

DEPARTAMENT DE CIÈNCIES EXPERIMENTALS I DE LA SALUT
PROGRAMA DE DOCTORAT EN CIÈNCIES DE LA SALUT I DE LA VIDA
UNIVERSITAT POMPEU FABRA (UPF)

**LA INFLUÈNCIA DE L'ESTEREOQUÍMICA
EN EL METABOLISME DE LA
3,4-METILENDIOXIMETAMFETAMINA (MDMA, ÈXTASI)**

Memòria presentada per M^a Nieves Pizarro Lozano per optar al títol de doctor per la Universitat Pompeu Fabra. Treball realitzat sota la direcció del Dr. Rafael de la Torre Fornell, en la Unitat de Recerca en Farmacologia, de l'Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM). Programa de Doctorat de la Universitat Pompeu Fabra, bienni 1998-2000.

Signatura del Director de tesi
(Dr. de la Torre Fornell)

Signatura de la doctoranda
(M^a Nieves Pizarro Lozano)

Dipòsit legal: B.14490-2005
ISBN: 84-689-1254-9

Un día tenía que llegar en que contaría estas cosas

José Saramago

A la meva família

Agraïments

Al Dr. Rafael de la Torre, director d'aquesta tesi, amb qui he tingut el plaer i privilegi de treballar tots aquests anys, per la seva confiança, paciència i serenitat.

Al Dr. Magí Farré, investigador principal dels assaigs clínics que han fet possible aquest treball, pel seu recolzament i bons consells.

Als Drs. Amadeu LLebaria i Jesús Joglar, per haver-me acollit al Departament de Química Orgànica Biològica del CSIC de Barcelona, ensenyar-me síntesi orgànica i oferir-me la seva amistat.

Al Dr. Jordi Segura, director de la Unitat de Farmacologia, per haver-me permès formar part de la gran família que dirigeix.

Als companys que han col·laborat més directament en l'elaboració d'aquest treball: l'Esther Menoyo, el Cándido Hernández, el Pere N. Roset i l'Anna M. Peiró, pel que fa als assaigs clínics i el Jordi Ortuño, la Mitona Pujadas i la Sílvia Cano pel que fa a l'anàlisi de mostres.

A tots i cadascun dels meus amics i companys de la Unitat de Farmacologia, tant els que hi són actualment com els que han anat a treballar a d'altres empreses, ciutats i països, pels bons moments compartits.

Als meus companys del IIQAB-CSIC de Barcelona, que fan que em senti com a casa quan estic amb ells.

A l'Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM), per l'ajut rebut pel pagament de les despeses finals de reprografia i enquadernació d'aquesta tesi.

A l'Eduard Ribas, que m'ha acompanyat durant tants anys.

A la meva família, una font d'energia inesgotable.

ABREVIACIONS

ACTH, hormona adrenocorticotropa
 ADH, hormona antidiurètica, vasopresina
 AMAF, alfametilacetilfentanil
 AMF, alfametilfentanil, China white
 AUC, àrea sota la corba de concentracions
 2CB, 4-bromo-2,5-dimetoxifenilamfetamina, MFT, afterturner
 CD, ciclodextrina
 C/D, cicles de congelació/descongelació
 CI, control inferior
 CL, cromatografia líquida, HPLC
 CM, control mig
 C_{max} , concentració màxima plasmàtica
 COMT, catecol metil transferasa
 CS, control superior
 CSIC, Consell Superior d'Investigacions Científiques
 DA, dopamina
 DE, desviació estàndard
 DEA, Drug Enforcement Administration
 DHBA, dihidroxibenzilamina
 DHEA, dehidroepiandrosterona
 2,4-DMA, 2,4-dimetoxiamfetamina
 DOB, 2,5-dimetoxi-4-bromoamfetamina
 DOET, 2,5-dimetoxi-4-etilamfetamina
 DOM, 2,5-dimetoxi-4-metilamfetamina, STP
 EC, electroforesi capil·lar
 EDTA, àcid etilendiaminotetraacètic
 e.e., excés enantiomèric
 ET, grup etil
 FDA, Food and Drug Administration
 GC, cromatografia de gasos
 GC/NPD, cromatografia de gasos amb detector de nitrògen-fòsfor
 GC/MS, cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses

ABREVIACIONS

GH, hormona de creixement
GHB, gammahidroxibutirat, èxtasi líquid
HFBPCI, clorur d'heptafluorobutirilprolil
H₁, receptor histamínic
HHA, 3,4-dihidroxiamfetamina, α -metildopamina
HHMA, 3,4-dihidroximetamfetamina
HMDS, hexametildisilazà
HMA, 4-hidroxi-3-metoxiamfetamina
HMEA, 4-hidroxi-3-metoxietilamfetamina
HMMA, 4-hidroxi-3-metoximetamfetamina
HPLC, High Performance Liquid Chromatography
HPLC/EC, cromatografia de líquids amb detector electroquímic
HPLC/UV, cromatografia de líquids amb detector ultraviolat
5-HT, serotonina
IIQAB, Institut d'Investigacions Químiques i Ambientals de Barcelona
IMIM, Institut Municipal d'Investigació Mèdica
IS, estàndard intern
IUPAC, International Union of Pure and Applied Chemistry
LC_i, límit de quantificació inferior
LC_s, límit de quantificació superior
LSD, àcid dietilaminolisèrgic
LTPCI, clorur de trifluoroprolil
k_a, constant d'absorció
k_e, constant d'eliminació
m-, meta
M₁, receptor muscarínic
MAO, monoaminoxidasa
MBDB, *N*-metil-1-(1,3-benzodioxole-5-il)-2-butanamina
MBTFA, *N*-metil-bis-(trifluoroacetamida)
MDEA, 3,4-metilendioxi-etilamfetamina, MDE, Eva
MDA, 3,4-metilendioxi-amfetamina, love drug
MDA-OH, *N*-hidroxi-3,4-metilendioxi-amfetamina
MDMA, 3,4-metilendioxi-metamfetamina, èxtasi
MDPA, 3,4-metilendioxi-propilamfetamina

3MF, 3-metilfentanil
 ML, metabolitzador lent
 MPPP, 1-metil-4-fenil-4-propionoxipiperidina
 MPTP, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
 MR, metabolitzador ràpid
 MS, espectròmetre de masses
 MSTFA, *N*-metil-*N*-trimetilsililtrifluoroacetamida
 (*R*)-MTPCI, clorur de (*R*)-(-)- α -metoxi- α -trifluorometilfenilacetil, reactiu de Mosher
 MU, metabolitzador ultraràpid
 NE, norepinefrina
o-, orto
 OHPCD, hidroxipropil- β -ciclodextrina
 OMS, Organització Mundial de la Salut
p-, para
 PCC, piperidinciclohexancarbonitril
 PCE, *N*-etilfenciclidina
 PCP, fenciclidina, pols d'àngel
 PFF, parafluorofentanil
 PHP, fenilciclohexilpirrolidina
 PMA, parametoxiamfetamina
 PMMA, parametoximetamfetamina
 SIM, Selected Ion Monitoring
 SNC, sistema nerviós central
 TAS, tampó acetat sòdic
 TCP, tiofenciclidina
 TFS, tampó fosfat sòdic
 THF, triptòfan hidroxilasa
 $t_{1/2r}$, semivida d'eliminació
 t_{max} , temps al qual s'arriba a la concentració màxima plasmàtica
 URF, Unitat de Recerca en Farmacologia

JUSTIFICACIÓ	3
1. INTRODUCCIÓ	9
1.1. LA MDMA COM A PROTOTIPUS DE LES DROGUES DE DISSENY:	
APUNTS BÀSICS	9
1.1.1. Introducció a les drogues de disseny.....	9
1.1.2. La MDMA: breu resum de la seva història.....	10
1.1.3. El consum actual de la MDMA a Espanya.....	12
1.1.4. Dades generals de la MDMA.....	12
1.1.5. Dades estructurals de la MDMA.....	13
1.2. FARMACOLOGIA DE LA MDMA	14
1.2.1. Mecanisme d'acció.....	14
1.2.2. Efectes aguts i efectes adversos.....	15
1.2.3. Metabolisme.....	16
1.2.4. Farmacocinètica.....	19
1.2.5. Farmacogenètica.....	22
1.2.6. Neurotoxicitat.....	24
1.3. ESTEREOQUÍMICA	25
1.3.1. Conceptes bàsics.....	26
1.3.2. L'estereoquímica en la farmacologia.....	32
<i>Estereoquímica i farmacocinètica</i>	33
<i>Estereoquímica i farmacodinàmia</i>	35
1.3.3. Els fàrmacs quirals.....	37
1.4. OBTENCIÓ DE COMPOSTOS ENANTIOMÈRICAMENT PURS	38
1.4.1. Síntesi estereoselectiva.....	38
1.4.2. Substrats quirals.....	39
1.4.3. Resolució de racemats.....	40
1.5. ANÀLISI DE COMPOSTOS QUIRALS	42
1.5.1. Anàlisi per cromatografia de líquids.....	43
<i>Mètodes directes amb fase estacionària enantioselectiva</i>	43
<i>Mètodes directes amb fase mòbil enantioselectiva</i>	45
<i>Mètodes indirectes</i>	45
1.5.2. Anàlisi per cromatografia de gasos.....	46
<i>Mètodes directes</i>	47
<i>Mètodes indirectes</i>	48

1.5.3. Anàlisi per electroforesi capil·lar.....	49
1.5.4. Validació de mètodes analítics.....	51
<i>Aspectes de la validació relacionats amb l'estereoquímica.....</i>	<i>51</i>
<i>Paràmetres de validació.....</i>	<i>52</i>
1.6. MDMA I ESTEREOQUÍMICA.....	57
1.6.1. Química de les amfetamines.....	57
1.6.2. Farmacologia i estereoquímica de la MDMA.....	60
1.6.3. Estereoquímica de la MDMA i activitat farmacològica <i>in vitro</i>	61
1.6.4. Estereoquímica de la MDMA en models animals.....	61
<i>Estereoquímica de la MDMA en rates.....</i>	<i>62</i>
<i>Estereoquímica de la MDMA en altres models animals.....</i>	<i>63</i>
1.6.5. Estereoquímica de la MDMA en humans.....	65
1.6.6. Estereoquímica de substàncies relacionades.....	68
2. OBJECTIUS.....	73
3. SUBJECTES I MÈTODES.....	77
3.1 SUBJECTES.....	77
3.1.1. Aspectes ètics.....	77
3.1.2. Criteris d'inclusió i exclusió.....	77
<i>Criteris d'inclusió.....</i>	<i>78</i>
<i>Criteris d'exclusió.....</i>	<i>78</i>
3.1.3. Criteris de valoració clínica i avaluació.....	79
<i>Efectes subjectius.....</i>	<i>79</i>
<i>Rendiment psicomotor.....</i>	<i>80</i>
<i>Paràmetres fisiològics.....</i>	<i>81</i>
<i>Valoració psiquiàtrica.....</i>	<i>81</i>
<i>Mesures analítiques.....</i>	<i>81</i>
3.1.4. Els participants a l'assaig clínic d'interacció entre la MDMA i l'alcohol a dosis úniques en humans.....	81
3.1.5. Els participants a l'assaig clínic d'administració de la MDMA dosis múltiples en humans.....	83
3.2. MÈTODES.....	84
3.2.1. Anàlisi convencional de MDMA, MDA, HMMA i HMA per GC/MS.....	84
3.2.2. Síntesi orgànica de (S)-HHMA, (R,S)-HHMA (S)-MDMA i (S)-HMMA.....	86
<i>Síntesi de (S)-HHMA i (R,S)-HHMA.....</i>	<i>86</i>

	<i>Síntesi de (S)-MDMA</i>	87
	<i>Síntesi de (S)-HMMA</i>	88
	<i>Correlació química</i>	88
3.2.3	Anàlisi enantiomèrica de MDMA, MDA i HMMA per CE.....	89
3.2.4	Anàlisi enantiomèrica per GC/MS. Desenvolupament metodològic per a l'anàlisi dels enantiòmers de MDMA, MDA, HMMA i HMA.....	90
3.2.5	Anàlisi enantiomèrica de MDMA, MDA, HMMA i HHMA per GC/MS.....	91
4.	RESULTATS	95
4.1.	PUBLICACIÓ A <i>BIOORG. MED. CHEM.</i>	95
4.2.	PUBLICACIÓ A <i>J. ANAL. TOXICOL.</i>	103
4.3.	PUBLICACIÓ A <i>RAPID COMMUN. MASS SPECTROM.</i>	113
4.4.	PUBLICACIÓ A <i>DRUG MET. DISP.</i>	121
5.	DISCUSSIÓ	133
5.1.	LA SÍNTESI	134
	<i>Síntesi de (S)-HHMA</i>	135
	<i>Correlació química de (S)-MDMA i (S)-HHMA</i>	136
	<i>Síntesi de (R,S)-HHMA</i>	136
	<i>Síntesi de (S)-HMMA</i>	137
	<i>Correlació química de (S)-MMMA, (S)-HHMA i (S)-HMMA</i>	137
5.2.	L'ANÀLISI	138
	<i>Anàlisi diastereoselectiva de la MDMA i dels seus metabòlits per GC/MS</i>	138
	<i>Anàlisi enantioselectiva de la MDMA i dels metabòlits MDA i HMMA per CE/UV</i>	139
	<i>Anàlisi enantioselectiva per GC/MS. Desenvolupament metodològic</i>	141
	<i>Anàlisi enantioselectiva per GC/MS. Modificacions per a la inclusió de l'HHMA</i>	145
5.3.	ELS RESULTATS	147
	<i>Dades dels mètodes enantioselectius vs. dades dels mètodes diastereoselectius</i>	147
	<i>Perfils enantiomèrics obtinguts per CE/UV</i>	148
	<i>Dades dels mètodes diastereoselectius per GC/MS</i>	151
	<i>Dades dels mètodes enantioselectius per GC/MS</i>	152
6.	CONCLUSIONS	157
7.	BIBLIOGRAFIA	163
8.	GLOSSARI	181
9.	ANNEXES	185

JUSTIFICACIÓ

La 3,4-metilendioximetamfetamina (MDMA, èxtasi) és una substància objecte d'abús per importants segments dels joves de la nostra societat. La MDMA, tot i estar relacionada amb les amfetamines, és la cap de sèrie d'un grup de compostos coneguts com a entactògens, que presenten una sèrie d'efectes aguts (d'extroversió, sociabilitat, benestar i empatia) que no són compartits per les amfetamines clàssiques. El consum de MDMA està associat amb episodis de toxicitat aguda i amb efectes tòxics a mig/llarg termini relacionats amb una neurodegeneració en el sistema serotoninèrgic. L'impacte que pot tenir la neurotoxicitat en els consumidors de la MDMA és el problema que més preocupa a la comunitat científica actualment.

Una de les principals característiques estructurals de la molècula de la MDMA és la presència d'un centre estereogènic que fa que la substància existeixi com a dues estructures tridimensionals diferents (enantiòmers). La MDMA es consumeix com a una barreja al 50% dels seus enantiòmers però la quiralitat, lluny de ser una propietat estructural purament anecdòtica, implica diferències farmacocinètiques i farmacodinàmiques entre els dos enantiòmers. A més a més, el carboni responsable de l'estereoquímica del fàrmac es conserva al llarg dels diferents passos metabòlics, de manera que tots els metabòlits de la MDMA també són quirals.

Els estudis relacionats amb la depuració metabòlica dels enantiòmers de la MDMA en animals d'experimentació han mostrat que aquesta és enantioselectiva. Pel que fa als estudis de la MDMA en humans, hi ha molt poques publicacions que tractin l'enantioselectivitat del seu metabolisme. La major part de les dades relacionades amb el metabolisme enantioselectiu de la MDMA s'ha obtingut a partir de mostres procedents de casos d'intoxicació aguda, on hi ha hagut un consum concomitant amb altres substàncies d'abús i es desconeixen les dosis administrades.

Existeix un únic estudi de l'estereoquímica de la MDMA en una administració controlada en humans, al que es van mesurar les principals dades farmacocinètiques dels enantiòmers de la MDMA i del seu metabòlit minoritari MDA durant un curt període de temps. Es va demostrar que la depuració metabòlica de la MDMA en humans també és enantioselectiva. Per qüestions ètiques, la dosi administrada (40 mg de MDMA racèmic) fou considerablement més petita que les dosis habituals de consum (aproximadament 70-100 mg) i això fa que no es pugui veure reflectit el fenomen d'autoinhibició del metabolisme la MDMA, responsable de la cinètica no lineal de la mateixa en humans. Així doncs, les dades procedents d'aquest estudi no permeten concloure com aquest fenomen afecta la depuració metabòlica dels enantiòmers de la MDMA i dels seus metabòlits.

S'ha pogut estudiar l'estereoquímica en el metabolisme en humans de substàncies anàlogues a la MDMA, com la MDEA (3,4-metilendioxiethylamfetamina), que han permès conèixer dades de disposició dels seus enantiòmers i dels seus principals metabòlits, tant després d'administrar el racemat com els enantiòmers per separat. La semblança estructural entre la MDEA i MDMA fa que els estudis fets amb la MDEA serveixin per extreure conclusions relacionades amb el comportament de la farmacocinètica dels enantiòmers de la MDMA. Malauradament, no es va mesurar el metabòlit tipus catecol de la MDEA, rellevant per explicar el mecanisme de neurotoxicitat dels derivats metilendioxi de les amfetamines. D'altra banda, la MDEA és una substància de baix consum entre els joves degut a un perfil farmacològic més difús pel que fa als efectes aguts quan es compara amb la MDMA. A més a més, la seva capacitat de induir neurotoxicitat és també inferior. Tots aquests factors limiten l'interès de l'estudi.

Cap dels estudis de l'estereoquímica de la MDMA estudia el perfil enantiomèric dels seus principals metabòlits què, no només tenen rellevància per ser molt abundants sinó que podrien estar directament relacionats amb els mecanismes de neurotoxicitat a mig/llarg termini.

Amb totes aquestes dades, es va considerar oportú analitzar la MDMA i els seus principals metabòlits dels del punt de vista de la seva estereoquímica a les mostres biològiques procedents d'un assaig clínic en voluntaris sans consumidors recreatius de la MDMA amb una administració d'una dosi de 100 mg de racemat, similar a la consumida de forma recreativa. Com a conseqüència directa de l'anàlisi d'aquestes mostres, va ser necessària la síntesi de material de referència dels enantiòmers de la MDMA i dels seus principals metabòlits. No existeixen patrons comercials d'aquests compostos i, malgrat la dificultat inherent a la síntesi enantiomèrica, no hi ha cap alternativa viable per a la inequívoca identificació dels enantiòmers.

Una altra eina necessària per a l'anàlisi de l'estereoquímica en el metabolisme de la MDMA va ser el desenvolupament de metodologies analítiques que permetessin la determinació simultània de la MDMA i dels seus principals metabòlits als fluids biològics. Treballar amb compostos de polaritat diferent (MDMA, MDA, HMMA i HHMA), afegeix una complexitat més al fet d'estudiar aquestes estructures des del punt de vista de l'estereoquímica però, va ser un requisit indispensable pel fet de treballar amb mostres biològiques finites i úniques.

Finalment, es pretenia estudiar el perfil farmacocinètic dels compostos al llarg d'extensos períodes de temps després de l'administració del fàrmac (fins a 48 hores), que

permetessin valorar més acuradament les dades dels temps de semivida d'eliminació dels metabòlits (estudiades prèviament fins a 24 h).

1. INTRODUCCIÓ

1.1. LA MDMA COM A PROTOTIPUS DE LES DROGUES DE DISSENY: APUNTS BÀSICS

1.1.1. INTRODUCCIÓ A LES DROGUES DE DISSENY

Les drogues de disseny, junt amb els al·lucinògens, són les anomenades drogues recreatives. Amb el terme *drogues recreatives* es fa referència a una sèrie de drogues que s'utilitzen quasi exclusivament amb la finalitat de diversió i relació satisfactòria amb l'entorn, per tal d'aprofitar i gaudir amb intensitat del temps lliure (Infante i cols., 2003).

Les *drogues de disseny* o *drogues de síntesi* foren desenvolupades a partir de la modificació de l'estructura química de certs productes naturals o fàrmacs mantenint però, uns efectes farmacològics similars als dels seus precursors. La síntesi d'aquestes drogues es pot dur a terme amb mètodes químics senzills de manera clandestina i la seva presentació sol ser en forma de pastilles de diferents colors i formes amb una gran varietat de símbols estampats.

En funció de la seva estructura química, les drogues de disseny es poden dividir en:

A.- *Feniletamines*: 3,4-metilendioxiemetamfetamina (MDMA, èxtasi), 4-metil-2,5-dimetoxiamfetamina (DOM, STP), 4-bromo-2,5-dimetoxiamfetamina (DOB), 2,4,5-trimetoxiamfetamina (TMA-2), parametoxiamfetamina (PMA), parametoximetamfetamina (PMMA), 4-bromo-2,5-dimetoxifenilamfetamina (2CB, afterturner), 3,4-metilendioxiametamfetamina (MDA, love drug), 3,4-metilendioxietilamfetamina (MDEA, MDE, Eva).

B.- *Opiacis*: alfametilfentanil (AMF, China white), 3-metilfentanil (3-MF), parafluorofentanil (PFF), alfametilacetilfentanil (AMAF), 1-metil-4-fenil-4-propionoxipiperidina (MPPP), 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP).

C.- *Arihexitamines*: fenciclidina (PCP, pols d'àngel), ketamina, piperidinciclohexancarbonitril (PCC), tiofenciclidina (TCP), *N*-etilfenciclidina (PCE), fenilciclohexilpirrolidina (PHP).

D.- *Derivats de la metacualona*: meclocualona, nitrometacualona.

E.- *Altres*: gammahidroxibutirat (GHB, èxtasi líquid), èxtasi vegetal.

(Lorenzo i Lizasoain, 1993; Infante i cols.,2003).

1.1.2. LA MDMA: BREU RESUM DE LA SEVA HISTÒRIA

Taula 1.1.1. *Dates més destacades de la història de la MDMA.*

1912	Síntesi de la MDMA per part d'investigadors de Merck Pharmaceuticals.
1914	Patent de la MDMA (patent nº 274.350).
1953	L'exèrcit nord-americà estudia la toxicitat de la MDMA en animals.
1965	Alexander Shulgin resintetitzava la MDMA per assajar-la en diferents estudis.
1967	Primeres síntesis clandestines confiscades.
1968	Alexander Shulgin comença a experimentar amb la MDMA.
1970	Primeres síntesis il·legals de MDMA a petita escala.
1976	Primer informe sobre els efectes psicoactius de la MDMA en humans (Shulgin i Nichols, 1978).
1977	El Regne Unit inclou la MDMA i amfetamines estructuralment relacionades en la categoria de drogues més controlades al país.
1977-1985	Època "daurada" de la MDMA, tant per ús experimental com terapèutic.
1984	Introducció de la MDMA en ambients estudiantils.
27/7/1984	La DEA proposa incloure la MDMA en la llista I de substàncies prohibides (substàncies amb un alt risc d'abús).
1/8/1985	S'inclou temporalment la MDMA en la llista I de la DEA.
26/4/1986	S' il·legalitza el consum de la MDMA a tot el món.
30/5/1986	Entra en vigor a Espanya la il·legalització de la MDMA.
1987	Primer cas publicat de mort relacionada amb l'ús de la MDMA.

La MDMA va ser sintetitzada el 1912 pels laboratoris Merck i patentada el 1914 com a anorexígen, tot i que mai va ser comercialitzada. No es tornen a tenir notícies de la MDMA fins el 1953, quan es van fer estudis toxicològics en models animals per part de l'exèrcit nord-americà (Holsten i Schieser, 1986). A partir de 1965 es va començar a experimentar el seu ús terapèutic i el 1976 es van publicar els primers informes sobre els efectes psicoactius de la MDMA (Shulgin i Nichols, 1978).

La MDMA es va popularitzar enormement a principis dels anys 80, utilitzant-se de manera terapèutica però també experimentalment en ambients contraculturals del moment (new agers). A finals de 1984 s'introdueix en ambients estudiantils i entre els *yuppies* (young urban professional people) però també en aquest any l'Organització Mundial de la Salut (OMS) proposa la inclusió de la MDMA en una llista de substàncies amb potencial d'abús i sense aplicació mèdica que incompleix les normes de seguretat exigides per la Food and Drug Administration (FDA). Després de diferents reunions de la FDA i envoltada d'una gran polèmica, a l'abril de 1986 la MDMA es considera il·legal arreu del món pel Comitè d'Experts en Drogodependències de l'OMS.

Les dates més destacades de la història de la MDMA es resumeixen a la taula 1.1.1. (Shulgin i Shulgin, 1971; Hardman i cols., 1973; Nichols i Shulgin, 1976; Dowling i cols., 1987; Eisner, 1994; Sáiz i cols., 2003).

A Espanya va aparèixer una ordre ministerial al BOE aproximadament un mes més tard de la decisió de l'OMS, de manera que es va prohibir l'ús, fabricació, importació, trànsit i comerç de la MDMA i del tots els preparats que la continguin.

Pel que fa a l'evolució de l'ús de la MDMA a Espanya, es poden distingir cinc períodes ben diferenciats (Gamella i Álvarez, 1999) (taula 1.1.2.).

Taula 1.1.2. *Evolució del consum de la MDMA a Espanya.*

Fase prèvia	1978-1986	Consum puntual i experimental. Primers consums grupals a Eivissa (1983).
Fase inicial	1987-1989	Extensió del consum a grans ciutats, però limitat a entorns cosmopolites i contraculturals. Primeres confiscacions policials.
Fase de popularització	1990-1991	Es popularitza el consum. Primeres emergències mèdiques.
Fase de vulgarització i consum extensiu	1992-1996	Massificació del consum a tot el país. Primers casos de mort.
Fase de rutina i esgotament (estabilització)	1997-	Estabilització del nombre de consumidors.

1.1.3. EL CONSUM ACTUAL DE LA MDMA A ESPANYA

Malgrat és difícil comparar estudis epidemiològics dels diferents països, les dades disponibles indiquen que actualment Espanya és el tercer país en número de consumidors d'èxtasi a la Unió Europea després del Regne Unit i Irlanda.

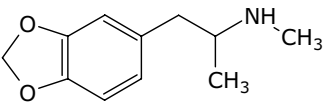
El consum de drogues recreatives a Espanya ha augmentat els darrers anys i ara es considera estabilitzat. En qualsevol cas, en comparació amb altres drogues consumides en entorns similars com l'alcohol o el cannabis, la MDMA té una prevalença bastant més petita. Les dades de 2001 apunten que el 4% de la població de 15-64 anys ha consumit algun cop drogues de disseny, el 1.8% ho havia fet l'últim any i un 0.7%, l'últim mes. A la *Encuesta sobre drogas a la población escolar* del 2001 es mostra que el 2.9% de joves de 15 i 16 anys ha consumit èxtasi algun cop.

El perfil del consumidor de MDMA és el d'un jove (més freqüentment home) de 15 a 29 anys, (sent el major consum dels 20 als 24 anys) integrat socialment, que estudia o treballa i viu generalment amb els pares. Pertany a una ciutat gran o mitjana i pren la droga durant el cap de setmana en un ambient festiu (discoteca, pub o bar) amb el seu grup d'amics. La major part dels consumidors són ocasionals, amb una freqüència mensual o setmanal (més freqüència de consum entre els homes que les dones). Segons el *Observatorio Español sobre Drogas*, la principal motivació dels consumidors de les drogues de disseny és divertir-se (46.1%), experimentar noves sensacions (39.5%) o ballar (22.9%).

Un altre aspecte molt important del consum d'èxtasi és el policonsum, tot i que durant molt de temps es va estendre la idea que la MDMA només es prenia conjuntament amb grans quantitats d'aigua. Actualment no hi ha consumidors purs d'èxtasi i les altres substàncies que es prenen juntament amb la MDMA són habitualment alcohol (93.8%), cannabis (88.1%), tabac (86.6%), o cocaïna (56.5%).
(Rodríguez i cols., 2003, Infante i cols., 2003)

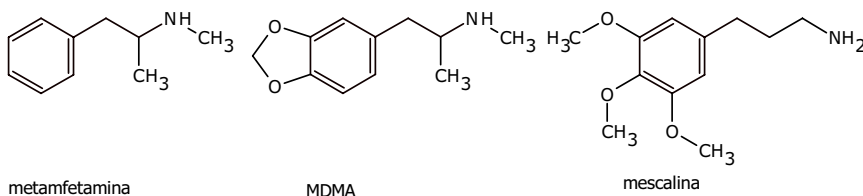
1.1.4. DADES GENERALS DE LA MDMA

Noms químics acceptats per la IUPAC: 3,4-metilendioximetamfetamina;
N-metil-3,4-metilendioxiamfetamina; N-metil-3,4-metilendioxifenilisopropilamina; N- α -
dimetil-1,3-benzodioxole-5-etanamina; (2-benzol-[1,3]-dioxol-5-il-1-metiletil)-metilamina;
(R,S)-3,4-metilendioximetamfetamina; (\pm)-3,4-metilendioximetamfetamina.

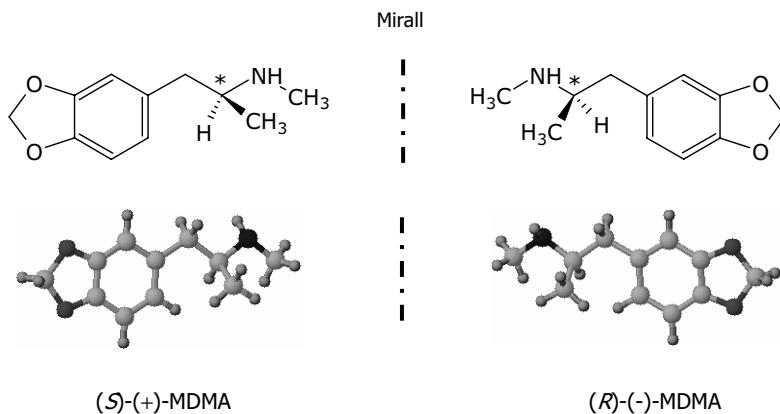
Estructura química:	
Noms a l'argot:	èxtasi; MDMA; X; XTC; Adam; E.
Fórmula molecular:	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂
Composició elemental:	C: 68.37%; H: 7.82%; N: 7.25%; O: 16.56%
Pes molecular:	193.25 (MDMA); 229.75 (MDMA·HCl)
pKa:	(pH 9.0) 9.41 (benzè); 8.69 (hexà); 8.84 (acetat d'etil)
Punt de fusió:	147-148 °C (MDMA·HCl precipitat en isopropanol/hexà); 152-153 °C (MDMA·HCl precipitat en isopropanol/èter)
Punt d'ebullició:	100-110 °C (MDMA)
Dades de referència de l'ultraviolat:	E ^{1%} _{1cm} =191.79; λ= 286 nm (metanol) (MDMA)
Dades de rotació òptica:	[α] ₂₀ ^D = +17.9 (c=1, H ₂ O) ((S)-MDMA·HCl)
CAS:	42542-10-9 (MDMA); 64057-70-1 (MDMA·HCl)
Espectre de masses:	m/z: 58, 135, 77, 51, 55, 136, 105, 63

1.1.5. DADES ESTRUCTURALS DE LA MDMA

La MDMA és un derivat de l'amfetamina, amb l'anell benzènic substituït amb un anell metilendioxi. Estructuralment és similar a la metamfetamina i la mescalina.



En posició α a l'amina té un centre estereogènic o centre quiral (*), responsable de que la molècula pugui existir en forma de dues estructures tridimensionals diferents, amb la mateixa relació que un objecte i la seva imatge en un mirall que no es poden superposar (enantiòmers).



1.2. FARMACOLOGIA DE LA MDMA

1.2.1. MECANISME D'ACCIÓ

La MDMA és capaç de produir un alliberament agut i ràpid de serotonina (5-HT), dopamina (DA) i norepinefrina (NE) dels terminals nerviosos del cervell en models animals, així com una inhibició dels mecanismes de recaptació d'aquests neurotransmissors. Aquestes accions són el resultat de la interacció de la MDMA amb els transportadors de membrana involucrats en la recaptació d'aquests neurotransmissors i els sistemes d'emmagatzematge vesicular. També inverteix la direcció dels transportadors de membrana, facilitant així el flux de 5-HT, DA i NE a l'espai presinàptic, amb el conseqüent increment de l'activació dels receptors postsinàptics (Green i cols., 2003).

De manera similar a altres anàlegs amfetamínics, la MDMA és un inhibidor de la monoaminoxidasa (MAO). Aquesta inhibició redueix el metabolisme de la 5-HT i DA als terminals nerviosos, contribuint així als efectes més sostinguts d'aquests neurotransmissors.

La MDMA també té algunes accions directes sobre els receptors 5-HT_{2A}, muscarínic (M₁), α₂-adrenèrgic i histamínic (H₁).

Finalment, la MDMA inhibeix la triptofan hidroxilasa, que és l'enzim limitant de la síntesi de serotonina, disminuint d'aquesta manera la formació d'aquest neurotransmissor. Aquesta inhibició s'ha pogut observar en models animals fins i tot dues setmanes després de l'administració d'una dosi única de MDMA.

1.2.2. EFECTES AGUTS I EFECTES ADVERSOS

Els efectes aguts de la MDMA han estat descrits en diversos estudis retrospectius, enquestes i casos d'intoxicació. Les observacions aportades per aquests estudis són limitades pel fet que es desconeixen les dosis administrades i sovint es tracta de consum concomitant amb altres drogues d'abús, pel que és difícil associar els efectes observats a una substància en concret. Malgrat les limitacions, aquests estudis han aportat dades molt significatives que posteriorment s'han pogut confirmar i aprofundir amb avaluacions rigoroses realitzades amb estudis controlats d'administració de MDMA en humans. A continuació es descriuen els principals efectes subjectius i fisiològics, sobre el rendiment psicomotor i sobre la regulació del sistema endocrí i immune:

Efectes subjectius i rendiment psicomotor: eufòria, benestar, estimulació i augment d'energia (propis de les amfetamines clàssiques), extroversió, sentiments de proximitat amb els altres, empatia, sociabilitat (efectes entactògens), alguns canvis en la percepció de colors i sons, moderada desrealització (no al·lucinacions, efectes disfòrics) (Vollenweider i cols., 1998; Camí i cols., 2001; Lietchti i Vollenweider, 2001). El rendiment psicomotor empitjora en incrementar-se la dosi de MDMA.

Efectes fisiològics: augments (dosi dependents) en la pressió arterial (sistòlica i diastòlica) i freqüència cardíaca, augment de la temperatura corporal i midriasi.

Efectes indesitjables després l'administració: tremolor, tensió muscular i mandibular, sequedat de boca, pèrdua de la gana, dificultat de concentració i confusió. També s'han descrit atacs de pànic i episodis psicòtics.

Efectes indesitjables a curt termini (fins a les 24 h després de l'administració): cansament, sequedat de boca, pèrdua de la gana, insomni, somnolència, feblesa, tensió muscular, dificultat de concentració i mals de cap.

Efectes indesitjables a mig termini (fins 7 dies després de l'administració): cansament, irritabilitat, ansietat, insomni, falta d'energia i tensió muscular (Vollenweider i cols., 1998; Mas i cols., 1999; de la Torre i cols., 2000a; Lietchi i Vollenweider, 2001).

Efectes hormonals: augment (dosi dependent) de la secreció de les hormones adrenocorticotropa (ACTH), cortisol, prolactina, dehidroepiandrosterona (DHEA) i antiürètica (ADH, vasopresina). No es veuen alterats els nivells de l'hormona de creixement (GH) (Grob i cols., 1996; Henry i cols., 1998; Mas i cols., 1999; Harrys i cols., 2002).

Efectes immunològics: la MDMA produeix estrès químic, induint augments en el nombre de cèl·lules naturals assassines (natural killers) i disminució del número de limfòcits CD4; reducció de la síntesi de interleukina-2, augment dels nivells de interleukines 4 i 10 (Pacifci i cols., 1999; 2000; 2001a, 2001b, 2002) i reducció de la funcionalitat del sistema immunitari.

