 mg. Una volta raggiunto il picco, le concentrazioni plasmatiche di MDMA iniziano a calare e tornano quasi ai livelli basali nel giro di 15-24 ore, risultati molto simili a quelli presenti in letteratura per le anfetamine (Figura 13).

7 CONCLUSIONI

Gli studi sulla farmacocinetica delle nuove sostanze stupefacenti rappresentano tutt'ora un importante argomento nel campo della tossicologia clinica e forense, in quanto, come già accennato, i composti che vengono prodotti mediante reazioni metaboliche potrebbero presentare delle attività farmacodinamiche e tossicologiche. Nonostante i catinoni sintetici rappresentino uno dei gruppi più rappresentati e consumati tra le NPS, poche sono le informazioni riguardo la loro cinetica e dinamica e soltanto pochi sono stati effettuati sull'uomo.

I risultati dello studio dimostrano una farmacocinetica lineare del metilone, al contrario di quanto ipotizzato inizialmente.

Da uno studio aggiornato della letteratura di riferimento, possiamo affermare che questo lavoro rappresenta il primo studio sulla farmacocinetica del metilone nell'uomo, a partire dalla somministrazione controllata a differenti dosaggi.

In conclusione, alla luce dei risultati ottenuti, è necessario approfondire gli studi finora condotti, al fine di comprendere al meglio la farmacocinetica dei catinoni sintetici e di conseguenza le ripercussioni che queste nuove sostanze stupefacenti potrebbero avere sulla salute dell'uomo.

BIBLIOGRAFIA

- [1] United Nation of Drug and Crime (UNODC). WORLD DRUG REPORT, COVID-19 and drugs: Impact and outlook. United Nations publication. 2021; Booklet 5.
- [2] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). European Drug Report 2022: Trends and Developments. 2022.
- [3] D.P. Antidroga. DCSA ANNUAL REPORT. 2021;1-136.
- [4] Scherbaum N, Bonnet U, Hafermann H, Schifano F, Bender S, Grigoleit T, Kuhn J, Nyhuis P, Preuss UW, Reymann G, Schneider U, Shibata J, Specka M. Availability of Illegal Drugs During the COVID-19 Pandemic in Western Germany. *Front Psychiatry*. 2021; 12:648273.
- [5] United Nation of Drug and Crime (UNODC). Global Smart Update. 2016;16.
- [6] Vari M.R, Mannocchi G, Tittarelli R, Campanozzi L.L, Nittari G, Feola A, Ronchi F.U, Ricci G. New Psychoactive Substances: Evolution in the Exchange of Information and Innovative Legal Responses in the European Union. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(22):8704.
- [7] Majchrzak M, Celiński R, Kuś P et al. The newest cathinone derivatives as designer drugs: an analytical and toxicological review. *Forensic Toxicol*. 2018; 36, 33–50.
- [8] Correia B, Fernandes J, Botica M.J, Ferreira C, Quintas A. Novel Psychoactive Substances: The Razor's Edge between Therapeutical Potential and Psychoactive Recreational Misuse. *Medicines (Basel)*. 2022;9(3):19.
- [9] Pieprzyca E, Skowronek R, Nižnanský L, Czekaj P. Synthetic cathinones - From natural plant stimulant to new drug of abuse. *Eur J Pharmacol*. 2020;875:173012.
- [10] Sørensen L.K. Determination of cathinones and related ephedrines in forensic whole-blood samples by liquid-chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Chromatography B*. 2011;879:11-12.
- [11] Giachetti A.D, Kahl J.H, Zaney M.E, Hime W.G, Boland D.M. Method Validation of Seven Synthetic Cathinones by LC–MS-MS Analysis and the

Prevalence of N-Ethylpentylone in Postmortem Casework. *Journal of Analytical Toxicology*. 2022;46:122–127.

[12] Soares J, Costa VM, Bastos ML, Carvalho F, Capela JP. An updated review on synthetic cathinones. *Arch Toxicol*. 2021;95(9):2895-2940.

[13] United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). Understanding the synthetic drug market: the NPS factor, *Glob. Smart Updat*. 2018;1–12.

[14] Dipartimento delle Politiche Antidroga (DPA). Catinoni Sintetici, *New Drugs Updat. e Piano Di Azione Naz. per La Prev. Della Diffus. Delle Nuove Sostanze Psicoattive e Dell'offerta Internet*. 2013;359–538.

[15] United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). Early Warning Advisory on New Psychoactive Substances: What are NPS. 2021.

[16] United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). Data from the UNODC early warning advisory on new psychoactive substances. 2022.

[17] United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). The role of drug analysis laboratories in Early Warning Systems. 2022.

[18] Berretta P, Vari M.R, Zaami S, Pacifici R, Pichini S, Sciotti M, Tittarelli R, La Maida N, Tini A, Marinelli E, Buscaglia E, Brambilla E, Scaravaggi G, Locatelli C.A, Busardò F.P, Cavallo M, Graziano S, La Diffusione Di Nuove S. Psicoattive. 2021;3–6.

[19] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). Operating guidelines for the European Union Early Warning System on new psychoactive substances. 2019.

[20] Marozzi F. SNAP: il controllo sulla diffusione delle sostanze psicoattive. 2021.

[21] Cozzi N.V, Sievert M.K, Shulgin A.T, Jacob P, Ruoho A.E. Inhibition of plasma membrane monoamine transporters by β - ketoamphetamines. *Eur. J. Pharmacol*. 1999; 63–69.