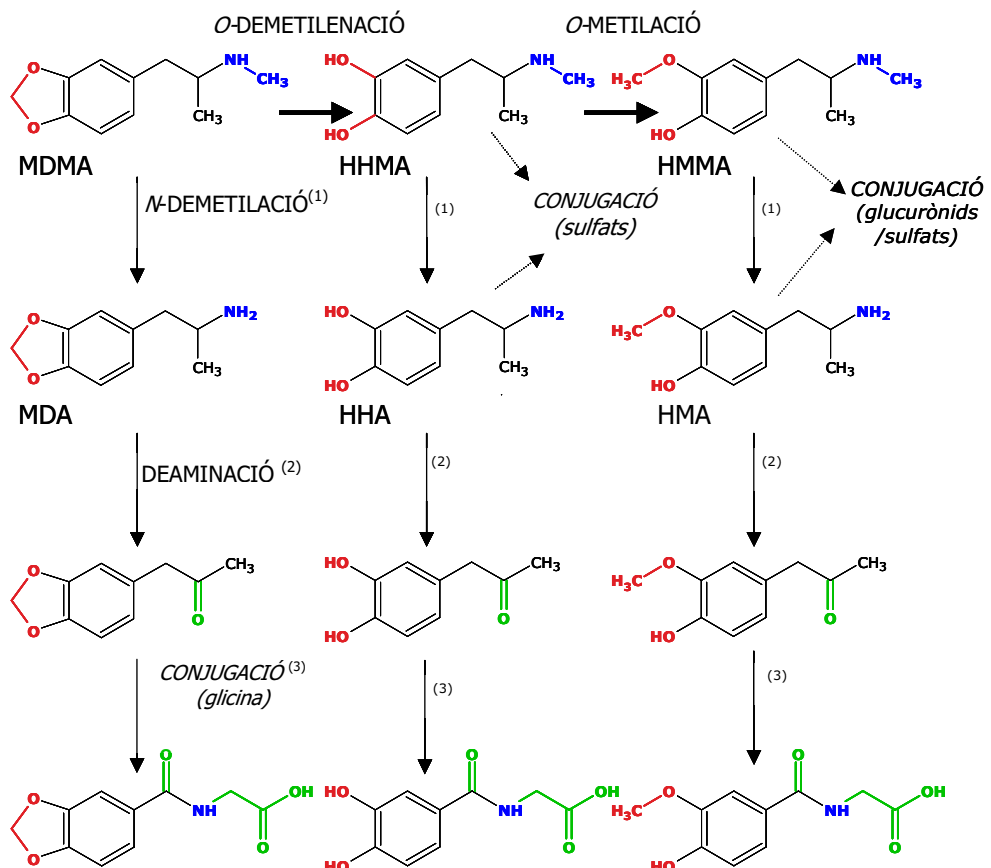
1.2.3. METABOLISME

Les principals vies metabòliques de la MDMA són l'*O*-demetilació de l'anell metilendiox i la *N*-demetilació de l'amina secundària (Ensslin i cols., 1996; Maurer, 1996; de la Torre i cols., 2000a; Kraemer i Maurer, 2002). Les principals vies metabòliques de la MDMA s'esquematitzen en el diagrama adjunt (esquema simplificat, p. 17). L'*O*-demetilació de la MDMA dona com a producte un intermedi metabòlic tipus catecol extremadament reactiu: la 3,4-dihidroxi metamfetamina, HHMA. Aquest intermedi es metila en posició 3 a l'anell donant 4-hidroxi-3-metoximetamfetamina, HMMA.

La *N*-demetilació de la MDMA dona lloc a la 3,4-metilendioxiamfetamina (MDA) que es metabolitza via una *O*-demetilació de la mateixa manera que la MDMA (formant-se 3,4-dihidroxi amfetamina, HHA i 4-hidroxi-3-metoxiamfetamina, HMA, consecutivament) o bé pateix una deaminació (donant derivats d'àcid benzòic) seguida d'una oxidació (que dona derivats de la glicina). També els metabòlits HHMA, HMMA, HHA i HMA poden donar lloc a derivats de l'àcid benzòic i de la glicina (Maurer, 1996). Finalment, mentre que l'HMMA i HMA poden formar conjugats glucurono/sulfat, l'HHMA i HHA formen generalment conjugats sulfat.

Respecte dels enzims responsables de les diferents vies metabòliques, estudis *in vitro* han pogut confirmar que la reacció d'*O*-demetilació té una cinètica bifàsica, amb un component d'alta afinitat regulat pel CYP2D6 (30% metabolisme) i un component de baixa

afinitat regulat principalment per l'isoenzim CYP1A2 i en menor extensió pels CYP2B6 i CYP3A4. La *N*-demetilació sembla tenir una cinètica monofàsica regulada pel CYP2B6 i la velocitat de la reacció és aproximadament un ordre de magnitud més petita que l'*O*-demetilació (5% metabolisme). Finalment, l'*O*-metilació està catalitzada per la catecol-*O*-metiltransferasa, COMT (Tucker i cols., 1994; Maurer, 2000; Kretz i cols., 2000) (veure esquema d'enzims implicats, p.18).



Esquema simplificat de la depuració metabòlica de la MDMA

1.2.4. FARMACOCINÈTICA

La farmacocinètica de la MDMA i dels seus principals metabòlits en humans s'ha pogut determinar en diferents estudis d'administració controlada. Aquests han pogut demostrar que la MDMA s'absorbeix ràpidament per via oral i s'obtenen concentracions màximes aproximadament 2 h després del consum (Mas i cols., 1999). Les concentracions dels metabòlits HHMA i HMMA superen els valors de la MDMA i en plasma es detecten abans que el propi fàrmac, fet que suggereix que hi ha un fenomen de *metabolisme de primer pas* molt important (Segura i cols., 2001).

A la taula 1.2.1. es presenten les principals dades farmacocinètiques de la MDMA, MDA, HHMA, HMMA i HMA, calculades a partir de les concentracions plasmàtiques obtingudes amb els estudis d'administració a dosi única de 100 mg de (*R,S*)-MDMA·HCl en voluntaris sans (Mas i cols., 1999; de la Torre i cols., 2000; Segura i cols., 2001).

Taula 1.2.1. *Paràmetres farmacocinètics de la MDMA i dels seus principals metabòlits.*

	C_{max} (ng/mL)	t_{max} (h)	AUC_{0-24h} (ng/mL·h ⁻¹)	k_a (h ⁻¹)	K_e (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)
MDMA						
Mitjana	225.5	2.3	3431.4	2.7	0.099	9.0
± DE	26.1	1.1	766.5	1.5	0.0015	2.3
MDA						
Mitjana	13.1	6.7	191.8	0.6		24.9
± DE	4.5	2.6	58.3	0.3		14.5
HHMA						
Mitjana	154.5	1.2	1990.9	5.3	0.063	13.4
± DE	76.6	0.3	647.1	2.9	0.026	8.1
HMMA						
Mitjana	236.7	2.3	2592.2	2.3	0.084	11.2
± DE	87.1	0.9	668.8	0.9	0.013	2.9
HMA						
Mitjana	7.5	8.2	132.0	0.4		37.4
± DE	4.0	1.7	86.8	0.1		17.9

n= 8 voluntaris (per HHMA, n=4 voluntaris)

INTRODUCCIÓ

On:

C_{\max} (ng/mL) = concentració màxima plasmàtica;

t_{\max} (h) = temps al qual s'arriba a la concentració màxima plasmàtica;

AUC_{0-24h} (ng/mL·h⁻¹) = àrea sota la corba de concentracions de 0 a 24 h;

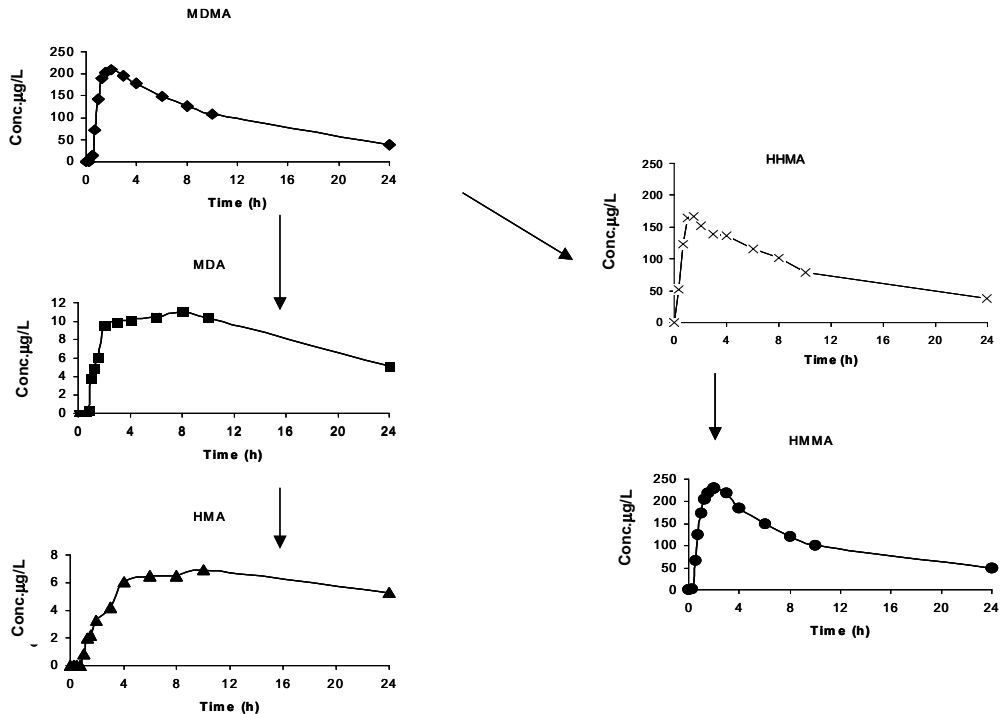
k_a (h⁻¹) = constant d'absorció per a la MDMA. En el cas dels metabòlits, es refereix a la corresponent constant de formació;

k_e (h⁻¹) = constant d'eliminació;

$t_{1/2}$ (h) = semivida d'eliminació.

Hi ha molt poques dades que facin referència a la capacitat de la MDMA i substàncies relacionades de lligar-se a proteïnes plasmàtiques. Les úniques dades experimentals s'han obtingut amb estudis en gossos i s'ha descrit un 27, 34 i 40% de lligam d'amfetamina, MDA i MDMA, respectivament, independentment de la dosi en tots els casos (Baggot i Davis, 1973; Garret i cols., 1991).

Les concentracions plasmàtiques al llarg del temps de la MDMA, HHMA, HMMA, MDA i HMA després d'administrar 100 mg de MDMA·HCl racemat s'han representat a les següents gràfiques:



La MDMA i els seus metabòlits també es van mesurar en orina recollida en diferents períodes després de l'administració del fàrmac. Els resultats es presenten a la taula 1.2.2.

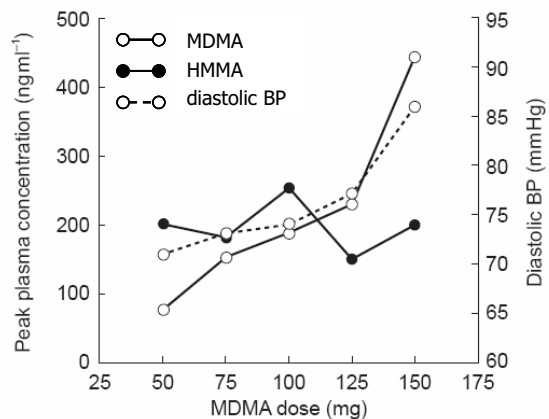
Taula 1.2.2. Concentracions urinàries de la MDMA i dels seus principals metabòlits.

	0-4 h (μmols)	4-8 h (μmols)	8-12 h (μmols)	12-24 h (μmols)	0-24 h (μmols , %)
MDMA	22.7	15.5	8.8	30.8	77.8 (15.0%)
MDA	1.4	1.1	0.8	4.6	7.8 (1.5%)
HHMA	30.9	21.4	12.8	26.6	91.8 (17.7%)
HMMA	35.4	30.3	11.7	40.0	117.4 (22.7%)
HMA	1.5	1.4	0.9	3.2	7.0 (1.4%)

Comparant aquests resultats amb estudis d'excreció d'altres amfetamines, el percentatge de MDMA que es *N*-demetila cap a MDA és més baix que el que s'ha observat per a la metamfetamina (10.6% en forma d'amfetamina a l'orina de 48 h) (Mendelson i cols., 1995). Per a la MDEA, un 2.8% de la dosi es recupera en forma del metabòlit *N*-deetilat a l'orina de 32 h, mentre que es recuperen quantitats comparables de la droga (15% dosi per a MDMA i 19% de la dosi per a MDEA) (Ensslin i cols., 1996). Respecte a l'*O*-demetilenació, l'HMEA representa el 31.6% de la dosi vs. el 22.7% d'HMMA, confirmant-se que l'*O*-demetilenació està afavorida davant la *N*-demetilació quan la molècula conté un anell metilendioxi. A més a més, l'*O*-demetilenació encara està més afavorida a mida que augmenta el substituent de l'amina secundària.

Els estudis d'administració de MDMA en voluntaris sans s'han pogut realitzar amb dosis de 50, 75, 100, 125 i 150 mg de (*R,S*)-MDMA·HCl. Els perfils farmacocinètics de les diferents dosis assajades han suggerit que aquest fàrmac té una *farmacocinètica no lineal*.

La farmacocinètica no lineal de la MDMA es veu reflectida en les concentracions plasmàtiques de la MDMA i dels seus metabòlits, en concret de l'HMMA (veure figura adjunta). Les concentracions d'aquests dos compostos no són proporcionals a les dosis utilitzades



en cada cas, existeix una tendència a l'acumulació de la MDMA a les dosis més elevades i s'observen nivells de concentració pràcticament constants del metabòlit HMMA (de la Torre i cols., 1999 i 2000a). Aquest fet s'atribueix a alguns intermedis de reacció en l'O-demetilació de la MDMA actuen com a inhibidors enzimàtics del CYP2D6, limitant-se la biotransformació de la MDMA a HHMA i HMMA via aquest isoenzim.

El fenomen de la farmacocinètica no lineal de la MDMA s'ha pogut confirmar en estudis d'administració del fàrmac a dosis repetides, en concret amb un assaig clínic en voluntaris sans on es van administrar dues dosis de 100 mg de (R,S)-MDMA·HCl amb un interval de separació de 24 h entre les dues administracions. Després de la primera administració, les concentracions plasmàtiques de MDMA de la segona dosi van augmentar respecte de la primera un 77% comparant AUCs (o un 29% comparant C_{max}), un augment més gran del que es podria esperar tenint en compte una acumulació simple del fàrmac i indicatiu d'una inhibició metabòlica (Farré i cols., 2004). Aquests resultats també mostren que la inhibició del CYP2D6 roman almenys durant 24h. La modelització matemàtica de les dades cinètiques obtingudes a diferents dosis de MDMA indiquen que el CYP2D6 pot trigar fins a 280 h en retornar a un 90% de la seva activitat basal després de l'exposició a aquest xenobiòtic (Yang i cols., 2003). La inhibició pot tenir conseqüències toxicològiques significatives tenint en compte que els usuaris de la MDMA no solen consumir dosis úniques i normalment fan un consum concomitant amb altres drogues o fàrmacs amb els que pot existir interacció metabòlica.

1.2.5. FARMACOGENÈTICA

Els principals enzims involucrats en el metabolisme de la MDMA en humans són, com s'ha vist anteriorment, el CYP2D6 i la COMT. Tots dos enzims són altament polimòrfics en humans.

El CYP2D6 és un enzim que pot tenir múltiples variants al·lèliques que poden afectar la seva expressió (Mizutani, 2003). Així, aproximadament un 7-10% de la població caucasiana europea té una deficiència metabòlica d'aquest enzim que fa que siguin catalogats com a metabolitzadors lents (ML), al ser els subjectes homozigots per dos variants al·lèliques no funcionals (p. e. CYP2D6 **4/*4*) (Marez i cols., 1997; Sachse i cols., 1997). La majoria dels individus presenta una càrrega genètica *wild type/wild type* (CYP2D6 **1/*1*) i es comporten com a metabolitzadors ràpids (MR). Existeixen també metabolitzadors

ultrarràpids (MU) (duplicacions de gens funcionals) i metabolitzadors intermedis (MI) heterozigots per una variant al·lèlica no funcional (p. e. CYP2D6 ^{*4/*1}).

Al plasma dels subjectes MR, el metabòlit majoritari és l'HMMA, seguit de l'HHMA i MDMA. Els ML, en canvi, mostren concentracions plasmàtiques de MDMA per sobre de les dels metabòlits (tres vegades superior que pels MR), seguits pels nivells d'HHMA (la meitat que pels MR) i HMMA (només el 12% de les dels MR). Els MI mostren uns nivells plasmàtics dels diferents compostos a mig camí dels trobats per MR i ML. La relació d'analits trobada en el cas dels MR és indicativa d'un metabolisme de primer pas, però no és tan clar que també es doni aquest tipus de fenomen en el cas dels ML i MI (dades intramurals).

Les diferències individuals degudes a l'activitat del CYP2D6 van crear una certa alarma científica, pel fet que es va suposar que els subjectes catalogats com a ML podrien presentar més susceptibilitat a la toxicitat aguda de la MDMA o bé una major tendència al seu abús (Henry i Hill, 1998). De fet, hi ha dades experimentals que mostren que la toxicitat aguda està associada a concentracions plasmàtiques elevades (Greene i cols., 2003), tot i que en una sèrie prou curta de intoxicacions mortals per MDMA no s'ha observat cap biaix que mostri una major presència de metabolitzadors lents entre els subjectes (Gillhooly i Daly, 2002). Per altra banda, és molt probable que els metabòlits de la MDMA contribueixin als seus efectes aguts. Per exemple, s'ha pogut demostrar *in vitro* que l'HMMA estimula l'alliberament de vasopresina (Forsling i cols., 2002), fet que està relacionat amb la hiponatrèmia associada al consum de MDMA. Així doncs, aquesta observació suggeriria que els ML podrien ser menys susceptibles pel que fa a la toxicitat aguda relacionada amb la hiponatrèmia. D'altra banda, tampoc s'ha d'oblidar que la COMT regula la formació de l'HMMA.

Un altre aspecte molt important relacionat amb l'activitat enzimàtica del CYP2D6 és la neurotoxicitat associada a mig/llarg termini, que sembla estar relacionada amb els nivells de concentració dels metabòlits de la MDMA. Aquests aspectes es discutiran amb més detall a l'apartat de neurotoxicitat.

Finalment, és important remarcar que la inhibició metabòlica del CYP2D6, conseqüència del consum de la MDMA, fa que independentment de la dotació genètica, MR i ML tenen un comportament metabòlic similar després del consum de la primera dosi de MDMA. Així doncs, altres isoenzims CYP són els que juguen un paper fonamental a la biodisponibilitat de la MDMA després de la primera dosi als dos casos.

El polimorfisme de *la COMT* dona lloc a formes enzimàtiques d'elevada o baixa activitat. En el cas d'aquest enzim, s'estima que el 25% de la població caucàsica presenta

una activitat baixa (Zhu, 2002). Variacions en l'activitat d'aquest enzim poden tenir repercussió en la secreció de vasopresina que s'observa després del consum de la MDMA i caldria conèixer l'activitat tant del CYP2D6 com de la COMT per poder predir variacions en la secreció d'aquesta hormona.

1.2.6. NEUROTOXICITAT

El consum de MDMA està associat amb una toxicitat aguda i a mig/llarg termini. La neurotoxicitat a mig i llarg termini s'ha relacionat amb una neurodegeneració en el sistema serotoninèrgic. L'impacte que pot tenir la neurotoxicitat en els consumidors de la MDMA és el problema que actualment més preocupa a la comunitat científica. En termes clínics, aquesta neurotoxicitat es tradueix en una pèrdua gradual de funcions cognitives com la memòria o la realització de tasques complexes, un augment de la impulsivitat i agressivitat i una major incidència de psicopatologies, com ara la depressió (Green i cols., 2003).

La neurotoxicitat no s'ha pogut demostrar en humans de forma conclouent però diferents estudis en models animals han pogut mostrar la presència de canvis neuroquímics i morfològics significatius en les neurones serotoninèrgiques com a resposta de l'administració d'anàlegs metilendioxí (Boot i cols., 2000; McCann i cols., 2000; Morgan, 2000).

Els mecanismes pels quals es produeix la neurotoxicitat encara no són del tot clars, tot i que es proposa que la hipertermia i la formació de radicals lliures induïts pel consum de la MDMA estarien relacionats amb el seu desenvolupament.

Un altre aspecte que es desconeix és si la neurotoxicitat ve provocada per la pròpia MDMA o en són responsables els seus metabolits. Si bé la MDMA i MDA són potents neurotòxics serotoninèrgics, estudis d'administració directa al cervell de models animals no han pogut reproduir la neurotoxicitat induïda per la MDMA quan s'administra per altres vies (Esteban i cols., 2001). Aquest fet en suggereix que és imprescindible una activació metabòlica d'aquestes substàncies per poder desenvolupar-la (McCann i Ricaurte, 1991; Chu i cols., 1996). La injecció directa dels metabòlits HMMA, HHMA, HHA i HMA al cervell tampoc reproduïx la neurotoxicitat induïda per la MDMA, pel que s'ha hipotetitzat que els responsables de la neurotoxicitat són uns *adductes d'HHMA i HHA amb glutatió i/o cisteïna* (Bai i cols., 1999; Monks i cols., 2001, Carvalho i cols., 2004). Aquests adductes, el 2,5-bis-(glutation-S-il)- α -metildopamina i el 5-(N-acetilcisteïna-S-il)- α -metildopamina, administrats intracerebrament, sí van ser capaços de reproduir la neurotoxicitat observada després de l'administració de MDMA o MDA, augmentant les concentracions de serotonina i dopamina a

l'estriat, hipocamp i còrtex dels models animals i provocant neurodegeneració serotoninèrgica. Tot i que aquest experiments ha aportat dades molt importants en l'estudi de la neurotoxicitat de la MDMA, la formació *in vivo* d'aquest compostos en models animals no s'ha pogut confirmar fins fa molt poc i els resultats estan pendents de confirmació (Carvalho i cols., 2004).

Tenint en compte la relació entre neurotoxicitat i la formació d'espècies intermèdies amb els metabòlits tipus catecolamina, es pot deduir que pot haver una diferent susceptibilitat a la neurotoxicitat en funció de la dotació genètica per l'enzim CYP2D6, responsable de la formació d'aquestes estructures dihidroxilades. Així, es podria hipotetitzar que els ML tindrien un risc menor de neurotoxicitat que els MU, MR o MI.

1.3. ESTEREOQUÍMICA

L'*estereoquímica* (del grec *stereos*, sòlid) és la part de la química que estudia l'estructura en tres dimensions. Com la majoria de molècules són tridimensionals, l'estereoquímica no és una branca de la química, sinó que és un punt de vista que cada científic decideix tenir present o no en funció de la situació que vol resoldre (Vollhardt, 1992; Eliel and Wilen, 1994).

En l'evolució del coneixement químic, la tercera dimensió ha estat molts cops ignorada i no és fins a la segona meitat del segle XX que es considera fonamental per tots els camps de la química, inclosa la bioquímica. També en el món de la farmacologia, l'estereoquímica es va fer sovint imprescindible per entendre l'activitat biològica de molts fàrmacs.

Tot i la rellevància de l'aplicació de l'estereoquímica a les diferents disciplines científiques, la seva evolució s'ha centrat molt en el camp de la química analítica i la síntesi orgànica. Els científics no estan sempre prou familiaritzats amb l'estereoquímica i la seva terminologia específica. De vegades, la nomenclatura s'utilitza de manera inadequada i es barreja la terminologia. Per això, es considera important aclarir alguns conceptes. (Eliel and Wilen, 1994; Menéndez, 1997).

1.3.1. CONCEPTES BÀSICS

Els *isòmers* són compostos amb la mateixa fórmula molecular i el mateix tipus d'enllaç entre àtoms però, els àtoms estan disposats de diferent manera. Diferenciem entre isomeria estructural i estereoisomeria.

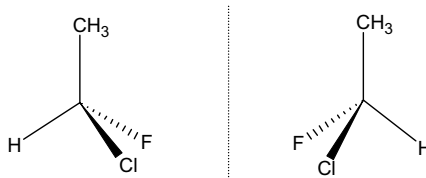
Les molècules que tenen la mateixa fórmula molecular però els seus àtoms estan enllaçats en un ordre diferent, s'anomenen *isòmers estructurals*.

Exemple: $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ i CH_3OCH_3

Els *estereoisòmers* tenen la mateixa fórmula molecular, els seus àtoms estan enllaçats en el mateix ordre però amb diferent distribució espacial. Hi ha dos tipus d'estereoisòmers: enantiòmers i diastereoisòmers.

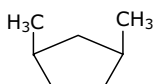
Els *enantiòmers* (del grec *enantios*, oposat; també anomenats *antímers*, *antípodes òptics* o *enantiomorfs*) tenen la mateixa relació que un objecte i la seva imatge en un mirall.

Exemple:

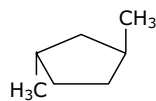
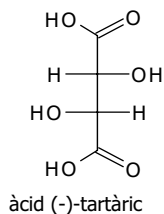


Per contraposició als enantiòmers, els *diastereoisòmers* (o *diastereòmers*) es defineixen com a estereoisòmers que no tenen relació d'un objecte i la seva imatge especular.

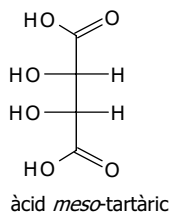
Exemples:



cis-1,3-dimetilciclopentà



trans-1,3-dimetilciclopentà



Una característica fonamental de l'estereoquímica és la *quiralitat* (del grec *quiro*, ma). Una molècula *quiral* és la que no es pot superposar amb la seva imatge en un mirall. Dit d'una altra manera, els compostos quirals són aquells que no tenen cap pla ni centre de simetria. Els compostos que no compleixen aquesta propietat s'anomenen *aquirals*.

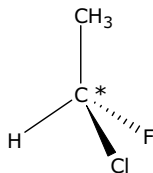
És important remarcar que tots els enantiòmers són quirals però no és el cas dels diastereoisòmers. Als exemples de diastereoisòmers anteriors, el *cis* i *trans*-1,3-dimetilciclopentà i l'àcid *meso*-tartàric són *aquirals* però l'àcid (-)-tartàric és *quiral*.

Existeix una certa ambigüitat en la utilització de l'adjectiu "quiral". El seu ús s'ha de restringir a caracteritzar, des d'un punt de vista conceptual, molècules (i compostos), cristalls i objectes que no es poden superposar amb la seva imatge en un mirall. No és correcte doncs, la seva aplicació per definir processos, com per exemple "síntesi quiral", "cromatografia quiral", etc.

Els termes "enantiòmer" i "diastereoisòmer" es refereixen globalment a la molècula (i no a un dels seus àtoms), malgrat que en molts casos la diferenciació es pot fer referint-se a un punt concret de l'estructura de la molècula, anomenat *centre estereogènic* (centre d'estereoisomeria), *centre quiral* o *centre asimètric*. Tot i que els tres noms s'utilitzen de forma indistinta, cal matisar que un centre estereogènic pot ser o no ser quiral, com és el cas d'alguns diastereoisòmers (per exemple, una forma *meso* és un diastereoisòmer *aquiral*). En aquestes casos, el centre d'estereoisomeria s'anomena *centre pseudoasimètric*.

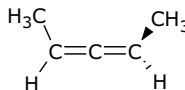
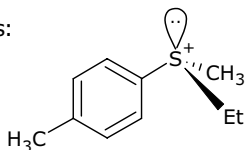
La situació més habitual en química orgànica és que un centre estereogènic correspongui a un àtom de carboni amb quatre substituents diferents.

Exemple:



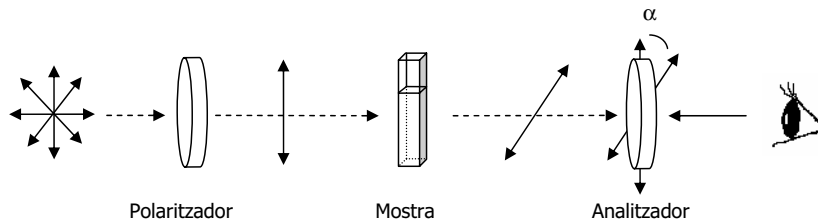
També es pot donar el cas que centre estereogènic sigui un àtom diferent del carboni o fins i tot, un punt en la estructura molecular tridimensional que no correspon a cap àtom.

Exemples:



INTRODUCCIÓ

Un parell d'enantiòmers té en comú totes les propietats físiques excepte l'*activitat òptica*, que és l'angle de rotació d'un plànol de llum polaritzada.



Així doncs, una parella d'enantiòmers té el mateix punt de fusió i ebullició o densitat però, un d'ells és capaç de rotar un plànol de llum polaritzada cap a una direcció oposada de l'altre.

L'activitat òptica compleix la llei de Biot (1815):

$$\alpha = [\alpha] \cdot c \cdot l$$

o bé:

$$[\alpha] = \frac{100 \alpha \text{ (graus)}}{l \text{ (dm)} \cdot c \text{ (g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}\text{)}}$$

on:

l = longitud de la cubeta que conté la substància en solució

c = concentració de la solució

$[\alpha]$ = rotació específica, (graus. $\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$), que depèn de la longitud d'ona a la que es fa la mesura (589 nm, línia de sodi, D), de la temperatura ($[\alpha]_D^T$), del dissolvent i de la concentració.

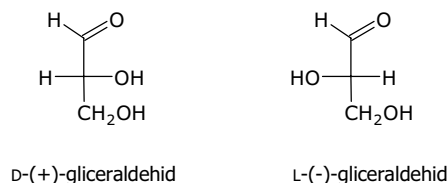
L'enantiòmer que gira un plànol de llum polaritzada en el sentit de les agulles del rellotge s'anomena (+)-enantiòmer. A la literatura científica es designa també com *dextro*- o *d*- (nomenclatura obsoleta –cursiva–). L'enantiòmer que gira el plànol de llum polaritzada en sentit antihorari és el (-)-enantiòmer (*levo*- o *l*-).

Les substàncies *aquirals* no poden girar un plànol de llum polaritzada. No s'ha de confondre amb un *racemat* o *mescla racèmica*, una mescla 1:1 d'enantiòmers, que compensa la rotació dels dos enantiòmers i globalment no s'aprecia rotació. Es designen normalment com (*R,S*), *rac*- o (\pm) (*dl*) en nomenclatura antiga). Una mescla d'enantiòmers

diferent de 1:1 (*no racèmica*) tindrà la rotació òptica que correspongui a la proporció de rotació de cadascun dels enantiòmers.

L'activitat òptica d'un enantiòmer pot variar en magnitud i direcció segons les condicions experimentals en les que es mesuri. Per això, es desaconsella fer servir aquest paràmetre com a indicador estereoquímic. A més a més, l'activitat òptica és la única propietat amb la que es poden diferenciar enantiòmers purs però totes les altres propietats físiques d'una substància quiral varien en funció de la seva composició enantiomèrica. Finalment, és molt important indicar que el signe de l'activitat òptica no és indicatiu de la configuració absoluta d'una molècula; és a dir, de la disposició tridimensional dels àtoms a la molècula.

Històricament, la configuració absoluta es deduïa per correlació química amb els enantiòmers del gliceraldehid als que es va assignar de manera arbitrària la nomenclatura D- i L- (versales).



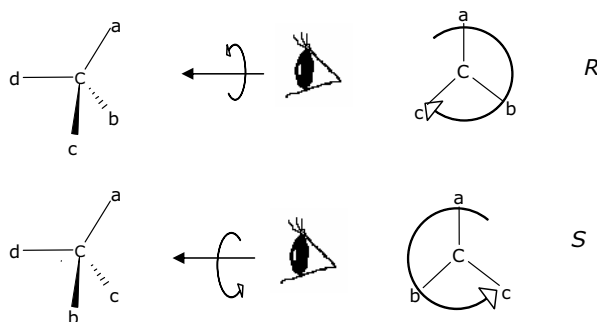
La correlació química amb el gliceraldehid consistia en la transformació d'un compost de configuració desconeguda en un dels enantiòmers del gliceraldehid, fent canvis que no afectessin el centre quiral al llarg de tots els passos de reacció necessaris. Aquells enantiòmers que es podien correlacionar químicament amb D- o L-gliceraldehid es van anomenar D- o L-, respectivament.

És molt important remarcar que la nomenclatura D, L es refereix a la disposició relativa dels substituents del centre estereogènic i no té cap relació amb el signe de l'activitat òptica. A més a més, avui dia aquesta nomenclatura només és correcte utilitzar-la per sucres i aminoàcids.

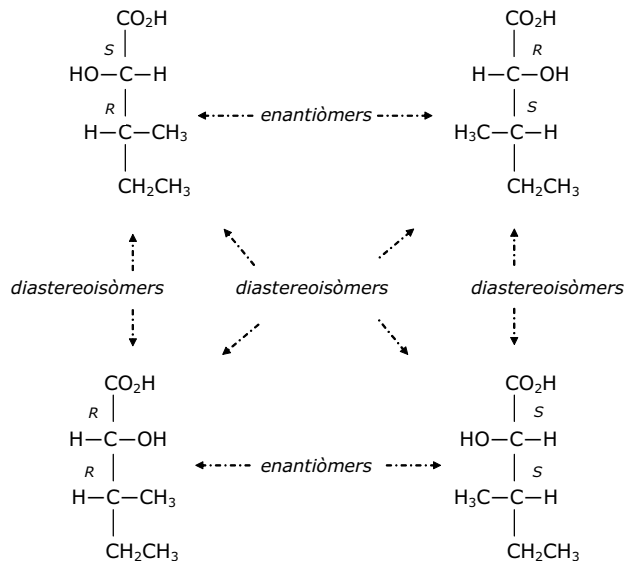
El 1951 es va fer servir per primer cop la difracció de raigs X aplicada a la determinació de la configuració absoluta i casualment, aquest fet va coincidir en el temps amb el desenvolupament d'un sistema inequívoc i senzill per indicar la quiralitat d'una molècula, el sistema R,S. Els químics R. S. Cahn, C. Ingold i V. Prelog van descriure unes

regles bàsiques per tal d'assignar prioritats als substituents d'un centre quirals (de més a menys prioritats: *a*, *b*, *c*, i *d*). Bàsicament, els substituents lligats al centre quirals s'ordenen segons una escala de prioritats basades en els seus números atòmics, donant una prioritats més alta a l'àtom de número atòmic més gran.

Un cop han estat assignades les prioritats, es disposa el substituent de menys prioritats (*d*) el més lluny de l'observador. Si per anar de *a* a *c* s'ha de fer en el sentit de les agulles del rellotge, el centre estereogènic s'anomena *R* (del llatí *rectus*, dreta –majúscules i cursiva-). La direcció contrària dona lloc al centre (*S*) (*sinister*, esquerra –majúscules i cursiva-). Igual que pel cas de la nomenclatura *D*-, *L*- , tampoc hi ha correlació entre l'assignació *R*, *S* i l'activitat òptica.

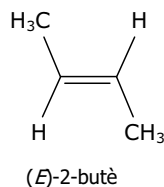
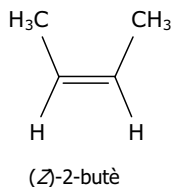
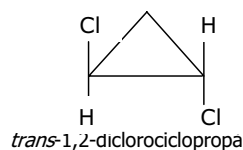
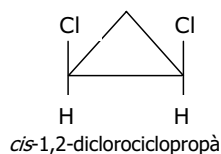


Així doncs, la manera correcta de definir un centre estereogènic és fent servir la nomenclatura *R,S*. El signe de l'activitat òptica és opcional però no necessari per a una assignació inequívoca del centre. Quan es tracta de centres pseudoasimètrics, s'utilitza la mateixa nomenclatura però en minúscules: *r*, *s*. En el cas de molècules amb més d'un centre estereogènic, cada centre pot ser *R* o *S*. Així, les diferents combinacions dels centres poden donar lloc a diferents estereoisòmers. Per exemple, una molècula amb dos centres quirals pot donar lloc a quatre possibles combinacions: (*R,R*), (*R,S*), (*S,R*) i (*S,S*) relacionades com s'indica al següent exemple:



Els diastereoisòmers amb diferents centres estereogènics que només es diferencien en la configuració d'un d'ells s'anomenen *epimers*. Pels diastereoisòmers també és habitual utilitzar la *configuració relativa*; és a dir, la disposició espacial dels elements estructurals d'una molècula per comparació entre ells, i es parla de configuracions R^*/S^* . En els cicles i alquens, normalment s'utilitza la nomenclatura *cis/trans* i *Z/E*, respectivament.

Exemple:



(Eliel and Wilen, 1994; Menéndez, 1997).

1.3.2. L'ESTEREOQUÍMICA EN LA FARMACOLOGIA

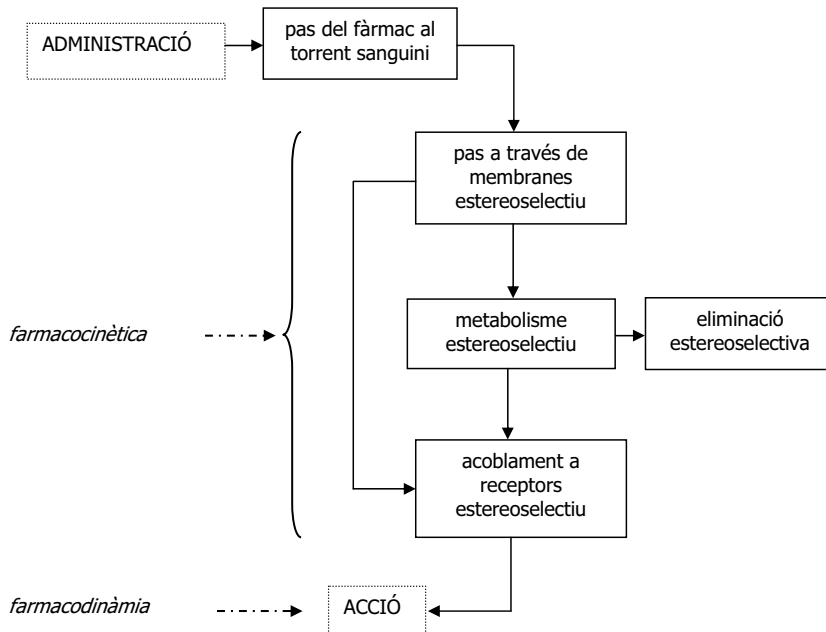
L'estereoquímica és especialment important en els sistemes biològics, molts cops capaços de discriminar o reconèixer enantiòmers individuals. Les diferents propietats dels membres d'una parella d'enantiòmers només es poden observar en medis quirals i els sistemes biològics són entorns quirals formats principalment per compostos de naturalesa proteica (constituïts per *L*-aminoàcids) i hidrats de carboni (*D*). Per tant, són bàsicament sistemes *homoquirals*, sistemes amb tots els seus centres estereogènics amb el mateix sentit de quiralitat (tots *R* o tots *S*).

Els estereoisòmers interaccionen amb receptors quirals dels sistemes biològics, de manera que la biodiscriminació d'aquests estereoisòmers és una discriminació diastereoisomèrica.

Els productes naturals sovint es presenten com a enantiòmers purs, tot i que també existeixen com a racemats. L'àcid làctic, per exemple, es troba a la sang i als músculs en forma de un únic enantiòmer i en canvi, existeix com a racemat a la llet agra. Els compostos quirals sintètics, en canvi, estan normalment disponibles com a racemats.

La biodiscriminació de les substàncies quirals pot veure's reflectida de múltiples formes. Als humans, les diferències estereoquímiques sovint afecten els sentits i existeixen nombrosos exemples. Per exemple, el diastereoisòmer *1,1* del monosacàric *N*-aspartilfenilamina metil ester és extremadament dolç mentre que el *1,2* és amarg. També, el (*R*)-limonè és responsable de la olor a llimona i l'enantiòmer *S* dona olor a les taronges.

En el món de la farmacologia, l'estereoquímica té un paper molt important degut a l'enantioespecificitat de les interaccions entre els fàrmacs quirals i les biomolècules. L'estereoquímica dels fàrmacs té una gran rellevància en el seu perfil farmacològic. De fet, l'estereoquímica pot ser determinant en qualsevol dels processos farmacològics que pateix un fàrmac a l'organisme.



Processos farmacològics que poden estar influenciats per l'estereoquímica d'un fàrmac

El perfil farmacològic de tots dos enantiòmers d'un fàrmac quiral es pot veure afectat al llarg de tots aquests processos, influint a la seva farmacocinètica i farmacodinàmica, i existint tot un ventall de possibilitats en aquests perfils: perfils iguals, similars, diferents o, fins i tot, oposats.

Entre enantiòmers, les diferències de magnitud als paràmetres farmacocinètics solen ser relativament petites (normalment, variacions de 1 a 3 vegades) (Tucker i Lennard, 1990) en comparació amb les diferències de magnitud de les propietats farmacodinàmiques, tot i que no per això deixen de ser molt importants.

Estereoquímica i farmacocinètica

L'estudi de la farmacocinètica d'una substància requereix de la coneixença de la seva absorció, distribució, metabolisme i eliminació, i tots aquests processos poden ser enantioselectius. L'enantioselectivitat és més important en aquells processos que depenen

d'una interacció entre el fàrmac i una macromolècula biològica quiral, que són el transport actiu per molècules transportadores, la unió a proteïnes plasmàtiques i el metabolisme.

De tots els punts que s'han de considerar quan s'estudia la farmacocinètica d'una substància en general, el *metabolisme* és un dels aspectes més importants. La funció del metabolisme és la de biotransformar els fàrmacs de manera total o parcial per tal de convertir-los en substàncies més hidrosolubles i, per tant, més fàcilment excretables. Aquestes substàncies s'anomenen metabòlits. La biotransformació suposa un canvi en l'activitat del fàrmac i, malgrat que l'objectiu del metabolisme és donar lloc a una inactivació, hi ha casos on es produeix una activació o un canvi d'activitat.

En el cas concret del metabolisme de substàncies quirals, la biotransformació pot ser enantioselectiva pel fet que els enzims poden tenir diferent afinitat pels enantiòmers. Això es tradueix en barreges enantiomèricament enriquides del fàrmac i/o dels metabòlits.

Hi ha fàrmacs que s'administren en forma de racemat i que tenen una farmacologia diferent segons la via d'administració, degut a un metabolisme de primer pas enantioselectiu. En aquests casos el càlcul de la dosi requerida haurà de ser en funció de la via d'administració.

Existeixen una sèrie de factors que depenen del pacient que s'han de considerar prèviament a l'administració d'un fàrmac quiral, perquè poden alterar la biodisponibilitat dels seus enantiòmers. Els aspectes més importants són l'edat (diferències en l'expressió de certs enzims) i el gènere del pacient, la coadministració d'altres fàrmacs (interaccions medicamentoses enantioselectives), certs factors genètics (polimorfisme genètic d'alguns enzims) o algunes malalties. Les disfuncions renals i hepàtiques són les malalties que més influeixen en la biodisponibilitat dels fàrmacs quirals. En el cas de malalties hepàtiques, s'ha de tenir en compte les dosis administrades, particularment per aquells fàrmacs que pateixen un metabolisme de primer pas enantioselectiu (Hutt i Tan, 1996; Wainer, 2001).

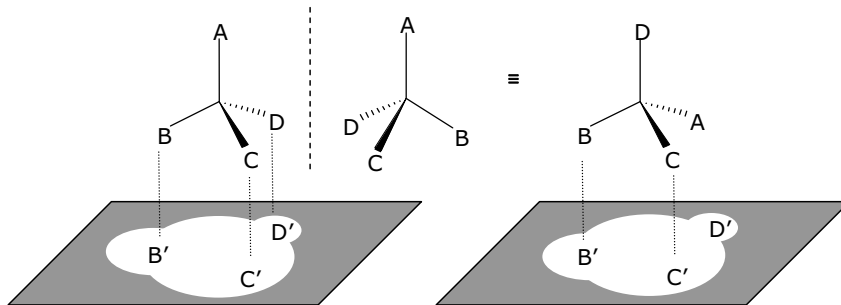
Com a conseqüència de l'estereoselectivitat en els processos de disposició d'un fàrmac quiral, els perfils plasmàtics dels seus enantiòmers poden ser notablement diferents. Així doncs, en aquests casos, les estimacions dels paràmetres farmacocinètics (i farmacodinàmics) basats en la determinació del fàrmac com a suma dels seus enantiòmers, poden ser potencialment enganyoses (Hutt i Tan, 1996).

Estereoquímica i farmacodinàmia

La farmacodinàmia estudia els mecanismes d'acció i la relació entre concentració i efectes d'un fàrmac.

Quan un fàrmac es presenta com a una parella d'enantiòmers, les interaccions fàrmac-receptor que s'estableixen no són equivalents per als dos enantiòmers, fet que explica que a bona part dels casos, les activitats farmacològiques dels dos enantiòmers no són iguals ni en grau ni, de vegades, en qualitat. Així doncs, en el moment d'establir les interaccions farmacològiques, s'ha de tenir present la distribució espacial dels grups funcionals de la molècula del fàrmac. Malgrat tot, les diferències d'activitat entre enantiòmers no només poden ser interpretades considerant les diferències d'acoblament fàrmac-receptor, sinó que cal tenir molt presents les diferents concentracions dels dos enantiòmers que arriben al receptor quan els processos farmacocinètics són estereoselectius.

Per tal de racionalitzar les diferències farmacodinàmiques observades entre els enantiòmers, Easson i Stedman (1933) van proposar un model d'acoblament de tres punts entre l'enantiòmer de més activitat i el seu receptor.



Segons el model de Easson-Stedman, l'enantiòmer més potent presenta un mínim de tres interaccions intermoleculares amb la superfície del receptor mentre que l'enantiòmer menys potent només pot interaccionar amb dos punts. Així doncs, l'acoblament dels enantiòmers amb el receptor és diferent, com també són diferents les seves energies d'enllaç. Aquest model, tot i ser una representació útil, és una aproximació simplista de la interacció fàrmac-receptor, ja que suposa que el fàrmac ha d'adoptar una orientació concreta respecte el centre receptor. A més a més, la interacció pot donar lloc a canvis

conformacionals al fàrmac i/o al receptor que poden suposar importants canvis qualitius i quantitius a les seves activitats biològiques.

Segons la seva activitat farmacològica, els enantiòmers d'un fàrmac quiral s'anomenen *eutòmer* (el més actiu) o *distòmer* (el menys actiu), sent la relació d'activitats entre ells el *quocient eudísmic* o *estereoselectivitat*. Cal dir però, que aquestes definicions es refereixen a una determinada activitat específica d'un fàrmac. En el cas d'un fàrmac amb més d'una activitat, l'eutòmer per a una activitat pot ser el distòmer per a una altra.

Tot i que sembla lògic pensar que els components d'una parella d'enantiòmers tenen efectes farmacològics similars, si no iguals, o bé que les propietats d'una mescla racèmica són la suma de les propietats dels seus enantiòmers per separat, la experiència ha demostrat que aquestes suposicions no sempre són correctes.

Comparant les accions d'una parella d'enantiòmers, es poden observar les següents possibilitats:

a) Accions farmacològiques similars amb intensitats comparables.

Ex.: els dos enantiòmers de la prometacina (antihistamínic) són equipotents, També és el cas dels enantiòmers de la flecainida (antiarrítmic) (Banitt i cols., 1986).

b) Accions farmacològiques similars amb intensitats diferents (un enantiòmer més potent que l'altre).

Ex.: la (*R*)-noradrenalina és 71 vegades més activa que la (*S*)-noradrenalina com a broncodilatadora. (Menéndez, 1997).

c) Accions farmacològiques diferents amb accions diferents.

Ex.: el (*R*)-propoxifè és un analgèsic i l'enantiòmer (*S*) té propietats antitusígenes. (Menéndez, 1997).

d) Accions farmacològiques diferents amb accions oposades.

Ex.: l'enantiòmer (+) del picenadol és un analgèsic agonista dels receptors opiàcics i el (-)-picenadol és antagonista dels mateixos receptors.

e) Accions farmacològiques diferents amb toxicitat associada a un d'ells.

Ex.: la (*S*)-penicillamina és antiartrític i l'enantiòmer *R* és un mutàgen (Aboul-Enein i Abou-Basha, 1997).

Les propietats farmacològiques d'un racemat també poden ser iguals o marcadament diferents de les dels seus enantiòmers administrats separatament i els mecanismes d'acció dels enantiòmers poden potenciar o disminuir l'acció del racemat (Caldwell, 2001). Per exemple, en els antiinflamatoris no esteroïdals, tot i que l'enantiòmer actiu és exclusivament el *R*, els efectes del fàrmac només es donen quan es coadministren els dos enantiòmers (Hutt i Caldwell, 1983).

Finalment, hi ha la possibilitat que els dos enantiòmers d'un fàrmac puguin contribuir al seu perfil farmacològic global però que la proporció òptima de cadascun dels enantiòmers sigui diferent de la proporció racèmica (Hutt i Tan, 1996). És el cas del diürètic indacrinona, pel que s'ha pogut demostrar que les mescles enantiomèriques enriquides en l'enantiòmer *S* donen un millor perfil terapèutic del fàrmac que el racemat (Vlasses i cols., 1984).

Amb totes aquestes possibilitats, és importat considerar les avantatges i inconvenients d'administrar un fàrmac com a racemat o fer servir només un dels seus enantiòmers. També és molt important tenir en compte l'estabilitat quiral dels enantiòmers, pel que s'han de tenir presents alguns aspectes. En el cas de fàrmacs que els seus enantiòmers no fan inversió quiral, es podria administrar com a únic enantiòmer si té l'efecte buscat. En canvi, quan la inversió quiral és possible, s'ha d'anar amb molt de compte. En alguns casos, la inversió quiral s'ha descrit *in vitro* però aquest resultat no sempre reflecteixen el que pot passar *in vivo*. De vegades, la inversió quiral pot contribuir a l'efecte terapèutic, com en el cas de l'antiinflamatori ibuprofè (Agranat i Caner, 1999). Altres casos però, són més conflictius perquè la inversió dona lloc a toxicitat, com és el cas de la talidomida (Reist i cols., 1998).

1.3.3. ELS FÀRMACS QUIRALS

Com a conseqüència del creixent interès per l'estereoquímica dels fàrmacs, la quiralitat s'ha convertit en un tema molt important per a la indústria farmacèutica i les autoritats reguladores competents.

Tot i que la farmacologia dels fàrmacs quirals té un ampli ventall de possibilitats d'accions i interaccions dels seus enantiòmers, la major part d'ells s'utilitzen com a racemats

més que com a enantiòmers aïllats. Les avantatges i inconvenients de l'ús d'enantiòmers purs dels fàrmacs s'han d'avaluar en cada cas i la obtenció d'aquests enantiòmers purs pot plantejar-se des de diferents punts de vista.

Un altre aspecte a considerar en la farmacologia dels compostos quirals és l'estudi de la seva farmacologia. Les aproximacions analítiques a l'estudi de fluids biològics han d'adaptar-se a les peculiaritats dels diferents estereoisòmers i són possibles moltes opcions.

Al llarg dels següents punts es desenvoluparan amb detall tant la obtenció de compostos químics enantiomèricament purs com l'anàlisi dels mateixos des del punt de vista de la seva estereoquímica.

1.4. OBTENCIÓ DE COMPOSTOS ENANTIOMÈRICAMENT PURS

Hi ha tres possibles maneres d'obtenir compostos enantiomèricament purs: la síntesi estereoselectiva, l'ús de substrats quirals o bé la resolució de racemats. A continuació es fa una breu introducció de les diferents aproximacions.

(Vollhardt, 1992; Eliel and Wilen, 1994; Menéndez, 1997)

1.4.1. SÍNTESI ESTEREOSELECTIVA

A diferència dels productes naturals, els compostos sintètics quirals estan normalment disponibles com a racemats. Per tant, en el moment de fer la síntesi orgànica d'una substància quiral, és fonamental tenir present que el producte comercial que es faci servir com a precursor és una mescla racèmica, si no es diu el contrari. Així doncs, una síntesi que s'inicia a partir del racemat del precursor donarà un producte final també racèmic.

És important diferenciar els termes estereoselectivitat i estereoespecificitat. Una reacció és *estereoselectiva* quan dona com a producte a un estereoisòmer amb preferència a un altre possible estereoisòmer. En canvi, una reacció es defineix com a *estereoespecífica* quan els precursors estereoquímicament diferents donen productes finals també

estereoquímicament diferents. Segons aquestes definicions, una reacció estereoespecífica és també estereoselectiva i però no és certa la afirmació inversa.

Les reaccions estereoselectives inclouen les *diastereoselectives* (el producte és un diastereoisòmer en excés sobre un altre) i les *enantioselectives* (el producte és un enantiòmer en excés sobre una altre). En qualsevol cas, per tal que es pugui dur a terme una reacció estereoselectiva, és imprescindible un entorn quirals.

En el cas de les reaccions diastereoselectives, la quiralitat ve donada pel substrat o pel reactiu. En el primer cas, la selectivitat es deu a que, com a conseqüència del mecanisme de reacció, està prohibit un dels dos modes d'addició a las cares del substrat. En el segon cas, el reactiu ha de tenir un centre estereogènic.

A les reaccions enantioselectives, la diferència de reactivitat prové d'estats de transició diastereoisomèrics. L'entorn quirals indispensable per a aquestes reaccions s'aconsegueix amb els auxiliars quirals, els reactius quirals o els catalitzadors.

Un *auxiliar quirals* és un agent homoquirals que s'uneix de manera covalent al substrat afavorint la formació d'un diastereoisòmer. Després de la reacció, l'auxiliar es regenera obtenint-se un únic enantiòmer del producte final. Els *reactius quirals* són reactius convencionals que s'han transformat en estructures quirals, normalment derivades d'un producte natural. Els *catalitzadors quirals* permeten obtenir grans quantitats de producte quirals amb una petita quantitat de catalitzador. Els més habituals són els enzims.

1.4.2. SUBSTRATS QUIRALS

L'aproximació dels substrats quirals consisteix en fer servir precursors de síntesi o intermedis de reacció que ja contenen la quiralitat desitjada. Avui dia hi ha disponibilitat comercial de diversos compostos enantiomèricament purs però també pot ser útil fer servir productes naturals, pel fet que la major part d'ells ja existeixen en forma enantiomèricament pura.

1.4.3. RESOLUCIÓ DE RACEMATS

En 1848, en Louis Pasteur va fer la primera resolució d'enantiòmers. Partint del racemat de l'àcid tartàric, va ser capaç de separar manualment cristalls dels enantiòmers de tartrat de sodi i amoni.

La resolució és un procediment per separar enantiòmers partint del corresponent racemat. Com es parteix d'un racemat, com a màxim es pot obtenir un 50% de rendiment de separació de cadascun dels enantiòmers.

Quan una resolució no és completa, es parla d'excés enantiomèric. Una mescla d'enantiòmers A i B en la que predomina un d'ells (A), es caracteritza per l'anomenat excés enantiomèric (e.e.) i que es defineix de la següent manera:

$$\% \text{ e.e.} = \%A - \%B = \frac{\text{quantitat d'A} - \text{quantitat de B}}{\text{quantitat d'A} + \text{quantitat de B}} \times 100 = 100 - 2B (\%)$$

Exemple: mescla A,B amb una relació A:B de 85:15, e. e.=70%

Les diferències en les quantitats dels enantiòmers també es poden expressar en termes d'activitat òptica amb la puresa òptica:

$$\text{Puresa òptica (\%)} = \frac{\alpha}{\alpha_{\text{màxima}}} \times 100$$

on:

α és la rotació òptica mesurada.

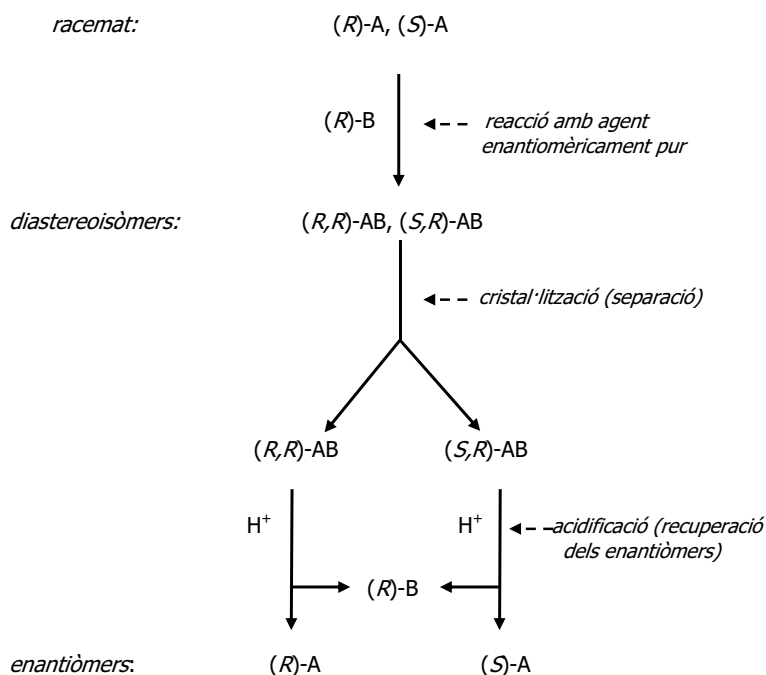
$\alpha_{\text{màxima}}$ és la rotació òptica de l'enantiòmer pur.

Tot i que les dues maneres de calcular la puresa enantiomèrica són correctes, els valors que donen no són iguals i, per tant, les expressions no són intercanviables.

La separació es pot fer tenint en compte les propietats físiques o les interaccions químiques entre la parella d'enantiòmers i un medi quiral. En qualsevol cas, una resolució

implica la recuperació de tots dos enantiòmers del producte de partida inalterats. Així doncs, per fer una resolució química és imprescindible que les reaccions que es facin siguin reversibles.

La *resolució química* consisteix en la formació d'una sal (una parella de diastereoisòmers) entre una parella d'enantiòmers i un agent homoquiral. Els diastereoisòmers se separen per tècniques convencionals i els enantiòmers es regeneren trencant els enllaços formats amb el compost enantiomèricament pur. Per a aquests casos, és molt habitual fer servir els àcids tartàrics, que formen fàcilment sals amb els enantiòmers de manera reversible.



De *resolucions físiques* n'hi ha de dos tipus: la resolució cinètica i la separació cromatogràfica. La *resolució cinètica* té en compte les diferències entre els enantiòmers en el temps de reacció amb un compost enantiomèricament pur. La *separació cromatogràfica* té molta rellevància en el camp de l'anàlisi. Les seves característiques i aplicacions es revisen àmpliament al punt 1.5.

1.5. ANÀLISI DE COMPOSTOS QUIRALS

L'anàlisi de compostos quirals suposa obligatòriament la intervenció d'espècies diastereoisomèriques, que es formen de manera permanent o transitòria. Les espècies formades se separen tenint en compte les diferències de solubilitat, estabilitat i/o adsorbtivitat pròpies dels diastereoisòmers. Les metodologies més utilitzades per a aquests propòsits són la cromatografia de líquids d'alta eficàcia (HPLC), la cromatografia de gasos (GC) i l'electroforesi capil·lar (CE).

Els procediments que es descriuran tot seguit estan enfocats a propòsits analítics, tot i que les resolucions (a petita escala) preparatives es poden dur a terme amb idèntica metodologia.

Els mètodes per fer separacions analítiques de parelles d'enantiòmers es poden classificar en mètodes directes i indirectes, segons com s'estableixi el medi quiral necessari per poder dur a terme la resolució. En el primer cas, els diastereoisòmers es formen durant el propi procés de separació i en el segon cas, els enantiòmers es transformen en diastereoisòmers prèviament a l'anàlisi. Malgrat poden semblar aproximacions oposades, aquests mètodes se solen considerar complementaris i cada cas pot ser tractat sota diferents punts de vista o fins i tot combinar les dues aproximacions.

Els *mètodes directes* són els més senzills per analitzar compostos quirals i l'única opció possible per aquells analits que no tenen grups funcionals susceptibles de ser derivatitzats. També és important remarcar la simplicitat en el moment de la preparació de la mostra, ja que es requereix el mateix tractament que pel cas de compostos aquirals. Els principals problemes que presenten els mètodes directes són però, el fet de la gran variabilitat entre lots analítics i la baixa estabilitat de les columnes cromatogràfiques enantioselectives, juntament amb l'elevat preu de les mateixes i la inexistència una fase estacionària universal per a la resolució de tots els racemats.

En els *mètodes indirectes* la transformació d'un parell d'enantiòmers en un parell de diastereoisòmers es fa utilitzant un derivatitzant enantiomèricament pur i la resolució té lloc en una columna convencional (diastereoselectiva). El reactiu de derivatització ha de complir els següents requisits: disponible amb una puresa més gran del 99%, estabilitat a les condicions de tractament de les mostres i reactivitat amb els dos enantiòmers amb el mateix

rendiment. La separació ve afavorida quan el grup que es derivatitza està estructuralment proper al centre estereogènic.

Els mètodes indirectes són molt versàtils perquè la gran majoria dels diastereoisòmers formats per reacció amb derivatitzants quirals es poden separar en columnes diastereoselectives, evitant-se així els problemes d'estabilitat i els elevats costos de les fases estacionàries enantioselectives. A més a més, els mètodes indirectes disminueix significativament la variabilitat inter-assaig. També és important que, tot i la necessitat de compliment d'uns requisits per part del reactiu de derivatització, comercialment hi ha disponibles un gran ventall de derivatitzants d'aquest tipus. Juntament amb la necessitat de fer una elecció acurada del reactiu de derivatització, el principal inconvenient dels mètodes indirectes és que les reaccions de derivatització poden allargar molt el procés analític.

En el moment de plantejar-se l'anàlisi de compostos quirals s'han d'avaluar acuradament els avantatges i inconvenients dels mètodes directes i indirectes, a més a més de seleccionar el procediment analític adequat per a cada cas. A continuació es detallen breument les característiques de les diferents combinacions de mètodes directes/indirectes amb cromatografia de líquids/gasos/electroforesi capil·lar.

(Allenmark, 1988, Eliel and Wilen, 1994)

1.5.1. ANÀLISI PER CROMATOGRÀFIA DE LÍQUIDS

A l'HPLC, els mètodes de determinació d'enantiòmers directes se subclassifiquen en dos grups, segons si s'utilitzen fases estacionàries enantioselectives o bé si la separació es fa en fases estacionàries convencionals però s'afegeixen additius quirals a la fase mòbil.

Tot i que s'han de contemplar totes les possibilitats, les resolucions de racemats per HPLC més habituals fan servir els mètodes directes amb fase estacionària enantioselectiva.

(Allenmark, 1988)

Mètodes directes amb fase estacionària enantioselectiva

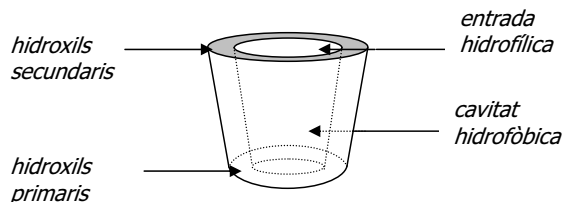
Hi ha hagut un gran desenvolupament en el número i tipus de fases estacionàries enantioselectives per a la seva aplicació a la cromatografia de líquids. Les fases estacionàries estan basades en polímers naturals (polisacàrids i proteïnes), polímers sintètics

(poliacrilamides) i selectors quirals (compostos quirals de baix pes molecular). Dintre del grup de fases estacionàries basades en polímers, es destaquen les basades en cel·lulosa, ciclodextrines i proteïnes.

Les *fases estacionàries enantioselectives basades en cel·lulosa* s'utilitzen amb la cel·lulosa inalterada o bé amb derivats ester i carbamat (Ichida i cols., 1984).

Les *fases estacionàries basades en ciclodextrines* han sigut objecte de diferents revisions científiques (Han i Armstrong, 1989; Menges i Armstrong, 1991; Han, 1997). Les *ciclodextrines* (CDs) són oligosacàrids cíclics quirals formats per unitats de glucosa unides mitjançant enllaços α -(1,4). Les tres ciclodextrines d'origen natural són l' α -CD (6 unitats de glucosa), β -CD (7 unitats) i γ -CD (8 unitats).

Les ciclodextrines tenen una estructura tridimensional toroidal, amb una cavitat hidrofòbica i les cares externes hidrofíliques. Les interaccions amb els analits són per inclusió i/o formació d'enllaços d'hidrogen amb els grups hidroxil.



Amb el desenvolupament de les CDs modificades, l'enantioselectivitat es pot modular mitjançant substitucions selectives dels diferents grups hidroxil, fent-les molt versàtils.

Les proteïnes utilitzades per *fases estacionàries basades en proteïnes* inclouen l'albumina glicoproteïnes i enzims. Tenen molts avantatges, entre els que destaquen l'ús de fases mòbils aquoses i la seva enantioselectivitat per a un gran ventall de substàncies. Entre els desavantatges cal assenyalar que són de baixa capacitat i poc robustes.

Pel que fa a les *fases estacionàries basades en selectors de baix pes molecular*, els selectors més comuns són els èters corona i metalls de transició.

Tot i que amb les fases estacionàries enantioselectives es poden dur a terme resolucions de molts tipus de compostos, sovint és difícil fer separacions utilitzant mètodes directes (Toyo'oka i cols., 1994). Molts cops és necessari fer derivatitzacions dels enantiòmers amb reactius aquirals per tal de poder introduir modificacions estructurals que

millorin les interaccions amb la fase estacionària i evitar interaccions inespecífiques reduint la polaritat dels analits (Gorog i Gazdag, 1994).

Mètodes directes amb fase mòbil enantioselectiva

Les aproximacions a la preparació d'una fase mòbil enantioselectiva són diverses. Una possibilitat consisteix en fer servir additius quirals en presència d'un metall de transició, de manera que la separació té lloc mitjançant complexacions amb el metall. Una altra opció és l'addició de diamides a una fase mòbil apolar, amb la conseqüent resolució via formació de ponts d'hidrogen entre els enantiòmers i les diamides. Les ciclodextrines també es poden utilitzar com a additius (Sybilska i Zukowski, 1989; Han i cols., 1997) i són molt habituals pel fet que no absorbeixen als intervals d'UV utilitzats habitualment per a la detecció cromatogràfica, són estables a un ampli ventall de pHs i poden ser útils per a la solubilització i estabilització d'analits que són poc solubles en aigua. Els principals inconvenients del seu ús per a aquest propòsit és que tenen una aplicació limitada a compostos que poden formar compostos d'inclusió i per HPLC de fase reversa, pel fet que les ciclodextrines són poc solubles en dissolvents orgànics.

De les limitacions de fer servir selectors quirals dissolts a la fase mòbil es destaquen la dificultat de la reproduïbilitat en la pròpia preparació de la fase mòbil, la necessària compatibilitat del selector amb el corresponent detector, a més a més de la necessitat de fer servir grans quantitats del selector en qüestió, dels que és impracticable la recuperació posterior a l'anàlisi. Per contra, pels mètodes directes no és estrictament necessari fer servir selectors enantiomèricament purs, pel fet que els diastereoisòmers que es formen són reversibles.

Mètodes indirectes

Un agent de derivatització quiral adient per cromatografia de líquids ha de tenir un grup cromòfor o fluoròfor que permeti l'anàlisi amb els detectors habituals (ultraviolat -UV- i fluorescència, respectivament). Sun i cols. (2001) van publicar una revisió a la que es presentaven els reactius quirals de derivatització més habituals per enantioseparacions per HPLC.

Un cop feta la resolució, la correlació de l'estereoquímica i l'ordre d'elució és possible amb bases mecàniques, empíriques o la combinació de les dues. Malauradament, les excepcions en els models són molt freqüents i és convenient realitzar l'assignació amb compostos de referència.

Els processos de derivatització comporten un tractament de les mostres més llarg i la necessitat d'un agent de derivatització enantiomèricament pur. Només es realitzaran quan la molècula tinguin un grup funcional fàcilment derivatitzable. Les particularitats dels reactius de derivatització enantiomèricament purs es tractaran amb detall a la cromatografia de gasos.

1.5.2. ANÀLISI PER CROMATOGRAFIA DE GASOS

La cromatografia de gasos té una aplicació clara per compostos volàtils i aquells que no tenen un grup cromòfor (i què, per tant, no es poden analitzar per HPLC). També permet fer anàlisis amb gran sensibilitat, selectivitat i exactitud gràcies a l'alta eficàcia de les columnes capil·lars.

La sensibilitat aconseguida amb la cromatografia de gasos fa que sigui utilitzada per determinar impureses enantiomèriques, fins i tot per sota d'un 1%. En aquests casos és preferible que l'enantiòmer minoritari elueixi primer, per tal d'evitar que el pic de l'enantiòmer majoritari pugui solapar el pic de la impuresa (Armstrong i cols., 1990a).

El problema fonamental de la cromatografia de gasos és la impossibilitat de recuperar la mostra, ja que és una tècnica destructiva. Per això, la cromatografia de gasos no té una aplicació preparativa.

Tant als mètodes directes com als indirectes, en cromatografia de gasos és convenient derivatitzar els compostos per tal de millorar la cromatografia i la volatilitat. Quan es el sistema de detecció és un espectròmetre de masses, EM, la derivatització també és útil per tal de crear un espectre de masses amb trencaments moleculars característics.

(Allenmark, 1988; König, 1993)

Mètodes directes

El desenvolupament de fases estacionàries per fer resolucions amb GC amb mètodes directes ha progressat paral·lelament al coneixement de nous principis d'interaccions moleculars. Les fases estacionàries més comuns estan basades en enllaços d'hidrogen i complexacions amb metalls. El primer cas és especialment útil per a compostos amb grups funcionals polars (com les amides, èsters i alcohols), el segon grup de fases estacionàries és el tipus de columna idoni per compostos menys polars i més volàtils que els anteriors.

Quan es van començar a utilitzar fases estacionàries formades per ciclodextrines per a les separacions enantioselectives per cromatografia de gasos, les altres fases van ser quasi bé completament substituïdes. Cal dir que els mecanismes de resolució de les ciclodextrines a la cromatografia de gasos són bàsicament idèntics que els exposats anteriorment per a la cromatografia de líquids.

Els primers esforços en el desenvolupament de columnes de gasos recobertes amb ciclodextrines es van centrar en l'ús de ciclodextrines naturals. Malauradament, aquestes fases no van donar els bons resultats esperats pel fet que les ciclodextrines natives són sòlids cristal·lins que no cobreixen bé les columnes i van donar lloc a columnes de molt baixa eficàcia. Aquests problemes però, es van poder solucionar amb el desenvolupament de fases amb ciclodextrines modificades.

En la cromatografia de gasos enantioselectiva sovint és necessari augmentar la volatilitat dels analits polars convertint-los en menys polars fent-los reaccionar amb un derivatitzant aquiral. És habitual fer derivats acetil o trifluoroacetil de les amines i alcohols i, en estudis estereoquímics, és important assenyalar que aquest derivat aquiral pot tenir un paper molt important en la resolució (Armstrong i Jin, 1990b). L'enantioselectivitat pot dependre del tipus del reactiu d'acilació utilitzat i sovint pot significar la diferència entre obtenir o no la separació dels enantiòmers. A més a més, el millor derivat per a un tipus de fase estacionària pot ser o no idoni per a una altra fase, fins i tot per a fases estacionàries del mateix tipus.

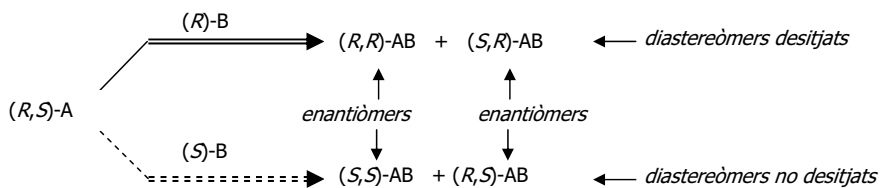
Les principals limitacions de les columnes de gasos amb fases estacionàries enantioselectives és la seva inestabilitat a elevades temperatures, així com la inexistència de fases estacionàries universals.

Mètodes indirectes

La conversió d'enantiòmers a diastereòmers per al seu anàlisi per cromatografia de gasos amb columnes convencionals requereix d'una derivatització amb un reactiu enantiomèricament pur que ha de complir una sèrie de requisits:

- a) La puresa enantiomèrica ha de ser idealment del 100%.