[22] Poyatos L, Papaseit E, Olesti E, Pérez-Mañá C, Ventura M, Carbón X, Grifell M, Fonseca F, Torrens M, de la Torre R, Farré M. A Comparison of Acute Pharmacological Effects of Methylone and MDMA Administration in Humans and

Oral Fluid Concentrations as Biomarkers of Exposure. *Biology (Basel)*. 2021; 10(8):788.

[23] Baumann MH, Ayestas MA Jr, Partilla JS, Sink JR, Shulgin AT, Daley PF, Brandt SD, Rothman RB, Ruoho AE, Cozzi NV. The designer methcathinone analogs, mephedrone and methylone, are substrates for monoamine transporters in brain tissue. *Neuropsychopharmacology*. 2012; 37(5):1192-203.

[24] Glicksberg L, Bryand K, Kerrigan S. Identification and quantification of synthetic cathinones in blood and urine using liquid chromatography-quadrupole/time of flight (LC-Q/TOF) mass spectrometry. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2016;91–103.

[25] Cawrse BM, Levine B, Jufer R.A, Fowler DR, Vorce SP, Dickson AJ Holler JM. Distribution of Methylone in Four Postmortem Cases. *Journal of Analytical Toxicology*. 2012, 36(6):434–439.

[26] Elmore JS, Dillon-Carter O, Partilla JS, Ellefsen KN, Concheiro M, Suzuki M, Rice KC, Huestis MA, Baumann MH. Pharmacokinetic Profiles and Pharmacodynamic Effects for Methylone and Its Metabolites in Rats. *Neuropsychopharmacology*. 2017;42(3):649-660.

[27] Kamata HT, Shima N, Zaitso K, Kamata T, Miki A, Nishik Kamata HT, Shima N, Zaitso K, Kamata T, Miki A, Nishikawa M, Katagi M, Tsuchihashi H. Metabolism of the recently encountered designer drug, methylone, in humans and rats. *Xenobiotica*. 2006;36(8):709-23.

[28] Lin HR, Kuo FW. Determination of the R- and S-enantiomers of methylone and ethylone in seized drugs by enantioselective liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis. *Forensic Sci Int*. 2020;317:110528.

[29] de la Torre R, Farré M, Roset PN, Pizarro N, Abanades S, Segura M, Segura J, Camí J. Human pharmacology of MDMA: pharmacokinetics, metabolism, and disposition. *Ther Drug Monit*. 2004;26(2):137-44.

[30] De La Torre R, Farré M, Roset P.N, Hernández López C, Mas M, Ortuño J, Menoyo E, Pizarro N, Segura J, Camí J. Pharmacology of MDMA in Humans, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2000;225–237.

[31] Steuer AE, Schmidhauser C, Tingelhoff EH, Schmid Y, Rickli A, Kraemer T, Liechti ME. Impact of Cytochrome P450 2D6 Function on the Chiral Blood Plasma

Pharmacokinetics of 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and Its Phase I and II Metabolites in Humans. *PLoS One*. 2016.

[32] Rietjens SJ, Hondebrink L, Westerink RHS, Meulenbelt J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA): Interindividual differences due to polymorphisms and drugdrug interactions. *Crit. Rev. Toxicol.* 2012;854–876.

[33] Concheiro M, Baumann MH, Scheidweiler KB, Rothman RB, Marrone GF, Huestis MA. Nonlinear pharmacokinetics of (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and its pharmacodynamic consequences in the rat. *Drug Metab Dispos.* 2014;42(1):119-25.

[34] Cardoso MS, Lanaro R, Dolores RC, Morais DR, Arantes ACF, Oliveira KD, Costa JL. Determination of Drugs of Abuse in Hair by LC-MS-MS: Application to Suicide Attempts Investigation. *J. Anal. Toxicol.* 2022;46:577–581.

[35] Wang X, Cui J, Zhuo Y, Shen B, Zhang S, Liu W, Shen M, Xiang P. A Retrospective of Prevalence of Drugs of Abuse by Hair Analysis in Shanghai using LC-MS-MS. *J. Anal. Toxicol.* 2020;44:482–489

[36] Navarro M, Pichini S, Farré M, Ortuño J, Roset PN, Segura J, De La Torre R. Usefulness of Saliva for Measurement of 3,4-Methylenedioxymethamphetamine and Its Metabolites: Correlation with Plasma Drug Concentrations and Effect of Salivary pH, *Clin. Chem.* 2001;47:1788–1795.

[37] Pichini S, Navarro M, Pacifici R, Zuccaro P, Ortuño J, Farré M, Roset PN, Segura J, De la Torre R. Usefulness of Sweat Testing for the Detection of MDMA after a Single-Dose Administration, *J. Anal. Toxicol.* 2003;27:294–303.

[38] De la Torre R, Farré M, Ortuño J, Mas M, Brenneisen R, Roset PN, Segura J, Camí J. Non-linear pharmacokinetics of MDMA ('ecstasy') in humans. *Br J Clin Pharmacol.* 2000;49(2):104-9.

[39] Farré M, de la Torre R, Mathúna BO, Roset PN, Peiró AM, Torrens M, Ortuño J, Pujadas M, Camí J. Repeated doses administration of MDMA in humans: pharmacological effects and pharmacokinetics. *Psychopharmacology (Berl)*. 2004;173(3-4):364-75.

[40] Gearlds C, Bouldin JB, McKinney M, Schreiner S, Brown SD, Pond BB. Pharmacokinetics of Synthetic Cathinones Found in Bath Salts in Mouse Brain and Plasma Using High-Pressure Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2021;46(6):771-778.

[41] The Organization of Scientific Area Committees for Forensic Science | NIST. 2022.