Exemple: en un cas hipotètic on el compost A es derivatitzi amb el reactiu quiral (*R*)-B contaminat amb (*S*)-B, les reaccions del compost A amb la contaminació (*S*)-B donarà productes que tindran una relació d'enantiòmers amb els productes desitjats. Com són enantiòmers, coelueixen, donant lloc a errors en la quantificació final dels productes desitjats.



- b) El rendiment de reacció ha de ser del 100% amb tots dos enantiòmers.
- c) En el procés de reacció no ha d'existir la possibilitat de produir-se racemitzacions (del derivatitzant) ni epimeritzacions (del producte).

Es defineix la racemització com la formació d'un racemat a partir d'un producte no racèmic.

L'epimerització és una interconversió d'estereoisòmers mitjançant el canvi de configuració d'un o més elements estereogènics.

Existeix un gran nombre de reactius de derivatització quirals utilitzats de manera rutinària a la cromatografia de gasos. Allenmark en 1988 i Skidmore en 1993 van fer una revisió sistemàtica dels reactius quirals utilitzats per derivatitzar un gran nombre de grups funcionals.

Els diastereoisòmers que es formen han de ser tèrmicament estables i raonablement volàtils. A més a més, és desitjable que tinguin els centres estereogènics el més a prop

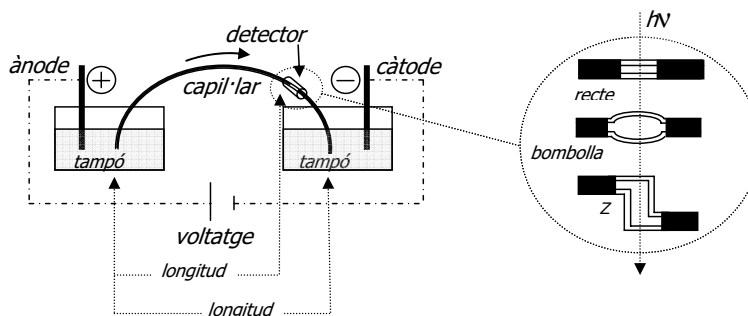
possible, per tal de maximitzar les diferències en les propietats cromatogràfiques. El considera òptima un diferència de tres enllaços.

De vegades existeix la possibilitat que la molècula tingui més d'un grup funcional derivatitzable. En aquests casos, és desitjable l'agent quiral derivatitzi de manera selectiva el grup funcional més proper al centre estereogènic. Els altres grups funcionals es transformaran amb derivatitzants aquirals convencionals que siguin compatibles amb l'agent quiral.

1.5.3. ANÀLISI PER ELECTROFORESI CAPIL·LAR

L'electroforesi capil·lar (CE) és una tècnica analítica que permet separar els diferents components d'una mescla tenint en compte la diferent mobilitat de les espècies iòniques quan se sotmeten a un camp elèctric molt intens a dins d'un tub capil·lar. La tècnica permet la separació de tot tipus de compostos (iònics i neutres) que siguin solubles en el tampó de treball (tampó aquós al que se li poden afegir solvents orgànics o altres agents que millorin la solubilitat dels soluts).

A diferència de les tècniques de cromatografia de gasos (i líquids), el capil·lar que s'utilitza per a l'electroforesi és un tub capil·lar buit (de 33 cm de longitud mínima total) amb una finestra (a 8.5 cm de longitud mínima efectiva) que permet la detecció (habitualment amb UV-visible) del pas dels compostos dissolts en el tampó de treball.



El flux dels ions a dintre del capil·lar és el resultat de la suma dels fluxos electroosmòtic i electroforètic. El flux electroosmòtic es genera a les parets del capil·lar i és

el moviment del tampó contingut a dintre del capil·lar com a conseqüència de la ionització de la paret interior i l'aplicació d'una diferència de potencial entre els seus extrems. El *flux electroforètic* és el moviment dels ions per efecte del camp elèctric.

L'aplicació de la CE a l'estereoquímica és relativament recent i ofereix avantatges respecte de les tècniques cromatogràfiques. Amb CE s'aconsegueix fer resolucions amb més eficàcia, flexibilitat i rapidesa que amb HPLC. A més a més, els petits volums de tampó necessaris i l'ús dels capil·lars de petita longitud i sense recobriment interior abarateix molt els costos en comparació amb les columnes de cromatografia líquida o de gasos. La sensibilitat de la tècnica és, en general, més baixa que a l'HPLC, tot i que hi ha diferents possibilitats de millora de la sensibilitat, com ara l'ús de cel·les d'alta sensibilitat (de bombolla o en forma de Z, per exemple).

L'electroforesi capil·lar és una tècnica molt versàtil que, entre altres aplicacions, permet el reconeixement de compostos quirals. Tot i que hi ha descrites resolucions basades en l'ús de capil·lars recoberts amb una fase estacionària enantioselectiva, és més habitual l'ús de selectors quirals que formen complexos amb els enantiòmers via enllaços no covalents. Alternativament, es poden formar enllaços covalents amb reactius enantiomèricament purs.

Els additius que més es fan servir per formar diastereoisòmers no covalents amb el solut quiral són les ciclodextrines (natives i derivatitzades) (veure pàgina 44). Altres selectors són els carbohidrats lineals (oligosacàrids neutres i polisacàrids carregats), els èters corona (naturals i sintètics), proteïnes, antibiòtics macrocíclics i metalls de complexació enantioselectius.

El mecanisme de discriminació enantioselectiu de les ciclodextrines no és molt clar, tot i que està acceptat el fet que el solut ha de complir dos requisits fonamentals. En primer lloc, el compost ha de tenir una estructura tridimensional que s'ajusti a les dimensions de la cavitat interior de la ciclodextrina. En segon lloc, els grups polars del solut han d'estar units al centre quiral o bé el més a prop possible, de manera que puguin existir interaccions estereoselectives. La resolució depèn de les diferències d'estabilitat dels complexos d'inclusió dels dos enantiòmers i/o de la mobilitat del complexos en el tampó de treball. Variacions de pH o l'addició de coadditius (dissolvents orgànics, urea, etc.) poden ajudar a aconseguir resolucions òptimes.

(Camilleri, 1994)

1.5.4. VALIDACIÓ DE MÈTODES ANALÍTICS

Davant de qualsevol estudi farmacocinètic, és imprescindible la validació dels mètodes analítics necessaris per a la determinació dels corresponents paràmetres. Es defineix validació com el conjunt d'operacions necessàries que permeten demostrar de manera documentada que un procediment d'anàlisi és adequat per a l'aplicació per a la que es vol utilitzar. Així doncs, validar un mètode vol dir aportar les evidències objectives que demostrin el compliment d'una sèrie de requisits, especificats prèviament a la validació, i que expressen la idoneïtat dels procediments.

A l'estudi de la farmacocinètica d'un compost quirals, el primer punt a considerar és si es vol fer un mètode capaç de determinar i quantificar els enantiòmers separatament o bé si es plantejarà l'anàlisi ignorant les seves propietats estereoquímiques i, per tant, s'estudiarà com a una única entitat.

Aspectes de la validació relacionats amb l'estereoquímica

En cas que es vulgui considerar l'estereoquímica dels compostos, s'hauran de valorar prèviament els següents punts:

a) *Elecció de la metodologia analítica.* La metodologia idònia per a cada cas dependrà, entre altres aspectes, de la necessitat o no del tractament de la mostra (hidròlisi, extracció), la sensibilitat que es vol aconseguir i el número de mostres que es vol analitzar. També és important decidir si es vol analitzar més d'una substància (substàncies relacionades i/o metabòlits), si també són quirals, quines diferències químiques tenen a la seva estructura i com això pot afectar la resolució de les diferents parelles d'enantiòmers.

b) *Elecció del material de referència.* L'analista ha de decidir si la quantificació dels analits es farà a partir d'una recta de calibrat que contingui els enantiòmers individuals, una mescla enantiomèricament enriquida o el racemat. Aquesta elecció es fa sovint en funció de la disponibilitat comercial del material de referència.

c) *Elecció de l'estàndard intern (IS).* En general, l'IS haurà de ser un compost amb una estructura química el més semblant possible al compost que es vol analitzar, per tal que el comportament analític de l'analit i el seu estàndard siguin similars. Els ISs ideals són els compostos deuterats, tot i que només són útils per cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses. En el cas de substàncies quirals, una possible opció és fer servir

ISs també quirals, de manera que es pugui relacionar cada enantiòmer del compost amb cadascun dels enantiòmers de l'estàndard (normalment es té en compte l'ordre d'elució).

d) *Caracterització estereoquímica*. S'ha de poder fer una assignació inequívoca de cada pic analític amb el corresponent enantiòmer i no existeix cap manera inequívoca de correlacionar l'ordre d'elució dels enantiòmers d'un compost quiral amb la configuració absoluta dels mateixos. Per a això és imprescindible analitzar, en paral·lel a les mostres, material de referència enantiomèricament pur o enantiomèricament enriquit. Per molts compostos aquest material de referència no existeix comercialment i pels seus metabòlits sovint no hi ha disponibles ni tan sols els racemats. Això fa que sigui pràcticament inevitable la síntesi orgànica d'almenys un dels enantiòmers de cada compost o bé una resolució dels corresponents racemats a nivell preparatiu.

e) *Estabilitat enantiomèrica/diastereoisomèrica*. En els procediments de determinació d'enantiòmers, s'ha d'avaluar la possible racemització dels enantiòmers (mètodes directes) o l'estabilitat dels diastereoisòmers formats i del reactiu de derivatització (mètodes indirectes). Una manera indirecta de comprovar l'estabilitat del compost consisteix en comparar els resultats dels enantiòmers individuals amb dades obtingudes amb un mètode convencional.

(Wozniak i cols., 1991)

Paràmetres de validació

Un cop solucionats els aspectes relacionats amb les peculiaritats estereoquímiques dels analits, la validació de mètodes analítics de substàncies quirals és bàsicament la mateixa que pel cas de compostos aquirals.

El procediment de validació de mètodes quantitius i els càlculs necessaris per obtenir els valors dels diferents paràmetres no són objecte d'aquest treball i estan descrits detalladament en els procediments normalitzats de treball utilitzats a la Unitat de –Recerca en Farmacologia de l'Institut Municipal d'Investigació Mèdica (URF, IMIM). El procediment consisteix en un protocol de quatre dies que permet avaluar els paràmetres analítics que es requereixen en cada cas. El protocol es resumeix a la taula 1.5.1.

Taula 1.5.1. Protocol de validació de mètodes d'anàlisi quantitativus.

Tipus	Nivell	Descripció	primer assaig		segon assaig			tercer assaig	quart assaig	
			M	S	M			M	M	
					C/D 0	C/D 1	C/D 2		v	v _r
Con	0	Blanc	4	2	2			5	2	
Cal	1	LC _i	4	4	2			2	2	
Con	CI	1.2 x LC_i	-	-	3	3	3	3	3	
Cal	2	≈R	4	-	2			2	2	
Con	CM	0.4 x LC_s	-	-	3	3	3	3	3	
Cal	3	≈2R	4	4	2			2	2	
Cal	4	≈3R	4	-	2			2	2	
Con	CS	0.85 x LC_s	-	-	3	3	3	3	3	3
Cal	5	LC _s	4	4	2			2	2	
Total anàlisi			24	14	21	9	9	24	21	3
Total anàlisi per assaig			38		39			24	24	

On:

Cal: mostra de calibració*Con:* mostra control*CI:* Control Inferior (mostra de control de concentració més baixa)*CM:* Control Mig (mostra de control de concentració intermèdia)*CS:* Control Superior (mostra de control de concentració superior)*LC_i:* Límit de quantificació inferior. Concentració mínima de calibració*LC_s:* Límit de quantificació superior. Concentració màxima de calibració

$$R = (LC_s - LC_i)/4$$

M: Assaigs realitzats en presència de la matriu (p.e. plasma)*S:* Assaigs realitzats sobre solucions patró afegides a matriu prèviament extreta o sense matriu*v_r:* Assaig realitzat amb un volum reduït (inferior al establert pel procediment, v)*C/D:* Cicles de congelació/descongelació

Cadascun dels assaigs i la combinació dels resultats obtinguts a tots ells permet calcular els diferents paràmetres de validació tal i com s'indica a la taula 1.5.2.

Taula 1.5.2. *Paràmetres calculats els diferents dies del protocol de validació.*

primer assaig	segon assaig	tercer assaig	quart assaig	
selectivitat				precisió inter-assaig i exactitud inter-assaig
contaminació entre mostres			contaminació entre mostres	
linealitat				
homocedasticitat/heteroscedasticitat	precisió intra-assaig			
idoneïtat en la precisió	exactitud intra-assaig			
idoneïtat en l'exactitud	estabilitat als cicles C/D		idoneïtat de la dilució	
límit de detecció				
límit de quantificació				
recuperació				
estabilitat intra-assaig				

On:

a) *Selectivitat/especificitat.* És la capacitat per determinar un analit en una mescla complexa sense ser interferit per altres components de la mateixa, tenint presents també els compostos inherents a la matriu biològica.

En el cas de les substàncies quirals, a més a més d'aconseguir una bona separació entre components de la mescla i d'evitar els interferents inherents a la matriu biològica, s'ha d'obtenir una resolució enantiomèrica òptima. Quan la substància quiral en concret està en forma de racemat, la separació a línia de base i la simetria dels pics no és crítica pel tal de determinar la relació enantiomèrica. En canvi, si el compost té majoritàriament un enantiòmer sobre l'altre, és imprescindible una separació a línia de base i simetria en els pics per poder determinar correctament les concentracions (i el límit de detecció) de l'enantiòmer minoritari. A més a més, és desitjable que l'enantiòmer minoritari elueixi en primer lloc i així evitar que el pic majoritari el pugui emmascarar.

b) *Contaminació entre mostres.* És una mesura de la capacitat del mètode per produir resultats d'una mostra independents de la mostra analitzada prèviament.

c) Homocedasticitat/heteroscedasticitat. Defineix la independència/dependència de la varianza de les respostes del mètode respecte a la concentració de les mostres analitzades.

d) Linealitat. És la demostració de que la relació entre la concentració del analit (x) i la resposta del mètode (y) s'ajusta a una equació del tipus $y = a + bx$, on a i b són els paràmetres propis de la equació obtinguda.

La linealitat es calcula dintre dels límits de l'interval de treball, que és l'escala de concentracions entre el límit de quantificació inferior (LC_i) i el límit de quantificació superior (LC_s) en el que es pot obtenir una exactitud i precisió adequades a l'objectiu del procediment.

L'interval de treball de les substàncies quirals utilitzant metodologies convencionals pot ser diferent quan es fa un anàlisi des del punt de vista de l'estereoquímica. Si es preveuen concentracions diferents dels dos enantiòmers i per a la recta de calibració es farà servir un racemat, es triarà un LC_i que correspongui a la concentració mínima que s'espera quantificar de l'enantiòmer minoritari i un LC_s que correspongui a la concentració màxima que s'espera quantificar de l'enantiòmer majoritari.

e) Límit de detecció. És la concentració mínima d'un analit que pot ser detectada reproduïblement.

f) Límit de quantificació. Es representa amb dos paràmetres diferents, els límits de quantificació inferior i superior.

El límit de quantificació inferior (LC_i) correspon a la concentració mínima d'un analit que pot ser quantificada un cop s'ha definit l'interval de treball (i correspon a la concentració inferior de l'interval).

El límit de quantificació superior (LC_s) correspon a la concentració màxima de un analit que pot ser quantificada un cop s'ha definit l'interval de treball (i correspon a la concentració superior de l'interval).

g) Recuperació. Representa la relació existent entre la resposta obtinguda quan una quantitat de analit es determina prescindint de tantes etapes del procediment analític com sigui possible, excepte la pròpia mesura, i quan s'analitza seguint el procediment analític complet.

h) *Estabilitat intra-assaig*. És la mesura de la independència entre el temps transcorregut fins el moment de l'anàlisi, dintre d'un mateix lot experimental, i els resultats obtinguts.

i) *Idoneïtat en la precisió*. Mesura l'error aleatori expressat per la dispersió obtinguda en una sèrie de mesures repetides realitzades durant el mateix lot experimental. Es calcula amb els replicats de les mostres de calibració.

j) *Precisió intra-assaig (repetibilitat)*. Mesura l'error aleatori expressat per la dispersió obtinguda en una sèrie de mesures repetides realitzades durant el mateix lot experimental. Es calcula amb els replicats de les mostres de control.

k) *Idoneïtat en l'exactitud*. Comprova el grau de concordança entre el resultat d'una mesura (expressat com la mitjana d'una sèrie de mesures realitzades durant el mateix lot experimental) i el valor de referència acceptat. Es calcula amb els replicats de les mostres de calibració.

l) *Exactitud intra-assaig*. Comprova el grau de concordança entre el resultat d'una mesura (expressat com la mitjana d'una sèrie de mesures realitzades durant el mateix lot experimental) i el valor de referència acceptat. Es calcula amb els replicats de les mostres de control.

m) *Precisió inter-assaig (precisió intermèdia)*. Mesura l'error aleatori expressat per la dispersió obtinguda en una sèrie de mesures repetides realitzades durant diversos lots experimentals realitzats en diferents dies. El terme reproducibilitat es reserva per a estudis inter-laboratori.

n) *Exactitud inter-assaig*. És el grau de concordança entre el resultat de una mesura (expressat com la mèdia de una sèrie de mesures realitzades durant diversos lots experimentals) i el valor de referència acceptat.

o) *Estabilitat davant cicles congelació/descongelació (C/D)*. És la mesura de la independència entre el número de cicles C/D a que ha estat sotmesa la mostra i els resultats obtinguts.

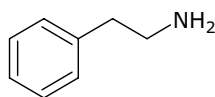
p) *Idoneïtat de l'anàlisi d'una mostra diluïda*. Es defineix com la capacitat per analitzar mostres de concentracions fora de l'interval de treball (superiors al LC_5) però mantenint els paràmetres de qualitat del mètode.

1.6. MDMA I ESTEREOQUÍMICA

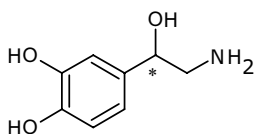
1.6.1. QUÍMICA DE LES AMFETAMINES

Les accions d'un fàrmac a l'organisme venen donades per la seva capacitat de combinar-se amb més o menys èxit amb receptors biològics específics. El factor principal que controla la capacitat de reacció d'un fàrmac amb un receptor és la forma de la molècula i disposició espacial dels seus grups funcionals, característiques que depenen de la configuració i la conformació estructural del fàrmac.

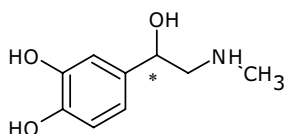
Les amfetamines tenen una estructura química relativament senzilla amb un esquelet general β -feniletilamina compartit pels neurotransmissors noradrenalina, adrenalina i dopamina.



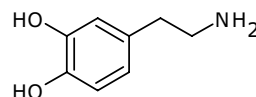
β -fenilisopropilamina



noradrenalina



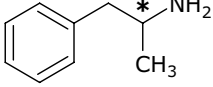
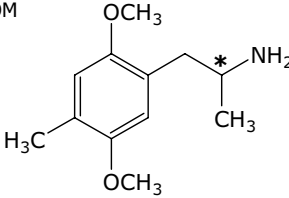
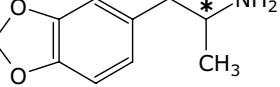
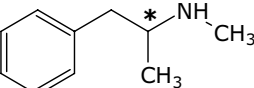
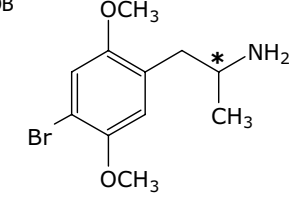
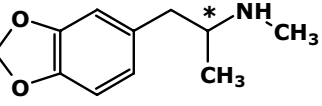
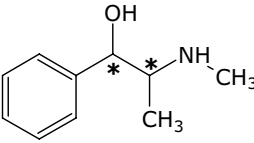
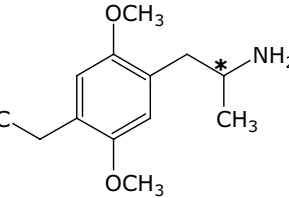
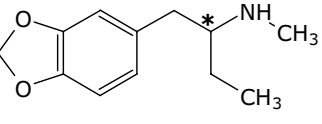
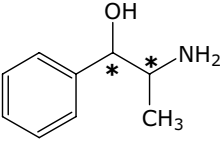
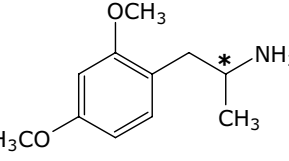
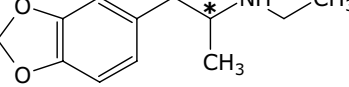
adrenalina



dopamina

Segons les seves activitats farmacològiques, les amfetamines es poden dividir en estimulants, al·lucinògenes i entactògenes. Les amfetamines clàssiques són *estimulants* del sistema nerviós central, mentre que hi ha un altre grup de β -fenilisopropilamines amb propietats psicotomimètiques (*al·lucinògenes*), més semblants al LSD. Un tercer grup d'amfetamines té unes propietats farmacològiques clarament diferents de les al·lucinògenes però tampoc es poden incloure en el grup de les estimulants. Nichols (1986) va proposar que aquestes amfetamines es cataloguessin com una nova classe farmacològica anomenada *entactògenes*. Algunes estructures de les amfetamines dels tres grups es poden veure a la taula 1.6.1.

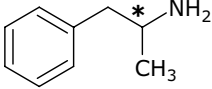
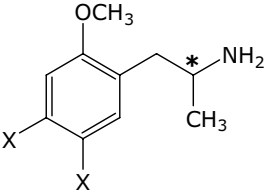
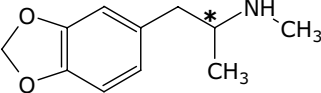
Taula 1.6.1. Exemples d'amfetamines estimulants, al·lucinògenes i entactògenes.

PROPIETATS		
estimulants	al·lucinògenes	entactògenes
<p>Amfetamina</p> 	<p>DOM</p> 	<p>MDA</p> 
<p>Metamfetamina</p> 	<p>DOB</p> 	<p>MDMA</p> 
<p>Efedrina</p> 	<p>DOET</p> 	<p>MBDB</p> 
<p>Norpseudoefedrina</p> 	<p>2,4-DMA</p> 	<p>MDEA</p> 

* centres estereogènics

Sovint, les propietats de les diferents amfetamines venen donades per les seves peculiaritats estructurals i es poden establir una sèrie de relacions estructura-activitat (Änggård, 1977; Anderson i cols., 1978; Nichols, 1986; Nichols i Oberlender, 1989; Glennon, 1991) (veure taula 1.6.2.).

Taula 1.6.2. Relacions estructura-activitat als diferents tipus d'amfetamines.

PROPIETATS		
estimulants	al·lucinògenes	entactògenes
		
SUBSTITUENTS A L'AMINA		
-H = -CH ₃ > -CH ₂ CH ₃	-H > -CH ₃ > -CH ₂ CH ₃	-CH ₃ > -H > -CH ₂ CH ₃
SUBSTITUENTS AL Cα		
-CH ₃ > -H > -CH ₂ CH ₃	-CH ₃ > -H > -CH ₂ CH ₃	-CH ₃ > -H > -CH ₂ CH ₃
SUBSTITUENTS A L'ANEL·L BENZÈNIC		
grups electronegatius (-F, -Cl, -Br)		
↓ efectes	(en <i>p</i>): ↑ efectes	
-OH		
↓ efectes	↓ efectes: inactivació	
-OCH₃		
1 x (-OCH ₃): <i>m</i> > <i>o</i> > <i>p</i> > -H	1 x (-OCH ₃): inactiu	
2 x (-OCH ₃): inactius	2 x (-OCH ₃): 2,4- i 2,5- actius	
3 x (-OCH ₃): inactius	3 x (-OCH ₃): actius	

En general, totes les amfetamines tenen a la seva estructura un centre estereogènic en α a l'amina (*), de manera que totes elles existeixen com a un parell d'enantiòmers. (les efedrines tenen dos centres estereogènics i, per tant, poden haver fins a quatre estereoisòmers).

En diferents estudis s'ha pogut observar que diferents efectes farmacològics han estat associats de forma predominant a un dels dos enantiòmers i el metabolisme també pot ser enantioselectiu (Anderson i cols., 1978; Nichols, 1986; Nichols i Oberlender, 1989; Glennon, 1991; Fallon i cols., 1999; Musshoff, 2000; Brunnenberg i Kovar, 2001; Spitzter i cols., 2001) (taula 1.6.3.).

Taula 1.6.3. *Diferències de magnitud d'efectes i metabòliques entre parelles d'enantiòmers.*

PROPIETATS	efectes	metabolisme
estimulants	<i>S>R</i>	<i>S>R</i>
al·lucinògenes	<i>R>S</i>	
entactògenes	<i>S>R</i>	<i>S>R</i>

1.6.2. FARMACOLOGIA I ESTEREOQUÍMICA DE LA MDMA

L'estudi de la farmacologia de qualsevol fàrmac quiral des del punt de vista de la seva estereoquímica suposa un pas endavant en el coneixement de les seves propietats. En el cas concret de la MDMA, la vessant estereoquímica de la farmacologia de la molècula pot ser molt important, considerant que es tracta d'una substància que representa una nova classe farmacològica i que és objecte de consum il·legal per part d'un sector molt jove i nombrós de la nostra societat. Malgrat la rellevància científica i social de l'estudi de l'estereoquímica de la MDMA, les publicacions científiques referents a la farmacologia dels seus enantiòmers són molt limitades.

Les aproximacions estereoquímiques a la farmacologia són, en general, d'una gran complexitat. Des del *punt de vista analític*, un dels principals problemes a resoldre és la necessitat de desenvolupar metodologies analítiques molt sensibles. Treballar amb els enantiòmers d'una substància vol dir mesurar concentracions que són, en el millor dels casos, la meitat de la concentració que es quantificaria amb metodologies convencionals. Un altre aspecte fonamental és la necessitat de patrons analítics que permetin la identificació inequívoca dels enantiòmers del compost i els dels seus metabòlits perquè, tal i com s'ha indicat en apartats anteriors, l'ordre d'elució dels pics cromatogràfics no es pot relacionar amb l'estereoquímica d'un compost, com tampoc es pot extrapolar el comportament analític d'una parella d'enantiòmers a compostos relacionats farmacològica i/o estructuralment. També és important insistir en el fet que, des del *punt de vista farmacològic*, el comportament dels enantiòmers del compost i/o dels seus metabòlits no sempre es pot deduir a partir dels resultats obtinguts amb estudis farmacològics que no tenen en compte l'estereoquímica del fàrmac.

En el cas concret de la MDMA, una gran part de les publicacions científiques que tenen en compte la seva estereoquímica estan enfocades en la pròpia MDMA i el seu metabòlit minoritari MDA, mentre que les dades referents als enantiòmers dels metabòlits majoritaris no són concloents (per a l'HMMA) o bé inexistentes (per a l'HHMA). Són molt

poques les dades referents a l'estereoquímica en la farmacologia de la MDMA en humans i la majoria d'aquestes publicacions estan referides a casos d'intoxicació aguda que, tot i el seu interès científic, no són suficientment representatius de la realitat global del consum d'aquest tipus de substància.

A continuació es fa una revisió de les dades que es troben a la literatura científica relacionades amb la farmacologia de la MDMA des del punt de vista de la seva estereoquímica. Les publicacions s'agrupen en estudis *in vitro*, estudis amb models animals i estudis en humans. S'inclou un apartat que tracta l'estereoquímica de substàncies relacionades que poden ajudar a entendre el comportament farmacològic dels enantiòmers de la MDMA.

1.6.3. ESTEREOQUÍMICA DE LA MDMA I ACTIVITAT FARMACOLÒGICA *IN VITRO*

Nichols i cols. (1982) van comparar la capacitat dels enantiòmers de la MDMA i de compostos similars d'induir l'alliberament de 5-HT dels terminals nerviosos del cervell de rata. Van poder observar enantioselectivitat, de manera que la (*S*)-MDMA va alliberar més 5-HT que (*R*)-MDMA amb un factor de 8.5.

Johnson i cols. (1986) van fer un estudi similar, aquesta vegada per tal d'estudiar la capacitat d'alliberament de 5-HT i DA dels racemats i dels enantiòmers de diferents entactògens al cervell de rata. Respecte la MDMA, els autors suggereixen que existeix enantioselectivitat en l'alliberament de tots dos neurotransmissors, sent la (*S*)-MDMA substancialment més potent que el seu enantiòmer *R*.

1.6.4. ESTEREOQUÍMICA DE LA MDMA I ACTIVITAT FARMACOLÒGICA EN MODELS ANIMALS

L'estereoquímica de la MDMA s'ha estudiat en diferents models animals, sent els estudis realitzats amb rates els més nombrosos. Les dades obtingudes amb models animals però, s'han d'avaluar amb molta cura pel fet que l'extrapolació a humans no és evident (de la Torre, 2004b). Malgrat tot, els models animals són una eina molt important que pot ajudar a entendre la complexitat inherent a l'estudi de la farmacologia i l'estereoquímica de la MDMA. Les principals dades referents a aquests estudis es detallen a continuació.

Estereoquímica de la MDMA en rates

L'experiment dut a terme per Schmidt (1987) va permetre avaluar el curs temporal dels nivells de 5-HT al cervell de rata, que té clarament dues fases: una fase de toxicitat aguda (3-6 h post-ingesta) i reversible de disminució dels nivells de 5-HT i una fase de neurotoxicitat (7 dies després), que es manifesta amb una disminució en la recaptació de la 5-HT, provocada per una pèrdua dels llocs de recaptació. Pel que fa a l'estereoquímica de la toxicitat aguda, la (*S*)-MDMA provoca una disminució dels nivells de 5-HT de manera més efectiva que la (*R*)-MDMA. La neurotoxicitat, en canvi, està exclusivament relacionada amb la (*S*)-MDMA, tot i que no sembla ser provocada per la pròpia molècula sinó que probablement sigui via un metabòlit.

Fitzgerald i cols. (1989) van quantificar els enantiòmers de la MDMA i MDA al plasma de rates i van poder observar diferències de gènere entre els animals. Així doncs, els mascles van metabolitzar més MDMA que les femelles. Pel que fa a l'estereoquímica, en tots dos casos es va metabolitzar més *S* que (*R*)-MDMA, que es va veure traduït en concentracions de metabòlit (*S*)-MDA superiors a les concentracions de (*R*)-MDA.

Fitzgerald i cols. (1990) van aportar dades farmacocinètiques dels enantiòmers de la MDMA i MDA en rates a les que es va administrar MDMA racèmic per via intravenosa i subcutània. Per totes dues vies es van mesurar nivells de (*R*)-MDMA més grans que de (*S*)-MDMA, mentre que la relació per als enantiòmers de la MDA va ser inversa. Les diferències de volum de distribució entre les dues vies d'administració (més gran en l'administració intravenosa) s'explica pel fenomen de metabolisme de primer pas. Aquestes diferències van ser més grans per a la (*S*)-MDMA, pel fet que es metabolitza preferentment respecte del seu enantiòmer. També es va poder descartar enantioselectivitat en els processos d'absorció i distribució, de manera que es va associar la formació preferent de la (*S*)-MDA a una *N*-demetilació enantioselectiva.

També al 1989, Hiramatsu i Cho van estudiar la disminució dels nivells de 5-HT i DA associats als consum de MDMA en funció de la seva estereoquímica. Es va observar que la (*S*)-MDMA disminueix de manera més efectiva els nivells de DA que la (*R*)-MDMA. En el cas de la 5-HT, no es van obtenir diferències enantiomèriques.

Lim i cols. (1993) van estudiar la disposició dels enantiòmers de la MDMA en orina i cervell de rates i per primer cop es van mostrar dades referents als enantiòmers més polars HMMA i HMA. En general, a la orina de 24 h es va trobar més quantitat d'enantiòmers *R* de MDMA i HMMA, mentre que es van mesurar més enantiòmers *S* en el cas de la MDA i HMA. Els autors afirmen que les dades són consistents amb una *N*-demetilació enantioselectiva i

possiblement a una *O*-demetilenació enantioselectiva, tot i que indiquen que l'enantioselectivitat d'aquesta segona via metabòlica s'hauria de confirmar. En el cas dels teixits de cervell, la sensibilitat de la metodologia només va permetre l'anàlisi dels enantiòmers de la MDMA i MDA i tots dos compostos van mostrar uns perfils enantiomèrics similars als observats en orina.

Meyer i cols. (2002) van comparar els perfils enantiomèrics de MDMA, MDA i HMMA observats en sang i cervell de rates després de l'administració via subcutània de MDMA i dels seus enantiòmers per separat. En plasma van obtenir concentracions de MDA i HMMA similars. En cervell, en canvi, les concentracions de MDA van ser més grans que les d'HMMA, suggerint que hi ha un pas metabòlic a les estructures del cervell un cop la substància ha travessat la barrera hematoencefàlica. Pel que fa a les relacions enantiomèriques, es van observar relacions $R/S > 1$ (en cervell) i $=1$ (en plasma) per als enantiòmers de la MDMA i <1 per als enantiòmers de la MDA i HMMA. No es van observar diferències en la qualitat o quantitat entre el metabolisme de la MDMA administrada en forma de racemat o bé en forma dels seus enantiòmers separatament.

Estereoquímica de la MDMA en altres models animals

Entre els models animals diferents de les rates amb els que s'han realitzat estudis que tenen en compte l'estereoquímica de la MDMA destaquen els ratolins, conills i primats. Aquests estudis són principalment, avaluacions dels efectes dels enantiòmers de la MDMA administrats separatament en comparació amb els efectes del racemat.

Pel que fa als estudis relacionats amb l'estereoquímica de la MDMA realitzats amb *ratolins*, destaca una publicació del 1987 (Glennon i cols.) que mostra un model d'estudi de la resposta de l'animal davant la MDMA i els seus enantiòmers administrats separatament. Es va observar que la (*S*)-MDMA va ser lleugerament més potent que el corresponent racemat i aproximadament 4 vegades més potent que la (*R*)-MDMA.

Fantegrossi i cols. (2003) van caracteritzar els efectes de la MDMA i dels seus enantiòmers en ratolins, mostrant que els efectes dels enantiòmers administrats separatament no equivalen a la suma dels efectes que es van presentar després de l'administració del racemat. Breument, tant el racemat com la (*S*)-MDMA van produir hipertèrmia i estimulació de l'activitat locomotora a diferència de la (*R*)-MDMA, que no va augmentar la temperatura dels animals i l'estimulació locomotora va ser més baixa que pels altres casos. Els efectes tòxics es van veure potenciats quan la situació dels animals emulava

les condicions d'aglomeració d'individus i elevada temperatura ambiental que té lloc a les festes *rave*.

Pel que fa a les dades relacionades amb la disposició dels enantiòmers de la MDMA en ratolins, un estudi preliminar (Fitzgerald i cols., 1989) mostra la MDA com a metabòlit de la MDMA, observant-se concentracions de (*S*)-MDA més grans que del seu enantiòmer. Pels enantiòmers de la MDMA, les concentracions d'enantiòmer *S* en plasma van ser lleugerament inferiors a les de l'enantiòmer *R*. Més tard, Lim i cols. (1993) van obtenir quantitats comparables dels dos enantiòmers de la MDMA i, comparant amb un estudi equivalent amb *rates*, es va veure un menor metabolisme del fàrmac a ratolins, fet que està en consonància amb una menor susceptibilitat dels ratolins a la neurotoxicitat induïda per la MDMA.

Els estudis publicats sobre l'estereoquímica de la MDMA en *conills* són escassos. Anderson i cols., (1978) van mesurar la hipertèrmia provocada als animals pel consum de la MDMA racèmica i/o dels seus enantiòmers, per tal de fer una avaluació indirecta de l'activitat central del fàrmac. Els resultats van portar a concloure que la (*S*)-MDMA actua sobre el sistema nerviós central de manera més efectiva que el racemat i molt més que la (*R*)-MDMA. En aquest cas es torna a fer evident que els efectes dels enantiòmers de la MDMA no són additius i no serveixen per predir els efectes del racemat.

Les publicacions referents a l'estereoquímica de la MDMA en *primats* són principalment estudis que pretenen avaluar els sistemes de recompensa que actuen davant l'autoadministració del racemat i els enantiòmers de la MDMA. Fantegrossi i cols. (2002) van realitzar un estudi d'aquest tipus d'autoadministració intravenosa amb la finalitat d'estudiar el paper del sistema serotoninèrgic en els mecanismes de recompensa. Els primats es van autoadministrar la forma racèmica així com els enantiòmers individuals, sense observar-se diferències en el número màxim d'injeccions entre les tres formes del fàrmac. Es va poder comprovar també el comportament d'autoadministració quan es feia un pre-tractament amb antagonistes serotoninèrgics i es va observar una disminució en l'autoadministració de l'enantiòmer *S* i una eliminació completa en l'autoadministració de l'*R*, pel que es pot extrapolar que la MDMA té un sistema de recompensa diferent del de la cocaïna (l'autoadministració de cocaïna no es pot manipular amb antagonistes del sistema serotoninèrgic). Un altre estudi d'autoadministració (Fantegrossi i cols., 2004) es va dissenyar amb l'objectiu d'avaluar l'abstinència espontània que presenten molts dels consumidors d'aquest tipus de substàncies. En els primats, els efectes reforçadors del fàrmac van disminuir pel racemat i la (*R*)-MDMA, amb una tendència similar per a la (*S*)-MDMA però més atenuada.

1.6.5. ESTEREOQUÍMICA DE LA MDMA EN HUMANS

La il·legalitat de la síntesi i consum de la MDMA a la nostra societat fa que la recerca sobre la seva farmacologia en humans sigui molt limitada. Quan es volen fer aproximacions a la seva estereoquímica, a les dificultats inicials associades als estudis farmacològics en humans s'afegeix la complexitat inherent al propi plantejament científic. En aquest cas, les publicacions científiques que combinen farmacologia i estereoquímica són encara menys nombroses.

La majoria de les dades publicades referents a la farmacologia dels enantiòmers de la MDMA en humans s'han pogut deduir a partir de casos d'intoxicació aguda. Aquestes dades són molt importants si es té en compte la seva exclusivitat, ja que inicialment van ser les úniques dades relacionades amb el consum d'aquesta substància en humans amb les que podia comptar la comunitat científica. Per contra, s'ha de tenir molta cautela en el moment d'avaluar el significat real dels paràmetres que es poden deduir a partir d'aquests estudis i fer extrapolacions, ja que es corresponen amb casos en els que molts cops s'ha fet un policonsum d'altres drogues i es desconeixen les dosis i pureses de les substàncies ingerides.

Per tal de poder avaluar convenientment la farmacocinètica i farmacodinàmia d'una substància es requereix de la realització d'estudis controlats en humans, pels que es requereix de l'aprovació per part de Comitès Ètics i de les Autoritats Sanitàries pertinents, segons la legislació de cada país. No cal dir però, que les autoritzacions per realitzar aquest tipus d'assaig clínic amb substàncies objecte d'abús es concedeixen rarament.

A continuació es fa una revisió de les publicacions més importants relacionades amb l'estereoquímica en la farmacologia de la MDMA en humans incloent-hi la metodologia analítica utilitzades en cada cas (veure taula 1.6.4.).

A més a més de les publicacions referides a la taula 1.6.4., el 1978 es va fer l'únic estudi publicat fins a l'actualitat d'administració dels enantiòmers de la MDMA en humans (Anderson i cols.). Es va observar que la (*S*)-MDMA és un estimulants del SNC més actiu que el seu enantiòmer i que el racemat. Una de les troballes més interessants d'aquest estudi és el fet que els efectes del consum del racemat no són equivalents a la suma dels efectes dels enantiòmers ingerits separadament. Per exemple, la midriasi i tensió mandibular associades a la MDMA es van manifestar després del consum de l'enantiòmer *S* i del racemat però no es van observar quan es va ingerir l'enantiòmer *R*.

Taula 1.6.4. *Relació d'estudis publicats sobre la farmacologia de la MDMA en humans.*

estudi	n	origen (dosi clorhidrat)	mostres (període)	mètode (derivatitzant)	compostos analitzats
Moore i cols., 1996	1	intoxicació	sang, orina, bilis	GC/MS (LTPCI)	MDMA, MDA
de Boer i cols., 1997	3	intoxicació	orina	GC/MS (HFBPCI+MSTFA)	MDMA, MDA, HMMA, HMA
Lanz i cols., 1997	3	estudi controlat (1.5 mg/kg)	orina (72 h)	CE	MDMA, MDA, HMMA
Hensley i Cody, 1999	8	estudi controlat (1.5 mg/kg)	orina (72 h)	GC/MS (LTPCI)	MDMA, MDA
Fallon i cols., 1999	8	estudi controlat (47.5 mg)	plasma (24 h), orina (72 h)	GC/MS (MTPCI)	MDMA, MDA

A l'estudi publicat per Moore i cols. (1996) es van presentar dades de distribució dels enantiòmers de la MDMA i del seu metabòlit MDA en sang total, bilis i orina d'un cas de mort per consum concomitant de MDMA, cocaïna i heroïna. Pel que fa als perfils enantiomèrics trobats en sang, es va observar una relació enantiomèrica molt propera a la unitat per a la MDMA i igual a 1 per a la MDA. En orina i bilis, en canvi, les relacions van ser $R/S > 1$ i < 1 per a la MDMA i MDA, respectivament (l'assignació dels enantiòmers amb els pics cromatogràfics es va fer de manera indirecta). Els autors suggereixen un comportament metabòlic enantioselectiu similar al descrit a rates però tot i això, són molt prudents en el moment d'avaluar les dades, pel fet que es desconeix la dosi i el temps transcorregut abans de la mort i perquè es tracta de les dades corresponents a un cas únic i de policonsum.

de Boer i cols. (1997) van poder analitzar els enantiòmers de la MDMA, MDA, HMMA i HMA a l'orina de tres pacients independents que van patir una intoxicació per consum de MDMA. Es va trobar una relació enantiomèrica > 1 per a la MDMA i < 1 per a la MDA en les tres orines estudiades. La relació enantiomèrica dels metabòlits hidroxilats només es va poder establir en una de les orines i van observar-se unes relacions de 0.87 i 0.43 per a l'HMMA i HMA, respectivament. Els autors no tenien patrons adients per poder assignar cada pic cromatogràfic amb el corresponent enantiòmer. Se suggereix l'existència d'un metabòlit que no s'havia descrit en animals d'experimentació, la MDA-OH, tot i que no descarten que es pugui tractar d'un compost que poguessin portar les pastilles que van consumir els pacients intoxicats.

També el 1997, Lanz i cols. van publicar dades dels enantiòmers de la MDMA i dels seus principals metabòlits en orina (MDA i HMMA) de dos voluntaris que van prendre 1.5

mg/kg de (*R,S*)-MDMA via oral. Es va recollir orina fins a 72 h després de la ingesta. Els resultats experimentals van mostrar que la MDMA en humans s'excreta principalment inalterada, amb relacions $R/S > 1$ i en augment al llarg del temps estudiat. Les relacions enantiomèriques de la MDA (primer enantiòmer eluït *vs.* segon) van ser < 1 , però la relació va anar apropant-se a la unitat al llarg del temps, fins a invertir-se en un dels voluntaris. A l'altre voluntari no arriba a fer-se la inversió en el temps estudiat però la tendència dels enantiòmers és la mateixa que pel primer voluntari. Pel que fa a l'HMMMA, es va veure que aquest compost hidroxilat és un metabòlit que es troba en orina en més concentració que la MDA però no es van poder obtenir dades concloents respecte el perfil dels seus enantiòmers perquè es van obtenir dades contradictòries per a l'orina de tots dos voluntaris estudiats.

L'article més important referent al metabolisme enantioselectiu de la MDMA es va publicar el 1999 (Fallon i cols.). Les dades publicades són les primeres dades farmacocinètiques dels enantiòmers de la MDMA i dels seu metabòlit MDA en humans, obtingudes mitjançant un assaig clínic d'administració de 47.5 mg de (*R,S*)-MDMA·HCl en 8 voluntaris sans. L'anàlisi dels enantiòmers també es va fer a l'orina. Es van obtenir concentracions i temps de vida mitja de (*R*)-MDMA més grans que del seu enantiòmer. Pel que fa a la MDA, les relacions inicials R/S en plasma van ser < 1 però amb tendència a invertir-se. Els resultats d'orina van confirmar les dades obtingudes al plasma.

Hensley i Cody (1999) publiquen uns resultats complementaris als de Lanz i cols. (1997), on van analitzar la orina dels participants en el mateix estudi. En aquest cas van aportar dades de 8 voluntaris i van poder assignar els pics cromatogràfics dels enantiòmers de la MDA. Van veure que la relació R/S dels enantiòmers de la MDA van ser inicialment < 1 i la relació va anar augmentant gradualment fins a invertir-se, aproximadament a les 24-36 h posteriors a la ingestió de la MDMA.

Peters i cols. (2003) van publicar recentment les relacions enantiomèriques plasmàtiques dels enantiòmers de la amfetamina, metamfetamina, MDA, MDMA i MDEA de mostres procedents de conductors sota la influència de drogues (73 mostres) i casos d'intoxicació (99 mostres). A les mostres a les que es va quantificar MDMA, es van trobar relacions $R/S > 1$. Aquestes dades es complementen amb un cas d'intoxicació aguda on van calcular relacions R/S dels enantiòmers de la MDMA i MDA durant aproximadament 50h després de l'administració del fàrmac. Les relacions van anar de 1 a 10, per a la MDMA; i de 0.15 a 2.5 per a la MDA.

1.6.6. ESTEREOQUÍMICA DE SUBSTÀNCIES RELACIONADES

Altres substàncies habitualment consumides pels usuaris de les drogues de disseny són la 3,4-metilendioxiàmfetamina (MDA) i la 3,4-metilendioxiètilamfetamina, (MDEA, MDE). Són anàlegs de la MDMA que també tenen un centre estereogènic i s'utilitzen en forma de racemat.

L'estereoquímica en la farmacologia d'aquestes substàncies també ha estat molts cops objecte d'estudi, sovint com a models del comportament estereoquímic de la MDMA. La substància més estudiada des del punt de vista de la seva estereoquímica ha estat la MDEA, també objecte d'abús però amb un menor potencial neurotòxic. Els principals estudis (humans i models animals) estan indicats en aquest apartat i les dades analítiques més rellevants del estudis (humans) es resumeixen a la taula 1.6.5.

Taula 1.6.5. *Relació d'estudis més rellevants sobre l'estereoquímica de la MDEA en humans.*

estudi	n	origen (dosi clorhidrat)	mostres (període)	mètode	compostos analitzats
Brunnenberg i Kovar, 2001	6	estudi controlat (140 mg)	Plasma (4 h)	HPLC	MDEA, MDA, HMEA
Spitzer i cols., 2001	5	estudi controlat (70 mg enantiòmers)	Plasma (34 h)	HPLC	MDEA
Buechler i cols., 2003	4	estudi controlat (70 mg enantiòmers)	Plasma (34 h) i orina (72 h)	HPLC	MDEA, MDA, HMEA

Hegandoren i cols. (1995) van fer un estudi d'administració intraperitoneal de MDEA en rates, per tal d'avaluar els perfils enantiomèrics de la MDEA i MDA al cervell dels animals. Van comparar els resultats obtinguts amb estudis similars fets amb MDMA, conclouent que la MDEA pateix una *N*-deetilació cap a MDA en menor extensió que la *N*-demetilació de la MDMA, juntament amb una enantioselectivitat de signe contrari i també menor.

Matsushima i cols. (1998) van comparar els perfils enantiomèrics de l'excreció urinària en rata després de l'administració oral de MDMA, MDA i MDEA. Es van obtenir relacions $R/S > 1$ pel cas de la MDA i MDMA, i < 1 per a la MDEA. Els autors atribueixen el canvi de signe en el perfil de la MDEA al grup etil de l'amina i suggereixen que aquesta substància deu metabolitzar-se preferentment cap al metabòlit hidroxilat HMEA, (l'equivalent a l'HMMA per a la MDMA). Per a la MDMA i MDEA van estudiar també els perfils enantiomèrics del metabòlit MDA, que van ser $R/S < 1$ i pràcticament = 1, respectivament.

Brunnenberg i Kovar (2001) van poder realitzar un estudi controlat d'administració de MDEA en humans. Amb les dades obtingudes es van mesurar els paràmetres farmacocinètics dels enantiòmers de la MDEA i dels seus metabòlits MDA i HMEA. En tots els subjectes ($n=8$) es van mesurar concentracions de $R/S > 1$ per a la MDEA i < 1 per als metabòlits.

Al 2001 es va fer un estudi d'administració dels enantiòmers de la MDEA en humans (Spitzer i cols.) i es van mesurar paràmetres farmacocinètics dels enantiòmers de la MDEA ($R/S > 1$), a més a més de poder-se avaluar per primer cop els efectes subjectius associats als enantiòmers independents. Així, mentre que la (*S*)-MDEA va produir efectes subjectius entactogènics, el seu enantiòmer va provocar al·lucinacions. Es postula que la (*R*)-MDEA podria ser la responsable dels efectes neurotòxics del consum de la droga.

Meyer i cols. (2002) van comparar els perfils enantiomèrics observats en sang i cervell de rates després de l'administració via subcutània MDMA i MDEA o els seus enantiòmers per separat. En el cas de la MDEA, tant administrant el racemat com els enantiòmers per separat s'observa una disminució del metabolisme respecte de l'observat per a la MDMA. En plasma s'obtenen relacions $R/S > 1$ per a la MDEA que no es tradueixen en relacions inverses per al metabòlits (MDA i HMEA) sinó que aquests també tenen la mateixa relació > 1 .

Buechler i cols. (2003) van reanalitzar les mostres de l'estudi de Spitzer i cols. (2001) després d'una administració controlada dels enantiòmers de la MDEA en humans, amb el que van donar dades farmacocinètiques dels enantiòmers de la MDEA i dels metabòlits HMEA i MDA. Novament es van obtenir relacions $R/S > 1$ per a la MDEA i < 1 per als dos metabòlits estudiats. Les dades urinàries van confirmar els resultats de les mostres de plasma.

Peters i cols. (2003) van comparar les relacions enantiomèriques plasmàtiques dels enantiòmers de la amfetamina, metamfetamina, MDA, MDMA i MDEA de mostres procedents de conductors sota la influència de drogues (73 mostres) i casos d'intoxicació (99 mostres). En general, es van obtenir relacions $R/S > 1$ per a l'amfetamina; $R/S > 1$ per a la metamfetamina, MDMA i MDEA. No es van poder treure conclusions respecte dels enantiòmers de la MDA, pel fet que normalment es tractava d'una MDA resultant del metabolisme de la MDMA o bé de la ingestió concomitant de les dues substàncies.

Els resultats obtinguts en animals d'experimentació i humans sobre les dues metilendioximetamfetamines més estudiades des del punt de vista de la seva estereoquímica, MDMA i MDEA, es poden resumir a la taula 1.6.6.

Taula 1.6.6. Resum del comportament metabòlic enantiomèric per a la MDMA, MDEA i els corresponents metabòlits.

	<i>R/S</i> animals		<i>R/S</i> humans
<p>MDMA ↓ MDA HMMA } metabòlits</p>	>1	← = →	>1
	<1		evolució de <1 a >1
	<1		?
<p>MDEA ↓ MDA HMEA } metabòlits</p>	<1	← ≠ →	>1
	>1	← ≠ →	<1
	>1	← ≠ →	<1

Les principals conclusions que es poden extreure d'aquesta taula són, en primer lloc, que si bé els estudis amb models animals són útils per tal d'avaluar la farmacologia i la toxicologia dels fàrmacs, s'ha d'anar amb molta cura en el moment de fer extrapolacions dels resultats entre espècies. Recordem, per exemple, que l'HMMA és un dels metabòlits majoritaris en humans i la *N*-demetilació és minoritària. A les rates, en canvi, hi ha una *N*-demetilació més acusada que als humans. D'altra banda mentre que l'estereoselectivitat en el metabolisme de la MDMA en humans passa per la reacció d'*O*-demetilació, en models animals la via metabòlica on s'observa la enantioselectivitat és la *N*-demetilació. Es desconeix si hi ha enantioselectivitat en altres vies.

2. OBJECTIUS

La MDMA és un compost quirals. Estudis en models animals suggereixen que la seva depuració metabòlica és enantioselectiva i que els seus enantiòmers tenen perfils farmacològics diferenciats. L'objectiu de la present memòria consisteix en estudiar l'enantioselectivitat de la depuració metabòlica de la MDMA en humans emprant una dosi que és compatible amb el seu consum recreatiu. L'estudi inclou la determinació de la MDMA i la dels seus principals metabòlits, que també són compostos quirals, donat que els metabòlits poden participar amb els efectes tòxics aguts i neurotòxics a mig/llarg termini associats al consum de la MDMA.

Per tal d'assolir aquest objectiu principal, és precís també assolir els següents objectius intermedis:

1. La síntesi orgànica de materials de referència (patrons de MDMA, HMMA i HHMA) enantiomèricament enriquits que permetin la inequívoca assignació i determinació analítica en fluids biològics.
2. El desenvolupament de metodologies analítiques que permetin la determinació quantitativa simultània dels enantiòmers de la MDMA i dels seus principals metabòlits en fluids biològics i la seva correlació amb els resultats obtinguts emprant aproximacions analítiques convencionals (que no tenen en compte l'estereoquímica).
3. L'estudi en voluntaris sans, consumidors recreatius de la MDMA, de la farmacocinètica dels seus enantiòmers i la dels seus principals metabòlits MDA, HMMA i HHMA.

3. SUBJECTES I MÈTODES

3.1. SUBJECTES

Les mostres analitzades en aquest estudi pertanyen a dos assaigs clínics en voluntaris sans en què es va administrar MDMA de forma controlada:

- Assaig clínic d'interacció entre la MDMA i l'alcohol a dosis úniques en humans. (Direcció General de Farmàcia i Productes Sanitaris, ref. 98/112).
- Assaig clínic d'administració de MDMA a dosis múltiples en humans. (Direcció General de Farmàcia i Productes Sanitaris, ref. 98/532).

3.1.1. ASPECTES ÈTICS

Els assaigs clínics van respectar les declaracions ètiques de Helsinki, Tokio i Venècia (1992), les recomanacions de la OMS, el codi deontològic i les derivades de la legislació espanyola sobre assaigs clínics (Ley del Medicamento 25/1990, Real Decreto 561/1993).

Els voluntaris van signar un consentiment informat abans dels estudis, després d'haver estat informats per part de l'investigador principal o algun dels seus col·laboradors, sobre els objectius, desenvolupament i abast de l'estudi. També van rebre un full informatiu sobre les característiques de l'assaig. Els voluntaris van ser informats de la llibertat d'abandonar l'estudi en qualsevol moment i van ser compensats econòmicament per les molèsties ocasionades per la seva participació.

Per la seva banda, els investigadors clínics es van comprometre a mantenir discreció sobre el desenvolupament de l'assaig i es van considerar confidencials el protocol i la seva documentació annexa, els fulls de recollida de dades i tota la informació generada a l'estudi. Tota aquesta informació es pot utilitzar pels investigadors i per a les finalitats especificades al protocol.

Finalment, el promotor de l'assaig disposava d'una assegurança que permetés cobrir les possibles incidències derivades de l'acció del fàrmac assajat.

3.1.2. CRITERIS D'INCLUSIÓ I EXCLUSIÓ

Els participants a tots dos estudis van ser seleccionats en funció d'una sèrie de criteris d'inclusió i exclusió. Un cop avaluada la idoneïtat dels subjectes, tots ells van acceptar els procediments que se'ls hi va sol·licitar de seguir al llarg del protocol, de manera que es van comprometre a:

- No automedicar-se durant el temps de duració l'assaig.
- Anar en dejú els dies de selecció i de les diferents sessions de l'estudi.
- No consumir alcohol, cafè, begudes de cola, xocolata i cacau des de les 24 h prèvies a cada sessió experimental i fins a 24 h després de l'inici de la corresponent sessió.
- No fumar fins a les 2 h després de l'administració del fàrmac.
- Abstenir-se del consum de drogues d'abús en la setmana prèvia a les sessions experimentals (verificat mitjançant controls de drogues en orina aplicant tècniques de immunoassaig-FPIA).

Els criteris d'inclusió i exclusió de l'estudi es detallen a continuació:

Criteris d'inclusió

1. Voluntaris homes entre 18 i 45 anys.
2. Historial i examen físic que mostrin que no presenten cap trastorn orgànic o psiquiàtric.
3. Electrocardiograma i analítica general en sang i orina previs a l'assaig normals, acceptant-se variacions de $\pm 10\%$ dels límits de normalitat o més grans, si segons el criteri dels investigadors, no són considerats rellevants.
4. Pes de $\pm 15\%$ de l'ideal de cada voluntari (segons corresponent alçada) i entre 50 i 100 kg.
5. Acceptació dels procediments d'assaig i signatura d'un consentiment informat.
6. Història de consum recreatiu de 3,4-metilendioximetamfetamina, havent consumit almenys 5 pastilles de MDMA al llarg de la vida i sense haver presentat reaccions adverses després de la utilització.
7. Història de consum social d'alcohol i experiència d'intoxicació alcohòlica.

Criteris d'exclusió

1. Incompliment de qualsevol dels criteris d'inclusió.
2. Història d'abús o dependència de fàrmacs i/o altres drogues o consum habitual de fàrmacs psicoactius, excepte l'ús recreatiu de MDMA i l'ús social d'alcohol.
3. Haver patit alguna malaltia orgànica o cirurgia major durant els tres mesos anteriors a l'assaig.
4. Antecedents psiquiàtrics individuals o d'esquizofrènia en familiars de primer grau.
5. Antecedents d'alcoholisme en familiars de primer grau.
6. Consum d'alcohol superior a 50 g/dia.

7. Fumadors de més de 20 cigarretes/dia.
8. Ingesta regular de medicació durant el mes abans de l'estudi.
9. Haver donat sang o haver participat en un altre assaig clínic amb fàrmacs el mes abans de l'estudi.
10. Antecedents d'al·lèrgia o reaccions adverses a fàrmacs.
11. Història de trastorns gastrointestinals, hepàtics, renals o de qualsevol tipus que puguin fer sospitar d'una alteració a l'absorció, distribució, metabolisme o excreció del fàrmac, o bé que siguin candidats a irritació gastrointestinal per fàrmacs.
12. Subjectes que no siguin capaços d'entendre la natura i conseqüències de l'assaig o bé els procediments que se'ls hi demana que segueixin.
13. Subjectes amb serologia positiva a hepatitis B i/o C i/o VIH.

3.1.3. CRITERIS DE VALORACIÓ CLÍNICA I AVALUACIÓ

En el desenvolupament de tots dos assaigs clínics, es van realitzar valoracions clíniques dels participants i es van perfilar els efectes farmacològics dels fàrmacs avaluant efectes subjectius, rendiment psicomotor, paràmetres fisiològics i perfil psiquiàtric dels participants, així com mesurant els nivells del fàrmac i dels seus metabòlits en plasma i orina i els nivells d'hormones en plasma (cortisol, prolactina, hormona del creixement i vasopresina).

Efectes subjectius

Per a l'avaluació dels efectes subjectius es van fer servir les escales analògiques visuals (EAV), el qüestionari Profile of Mood State (POMS) i una versió reduïda del Addiction Research Center Inventory (ARCI). A més a més, es va fer un qüestionari d'identificació de la classe farmacològica i una valoració dels efectes subjectius de substàncies que produeixen abús (VESSPA).

Les *escales analògiques visuals (EAV)* consisteixen en una línia recta de 10 cm que té en un extrem la paraula "ninguno/nada" i a l'altre extrem la paraula "máximo". El subjecte avalua a diferents temps el seu grau de: estimulat; col·locat; embriagat; content; algun efecte; bons efectes; efectes dolents; li agrada el fàrmac; somnolència; actiu; passiu; nerviós; calmat; concentrat; rendiment; canvis en les distàncies; canvis en els colors; canvis en les formes; canvis en les llums; alteracions en l'audició; al·lucinacions –visió de llums i taques-; mareig; al·lucinacions –audició de sorolls i veus-; al·lucinacions –visió de coses, animals, insectes o gent-; confusió; por; depressió o tristesa; sensació corporal diferent, alterada o irreal; entorn diferent o irreal.

Pel que fa al *Profile of Mood States (POMS)*, es va fer servir una versió formada per 72 adjectius amb els que el voluntari pot expressar el seu estat d'ànim en el moment de compliment del qüestionari. Cadascun dels adjectius es puntua segons una escala cinc punts que va des de 0 ("gens") a 4 ("extremadament") punts. Els adjectius pertanyen a 10 subescales que han estat agrupades empíricament en: ansietat, depressió, hostilitat, vigor, fatiga, confusió, amigabilitat i alegria. Derivades d'aquestes s'obtenen les escales d'humor positiu i activació.

Respecte de l'*Addiction Research Center Inventory (ARCI)*, es va utilitzar la versió reduïda i validada en castellà, que té 49 ítems de resposta cert/fals. El qüestionari té les següents sub-escales: MBG (eufòria), PCAG (sedació), LSD (disfòria), BG (eficiència intel·lectual) i A (mesura dels efectes amfetamínicos).

El *qüestionari d'avaluació dels efectes subjectius de substàncies que produeixen abús (VESSPA)*

Al final de cada sessió es va donar als participants un *qüestionari d'identificació de la classe farmacològica*, per tal que el voluntari decidís si els efectes del que va prendre podria ser degut a: placebo, benzodiacepines, alcohol, estimulants, drogues de disseny, cocaïna, al·lucinògens, cannabinòids o altres.

Rendiment psicomotor

Per a l'avaluació del rendiment psicomotor dels voluntaris, es van fer diferents proves al llarg de les sessions, d'uns cinc minuts de duració global. Les proves van ser un test de substitució de dígit per símbols (DSST), la mesura del temps de reacció simple (RT) i l'ala de Maddox.

El *test de substitució de dígit per símbols (DSST)* avalua l'atenció, velocitat de resposta i coordinació visual-motora. El test està basat en un codi de 9 dígit associats a diferents símbols geomètrics que apareixen a la part superior d'una pantalla d'ordinador. Al llarg d'un minut i mig es van mostrant dígit aleatòriament i el voluntari ha de complimentar el model geomètric que representa cada dígit. Al final del test es comproven el número total de respostes i el número de respostes encertades.

El *temps de reacció simple* és una plataforma amb una llum que té un botó de resposta i un punt de recolzament. El subjecte manté el dit en el punt de recolzament i s'entrena per que polsi el botó de seguida que vegi que s'encén una llum groga. Posteriorment, ha de tornar al punt de recolzament. El temps transcorregut entre que s'encén la llum i s'inicia la resposta del subjecte (pèrdua de contacte amb el punt de recolzament) és el temps de decisió, mentre que el temps que passa entre l'inici de la

resposta i la pressió del botó de resposta s'anomena temps motor. La suma d'aquests dos temps és el temps de reacció simple. El test té un total de 20 estímuls separats per intervals aleatoris de 1 a 5 segons i el resultat final és la mitja aritmètica dels temps mesurats per als 20 estímuls expressat en mil·lisegons.

L'*ala de Maddox* permet mesurar el to de la musculatura extraocular i evidencia heterofòries en la visió propera.

Paràmetres fisiològics

Els voluntaris van estar monitoritzats al llarg de cadascuna de les sessions i es va poder avaluar els corresponents electrocardiogrames. També es van mesurar les pressions arterials sistòlica (PAS) i diastòlica (PAD), freqüència cardíaca (FC), temperatura bucal (T) i diàmetre pupil·lar.

Valoració psiquiàtrica

Un psiquiatra va valorar les possibles alteracions psiquiàtriques dels voluntaris i va complimentar l'Escala de Mania de Young.

Mesures analítiques

Al llarg de les diferents sessions clíniques, es van recollir mostres de sang i orina dels participants. Es van mesurar les concentracions de la MDMA i dels seus metabòlits en plasma i orina i els nivells de prolactina, cortisol i hormona del creixement es van quantificar en sèrum. En el cas de l'assaig d'interacció de MDMA i alcohol, es va mesurar l'etanol en sang total i en orina.

3.1.4. ELS PARTICIPANTS A L'ASSAIG CLÍNIC D'INTERACCIÓ ENTRE LA MDMA I L'ALCOHOL A DOSIS ÚNIQUES EN HUMANS

L'estudi (ref. 98/112) va ser dissenyat amb l'objectiu principal de determinar l'existència d'una interacció farmacològica entre la MDMA i l'alcohol, pel que es van determinar els efectes subjectius, fisiològics, de rendiment psicomotor i endocrins que s'observen després de l'administració d'una combinació de MDMA i alcohol a dosis única i es van determinar els possibles canvis en els paràmetres farmacocinètics de la MDMA i l'alcohol després de la seva administració en combinació i a dosi única.

L'assaig complet va consistir en dues fases (pilot i definitiva), estructurades en quatre assaigs clínics de quatre sessions experimentals cadascun d'ells (separades per una setmana) i als que van participar un total de 14 subjectes. El disseny dels estudis va ser a

doble cec, creuat, amb assignació aleatòria de les seqüències de tractament (mitjançant dos quadrats llatins de 4x4 balancejats) i controlat.

Es van fer tres estudis pilot (amb 2 voluntaris cadascun d'ells) per tal de poder determinar les dosis idònies de MDMA i etanol per a l'estudi definitiu. Per a l'estudi definitiu (amb 8 voluntaris) tots els participants van assistir a les següents sessions experimentals:

- 100 mg de MDMA + placebo d'alcohol
- placebo de MDMA + 0.8 mg/kg d'alcohol
- 100 mg de MDMA + 0.8 mg/kg d'alcohol
- placebo de MDMA + placebo de alcohol

Cadascuna de les quatre sessions experimentals es van desenvolupar de manera idèntica. Els participants arribaven en dejú i se'ls hi col·locava un catèter per realitzar corresponents extraccions de sang. Immediatament abans de l'administració del fàrmac es va fer la primera extracció i es va recollir una mostra d'orina (basal).

Els temps de recollida de mostres després de l'administració del fàrmac, van ser els següents:

Sang: 0, 0.25 h, 0.50 h, 0.75 h, 1 h, 1.25 h, 1.50 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h i 24 h.

Orina: 0, 0-2 h, 2-4 h, 4-6 h, 6-8 h, 8-10 h, 10-24 h.

Les mostres de sang es van recollir en tubs heparinitzats, van ser centrifugades a 1100 rpm durant 10 minuts i el plasma es va guardar en tubs de polipropilè a -20°C fins al seu anàlisi. Les mostres d'orina també es van conservar a -20°C.

Els subjectes inclosos a l'estudi tenien una edat mitja de 23 anys (interval 19-36) un pes corporal mig de 67.4 kg (interval 59-81), i una alçada mitja de 175 cm (interval 167-183). El seu consum mig d'alcohol era de 1.6 unitats/dia (1 unitat = 8 g d'etanol) i referiren un consum previ de MDMA de 26 sessions (interval 5-100). Tots els subjectes excepte dos foren fumadors.

Per als propòsits del present treball es van seleccionar únicament les mostres corresponents a les sessions clíniques d'administració de 100 mg de MDMA i placebo d'alcohol de sis dels participants. Els resultats de l'anàlisi d'aquestes mostres es van publicar a la revista Journal of Analytical Toxicology (veure apartat 4.2.)

3.1.5. ELS PARTICIPANTS A L'ASSAIG CLÍNIC D'ADMINISTRACIÓ DE LA MDMA A DOSIS MÚLTIPLES EN HUMANS

L'estudi ref. (98/532) va ser dissenyat amb l'objectiu principal d'avaluar la interacció farmacològica entre dues dosis consecutives de MDMA, pel que es van determinar els efectes subjectius, fisiològics, de rendiment psicomotor i endocrins que s'observen després de l'administració MDMA 50 mg seguida de MDMA 100 mg 2 hores més tard. Es van determinar els possibles canvis en els paràmetres farmacocinètics de la MDMA després de la seva administració a dosi única i a dosis repetides.

L'assaig complet va consistir en dues fases (pilot i definitiva), estructurades en quatre assaigs clínics de dues sessions experimentals cadascun d'ells (separades per una setmana) i als que van participar un total de 14 subjectes. El disseny dels estudis va ser a doble cec, creuat, amb assignació aleatòria de les seqüències de tractament i controlat.

Es van fer tres estudis pilot (amb 2 voluntaris cadascun d'ells) per tal de poder determinar les dosis idònies de MDMA per a l'estudi definitiu (50+75 mg; 50+100 mg i 100+50 mg). Per a l'estudi definitiu (amb 8 voluntaris) tots els participants van assistir a les següents sessions experimentals:

- 50 mg de MDMA + 100 mg MDMA (2 hores més tard)
- placebo de MDMA + 100 mg MDMA (2 hores més tard)

Cadascuna de les dues sessions experimentals es va desenvolupar de manera idèntica. Els participants arribaven en dejú i se'ls hi col·locava un catèter per realitzar corresponents extraccions de sang. Immediatament abans de l'administració del fàrmac es va fer la primera extracció i es va recollir una mostra d'orina (basal).

Els temps de recollida de mostres després de l'administració del fàrmac, van ser els següents:

Sang: 0, 0.33 h, 0.66 h, 0.1 h, 1.50 h, 2.00 h, 2.33 h, 2.66 h, 3 h, 3.50 h, 4 h, 5 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, 26 h, 30 h i 50 h

Orina: 0, 0-2 h, 2-4 h, 4-8 h, 8-14 h, 14-26 h, 26-50 h, 50-74 h

Les mostres de sang es van recollir en tubs heparinitzats, van ser centrifugades a 1100 rpm durant 10 minuts i el plasma es va guardar en tubs de polipropilè a -20°C fins a la seva anàlisi. Les mostres d'orina també es van conservar a -20°C.

Els subjectes inclosos a l'estudi tenien una edat mitja de 25.3 anys (interval 22-35), un pes corporal mig de 71.4 kg (interval 57.5-81.6) i una alçada mitja de 176.8 cm (interval 170-190). Referiren un consum previ de MDMA de 26 sessions (interval 5-100). Tots els subjectes excepte dos foren fumadors.

Els resultats de les mostres de plasma i orina d'aquest assaig analitzades per a aquest treball estan acceptats per a la seva publicació a la revista *Drug Metabolism and Disposition* (apartat 4.4.). En aquest cas es van analitzar les mostres corresponents a les sessions d'administració de placebo + 100 mg de MDMA.

3.2. MÈTODES

Per a l'anàlisi de la MDMA, MDA, HMMA, HMA i HHMA a les mostres de plasma i orina procedents dels voluntaris sans participants als diferents assaigs es van desenvolupar les següents eines analítiques, necessàries per a les corresponents determinacions enantioselectiva i no enantioselectiva:

- Mètode d'anàlisi no enantioselectiva (convencional) de MDMA, MDA, HMMA i HMA en plasma i orina per GC/MS.
- Síntesi orgànica de patrons analítics enantiomèricament enriquits de (S)-MDMA, (S)-HMMA i (S)-HHMA i racemat d'HHMA.
- Mètode d'anàlisi per CE/UV dels enantiòmers de la MDMA, HMMA i MDA en orina.
- Mètode d'anàlisi dels enantiòmers de la MDMA, MDA i HMMA en plasma i orina per GC/MS.
- Mètode d'anàlisi dels enantiòmers de la MDMA, MDA, HMMA i HHMA en plasma i orina per GC/MS.

A continuació es descriuen amb detall els diferents desenvolupaments.

3.2.1. ANÀLISI CONVENCIONAL DE MDMA, MDA, HMMA I HMA PER GC/MS

Els resultats de l'anàlisi convencional de la MDMA i els seus principals metabòlits en plasma i orina van ser publicats a la revista *Journal of Analytical Toxicology* (veure apartat 4.2.):

Pizarro, N., Ortuño, J., Farré, M., Hernández-López, C., Pujadas, M., Llebaria, A., Joglar, J., Roset, P.N., Mas, M., Segura, J., Camí, J. and de la Torre, R. (2002) Determination of MDMA and its metabolites in blood and urine by gas chromatography-mass spectrometry and analysis of enantiomers by capillary electrophoresis. *J. Anal. Toxicol.* **26**, 157-165.

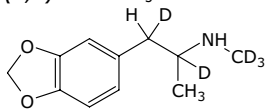
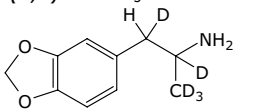
El procediment d'anàlisi de plasma i orina per GC/MS que permet detectar i quantificar la MDMA, MDA, HMMA i HMA des d'un punt de vista no enantioselectiu, és bàsicament idèntic per a totes dues matrius biològiques, tot i que les diferents

concentracions dels analits a tots dos fluids biològics fan que sigui necessari 1 mL de mostra en el cas del plasma i només 100 µL d'orina (diluït amb blanc d'orina fins arribar a un volum total de 1 mL).

Taula 3.2.1. Esquema de preparació de mostres per a l'anàlisi diastereoselectiva per GC/MS.

<p>HIDRÒLISI ENZIMÀTICA: + 1 mL TAS 1.1 M, pH=5.2 + 50 µL β-glucoronidasa <i>Helix Pomatia</i> (HP-2) 37°C, 16h</p>
<p>EXTRACCIÓ SÒLID-LÍQUID: columnes Bond Elut Certify® (BEC) — <i>condicionament:</i> + 2 mL metanol + 2 mL TFS, pH=6, 0.1M — <i>mostra</i> — <i>rentat:</i> + 1mL CH₃COOH, 1M + 6mL metanol — <i>elució:</i> + 2mL CH₃COOCH₂CH₃/NH₃ (2%)</p>
<p>EVAPORACIÓ: + 20 µL MBTFA <40°C</p>
<p>DERIVATITZACIÓ: + 50 µL MBTFA 70°C, 45 min</p>

Taula 3.2.2. Condicions d'anàlisi diastereoselectiva per GC/MS

	MDMA	MDA	HMMA, HMA
PATRONS INTERNS (IS)	(<i>R,S</i>)-MDMA-D ₅ 	(<i>R,S</i>)-MDA-D ₅ 	(<i>R,S</i>)-Foledrina (<i>p</i> -hidroxi-metamfetamina)
DERIVATS	MDMA- <i>N</i> -TFA MDMA-D ₅ - <i>N</i> -TFA	MDA- <i>N</i> -TFA MDA-D ₅ - <i>N</i> -TFA	HMMA- <i>N</i> -TFA, <i>O</i> -TFA HMA- <i>N</i> -TFA, <i>O</i> -TFA FOLEDRINA- <i>N</i> -TFA, <i>O</i> -TFA
COLUMNA	5%-fenilmetilsilicona, 12m x 0.2mm x 0.3µm		
CONDICIONS	He, 1.2 mL/min; split (1/10) SIM (70 eV); injector, 280°C; interfaç, 280°C		
VOLUM INJECCIÓ	1 µL		
RAMPA DE TEMPERATURES:	70°C, 2 min → 160°C → 170°C → 200°C → 280°C 30°C/min 5°C/min 15°C/min 30°C/min		

El procés de tractament de la mostra es pot veure detallat a la taula 3.2.1. (Ortuño i cols., 1999), mentre que les condicions analítiques estan descrites a la taula 3.2.2. Totes dues metodologies van ser validades seguint el procediment estàndard de validació de mètodes analítics de la URF (apartat 1.5.4.)

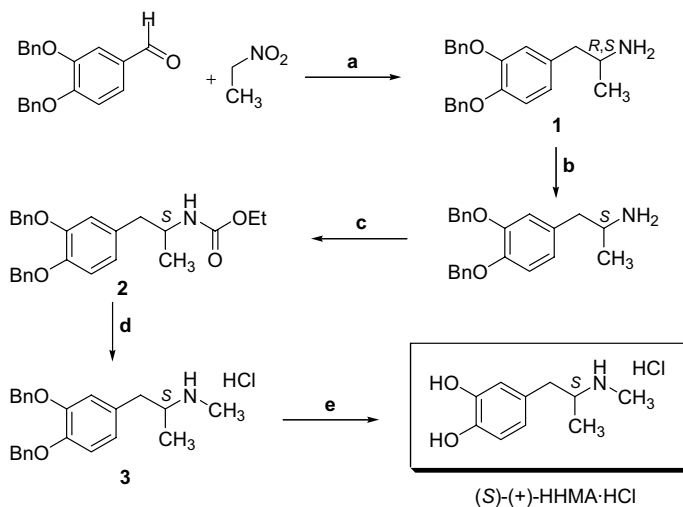
3.2.2. SÍNTESI ORGÀNICA DE (S)-MDMA, (S)-HHMA, (S)-HMMA I (R,S)-HHMA

Les síntesis orgàniques que es descriuran a continuació es van realitzar al llarg d'una estada de cinc mesos al Departament de Química Orgànica Biològica de l'Institut d'Investigacions Químiques i Ambientals (IIQAB-CSIC) de Barcelona, com a resultat d'un col·laboració entre aquesta institució i l'Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM). Els resultats van ser publicats l'any 2002 a l'article següent (apartat 4.1.):

Pizarro, N., de la Torre, R., Farré, M., Segura, J., Llebaria, A. and Joglar, J. (2002) Synthesis and capillary electrophoretic analysis of enantiomerically enriched reference standards of MDMA and its main metabolites. *Bioorg. Med. Chem.* **10**, 1085-1092.

Síntesi de (S)-HHMA i (R,S)-HHMA

Per a la síntesi de (S)-HHMA es van seguir els passos descrits per Pratesi i cols. (1964) per a la síntesi de l'(-)-HHA.



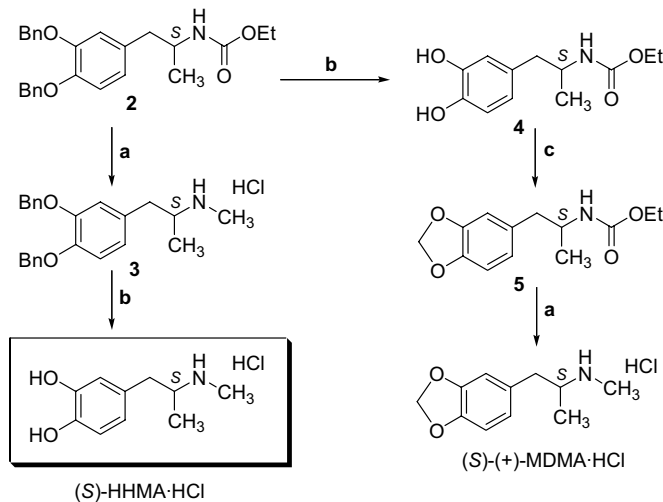
a: 1) $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$; 2) LiAlH_4 ; b: resolution; c: ClCO_2Et ; d: 1) LiAlH_4 , 2) HCl ;
e: H_2 , Pd-C, MeOH

Bàsicament, el procediment consisteix en la síntesi de (*R,S*)-HHA i la resolució del racemat per precipitació amb un àcid tartàric enantiomèricament pur (àcid dibenzoil-d-(+)-tartàric). Les sals obtingudes pels dos enantiòmers són diastereoisomèriques (tenen propietats físiques diferents), de manera que un d'ells precipita de manera selectiva mentre que l'altre roman en dissolució. Per filtració se separen els diastereoisòmers i posteriorment, es reverteix a l'enantiòmer de la sal que ha precipitat i es continua la síntesi amb aquest enantiòmer. Després de metilar l'amina i desprotegir els grups benzil, s'obté l'(*S*)-HHMA.

El mateix procediment però obviant la resolució es va seguir per a la síntesi de (*R,S*)-HHMA.

Síntesi de (*S*)-MDMA

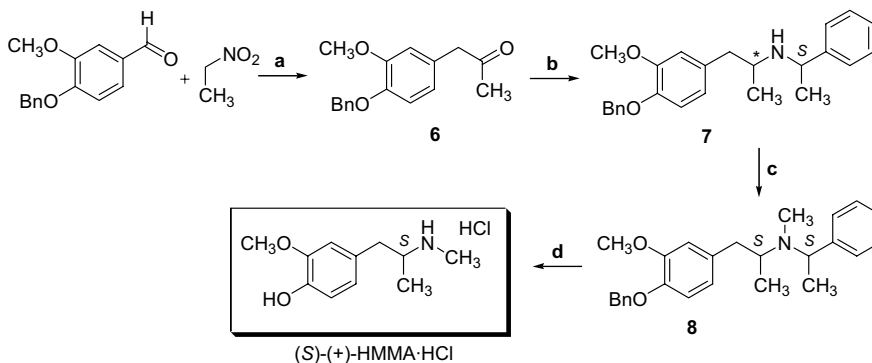
Es va sintetitzar (*S*)-(+)-MDMA per tal de poder correlacionar aquest enantiòmer amb el sintetitzat prèviament d'HHMA. Aquest material de referència es va poder fer servir per confirmar de manera directa l'assignació dels pics cromatogràfics dels enantiòmers de la MDMA.



a) 1) LiAlH_4 , 2) HCl ; b) H_2 , Pd-C , MeOH ; c) BrCH_2Cl , CsCO_3

Síntesi de (S)-HMMA

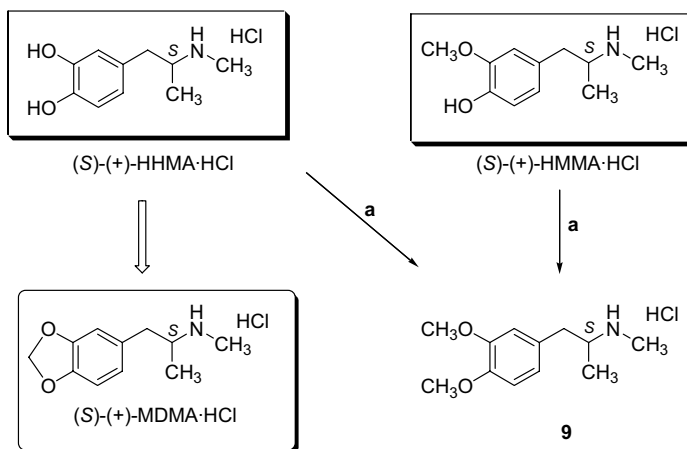
L'(S)-HMMA es va sintetitzar segons una aproximació descrita l'any 1973 per a compostos anàlegs (fenilisopropilamines substituïdes a l'anell) (Nichols i cols., 1973). En aquest cas, la formació de diastereoisòmers es fa per enllaç covalent (síntesi asimètrica) amb (S)- α -benzilamina i la separació té lloc en columna de cromatografia.



a: 1) $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$; 2) Fe, HCl- H_2O ; b: (S)- α -methylbenzylamine, NaBH_4CN ; c: 1) CH_3I , Na_2CO_3 ; 2) chromatography separation; d: 1) HCl; 2) H_2 , Pd-C, MeOH

Correlació química

Esquema que descriu els estudis de correlació fets per tal de comprovar el signe de rotació de la llum polaritzada de la (S)-HMMA.



a: $\text{CH}_2\text{N}_2\text{-Et}_2\text{O}$

3.2.3. ANÀLISI ENANTIOMÈRICA DE MDMA, MDA I HMMA PER ELECTROFORESI CAPIL·LAR (CE-UV)

El desenvolupament metodològic i l'anàlisi dels enantiòmers de la MDMA, MDA i HMMA en orina es van publicar a la revista *Journal of Analytical Toxicology* (apartat 4.2.):

Pizarro, N., Ortuño, J., Farré, M., Hernández-López, C., Pujadas, M., Llebaria, A., Joglar, J., Roset, P.N., Mas, M., Segura, J., Camí, J. and de la Torre, R. (2002) Determination of MDMA and its metabolites in blood and urine by gas chromatography-mass spectrometry and analysis of enantiomers by capillary electrophoresis. *J. Anal. Toxicol.* **26**, 157-165.

Per a l'anàlisi dels enantiòmers de la MDMA i dels seus metabòlits en orina amb l'CE, només van ser necessaris 100 µL d'orina (portats a 1 mL amb blanc de la matriu) per a la quantificació de MDMA i HMMA mentre que per als enantiòmers de la MDA va ser necessari 1 mL de mostra. Pel que fa al tractament de les mostres, se segueix essencialment el mateix procediment que per a una anàlisi convencional però, a diferència de l'anàlisi per GC/MS, en aquest cas no es derivatitzen els compostos. Per això, l'eluent s'elimina amb un corrent de N₂, controlant la pressió i la temperatura del bany (per tal d'evitar pèrdues dels compostos) i l'extracte es pot analitzar sense posteriors tractaments, només reconstituïnt-lo en 50 µL d'H₃PO₄. Les condicions analítiques es descriuen a la taula 3.2.3.

Taula 3.2.3. *Condicions d'anàlisi enantioselectiva per CE/UV.*

	MDMA, MDA	HMMA
<i>IS</i>	(<i>R,S</i>)-MDPA 3,4-metiledioxipropilamfetamina	codeïna
<i>DETECTOR</i>	UV	
<i>CAPIL·LAR</i>	sílica sense tractar 48.5cm (40cm fins el detector), 50µm (finestra òptica)	
<i>SELECTOR QUIRAL</i>	OHPCD, 10 mM	OHPCD, 50 mM
<i>PRE-ACONDICIONAMENT</i>	H ₃ PO ₄ 50 mM pH= 2.5 6 bars, 1 min OHPCD 10 mM, 6 bars, 1 min	H ₃ PO ₄ 50 mM, pH= 2.5 6 bars, 1.5 min OHPCD 50 mM, 6 bars, 1 min
<i>INJECCIÓ</i>	50 mbar, 2 s	
<i>CONDICIONS</i>	30 kV, 15°C	
<i>DETECCIÓ</i>	λ= 204 nm	

3.2.4. ANÀLISI ENANTIOMÈRICA PER GC/MS. DESENVOLUPAMENT METODOLÒGIC PER A L'ANÀLISI DELS ENANTIÒMERS DE MDMA, MDA, HMMA I HMA

Per a l'estudi dels enantiòmers de la MDMA i dels seus principals metabòlits per GC/MS es va desenvolupar una estratègia de derivatització que permetia l'anàlisi i quantificació de la MDMA, MDA i dels metabòlits hidroxilats HMMA i HMA. El disseny metodològic es troba descrit a la següent publicació (apartat 4.3.):

Pizarro, N., Llebaria, A., Cano, S., Joglar, J., Farré, M., Segura, J. and de la Torre R. (2003) Stereochemical analysis of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and its main metabolites by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17**, 330–336.

Per a la MDMA i els seus metabòlits, hi ha dos grups funcionals a la molècula susceptibles de ser derivatitzats: un grup amino (primari per a MDA i HMA i secundari per a MDMA i HMMA) i un grup hidroxil (per a l'HMA i HMMA). El procés de derivatització es troba a la taula 3.2.4 i les condicions instrumentals es resumeixen a la taula 3.2.5.

Taula 3.2.4. Procés de derivatització per a l'anàlisi enantiomèrica per GC/MS.

DERIVATITZANT	T (°C)	t (min)	DERIVATS
+ 20 µL (R)-MTPCl en 2mL CH ₃ COOCH ₂ CH ₃ /C ₆ H ₆ (1/1), 0.015% (CH ₂ CH ₃) ₃ N	80°C	20 min	-N-MTP -O-MTP (parcialment)
+ 10 µL NH ₃ (concentrat)	80°C	20 min	-N-MTP -OH
<i>eliminació de precipitats i evaporació dels dissolvents</i>			
+ 50 µL HMDS	80°C	60 min	N-MTP O-TMS

Taula 3.2.5. Condicions d'anàlisi enantiomèrica per GC/MS.

	MDMA	MDA	HMMA, HMA
IS	(R,S)- MDMA-D ₅	(R,S)-MDA-D ₅	(R,S)-foledrina
COLUMNA	5%-fenilmetilsilicona, 12m x 0.22mm x 0.33µm		
CONDICIONS	He, 1.2 mL/min; split (1/10) SIM (70eV); injector; 280°C; interfaç, 280°C		
VOLUM INJECCIÓ	2 µL		
RAMPA DE TEMPERATURES	150°C, 1 min → 290°C 15°C/min		

3.2.5. ANÀLISI ENANTIOMÈRICA DE MDMA, MDA, HMMA I HHMA PER GC/MS.

Es va decidir incloure l'anàlisi de l'HHMA des del punt de vista enantiomèric. El desenvolupament metodològic es trobarà descrit al següent article acceptat per a la seva publicació a la revista *Drug Metabolism and Disposition* (apartat 4.4.):

Pizarro, N., Farré, M., Pujadas, M., Peiró, A., Roset, P. N., Joglar, J. and de la Torre, R. (2004) Stereochemical analysis of MDMA and its main metabolites in human samples including the catechol-type metabolite (HHMA). *Drug Metab. Disp.* (in press).

El procés de tractament de la mostra, descrit prèviament per a l'anàlisi de l'HHMA per HPLC/DE (Segura i cols., 2002), es va acoblar a la derivatització en tres passos desenvolupada per a l'anàlisi enantioselectiva de la MDMA, MDA, HMMA i HMA (Pizarro i cols., 2003) (veure taula 3.2.6.). Les condicions analítiques es troben descrites a la taula 3.2.7.

Taula 3.2.6. *Procés de preparació de mostres per a l'anàlisi per GC/MS que inclou HHMA.*

HIDRÒLISI ÀCIDA	+ 1 mL HCl 0.5 M + 200 µL Na ₂ S ₂ O ₅ , 250 mM + 50 µL EDTA, 250 mM (+ 50 µL metilcatecol al plasma) 100°C, 30 min + NaOH 10 M fins a pH=5.5-6 (<i>neutralització</i>)
EXTRACCIÓ SÒLID-LÍQUID	columnes Stron Cation eXchange® (SCX) — <i>condicionament:</i> + 2 mL metanol + 2 mL TFS, (pH=6, 0.1M) — <i>mostra:</i> — <i>rentat:</i> + 1mL H ₂ O milliQ + 6mL metanol — <i>elució:</i> + 2mL metanol/HCl (2%), 2% Na ₂ S ₂ O ₅ , 250 mM; 2% EDTA, 250 mM <i>evaporació a aproximadament 40°C</i> <i>+200 µL metanol</i>
TRACTAMENT DELS EXTRACTES (X 2)	+ 2mL CH ₃ COOCH ₂ CH ₃ /NH ₃ (2%) agitador de balanceig, 20 min centrifugació i separació dels precipitats <i>evaporació del dissolvent a aproximadament 40°C</i>
DERIVATITZACIÓ	+ 20 µL (<i>R</i>)-MTPCI en 2mL CH ₃ COOCH ₂ CH ₃ /C ₆ H ₆ (1/1), 0.015% (CH ₂ CH ₃) ₃ N 80°C, 20 min + 10 µL NH ₃ (concentrat); 80°C, 20 min <i>eliminació dels precipitats i evaporació dels dissolvents</i> + 50 µL HMDS; 60°C, 60 min

Taula 3.2.7. Condicions d'anàlisi enantiomèrica per GC/MS que inclou HHMA.

	MDMA	MDA	HMMA, HMA	HHMA
<i>IS</i>	(<i>R,S</i>)- MDMA-D ₅	(<i>R,S</i>)-MDA-D ₅	(<i>R,S</i>)-foledrina	DHBA (dihidroxibenzilamina)
<i>COLUMNA</i>	5%-fenilmetilsilicona, 15m x 0.25mm x 0.25µm			
<i>CONDICIONS</i>	He, 1 mL/min; splitless (1min) SIM (70eV); injector; 280°C; interfaç, 280°C			
<i>VOLUM INJECCIÓ</i>	3 µL			
<i>RAMPA DE TEMPERATURES</i>	150°C, 1 min → 290°C, 7min 20°C/min			

4. RESULTATS

Pizarro N; de la Torre R; Farré M; Segura J; Llebaria A; Joglar J
Synthesis and capillary electrophoretic analysis of enantiomerically enriched reference standards of MDMA and its main metabolites.
Bioorganic & medicinal chemistry 2002 Apr; 10 (4), pp. 1085-92.



Pergamon

Bioorganic & Medicinal Chemistry 10 (2002) 1085–1092

BIOORGANIC &
MEDICINAL
CHEMISTRY

Synthesis and Capillary Electrophoretic Analysis of Enantiomerically Enriched Reference Standards of MDMA and its Main Metabolites

Nieves Pizarro,^a Rafael de la Torre,^a Magí Farré,^a Jordi Segura,^a
Amadeu Llebaria^b and Jesús Joglar^{b,*}

^aPharmacology Research Unit, Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM), Doctor Aiguader 80, E-08003 Barcelona, Spain

^bDepartment of Biological Organic Chemistry, IQAB-CSIC, Jordi Girona 18-26, E-08034 Barcelona, Spain

Received 9 February 2001; accepted 15 October 2001

Abstract—Enantiomerically-enriched (*S*)-3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) and its main metabolites (*S*)-4-hydroxy-3-methoxymethamphetamine (HMMA) and (*S*)-3,4-dihydroxymethamphetamine (HHMA) were prepared for unequivocal identification of the differential enantioselective metabolism of these compounds as well as for its application in the analysis of biological samples. Capillary electrophoresis with cyclodextrin derivatives and a chemical correlation of (*S*)-MDMA, (*S*)-HMMA and (*S*)-HHMA has been performed to assign the absolute stereochemistry of major isomers in analytical standards enriched with such enantiomers. © 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Introduction

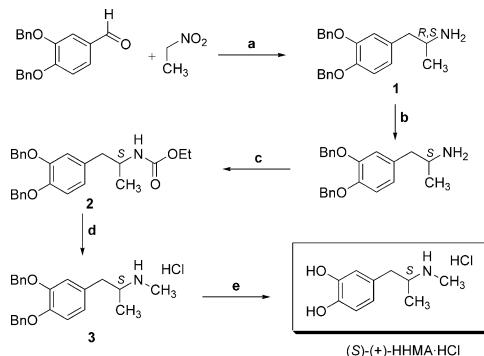
3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDMA, 'ecstasy') is an illicit drug frequently misused by the youth, and potentially associated with acute and long-term effects. MDMA is available as its racemate (*R,S*)-MDMA but different pharmacological properties for each enantiomer have been reported. Acute effects of MDMA that ultimately may be the cause of death¹ are related to sympathetic hyperactivity in the neural and cardiovascular systems. Neurotoxicity and some psychomimetic properties are related to the (*S*)-isomer.² Body disposition of MDMA is also subjected to selective enantiomeric metabolism. Well characterized metabolites of MDMA include 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA), 4-hydroxy-3-methoxymethamphetamine (HMMA) and 4-hydroxy-3-methoxyamphetamine (HMA). 3,4-Dihydroxyamphetamine (HHA) and 3,4-dihydroxymethamphetamine (HHMA) are metabolic intermediates. Analysis of the enantiomeric ratio of major MDMA metabolites in human samples is desirable given the pharmacological relevance of the enantioselectivity of MDMA, HHMA and HMMA. We have recently

shown that capillary electrophoresis (CE) using (2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin as enantioselective selector provided an efficient baseline separation of these enantiomers.³ However, unequivocal identification of elution order of enantiomers is indispensable to characterize the results obtained from the analysis of biological samples. Although two syntheses of (*S*)-MDMA are already described in the literature,⁴ preparation of the enantiomers of HMMA and HHMA has not been performed. Accordingly, a study was conducted to undertake the synthesis of standards of MDMA, HMMA and HHMA enriched in its *S* enantiomer. The synthetic chemistry leading to these standards and the chemical correlation used for enantiomer identification in the CE peaks are here reported.

Results and Discussion

Synthesis of (*S*)-HHMA was originally planned as previously described⁵ using the key intermediate (*S*)-(3,4-dibenzyloxyphenyl)-2-propanamine **1** and expecting transformation of **1** into HHMA by *N*-monomethylation followed by hydrogenolytic debenzoylation. Racemic **1** was prepared from commercially available 3,4-dibenzyloxybenzaldehyde upon condensation with nitroethane followed by reduction with lithium aluminium hydride

*Corresponding author. Tel: +34-93-4006115; fax: +34-93-2045904; e-mail: joglar@iqab.csic.es



Scheme 1. Synthesis of enantiomerically enriched (*S*)-HHMA-HCl. a: 1) $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$; 2) LiAlH_4 ; b: resolution; c: ClCO_2Et ; d: 1) LiAlH_4 ; 2) HCl ; e: H_2 , Pd-C, MeOH.

(see Scheme 1). Reaction of amine **1** with an equimolar amount of dibenzoyl-D-(+)-tartaric acid gave rise to a crystalline diastereomeric salt that after a single crystallization step with methanol resulted in a compound with an $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 65.8$ (*c* 0.84, methanol). The optical rotation sign of this compound was opposed to that reported by Pratesi et al. ($[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 62.9$ (*c* 0.78, methanol)).⁵ This result, however, was confirmed by treating the salt with 1 N NaOH giving rise to a recovered amine **1** with an $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 6.4$ (*c* 1.8, chloroform) that also had an optical rotation sign opposed to that reported in the literature for **1** [$\alpha]_{\text{D}}^{20} + 12.6$ (*c* 3.7, chloroform)].⁵

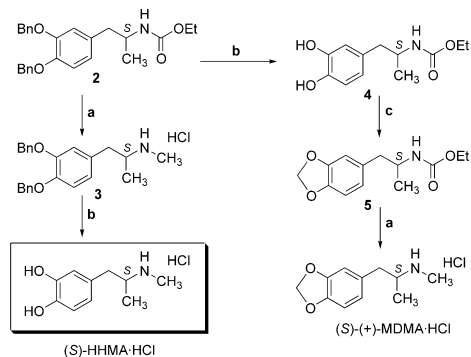
Resolution of **1** with dibenzoyl-L-(−)-tartaric acid was assessed. Products with specific sign and rotation values consistent with those obtained for resolution of **1** with dibenzoyl-D-(+)-tartaric acid⁵ were recovered. Moreover, repeated re-crystallization of the salt formed from **1** with dibenzoyl-L-(−)-tartaric acid resulted in a very slight enrichment after three steps. For this reason, synthesis of HHMA with the enantioenriched amine **1** was continued. Thus, (*S*)-(3,4-dibenzyloxyphenyl)-2-propanamine was converted to the corresponding carbamate **2** by reaction with ethyl chloroformate. Reduction with lithium aluminium hydride and subsequent treatment with an ethereal solution of hydrogen chloride resulted in *N*-methylamine **3** as its hydrochloride salt. Hydrogenation with a catalytic amount of palladium on charcoal yielded (*S*)-HHMA-HCl with an 80% ee. A sample of racemic HHMA-HCl was also prepared from racemic 1-(3,4-dibenzyloxyphenyl)-2-propanamine **1** following the same synthetic scheme.

A chemical correlation with (*S*)-MDMA⁴ was performed in order to determine the stereochemistry of (*S*)-HHMA-HCl. (*S*)-MDMA was prepared from a common intermediate to the previously synthesized (*S*)-HHMA (Scheme 2). Thus, hydrogenation of (*S*)-*N*-ethoxycarbonyl-1-(3,4-dibenzyloxyphenyl)-2-aminopropane **2** with a catalytic amount of Pd/C resulted in (*S*)-*N*-ethoxycarbonyl-1-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-aminopropane **4**. The corresponding (*S*)-*N*-ethoxycarbonyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-aminopropane **5** was obtained after treatment with bromochloromethane

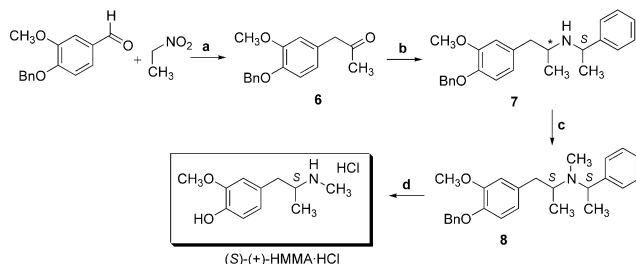
and cesium carbonate in anhydrous *N,N*-dimethylformamide.

Finally, reduction with lithium aluminium hydride and subsequent hydrochloride formation yielded (*S*)-(+)-MDMA-HCl with an optical rotation of $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 15.2$ (*c* 0.79, H_2O). Analysis of this compound by CE gave a 77% ee, confirming that the synthesised (*S*)-*N*-methyl-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-aminopropane [(*S*)-HHMA] had the expected *S* configuration.

On the other hand, synthesis of (*S*)-HMMA (see Scheme 3) was accomplished following an asymmetric synthesis described for similar compounds.⁶ Condensation of the commercially available 4-benzyloxy-3-methoxybenzaldehyde with nitroethane, followed by reduction with iron metal in aqueous HCl resulted in ketone **6**.⁷ Reductive amination of **6** with (*S*)- α -methylbenzylamine and sodium cyanoborohydride gave rise to amine **7** as a 67:33 mixture of diastereomers. Methylation of amine **7** with iodomethane and sodium carbonate provided the corresponding *N*-methylamine as a mixture of two diastereomers. They were partially



Scheme 2. Chemical correlation of (*S*)-HHMA-HCl with (*S*)-MDMA-HCl. a: 1) LiAlH_4 , 2) HCl ; b: H_2 , Pd-C, MeOH; c: BrCH_2Cl , CsCO_3 .

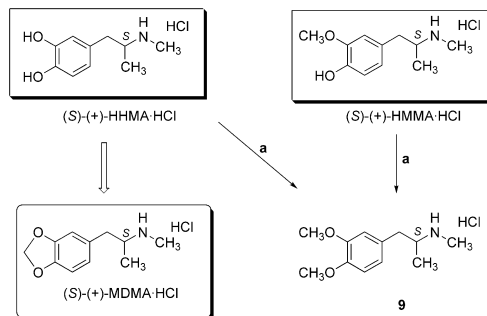


Scheme 3. Synthesis of enantiomerically enriched (*S*)-HMMA-HCl. a: 1) $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$; 2) Fe, HCl-H₂O; b: (*S*)- α -methylbenzylamine, Na BH₄ CN; c: 1) CH_3L , Na₂CO₃; 2) chromatography separation; d: 1) HCl; 2) H₂, Pd-C, MeOH.

separated by flash column chromatography yielding a fraction enriched in the (*S,S*)-isomer **8**. After hydrochloride formation, hydrogenolysis provided the corresponding (*S*)-HMMA hydrochloride with a 72% ee as determined by CE analysis.

The stereochemistry of synthetic (*S*)-HMMA-HCl was confirmed by correlation with HHMA and MDMA. Thus, reaction of (*S*)-*N*-methyl-1-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-aminopropane hydrochloride [(*S*)-HHMA-HCl] with an ethereal solution of diazomethane provided the enriched (*S*)-isomer of *N*-methyl-1-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-aminopropane hydrochloride [(*S*)-MMMA-HCl] **9** (see Scheme 4) and the same reaction was performed with synthetic (*S*)-HMMA-HCl. Comparison of the results obtained from enantioselective capillary electrophoresis analysis of MMMA-HCl **9** from both sources confirmed that both compounds had the same configuration (see Fig. 1).

To determine the elution order of the enantiomers of the synthesized compounds and the enantiomeric excess for (*S*)-MDMA, (*S*)-HHMA and (*S*)-HMMA, CE analysis was performed following the method developed by our group.³ Thus, for each analyte, separate analysis was performed for the racemic mixture and the synthesized enantioenriched material. In all cases, (*S*)-enantiomers eluted after the (*R*)-enantiomers (see Fig. 1).



Scheme 4. Chemical correlation of (*S*)-HHMA-HCl and (*S*)-HMMA-HCl with (*S*)-MDMA-HCl. a: $\text{CH}_2\text{N}_2\text{-Et}_2\text{O}$.

Conclusion

This is the first report describing the synthesis and chemical correlation of enantioenriched (*S*)-MDMA, (*S*)-HHMA and (*S*)-HMMA. Although these methods would probably allow the preparation of higher enantiomerically pure compounds, it was considered this unnecessary for the current objectives of the present study, and irrelevant from an analytical point of view. The availability of the newly synthesized enantiomerically enriched metabolites of MDMA are crucial for ongoing future studies on in vivo differential metabolism of MDMA enantiomers and their role in the neurotoxicity and other pharmacological effects of MDMA in humans.

Experimental

General methods

Reactions sensitive to moisture were carried out under Ar atmosphere. Commercial grade reagents were used directly without further purification (unless otherwise indicated). Solvents were dried by standard methods and distilled before use. Purification of products by column chromatography was performed on Merck silica gel 60. TLC was carried out on precoated silica gel Merck 60 F₂₅₄ (0.25 mm) sheets. IR spectra were recor-

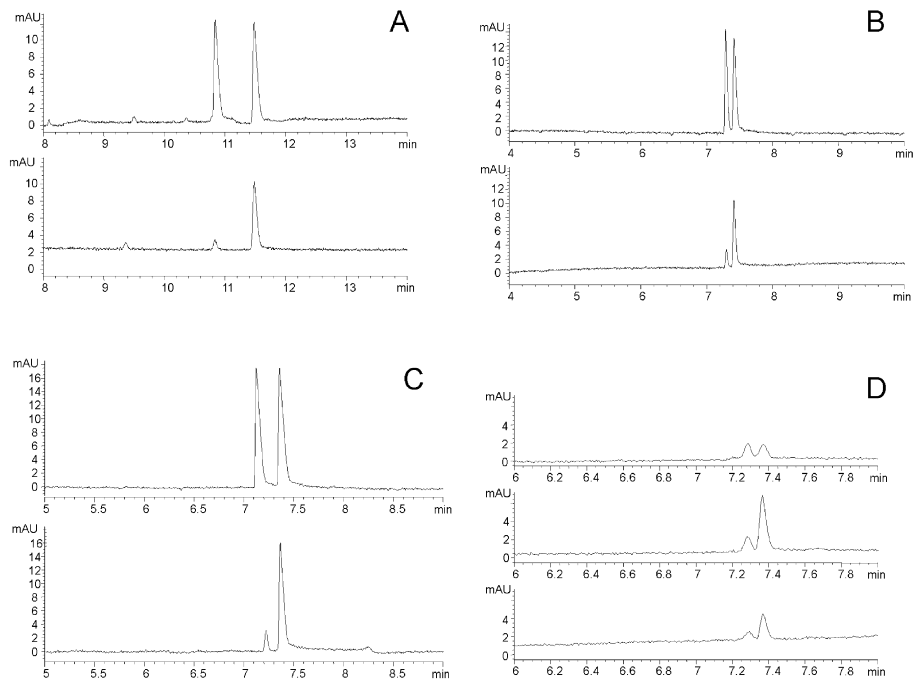


Figure 1. Capillary electropherograms for racemic and enantioenriched samples of HHMA, HMMA, MDMA and MMMA. (A) Top: (*R,S*)-HHMA; bottom: enriched (*S*)-HHMA; (B) top: (*R,S*)-HMMA, bottom: enriched (*S*)-HMMA; (C) top: (*R,S*)-MDMA; bottom: enriched (*S*)-MDMA; and (D) top: (*R,S*)-MMMA, middle: enriched (*S*)-MMMA from (*S*)-HHMA, bottom: enriched (*S*)-MMMA from (*S*)-HHMA.

ded on a Michelson Bomem MB-120 with Fourier transform instrument and are reported in cm^{-1} . ^1H and ^{13}C NMR spectra were obtained in CDCl_3 Solutions (unless otherwise indicated) on a Varian Gemini XL200 and a Varian Unity 300 spectrometers, operating at 200 and 300 MHz for ^1H and 50 and 75 MHz for ^{13}C , respectively. Chemical shifts are reported in delta (δ) units, parts per million (ppm) downfield from $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$, or in ppm relative to the singlet at 7.26 ppm of CDCl_3 for ^1H and in ppm relative to the centre line of a triplet at 77.0 ppm of CDCl_3 for ^{13}C . ^1H NMR: splitting pattern abbreviations include the following: s, singlet; bs, broad singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; m, multiplet. ^{13}C NMR: multiplicities were determined by DEPT experiments using standard pulse sequences. In case of a mixture of diastereomers, abbreviations 'min' and 'maj' refer to signals of the minor and major diastereomer, respectively; when no specification is mentioned, it either has not been possible to assign the signal to any diastereomer or belongs to both of them.

A 341 Perkin-Elmer polarimeter was used for optical rotatory measures. A gas chromatograph (HP 6890 series GC system, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) equipped with a quadrupole mass spectrometer (HP 5973 mass selective detector) and an autosampler (5683 series injector) was used. A cross-linked 5% phenyl-

methylsiloxane capillary column ($12\text{ m} \times 0.2\text{ mm}$ I.D. $\times 0.3\text{ }\mu\text{m}$ film thickness) (HP, Ultra-2) was employed, with helium as the carrier gas at a flow rate of 1.2 mL/min. The oven was maintained at $100\text{ }^\circ\text{C}$ for 1 min and two cycles were programmed, from $100\text{--}200\text{ }^\circ\text{C}$ at $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ followed by $200\text{--}280\text{ }^\circ\text{C}$ at $30\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ (total run time 13.67 min). Samples were injected in the split mode. Insert liners packed with silanized glass-wool were used. Injector and interface were set at $280\text{ }^\circ\text{C}$. The mass spectrometer was operated by electron impact ionisation (E.I., 70 eV) and in the scan mode (working range 100–550 amu).

Trifluoroacyl derivatives of each enriched forms were analysed by GC–MS for assessing the purity of all synthesized standards. Methanolic solutions of every racemic and enriched form were allowed to react with an appropriate amount of *N*-methyl-bis(trifluoroacetamide) (MBTFA) at $70\text{ }^\circ\text{C}$ for 45 min, and the corresponding *N*-TFA and/or *O*-TFA derivatives were obtained.

A capillary electrophoresis system (^3DCE , Hewlett-Packard) equipped with a diode-array detector was employed for the enantiomeric separation. Separation was performed in an untreated fused-silica capillary of 48.5 cm total length (40 cm effective length) and a stan-

standard 50 μm optical path length cell. A constant voltage of 30 kV was applied and the cartridge temperature was maintained at 15 °C. The diode-array detector was set to monitor the signal at 204 nm. (2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (Hewlett-Packard CE grade 97+%. Part # 8501-0133) in 50 mM H_3PO_4 (pH=2.5) at a concentration of 50 mM as running buffer was used for the enantioselective separation of the enantiomers, with 50 mM H_3PO_4 for 1.5 min and running buffer for 1 min as preconditioning conditions before each experiment. Injection of the sample was performed by applying external pressure of 50 mbar for 2 s.

Synthesis of enantiomerically enriched (*S*)-*N*-methyl-1-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-aminopropane [(*S*)-3,4-dihydroxy methamphetamine, (*S*)-HHMA]

1-(3,4-Dibenzoyloxyphenyl)-2-nitropropene. This compound was synthesized following the method described by Glennon et al.⁸ 3,4-Dibenzoyloxybenzaldehyde (10 g, 30.77 mmol), nitroethane (150 mL) and ammonium acetate (2.47 g, 30.77 mmol) were dissolved in a 250 mL round bottom flask and the mixture heated at reflux for 17 h. Nitroethane was then removed with a Büchi rotary evaporator and the solid residue was taken up in 250 mL of ethyl acetate and then washed with water (2 \times 40 mL) and brine (40 mL). The organic layer was dried over anhydrous MgSO_4 and filtered. The solvent was removed and 1-(3,4-dibenzoyloxyphenyl)-2-nitropropene as a yellow powder (11.08 g, 29.55 mmol, 96% yield) was obtained. IR (neat, ν_{max} cm^{-1}): 1600, 1523, 1510, 1454, 1317, 1269, 1236, 1141, 1022, 860, 696. ^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 , δ): 2.31 (s, 3H), 5.22 (s, 2H), 5.24 (s, 2H), 6.96–7.01 (m, 3H), 7.32–7.49 (m, 10H), 7.98 (s, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz; CDCl_3 , δ): 13.9, 70.8, 71.3, 114.1, 116.6, 124.8, 125.2, 127.0, 127.1, 127.9, 128.0, 128.5, 128.6, 133.6, 136.5, 136.7, 145.9, 148.4, 150.6.

1-(3,4-Dibenzoyloxyphenyl)-2-aminopropane. According to a method previously described,^{8,9} 100 mL of anhydrous tetrahydrofuran (THF) and LiAlH_4 (2.5 g, 62.5 mmol) were introduced into a three-neck round bottom flask, previously evacuated (equipped with a thermometer, a dropping funnel with pressure-equalisation arm, and a septum) under an argon atmosphere and with continuous stirring, placed in an ice bath.

A solution of 11.08 g (29.55 mmol) of 1-(3,4-dibenzoyloxyphenyl)-2-nitropropene in 75 mL of anhydrous THF was transferred to the dropping funnel via cannula. Its addition over the LiAlH_4 suspension was slowly and carefully performed so that the temperature did not exceed 15 °C. Once the addition was complete, the funnel was changed to a condenser and the resulting mixture was refluxed and stirred for 4 h and cooled to room temperature followed by an ice bath. LiAlH_4 excess was removed by careful dropwise addition of water and then treated with anhydrous Na_2SO_4 . After filtration, the solution was concentrated and dried yielding 1-(3,4-dibenzoyloxyphenyl)-2-aminopropane **1**, 7.1 g (19.97 mmol, 71% yield) as a pale yellow powder. ^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 , δ): 1.07 (d, 3H), 1.20 (bs, 2H), 2.38

(A of an ABX syst., $J=8.2$, 13.4 Hz, 1H), 2.61 (B of an ABX syst., $J=5.0$, 13.4 Hz, 1H), 3.01–3.12 (X of an ABX syst., m, 1H), 5.15 (s, 2H), 5.17 (s, 2H), 6.68–6.90 (m, 3H), 7.28–7.47 (m, 10H). ^{13}C NMR (75 MHz; CDCl_3 , δ): 23.4, 46.0, 48.4, 71.2, 71.4, 115.1, 116.4, 122.1, 127.2, 127.3, 127.6, 127.7, 128.4, 133.1, 137.2, 137.4, 147.4, 148.6.

(*S*)-1-(3,4-Dibenzoyloxyphenyl)-2-aminopropane.⁵ 10 g of racemic 1-(3,4-dibenzoyloxyphenyl)-2-aminopropane was placed in a 500 mL round bottom flask containing 250 mL of boiling methanol, and 10 g of dibenzoyl-L-(–)-tartaric acid was added. Once the solution reached the room temperature, it was stored in the refrigerator for about one week until the crystals precipitated. Crystals were filtered, washed with cool methanol and dried achieving a total amount of 9.48 g. The crystals were dissolved in 50 mL of dichloromethane and treated with 15 mL of 1 N NaOH aqueous solution. The organic layer was decanted and the aqueous layer extracted with dichloromethane (3 \times 5 mL). The combined organic phases were dried over anhydrous Na_2SO_4 to obtain the free amine. After two repetitions of these steps 3.90 g of salt with an $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -59.5$ (c 0.82, methanol) were obtained [literature:⁵ $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -59.3$ (c 0.84, methanol) for the salt of the dibenzoyl-D-(+)-tartaric acid]. After treatment with base, it yielded 1.44 g of (*S*)-1-(3,4-dibenzoyloxyphenyl)-2-aminopropane with an $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +10.89$ (c 3.35, chloroform) [literature:⁵ $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +15.1$ (c 3.4, chloroform)].

(*S*)-*N*-Ethoxycarbonyl-1-(3,4-dibenzoyloxyphenyl)-2-aminopropane (2**).** Carbamate **2** was synthesized as described by Yousif et al.⁹ Again, 10 mL of anhydrous THF, 1.24 g (3.57 mmol) of (*S*)-1-(3,4-dibenzoyloxyphenyl)-2-aminopropane, 1.1 mL (7.14 mmol, 2 equiv) of triethylamine and 6.74 mg (0.06 mmol, 0.01 equiv) of 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP) were placed in an ice cooled 100 mL round bottom flask under an argon atmosphere and continuous stirring. A solution of ethyl chloroformate (0.66 mL, 6.95 mmol, 2 equiv) in 10 mL of anhydrous THF was slowly added, and the mixture left at room temperature for 6 h. The residue was dissolved in diethyl ether (60 mL) and washed with 20 mL of water. Ether was decanted and the aqueous phase extracted with diethyl ether (2 \times 25 mL). The combined organic extracts were washed with water (10 mL), HCl 1 N (20 mL) and saturated NaCl (10 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4 , and evaporated to obtain 1.22 g (2.90 mmol, 81%) of (*S*)-*N*-ethoxycarbonyl-1-(3,4-dibenzoyloxyphenyl)-2-aminopropane **2** as a white solid. ^1H NMR (300 MHz; CDCl_3): δ 1.03 (d, 3H), 1.24 (t, 3H), 2.57 (A of an ABX syst., $J=7.2$, 13.5 Hz, 1H), 2.75 (B of an ABX syst., $J=5.4$, 13.5 Hz, 1H), 3.80–3.96 (X of an ABX syst., m, 1H), 4.10 (q, 2H), 5.14 (s, 2H), 5.16 (s, 2H), 6.67–6.88 (m, 3H), 7.28–7.47 (m, 10H). ^{13}C NMR (75 MHz; CDCl_3): δ 14.6, 20.0, 42.2, 47.7, 60.5, 71.2, 71.3, 115.0, 116.5, 122.4, 127.2, 127.3, 127.6, 127.7, 128.4, 131.3, 137.2, 137.4, 147.6, 148.6, 155.8.

(*S*)-*N*-Methyl-1-(3,4-dibenzoyloxyphenyl)-2-aminopropane hydrochloride (3**).** This reaction has been previously described.⁹ In this case, 11 g of LiAlH_4 (2.86 mmol, 3 equiv) and 6 mL of anhydrous THF were added in a

three-neck round bottom flask, previously evacuated and filled with argon (equipped with a thermometer, a dropping funnel with pressure-equalization arm, and a septum) and placed on an ice bath. A solution of carbamate **2** (0.4 g, 0.95 mmol) in 18 mL of anhydrous THF was slowly added through the dropping funnel controlling to keep the temperature below 15 °C. When the addition was done, the funnel was exchanged by a condenser and the resulting mixture was refluxed and stirred for 18 h, obtaining a grey suspension. The LiAlH₄ excess was destroyed by addition of water (drop by drop) and then of anhydrous Na₂SO₄. The resulting solid was filtered, washed with diethyl ether (2 × 25 mL) giving rise to a colorless solution. This solution was concentrated and dried under vacuum yielding an oil that was purified by column chromatography (silica gel) using dichloromethane/methanol (1500 mL, 9:1, v/v). A total of 264.1 mg (0.73 mmol, 78% yield) of colorless oil was obtained. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 1.03 (d, 3H), 2.35 (s, 3H), 2.55 (A of an AB syst., *J* = 2.4 Hz, 1H), 2.58 (B of an AB syst., *J* = 2.1 Hz, 1H), 2.64–2.75 (m, 1H), 5.15 (s, 2H), 5.18 (s, 2H), 6.70–6.90 (m, 3H), 7.28–7.49 (m, 10H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 19.5, 33.9, 42.9, 56.2, 71.1, 71.3, 115.0, 116.3, 122.0, 127.1, 127.2, 127.5, 127.6, 128.3, 132.7, 137.2, 137.3, 147.4, 148.5. Finally, HCl 3 N in anhydrous diethyl ether was added (dropwise) to the oil dissolved in 5 mL of anhydrous diethyl ether. A pale yellow solid precipitate was filtered and dried yielding (*S*)-*N*-methyl-1-(3,4-dibenzyloxyphenyl)-2-aminopropane hydrochloride (278.5 mg, 0.70 mmol, 74% yield from **2**) that was used without further characterization.

(*S*)-*N*-Methyl-1-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-aminopropane hydrochloride, (*S*)-HHMA·HCl.^{8,9} In a 10 mL round bottom flask were placed 115 mg of (*S*)-*N*-methyl-1-(3,4-dibenzyloxyphenyl)-2-aminopropane hydrochloride dissolved in 2 mL of anhydrous methanol and a catalytic amount of palladium (10 wt% on carbon powder) and the flask was capped with a septum. By means of a three-way stopcock connected to a hydrogen containing balloon, a water aspirator, and the flask, three cycles of vacuum/hydrogen filling were done. The flask was then left under hydrogen atmosphere and stirred for 4 h. After that time, the solution was filtered through Celite[®], washing the solid with previously degassed anhydrous methanol. Finally, the solution was concentrated and dried to yield 58 mg (0.26 mmol, 92% yield) of grey oil that was conserved under nitrogen atmosphere and protected from the light until its use. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 200 MHz): δ 1.01 (d, 3H), 2.34 (A of an AB syst., *J* = 12.4 Hz, 1H), 2.94 (B of an AB syst., *J* = 13.0 Hz, 1H), 3.00–3.20 (m, 1H), 3.09 (s, 3H), 6.38–6.64 (m, 3H), 8.97 (bs, 2H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 50 MHz): δ 14.9, 29.5, 37.7, 55.5, 115.8, 116.6, 119.9, 127.3, 144.1, 145.2. GC–MS (*N*-TFA, *O*-TFA derivative); *m/z* 110, 154, 343.

Synthesis of racemic *N*-methyl-1-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-aminopropane (3,4-dihydroxymethamphetamine, HHMA). Following the above-mentioned method for the enantiomerically enriched (*S*)-*N*-methyl-1-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-aminopropane hydrochloride [(*S*)-HHMA·HCl],

475 mg (2.18 mmol, 54% overall yield) of racemic *N*-methyl-1-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-aminopropane hydrochloride (HHMA·HCl) were obtained starting from 880 mg (2.76 mmol) of 3,4-dibenzyloxybenzaldehyde.

Synthesis of enantiomerically enriched (*S*)-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-aminopropane hydrochloride [(*S*)-3,4-methylenedioxyamphetamine, (*S*)-MDMA]

(*S*)-*N*-Ethoxycarbonyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-aminopropane (5**).**¹⁰ In a round bottom flask were dissolved 373 mg (0.89 mmol) of (*S*)-*N*-ethoxycarbonyl-1-(3,4-dibenzyloxyphenyl)-2-aminopropane **2** in 8 mL of methanol. A catalytic amount of Palladium 10 wt. % on carbon powder was added and hydrogenation was performed as usual. After the workup were obtained 202 mg (0.84 mmol, 95% yield) of (*S*)-*N*-ethoxycarbonyl-1-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-aminopropane **4** that was used without further purification. This crude product was dissolved in a 50 mL round bottom flask in 3 mL of anhydrous dimethylformamide. To this solution was added 100 μL (1.34 mmol, 1.6 equiv) of BrCH₂Cl and 0.44 g (1.34 mmol, 1.6 equiv) of CsCO₃ and the mixture was stirred for 2 h. After that time, the solution was filtered through a Celite[®] pad and taken to dryness under vacuum. The residue was then dissolved in 200 mL of ethyl acetate and washed with water (2 × 25 mL) and brine (25 mL). The organic layer was dried over anhydrous MgSO₄, filtered and the solvent was removed giving a solid that was dried under vacuum. This product was purified by column chromatography (silica gel) using hexane/ethyl acetate (starting with hexane and increasing ethyl acetate concentration in 5% every 100 mL, 1200 mL of total volume). Finally, 213.2 mg (0.85 mmol, 95% yield) of (*S*)-*N*-ethoxycarbonyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-aminopropane **5** were obtained. ¹H NMR (CDCl₃; 200 MHz): δ 1.07 (d, 3H), 1.19 (t, 3H), 2.55 (A of an ABX syst., *J* = 11.2, 13.4 Hz, 1H), 2.73 (B of an ABX syst., *J* = 5.8, 13.4 Hz, 1H), 3.71–3.96 (X of an ABX syst., 1H), 4.05 (q, 2H), 4.67 (bs, 1H), 5.88 (s, 2H), 6.53–6.76 (m, 3H).

(*S*)-3,4-Methylenedioxyphenyl-2-aminopropane hydrochloride. To a previously evacuated 100 mL Schlenk flask, and under argon atmosphere, containing 97 mg of LiAlH₄ (2.55 mmol, 3 equiv) in 5 mL of anhydrous THF, were dropwise added 213 mg of (*S*)-*N*-ethoxycarbonyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-aminopropane **5** in 10 mL of anhydrous THF. The mixture was refluxed with stirring for 2 h and then was cooled to room temperature and worked-up as performed for compound **3** achieving 160.4 mg (0.83 mmol, 98% yield) of the white solid (*S*)-MDMA. ¹H NMR (CDCl₃; 200 MHz): δ 1.02 (d, 3H), 1.84 (bs, 1H), 2.36 (s, 3H), 2.46–2.75 (m, 3H), 5.89 (s, 2H), 6.55–6.77 (m, 3H). This compound was then dissolved in anhydrous diethyl ether and HCl 3 N (in anhydrous diethyl ether) was dropwise added, yielding 180 mg (0.79 mmol, 94% yield) of (*S*)-3,4-methylenedioxyphenyl-2-aminopropane hydrochloride, (*S*)-MDMA·HCl, as a white solid whose optical rotation was $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 15.16$ (*c* 0.79, H₂O). GC–MS (*N*-TFA derivative); *m/z* 110, 135, 154, 162, 289.

Synthesis of enantiomerically enriched (*S*)-*N*-methyl-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-aminopropane [(*S*)-4-hydroxy-3-methoxymethamphetamine, (*S*)-HMMA]

1-(4-benzyloxy-3-methoxyphenyl)-2-nitropropene. This compound was prepared as already described for 1-(3,4-dibenzyloxyphenyl)-2-nitropropene. By reaction of 12.3 g (50 mmol) of 4-benzyloxy-3-methoxybenzaldehyde were obtained 14.22 g (47.5 mmol, 95%) of 1-(4-benzyloxy-3-methoxyphenyl)-2-nitropropene. IR (neat, ν_{\max} cm^{-1}): 1632, 1594, 1515, 1500, 1463, 1422, 1387, 1314, 1268, 1241, 1170, 1145, 1037, 998, 990, 915, 850, 815, 749, 697. ^1H NMR (300 MHz; CDCl_3): δ 2.47 (s, 3H), 3.92 (s, 3H), 5.21 (s, 2H), 6.93–7.00 (m, 3H), 7.32–7.50 (m, 10H), 8.05 (s, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz; CDCl_3): δ 14.1, 56.0, 70.8, 113.4, 113.5, 123.8, 125.2, 127.1, 128.0, 128.6, 133.7, 136.3, 145.9, 149.5, 149.8. GC–MS m/z 91, 176, 242, 267, 299.

1-(4-benzyloxy-3-methoxyphenyl)-2-propanone 6.7 A mixture of 11 g (37 mmol) of 1-(4-benzyloxy-3-methoxyphenyl)-2-nitropropene, 15 g (257 mmol, 7 equiv) of iron, 60 mg (0.37 mmol, 0.01 equiv) of FeCl_3 and 25 mL of water were placed in a 250 mL round bottom flask. The mixture was refluxed and stirred, and 6 mL of concentrated HCl were carefully added through the condenser. After 6 h, it was allowed to cool to room temperature and 100 mL of benzene were added. The resulting suspension was filtered off through a Celite[®] pad and the solids were washed with benzene (2 \times 50 mL). Then, the benzene layer was separated and washed with diluted HCl (25 mL) and water (2 \times 25 mL), dried over anhydrous MgSO_4 and filtered. The solvent was removed and the residue was dried under vacuum and purified by column chromatography (silica gel) using hexane/ethyl acetate (1:1, v/v) to give 9.5 g (35.14 mmol, 95% yield) of 1-(4-benzyloxy-3-methoxyphenyl)-2-propanone as an orange oil. IR (neat, ν_{\max} cm^{-1}): 1708, 1591, 1514, 1463, 1454, 1419, 1261, 1228, 1157, 1139, 1033, 1026, 738, 698. ^1H NMR (300 MHz; CDCl_3): δ 2.15 (s, 3H), 3.63 (s, 2H), 3.89 (s, 3H), 5.15 (s, 2H), 6.74–6.87 (m, 3H), 7.28–7.56 (m, 10H). ^{13}C NMR (75 MHz; CDCl_3): δ 29.1, 50.6, 55.9, 71.0, 112.8, 114.1, 121.5, 127.2, 127.8, 128.3, 128.5, 137.1, 147.2, 149.7, 206.8. GC–MS m/z : 43, 91, 137, 227, 270.

***N*-(*S*)-(1-phenylethane)-(*R,S*)-1-(4-benzyloxy-3-methoxyphenyl)-2-aminopropane (7).**¹¹ In a 500 mL round bottom flask was dissolved 5.2 g (19.2 mmol) of 1-(4-benzyloxy-3-methoxyphenyl)-2-propanone in 50 mL of methanol and 10.1 mL (76.9 mmol, 4 equiv) of 1-(*S*)-phenylethanamine. To this solution were also added 1.3 g (21.1 mmol, 1.1 equiv) of NaBH_3CN in 2 mL of diethyl ether/HCl. The resulting orange mixture was stirred at room temperature for 28 h, and after that time, concentrated HCl was added dropwise until pH < 2 was achieved and the solution was then concentrated to dryness. The resulting mixture was dissolved with water (150 mL) and ethyl acetate (250 mL) and the organic layer was decanted. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate (2 \times 250 mL) and the combined organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated to give 6.74 g of a dark orange oil which was redissolved

in 200 mL of CH_2Cl_2 and treated with 3N NaOH aqueous solution until pH > 12, decanted and extracted with CH_2Cl_2 (2 \times 50 mL). The combined organic layer was washed with water (2 \times 25 mL) and brine (25 mL). Drying with MgSO_4 and concentration produced 4.25 g (11.32 mmol, 59% yield) of *N*-(*S*)-(1-phenylethane)-(*R,S*)-1-(4-benzyloxy-3-methoxyphenyl)-2-aminopropane as a yellow oil. Attempts to separate the two diastereomers were not successful at this point. ^1H NMR (CDCl_3 ; 300 MHz): δ 0.95 (d, 3H, maj), 1.08 (d, 3H, min), 1.28 (d, 3H, min), 1.33 (d, 3H, maj), 2.29 (bs, 1H), 2.40–2.86 (m, 3H), 3.80 (s, 3H, min), 3.83 (s, 3H, maj), 3.84–3.97 (m, 1H), 5.13 (s, 2H, maj), 5.18 (s, 2H, min), 6.57–6.97 (m, 3H), 7.16–7.52 (m, 10H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 19.8, 21.0, 24.3, 24.7, 41.9, 43.5, 50.7, 52.0, 54.7, 55.3, 55.7, 55.8, 71.0, 104.8, 112.5, 112.9, 113.9, 114.0, 121.1, 121.2, 126.2, 126.5, 126.6, 126.8, 127.1, 127.2, 127.3, 127.6, 127.7, 128.2, 128.4, 132.2, 132.7, 137.2, 145.1, 145.7, 146.3, 146.4, 149.3, 149.5. GC–MS m/z 91, 105, 148, 228, 270, 360, 376.

***N*-methyl-*N*-(*S*)-(1-phenylethane)-(*S,S*)-1-(4-benzyloxy-3-methoxyphenyl)-2-aminopropane (8).** 2.26 g (6.03 mmol) of *N*-(*S*)-(1-phenylethane)-(*R,S*)-1-(4-benzyloxy-3-methoxyphenyl)-2-aminopropane were dissolved in 50 mL of CH_2Cl_2 in a round bottom flask. To this solution 1.9 g (18 mmol, 3 equiv) of Na_2CO_3 and 760 μL (12.05 mmol, 2 equiv) of CH_3I were also added. After 16 h of stirring at room temperature, another 760 μL of CH_3I were added and mixture was then stirred for 48 h. The resulting solution was washed with water (2 \times 25 mL) and brine (25 mL), dried with MgSO_4 and concentrated to give 2.22 g (0.60 mmol, 94% yield) of a yellow solid consisting in a 6:4 diastereomeric mixture of *N*-(*S*)-(1-phenylethane)-(*S,S*)-1-(4-benzyloxy-3-methoxyphenyl)-2-aminopropane and *N*-(*S*)-(1-phenylethane)-(*R,S*)-1-(4-benzyloxy-3-methoxyphenyl)-2-aminopropane. Silica gel column chromatography purification of this diastereomeric mixture, eluting with hexane/ethyl acetate (1:1, v/v) resulted in the obtention of different diastereomeric ratio mixtures depending on the column fractions collected, observing that the minor component of the crude mixture was the first one in eluting from the column. Four different fractions were obtained: fraction 1 (256 mg) contained a 30:70 (*S,S*)/(*R,S*) diastereoisomers ratio (determined by 300 MHz ^1H NMR) [$[\alpha]_D^{20}$ –93.13 (*c* 0.99, chloroform), fraction 2 [991 mg, 50:50 (*S,S*)/(*R,S*) ratio], fraction 3 (404 mg, 80:20 (*S,S*)/(*R,S*) ratio), and fraction 4 (390 mg, 92:8 (*S,S*)/(*R,S*) ratio [$[\alpha]_D^{20}$ + 77.36 (*c* 0.98, chloroform)]. IR (neat, ν_{\max} cm^{-1}): 3060, 3029, 2967, 2933, 2869, 2848, 2748, 1588, 1513, 1492, 1463, 1451, 1417, 1368, 1262, 1224, 1156, 1139, 1025, 734, 699. ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ Major isomer: 0.92 (d, 3H), 1.35 (d, 3H), 2.28 (A of an ABX syst., 1H containing a s, 3H), 2.91 (B of an ABX syst., *J* = 4.5, 12.9 Hz, 1H), 2.97–3.11 (X of an ABX syst., 1H), 3.71 (q, 1H), 3.79 (s, 3H), 5.12 (s, 2H), 6.48–6.80 (m, 3H), 7.15–7.50 (m, 10H). Minor isomer: 0.87 (d, 3H), 1.33 (d, 3H), 2.28 (s, 3H), 2.38 (A of an ABX syst., *J* = 8.4, 13.2 Hz, 1H), 2.76 (B of an ABX syst., *J* = 5.7, 13.2 Hz, 1H), 2.85–2.97 (X of an ABX syst., 1H), 3.62 (q, 1H), 3.80 (s, 3H), 5.15 (s, 2H), 6.48–6.80 (m, 3H), 7.15–7.50 (m, 10H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ Major isomer:

15.7, 22.0, 32.3, 37.0, 55.7, 55.8, 62.2, 71.0, 112.5, 113.8, 120.9, 126.6, 127.1, 127.2, 127.6, 128.3, 128.4, 134.3, 137.3, 146.0, 146.3, 149.2. Minor isomer: 12.5, 22.1, 31.7, 40.6, 55.7, 56.0, 62.0, 71.1, 112.8, 113.7, 121.0, 126.4, 126.7, 127.2, 127.6, 128.1, 128.2, 128.4, 134.2, 137.4, 146.1, 146.1, 149.1. GC–MS m/z 91, 107, 136, 227, 262.

***N*-methyl-*N*-(*S*)-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1-methylpropanamine hydrochloride, (*S*)-HMMA-HCl.** In a pressure resistant glass reactor, were dissolved 150 mg (0.38 mmol) of *N*-methyl-*N*-(*S*)-(1-phenylethane)-(*S*)-1-(4-benzyloxy-3-methoxyphenyl)-2-aminopropane **8** [(*S,S*)/(*R,S*) 80:20 ratio] in diethyl ether and treated with a solution of HCl/diethyl ether. The white solid that precipitated was taken to dryness and redissolved in 8 mL of previously degassed methanol, and to this solution was added a catalytic amount of Pd/C. Hydrogenation was performed at 3 bar pressure with continuous stirring at room temperature for 24 h. After filtration through Celite[®] of the residue and concentration were obtained 82 mg (0.35 mmol, 92%) of *N*-methyl-*N*-(*S*)-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1-methylpropanamine hydrochloride as a white solid. ¹H NMR (CD₃OD; 300 MHz): δ 1.41 (d, 3H), 2.87 (A of an ABX syst., 1H containing a s, 3H), 3.21 (B of an ABX syst., *J* = 4.1, 13.4 Hz, 1H), 3.53–3.70 (X of an ABX syst., 1H), 4.03 (s, 3H), 5.10 (bs, 4H), 6.81–7.09 (m, 3H). ¹³C NMR (CD₃OD, 75 MHz): δ 15.8, 31.0, 39.9, 56.4, 57.9, 113.8, 116.4, 122.9, 128.1, 146.9, 149.2. GC–MS (*N*-TFA, *O*-TFA derivative); m/z 110, 154, 260, 387.

Synthesis of *N*-1-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-aminopropane hydrochloride (3,4-dimethoxymethamphetamine hydrochloride, MMMA-HCl) and enantiomerically enriched (*S*)-*N*-1-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-aminopropane hydrochloride [(*S*)-3,4-dimethoxymethamphetamine hydrochloride, (*S*)-MMMA-HCl]

General procedure. To an Erlenmeyer flask containing the corresponding substrate dissolved in methanol was slowly added an excess of an ethereal solution of CH₂N₂ and the resulting solution was left to stand overnight. Then, the excess of reagent was evaporated by passing a stream of argon, the solvent removed on a rotaeva-

porator and the resulting residue dried under vacuum yielding a solid in almost quantitative yield. ¹H NMR (CD₃OD; 300 MHz): δ 1.96 (d, 3H), 2.53 (s, 3H), 2.60–2.73 (m, 1H), 2.85–3.01 (m, 2H), 3.85 (bs, 2H), 3.90 (s, 6H), 6.87–7.08 (m, 3H). ¹³C NMR (CD₃OD, 75 MHz): δ 19.0, 33.6, 43.4, 56.4, 56.5, 57.7, 113.1, 114.1, 122.6, 133.2, 149.1, 150.5. In all cases, GC–MS (*N*-TFA derivative); m/z 110, 151, 178, 305.

Acknowledgements

This investigation was supported by: FIS 98/0181, CIRIT 95-SGR-00432, CIRIT 99-SGR-00187, ISC-III 98/4344, and PNSD (Spain). We thank Marta Pulido for editorial assistance.

References and Notes

- Green, A. R.; Goodwin, G. M. *Br. Med. J.* **1996**, *312*, 1493.
- Johnson, M.; Letter, A. A.; Merchant, K.; Hanson, G. R.; Gibb, J. W. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1988**, *244*, 977.
- Pizarro, N.; Ortuño, J.; Farré, M.; Hernández-López, C.; M. A. Pujades, M. A.; Llebaria, A.; Joglar, J.; Roset, P. N.; Mas, M.; Segura, J.; Cami, J.; de la Torre, R. *J. Anal. Toxicol.* (in press).
- (a) Effenberger, F.; Jäger, J. *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 1370. (b) Nichols, D. E.; Hoffman, A. J.; Oberlender, R. A.; Jacob, P.; Shulgin, A. T., III. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 2009.
- Pratesi, P.; La Manna, A.; Grana, E. *Farmaco, Ed. Sci.* **1964**, *19*, 529.
- Nichols, D. E.; Barfknecht, C. F.; Rusterholz, D. B. *J. Med. Chem.* **1973**, *16*, 480.
- (a) Lim, H. K.; Foltz, R. L. *Chem. Res. Toxicol.* **1988**, *1*, 370. (b) Morgan, P. H.; Beckett, A. H. *Tetrahedron* **1975**, *31*, 2595.
- Glennon, R. A.; Liebowitz, S. M.; Leming-Doot, D. *J. Med. Chem.* **1980**, *23*, 990.
- Yousif, M.; Fitzgerald, R. L.; Narasimhachari, N.; Rosecrans, J. A.; Blanke, R. V.; Glennon, R. A. *Drug Alcohol Depend.* **1990**, *26*, 127.
- Zelle, R. E.; McClellan, W. J. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 2461.
- Borch, R. F.; Berstein, M. D.; Durst, H. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2897.

Pizarro N; Ortuño J; Farré M; Hernández-López C; Pujadas M; Llebaria A; Joglar J; Roset PN; Mas M; Segura J; Camí J; de la Torre R

Determination of MDMA and its metabolites in blood and urine by gas chromatography-mass spectrometry and analysis of enantiomers by capillary electrophoresis.

Journal of analytical toxicology 2002 Apr; 26 (3), pp. 157-65.

Reproduced from the *Journal of Analytical Toxicology* by permission of Preston Publications – a Division of Preston Industries, Inc.

Determination of MDMA and its Metabolites in Blood and Urine by Gas Chromatography–Mass Spectrometry and Analysis of Enantiomers by Capillary Electrophoresis

Nieves Pizarro¹, Jordi Ortuño¹, Magí Farré^{1,2}, Cándido Hernández-López¹, Mitona Pujadas¹, Amadeu Llebaria³, Jesús Joglar³, Pere N. Roset¹, Marta Mas¹, Jordi Segura^{1,4}, Jordi Camí^{1,4}, and Rafael de la Torre^{1,2,4,*}

¹Pharmacology Research Unit, Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM); ²Universitat Autònoma and ⁴Universitat Pompeu Fabra; and ³Department of Biological Organic Chemistry, Institut de Investigacions Químiques i Ambientals, E-08003 Barcelona, Spain

Abstract

A gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) method was used for the simultaneous quantitation of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) and the 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA), 4-hydroxy-3-methoxymethamphetamine (HMMA), and 4-hydroxy-3-methoxyamphetamine (HMA) metabolites in plasma and urine samples after the administration of 100 mg MDMA to healthy volunteers. Samples were hydrolyzed prior to a solid-phase extraction with Bond Elut Certify[®] columns. Analytes were eluted with ethyl acetate (2% ammonium hydroxide) and analyzed as their trifluoroacetyl derivatives. Linear calibration curves were obtained at plasma and urine concentration ranges of 25–400 ng/mL and 250–2000 ng/mL for MDMA and HMMA, and of 2.5–40 ng/mL and 100–1000 ng/mL for MDA and HMA. Following the same urine preparation procedure but without the derivatization step, a capillary electrophoresis (CE) method for enantiomeric resolution of compounds was developed using (2-hydroxy)propyl- β -cyclodextrin at two different concentrations (10 and 50 mM in 50 mM H₃PO₄, pH 2.5) as chiral selector. Calibration curves for the CE method were prepared with the corresponding racemic mixture and were linear between 125 and 2000 ng/mL, 50 and 1000 ng/mL, and 125 and 1500 ng/mL for each enantiomer of MDMA, MDA, and HMMA, respectively. Stereoselective disposition of MDMA and MDA was confirmed. HMMA disposition seems to be in apparent contradiction with MDMA findings as the enantiomer ratio is close to 1 and constant over the time.

Introduction

3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDMA, “ecstasy”) is an amphetamine derivative widely used as a recreational drug among youth. It has been involved in an increasing number of acute intoxications, some of which have resulted in death (1–4). Deleterious long-term effects of the drug seem to be associated with progressive neurodegeneration of the serotonergic system (5).

In relation to the metabolism of MDMA, its main metabolites include 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA), 4-hydroxy-3-methoxymethamphetamine (HMMA), and 4-hydroxy-3-methoxyamphetamine (HMA), with 3,4-dihydroxyamphetamine (HHA) and 3,4-dihydroxymethamphetamine (HHMA) as metabolic intermediates. The pharmacological effects of MDMA in humans have been evaluated in a limited number of studies with single-dose protocols. Verebey et al. (6) tested 50 mg of MDMA in one volunteer and quantitated MDMA and MDA in plasma and urine samples. Helmlin et al. (7) studied two patients given 1.5 mg/kg of MDMA and quantitated HMMA and HMA in urine. MDMA and vasopressin hormone were studied by Henry et al. (8) in eight volunteers who received 40 mg of MDMA. In a previous study by our group (9), pharmacokinetics and cardiovascular and neuroendocrine effects of MDMA and MDA at doses of 75 and 125 mg were assessed. We recently reported quantitation of HMMA and HMA in plasma samples of healthy volunteers treated with 100 mg MDMA (10).

MDMA is a chiral compound used in its racemic form (*R,S*-MDMA), the (*S*)-MDMA enantiomer being the most psychoactive (11). In animal models (12,13), MDMA showed a stereoselective disposition resulting in *R/S* MDMA and HMMA ratios > 1 and *R/S* MDA and HMA ratios < 1, except in mice that excreted similar amounts of enantiomers. Enantioselective

* Author to whom correspondence should be addressed. Rafael de la Torre, Pharmacology Research Unit, Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM), Doctor Aiguader 80, E-08003 Barcelona, Spain. E-mail: rtorre@imim.es.

metabolism in humans has also been reported. Urinary results from MDMA intoxications (14,15) seem to confirm findings in animal models. Lanz et al. (16) analyzed urine samples of two subjects who received 1.5 mg/kg of racemic MDMA and found the following: most MDMA was excreted unchanged, *R/S* ratios increased progressively over time, and (*R*)-MDMA was practically the only compound detected at 72 h after drug administration. On the other hand, MDA showed an inversion in its ratio in both volunteers and HMMA results reflected large interindividual differences (no enantiomeric identification could be done for either MDA or HMMA). Hensley et al. (17) reported that *R/S* MDA ratio crossed between approximately 24–36 h after dosing, and Fallon et al. (18) simultaneously performed a very comprehensive MDMA and MDA enantiomeric study in plasma and urine samples reporting pharmacokinetic parameters and urinary recovery data.

We report a validated method for the simultaneous analysis of MDMA and its main metabolites in plasma and urine by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) and a validated capillary electrophoresis (CE) method for the analysis of enantiomers of MDMA, MDA, and HMMA in urine. These methods were applied for the determination of MDMA and its main metabolites in biological fluids from clinical studies in healthy volunteers. To our knowledge, HMMA enantiomeric ratios are presented here for the first time and their possible metabolic implications are discussed.

Methods

Materials and reagents

MDMA, MDA, HMMA, HMA, and the internal standards MDMA-*d*₅, MDA-*d*₅, and codeine were purchased from Lipomed (Arlesheim, Switzerland). Enantiomerically enriched standards for (*S*)-MDMA and (*S*)-HMMA were synthesized in our laboratory (19). 3,4-Methylenedioxypropylamphetamine (MDPA) (internal standard, I.S.) was supplied by Alltech-Applied Sciences (State College, PA). Pholedrine (4-hydroxymethamphetamine) (I.S.) was generously given by Deutsche Sporthochschule (Biochemistry Department, Cologne, Germany).

N-Methyl-bis(trifluoroacetamide) (MBTFA) (GC grade) was purchased from Macherey-Nagel (Düren, Germany). Acetic acid (glacial), ethyl acetate, ortho-phosphoric acid, ammonia solution, sodium acetate trihydrate, disodium hydrogen phosphate anhydrous, sodium hydrogen phosphate monohydrate (reagent grade), and methanol (high-performance liquid chromatographic [HPLC] grade) were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). β -Glucuronidase from *Helix pomatia* (HP-2) was supplied from Sigma (St. Louis, MO). (100,000 and 7500 units per milliliter for β -glucuronidase and sulfatase activities, respectively). α -Cyclodextrin was obtained from Merck and β -cyclodextrin, γ -cyclodextrin, (2-hydroxy)propyl- β -cyclodextrin (2-OHP- β -CD), and heptakis(2,6-di-O-methyl)- β -cyclodextrin were purchased from Hewlett-Packard (Palo Alto, CA). Ultra pure water was obtained using Milli-Q purification system (Millipore, Molsheim, France). Bond Elut Certify® solid-phase extraction columns were obtained from Varian Sample Prepa-

ration Products (Harbor City, CA). The extraction was performed on a Vac-Elut vacuum manifold (Supelco, Bellefonte, PA). Drug-free urine was a drug urine bulk supplied from Bio-Rad Laboratories, S.A. (Barcelona, Spain). Drug-free plasma was obtained from Hospital del Mar blood bank (Barcelona, Spain).

Clinical studies

Biological samples were obtained from six male healthy volunteers who were recreational users of MDMA. All participants gave the written informed consent and the study was approved by the institutional review board and authorized by the Spanish Ministry of Health (AEM no. 98/112). MDMA was obtained from the Spanish Ministry of Health, and MDMA soft gelatin pills were prepared and supplied by the Department of Pharmacy of Hospital del Mar. Participants were phenotyped with dextromethorphan for CYP2D6 enzyme activity, and all were categorized as extensive metabolizers (20). The study protocol included urine drug testing for amphetamines and synthetic drugs as well as other drugs of abuse (cocaine, cannabinoids) before participation in every experimental session. Individuals testing positive were excluded from the study. Blood samples were obtained through a catheter inserted in a peripheral vein before drug administration (baseline) and at 0, 15, 30, 45, 60, 75, and 90 min and at 2, 3, 4, 6, 8, 10, and 24 h after the administration of the drug. The heparinized blood was centrifuged at $1100 \times g$ for 10 min, and plasma was transferred to polypropylene tubes and stored at -20°C until analysis. Urine samples were collected before and after drug administration at 0–2, 2–4, 6–8, 8–10, and 10–24 h time periods and stored at -20°C until analysis.

Instrumentation

A GC (HP 6890 series GC system, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA) equipped with a quadrupole MS (HP 5973 mass selective detector) and autosampler (7683 series injector) was used for MDMA, MDA, HMMA, and HMA analysis using MDMA-*d*₅ as MDMA I.S., MDA-*d*₅ as MDA I.S., and pholedrine as both HMMA and HMA I.S. Separation was performed using a cross-linked 5% phenylmethylsiloxane capillary column (12 m \times 0.2-mm i.d., 0.3- μm film thickness) (HP, Ultra-2). Helium was used as carrier gas at a flow rate of 1.2 mL/min. The oven was maintained at 70°C over 2 min, and then four consecutive rates

Table 1. MDMA and its Metabolites Selected Ions for GC–MS Identification and Quantitation

Compound	Derivative	<i>m/z</i> *
MDMA	N-TFA	154, 162, 289
MDA	N-TFA	135, 162, 275
HMMA	N-TFA, O-TFA	110, 154, 260
HMA	N-TFA, O-TFA	140, 163, 260
MDMA- <i>d</i> ₅	N-TFA	158, 164, 294
MDA- <i>d</i> ₅	N-TFA	136, 167, 280
Pholedrine	N-TFA, O-TFA	110, 154, 230

* Ions selected for quantitation in bold face.

were programmed as follows: first, from 70°C to 160°C at 30°C/min; second, from 160°C to 170°C at 5°C/min; third, from 170°C to 200°C at 15°C/min; and fourth, from 200°C to 280°C at 30°C/min with a total run time of 11.67 min. Samples were injected in the splitless mode. Insert liners packed with silanized glasswool were used. Injector and interface were set at 280°C.

The MS was operated by electron ionization (70 eV) and in the selected ion monitoring (SIM) acquisition mode. Three ions were selected for each substance and the cleanest ion trace was used for quantitation (Table I). Ions selected for quantitation were used consistently from sample to sample. Ion ratios of selected ions for the quantitation of each substance and the internal standard were always used.

The CE system (³DCE, Hewlett-Packard) used for the enan-

tiomeric study of MDMA, MDA, and HMMA was equipped with a diode-array detector. MDPA was used as I.S. for both MDMA and MDA and codeine as the HMMA I.S. Separation was performed in an untreated fused-silica capillary of 48.5-cm total length (40-cm effective length) and a standard 50- μ m optical path length cell. A constant voltage of 30 kV was applied and the cartridge temperature was maintained at 15°C. The diode-array detector was set to monitor the signal at 204 nm. Two different concentrations of (2-hydroxy)propyl- β -cyclodextrin in 50mM H₃PO₄ at pH 2.5 as running buffer were selected for the chiral separation of analytes. MDMA and MDA enantiomers were separated at a concentration 10mM of cyclodextrin, whereas HMMA enantiomers were separated at 50mM. Preconditioning conditions before each experiment included 50mM H₃PO₄ for 1 min (when chiral selector concentration was 10mM) or 1.5 min (when its concentration was 50mM) and running buffer for 1 min. Injection of the sample was done by applying 50 mbar of external pressure for 2 s. Buffer solutions were freshly prepared on each experimental day.

Synthetic procedure for enantiomerically enriched standards

Preparation of enantiomerically enriched standards has been already reported (19). Briefly, (S)-MDMA was obtained from enantiomerically enriched 3-(3,4-dibenzoyloxyphenyl)-2-propanamine that was synthesized from commercially available 3,4-dibenzoyloxybenzaldehyde after a resolution with dibenzoyl(-)-tartaric acid. (S)-HMMA was obtained by an asymmetric synthesis from commercially available 4-benzoyloxy-3-methoxybenzaldehyde and (S)-(+)- α -methylbenzylamine.

Preparation of standards

One milligram per milliliter solutions of racemic MDMA, MDA, HMMA, HMA, MDMA-d₅, MDA-d₅, and pholedrine were prepared by dissolving 10 mg of each substance in 10 mL methanol. Working solutions of 10 and 100 μ g/mL of each compound were prepared by dilution of the corresponding 1 mg/mL solution.

For GC-MS analysis, a mixture of MDMA-d₅ (200 ng/mL for plasma or 500 ng/mL for urine), MDA-d₅ (20 ng/mL for plasma or 250 ng/mL for urine), and pholedrine (200 ng/mL for plasma or 250 ng/mL for urine) was prepared as I.S. working mixture from stock solutions. For the CE analysis, a mixture of MDPA (100 μ g/mL) and codeine (75 μ g/mL) was prepared as I.S. from stock solutions of 1 mg/mL and 100 μ g/mL, respectively.

Calibration and sample preparation quality control

Calibration curves were prepared for each analytical batch. Appropriate volumes of working solutions were added to test tubes containing 1 mL of drug-free plasma or urine and vortexed vigorously. In the GC-MS method, final concentrations of MDMA and HMMA were 25, 100, 200, 300, and 400 ng/mL for the analysis of plasma samples and 250, 500, 750, 1000, and 2000 ng/mL for the analysis of urine samples. Final concentrations of MDA and HMA were 2.5, 10, 20, 30, and 40 ng/mL for the analysis of plasma samples and 100, 250, 500, 750, and 1000 ng/mL for that of urine samples. In the CE method, final concentrations were 250, 1000, 2000, 3000, and 4000 ng/mL of

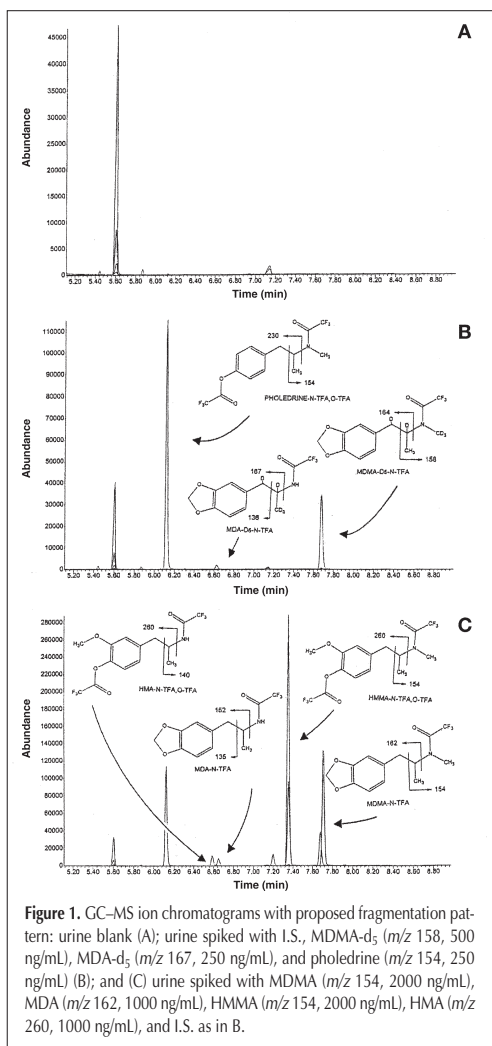


Figure 1. GC-MS ion chromatograms with proposed fragmentation pattern: urine blank (A); urine spiked with I.S., MDMA-d₅ (*m/z* 158, 500 ng/mL), MDA-d₅ (*m/z* 167, 250 ng/mL), and pholedrine (*m/z* 154, 250 ng/mL) (B); and (C) urine spiked with MDMA (*m/z* 154, 2000 ng/mL), MDA (*m/z* 162, 1000 ng/mL), HMMA (*m/z* 154, 2000 ng/mL), HMA (*m/z* 260, 1000 ng/mL), and I.S. as in B.

racemic MDMA; 100, 500, 1000, 1500, and 2000 ng/mL of racemic MDA; and 250, 750, 1500, 2000, and 3000 ng/mL of racemic HMMA.

Control plasma samples containing appropriate analytes at three different concentrations were prepared in drug-free plasma or drug-free urine and were kept frozen at -20°C in 1-mL aliquots. In the analysis of plasma samples by GC-MS, low control concentrations were 50 ng/mL for MDMA and HMMA and 4 ng/mL for MDA and HMA; medium control concentrations were 125 ng/mL for MDMA and HMMA and 12.5 ng/mL for MDA and HMA; and high control concentrations were 300 ng/mL for MDMA, 325 ng/mL for HMMA, 32.5 ng/mL for MDA, and 30 ng/mL for HMA. In the analysis of urine samples by GC-MS, control concentrations were 300, 800, and 1500 ng/mL for MDMA and MDA and 200, 600, and 900 ng/mL for HMMA

and HMA (low, medium, and high controls, respectively). In the analysis of urine samples by CE, concentrations of racemic forms were as follows: low control concentrations were 300 ng/mL for MDMA and HMMA and 200 ng/mL for MDA; medium control concentrations were 1600 ng/mL for MDMA, 800 ng/mL for MDA, and 1200 ng/mL for HMMA; and high control concentrations were 3400 ng/mL for MDMA, 1700 ng/mL for MDA, and 2500 ng/mL for HMMA.

Hydrolysis procedure

One milliliter of plasma or 100 μL of urine mixed with 900 μL of drug-free urine were required for analysis. The pH of the sample was adjusted to 5 by adding 1 mL of 1.1M acetate buffer (pH 5.2). About 5000 Fishman units of β -glucuronidase (50 μL) were added to each sample and incubation was performed in a shaking water bath for 16 h at 37°C .

Extraction and derivatization

Samples analyzed by GC-MS were processed according to a previously reported method (21). Briefly, samples were submitted to a solid-liquid extraction procedure using Bond Elut Certify columns. Elution was done with 2 mL of ethyl acetate (2% of ammonium hydroxide). Trifluoroacetyl derivatives were formed by reaction with MBTFA as derivatization agent. When analysis was performed with CE, the same extraction procedure was followed, but the derivatization step was omitted. Residues were reconstituted with 50 μL of 50mM H_3PO_4 buffer at pH 2.5.

Results and Discussion

The determination of MDMA and its main metabolites in plasma and urine by GC-MS and in urine by CE have been validated. Representative chromatograms of the GC-MS method are presented in Figure 1 and electropherograms for CE in Figure 2. Regarding methods validation, the following results were obtained.

Validation results

Calibration curves for the GC-MS methods were linear over 25–400 ng/mL (plasma) and over 250–2000 ng/mL (urine) concentration ranges for MDMA and HMMA. For MDA and HMA linearity was tested in the following concentration ranges: 2.5–40 ng/mL (plasma) and 100–1000 ng/mL (urine). Calibration curves for the CE method were prepared with the corresponding racemic mixture and were linear between 125 and 2000 ng/mL, 50 and 1000 ng/mL, and 125 and 1500 ng/mL for each enantiomer of MDMA, MDA, and HMMA, respectively.

Peak-area ratios between compounds and I.S. were used for calculations. A weighted (1/concentration) least-square regression analysis was used (SPSS for Windows, version 7.0). Mean determination coefficients ($n = 4$) by GC-MS method from the analysis of plasma were 0.998 ± 0.001 for MDMA, 0.996 ± 0.001 for MDA, 0.994 ± 0.002 for HMMA, and 0.996 ± 0.003 for HMA; the corresponding values from the analysis of urine were 0.996 ± 0.001 , 0.991 ± 0.004 , 0.993 ± 0.005 , and 0.986 ± 0.006 , respectively. Mean determination coefficients

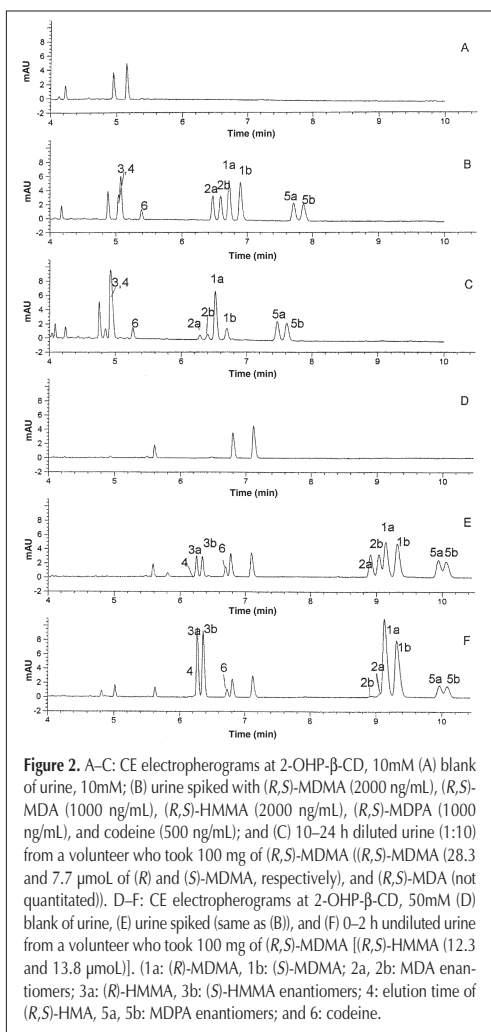


Figure 2. A–C: CE electropherograms at 2-OHP- β -CD, 10mM (A) blank of urine, 10mM; (B) urine spiked with (R,S)-MDMA (2000 ng/mL), (R,S)-MDA (1000 ng/mL), (R,S)-HMMA (2000 ng/mL), (R,S)-MDPA (1000 ng/mL), and codeine (500 ng/mL); and (C) 10–24 h diluted urine (1:10) from a volunteer who took 100 mg of (R,S)-MDMA [(R,S)-MDMA (28.3 and 7.7 μmol of (R) and (S)-MDMA, respectively), and (R,S)-MDA (not quantitated)]. D–F: CE electropherograms at 2-OHP- β -CD, 50mM (D) blank of urine, (E) urine spiked (same as (B)), and (F) 0–2 h undiluted urine from a volunteer who took 100 mg of (R,S)-MDMA [(R,S)-HMMA (12.3 and 13.8 μmol)]. (1a: (R)-MDMA, 1b: (S)-MDMA; 2a, 2b: MDA enantiomers; 3a: (R)-HMMA, 3b: (S)-HMMA enantiomers; 4: elution time of (R,S)-HMA, 5a, 5b: MDPa enantiomers; and 6: codeine.

($n = 4$) by the CE method were 0.998 ± 0.001 for (*R*)-MDMA, 0.999 ± 0.001 for (*S*)-MDMA, 0.997 ± 0.001 for (1)-MDA, 0.997 ± 0.001 for (2)-MDA, 0.992 ± 0.009 for (*R*)-HMMA, and 0.992 ± 0.001 for (*S*)-HMMA. MDA enantiomers were identified following their elution order and were named (1)-MDA and (2)-

MDA, respectively.

Four replicate analyses were performed with plasma or urine samples corresponding to the first level of concentrations of the calibration curves, and 3 and 10 standard deviations (SD) of the calculated concentrations at this calibration level were used for estimating the limits of detection and quantitation, respectively. Precision was calculated as the relative standard deviation (RSD) of the quality control samples concentrations. Accuracy is expressed as the relative error of the calculated concentrations. Limits of detection and quantitation as well as precision and accuracy results are listed in Table II.

	Detection limit (ng/mL)	Quantitation limit (ng/mL)	Within-run		Between-run	
			Precision	Accuracy	Precision	Accuracy
			(RSD, %)*	(%)	(RSD, %)*	(relative error, %)
GC-MS, plasma						
MDMA	5.7	19.1	4.4	2.5	3.3	5.2
MDA	0.4	1.5	3.4	1.4	6.7	9.0
HMMA	3.0	9.9	5.0	6.16	3.85	9.7
HMA	0.1	0.4	10.1	12.0	11.1	10.4
GC-MS, urine						
MDMA	37.5	113.6			7.6	10.5
MDA	16.4	49.7			12.8	18.8
HMMA	47.0	142.5			11.3	12.0
HMA	23.1	69.9			10.5	8.3
CE method						
(<i>R</i>)-MDMA	33	99	8.4	8.7	5.1	7.4
(<i>S</i>)-MDMA	13	41	6.2	7.1	4.6	6.0
(1)-MDA	14	43	6.57	11.2	6.1	6.6
(2)-MDA	11	35	4.6	9.2	4.9	5.1
(<i>R</i>)-HMMA	16	48	15.9	17.9	11.8	10.9
(<i>S</i>)-HMMA	12	37	15.3	17.3	10.6	10.1

* RSD: relative standard deviation of the quality control samples concentrations.

CE method development

Several cyclodextrins were assayed in the CE method development: α -cyclodextrin, γ -cyclodextrin, 2-OHP- β -CD, and heptakis(2,6-di-O-methyl)- β -cyclodextrin (at 5, 10, 25, and 50mM concentrations) and β -cyclodextrin (at 5, 10, and 15mM concentrations) (data not shown). A good separation of MDMA and MDA enantiomers was obtained with 2-OHP- β -CD at 10mM concentration, using racemic MDPA as I.S. (Figure 2). Each enantiomer of the two analytes was quantitated with the corresponding enantiomer of MDPA (according to the elution order). Enantiomeric separation of HMMA was performed at 50mM concentration of 2-OHP- β -CD. Codeine was used as I.S. for the two HMMA enantiomers (Figure 2). Attempts to use an alternative chiral I.S. for HMMA were unsuccessful. HMA enantiomers were not separated at the two final concentrations of 2-OHP- β -CD, and given that HMA is a minor metabolite of MDMA, other analyses were not performed.

MDMA and its main metabolites in plasma

Time-course of plasma concentrations of MDMA, MDA, HMMA, and HMA are shown in Figure 3. Experimental (C_{max} , t_{max} , and AUC_{0-24h}) and calculated pharmacokinetic parameters (using PKCALC computer program) (22) are also depicted (Table III). Other pharmacokinetic data have already been described in previous studies (10,23). MDA and HMA represented approximately 8% and 5% of MDMA concentrations, respectively (AUC comparisons), as it has already been reported in previous studies (10,23). Although HMMA concentrations were close to the detection limit when the free form was analyzed (10,23), AUC_{0-24h} was even a 5% higher than the corresponding to MDMA after hydrolysis of HMMA. Conjugated HMMA is then the major MDMA metabolite.

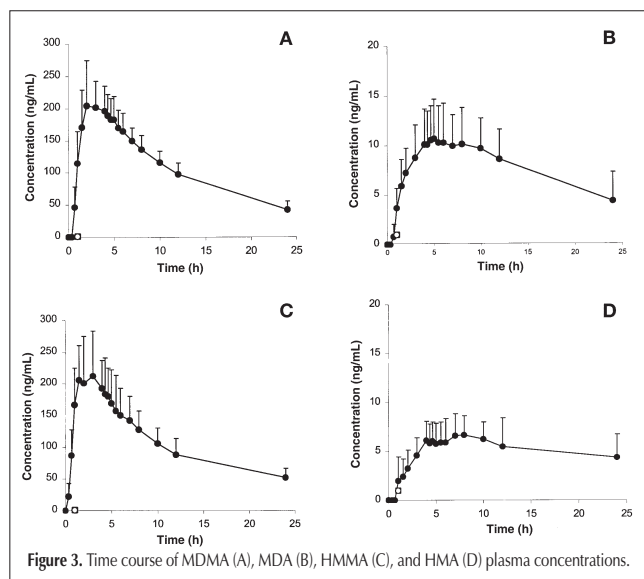


Figure 3. Time course of MDMA (A), MDA (B), HMMA (C), and HMA (D) plasma concentrations.

MDMA and its main metabolites in urine

GC-MS results. A total of 44.7% of the dose was recovered at 24 h in urine as MDMA, MDA, HMMA, and HMA (Table IV). MDMA and MDA urine results were in accordance with those previously published (18,23). MDA represented approximately 7.4% of the dose recovered as MDMA in 24 h urine (μmol recovered comparison) a similar figure was observed in plasma. The MDMA *N*-demethylation pathway to MDA (1.8% of dose recovered in urine) is much less relevant than for methamphetamine (24) where a $10.6 \pm 3.7\%$ of methamphetamine dose is recovered in 48 h urine as amphetamine. In the case of 3,4-methylenedioxyethylamphetamine (MDEA) (25), 2.8% of the dose was recovered as the *N*-deethylated metabolite in 32 h urine being similar the amounts of the parent compound recovered (21% dose of MDMA and 19% dose of MDEA). 4-Hydroxy-3-methoxyethylamphetamine (HMEA) represented 31.6% of dose, while 17.1% of MDMA dose was recovered as HMMA. These findings confirm that *O*-demethylation is favored compared with *N*-demethylation when the methylene-

dioxy group is present in the chemical structure and that such *O*-demethylation seems to be more extensive when the substituted secondary amine contains a larger alkyl group.

Urinary recoveries of HMMA and HMA in comparison with that of MDMA were somewhat lower and somewhat higher, respectively, than those expected according to plasma AUC comparisons (71.7% in urine versus 105% in plasma for HMMA and 7.8% vs. 5.3% for HMA, respectively) (Tables III and IV). These results are in agreement with previous observations (23) and seem to point towards a further *N*-demethylation of HMMA to HMA.

CE results. MDMA and HMMA enantiomers were the only ones quantitated in urine. MDA enantiomeric profile was determined in one volunteer with the aim of confirming results previously reported by others (16–18). The ratio (1)-MDA/(2)-MDA was lower than 1 at all time periods, increasing from 0.42 at 0–2 h to 0.86 at 10–24 h post-drug administration. These figures are compatible with an assignation of (1)-MDA as (*R*)-MDA and (2)-MDA as (*S*)-MDA. In previous studies (16,17), (*R*)-MDA concentration initially exceed those corresponding to the (*S*)-enantiomer, but over the time (*S*)-MDA concentrations rise progressively surpassing those of (*R*)-MDA at approximately 24–36 h post-drug administration. Although no enantiomer concentration crossing was observed, the enantiomeric profile found in our case agreed indirectly with an enantioselective *O*-demethylation of MDMA. This is because the (*R*) enantiomer of MDMA less prone to be metabolized by CYP2D6 is ready available to be *N*-demethylated. As a consequence, ratios observed for MDA must be just the reverse of those corresponding to MDMA, in the absence of an unlikely enantioselective metabolism of the *N*-demethylation of MDMA. Because of being a very minor metabolite, MDA quantitation required more concentrated samples than needed for MDMA and HMMA analysis (a 1:10 sample dilution was needed for their analysis). Then to fit in the CE dynamic range, a duplicate of every sample undiluted was necessary for MDA analysis. It was observed that samples were unstable and that extracts cannot be left for long periods of time (no more than 24 h) either in the CE autosampler or at 4°C until analysis. Accordingly, it was decided to not analyze all samples for MDA and to concentrate on HMMA.

A very good correlation was found when comparing quantitative results from GC-MS (enantiomeric mixture of substances) and CE (sum of enantiomers measured separately for each substance) methods for MDMA ($r = 0.99$) and for HMMA ($r = 0.98$, but with some bias). (*R*)-MDMA recovered was higher than (*S*)-MDMA at all time periods studied and such differences were increasing over time (Table V) showing a mean of $80.7 \pm 19.0 \mu\text{mol}$ of (*R*)-

Table III. Pharmacokinetic Parameters of MDMA and HMMA

	C_{max}^* (ng/mL)	t_{max} (h)	AUC_{0-24h} (ng/mL.h ⁻¹)	AUC_{total} (ng/mL.h ⁻¹)	k_a^{\dagger} (h ⁻¹)	k_e (h ⁻¹)	$t_{1/2a}^{\ddagger}$ (h)	$t_{1/2e}$ (h)
MDMA								
Mean	223.0	2.8	2554.8	3020.4	1.86	0.082	0.54	8.49
± SD	48.0	1.0	469.7	589.6	1.29	0.009	0.30	0.97
HMMA								
Mean	220.6	2.5	2684.4	3266.3	2.14	0.068	0.39	10.35
± SD	62.9	1.2	455.7	797.1	0.61	0.010	0.14	1.73

* Abbreviations: C_{max} = peak plasma concentration, t_{max} = time of peak plasma concentration, AUC_{0-24h} = area under curve from 0 to 24 h, AUC_{total} = area under curve from 0 to infinite, k_a = absorption rate constant, k_e = elimination rate constant, $t_{1/2a}$ = absorption half-life, $t_{1/2e}$ = elimination half-life.
[†] Formation constant rate in the case of HMMA.
[‡] Formation half-life in the case of HMMA.

Table IV. Urinary Recovery* of MDMA and its Metabolites

	0–2 h	2–4 h	4–6 h	6–8 h	8–10 h	10–24 h	Overall 0–24 h
MDMA							
	31.7 ± 11.2 (6.1%)	27.3 ± 14.7 (5.4%)	16.8 ± 8.0 (3.2%)	9.8 ± 7.1 (1.9%)	4.4 ± 3.3 (0.8%)	33.3 ± 11.0 (6.4%)	123.6 ± 24.4 (23.9%)
MDA							
	0.9 ± 0.3 (0.2%)	1.5 ± 0.8 (0.3%)	1.5 ± 1.0 (0.3%)	0.7 ± 0.6 (0.1%)	0.4 ± 0.2 (0.1%)	4.1 ± 1.2 (0.8%)	9.2 ± 1.7 (1.8%)
HMMA							
	13.6 ± 5.2 (2.6%)	18.6 ± 7.2 (3.6%)	13.8 ± 3.5 (2.7%)	10.0 ± 3.0 (1.9%)	6.7 ± 3.3 (1.3%)	25.9 ± 11.5 (5.0%)	88.7 ± 31.8 (17.1%)
HMA							
	0.8 ± 1.2 (0.2%)	1.2 ± 1.0 (0.2%)	1.4 ± 1.2 (0.3%)	0.8 ± 0.3 (0.2%)	0.8 ± 0.3 (0.2%)	4.7 ± 2.5 (0.9%)	9.6 ± 5.5 (1.9%)

* μmol and % dose recovered calculated by GC-MS method.

MDMA and $42.1 \pm 12.5 \mu\text{mol}$ of (*S*)-MDMA over 24 h post-drug administration (*R/S* ratio around 1.9). These results indicate an enantioselective disposition of (*R*) and (*S*) enantiomers. (*R*)-MDMA/(*S*)-MDMA ratio was increasing over the time from 1.36 at 0–2 h to 4.99 at 10–24 h post-drug administration (Figure 4). Similar results have been reported recently (18).

A mean of $49.8 \pm 11.5 \mu\text{mol}$ of (*R*)-HMMA and $41.4 \pm 20.9 \mu\text{mol}$ of (*S*)-HMMA were excreted over 24 h post-drug admin-

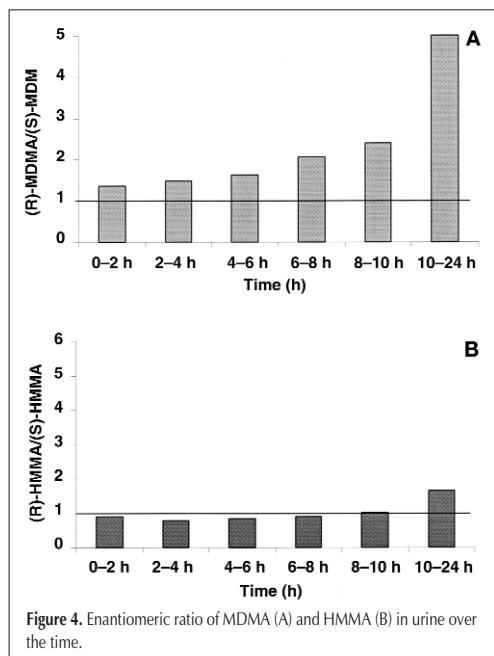


Figure 4. Enantiomeric ratio of MDMA (A) and HMMA (B) in urine over the time.

istration, with an (*R*)/(*S*) ratio of 1.2. However, the ratios of the two HMMA enantiomers were almost similar throughout the study period. In fact, (*R*)-HMMA/(*S*)-HMMA ratio was a close to 1 for all periods, although for the 10–24 h it was around 1.7 (Figure 4). Taking into account that the chiral center was not affected during all metabolic steps from MDMA to HMMA and according to MDMA stereoselective disposition, we firstly hypothesized that HMMA enantiomeric ratios would be the opposite of MDMA enantiomeric ratios. Surprisingly, not only ratios were different from that expected but also were rather constant. Reported ratios > 1 in mice and rat in 24 h urine (12) and those > 0.5 in urine samples from three unrelated MDMA intoxications (14) did not contribute to clarify the results. In a controlled trial in two volunteers carried out by Lanz et al. (16), large interindividual differences in HMMA ratios in 72 h urine samples were found. In this study, HMMA recovery was very low, which is in contrast with the majority of studies performed in humans (7).

The *O*-demethylation of MDMA to HHMA has been reported to be enantioselective. The *S*-enantiomer has a higher affinity for CYP2D6, the major isoenzyme of cytochrome P450 reported to be regulating this metabolic pathway (26,27). On the basis of in vitro results, CYP2D6 should be responsible for approximately 60% of total *O*-demethylation of MDMA, which implies that other isoenzymes are involved partially in this metabolic reaction. Recently several isoenzymes of cytochrome P450 have been identified as participating to different rates in MDMA *O*-demethylation: CYP1A2, CYP2B6, and CYP3A4 (28). Then, theoretically, this partially enantioselective step should be translated in (*R*)-MDMA/(*S*)-MDMA ratio > 1, but lower than those reported for other amphetamine-like compounds because the involvement of enzymes without chiral requirements (29). CYP2D6 is no longer involved in further metabolic steps and hence, expected (*R*)-HHMA/(*S*)-HHMA and (*R*)-HMMA/(*S*)-HMMA ratios should be < 1, just the reverse of those observed for MDMA, as no changes in the enantiomeric ratio should be expected.

In vivo, MDMA shows a lack of linearity on its pharmacokinetics (23,30). The formation of a catalytically inactive complex in the first metabolic step, probably because an interaction of the nascent HHMA, a catechol-like compound with the enzyme has been documented by several authors (31,32), may be the basis for observations made in vivo. The progressive inactivation over time of CYP2D6 while exposed to MDMA is translated in the accumulation of MDMA in the body that accounts for a rise of plasma concentrations of about 30% (23). The relatively modest increase in MDMA plasma concentrations suggests that while the enzyme inhibition is operating other isoenzymes of cytochrome P450 (as described before) contribute to MDMA disposition. It is hypothesized that these enzymes would metabolize the (*R*)-MDMA enantiomer preferentially not because chiral requirements but because in the early stages of MDMA kinetics it

Table V. Urinary Recovery* of Enantiomers of MDMA and its Metabolites

	0–2 h	2–4 h	4–6 h	6–8 h	8–10 h	10–24 h	Overall 0–24 h
(R)-MDMA	18.5 ± 5.0 (3.6%)	14.9 ± 6.0 (2.9%)	10.5 ± 4.3 (2.0%)	5.5 ± 2.6 (1.0%)	4.4 ± 2.3 (0.9%)	26.9 ± 8.3 (5.2%)	80.7 ± 19.0 (15.6%)
(S)-MDMA	13.9 ± 3.8 (2.7%)	10.3 ± 4.5 (2.0%)	6.5 ± 2.7 (1.2%)	2.7 ± 1.3 (0.5%)	2.0 ± 1.3 (0.4%)	6.8 ± 3.3 (1.3%)	42.1 ± 12.5 (8.1%)
(R)-HMMA	6.8 ± 3.0 (1.3%)	8.3 ± 2.3 (1.6%)	7.3 ± 2.5 (1.4%)	5.0 ± 1.9 (1.0%)	4.2 ± 0.9 (0.8%)	18.3 ± 5.2 (3.5%)	49.8 ± 11.5 (9.6%)
(S)-HMMA	7.6 ± 3.4 (1.5%)	10.4 ± 2.6 (2.0%)	8.6 ± 2.8 (1.7%)	5.4 ± 1.7 (1.0%)	4.2 ± 1.1 (0.8%)	11.1 ± 3.5 (2.1%)	41.4 ± 20.9 (8.0%)

* μmol and % dose recovered calculated by CE method.

is the most abundant. Then overall the net balance of the formation of the metabolite-enzyme complex and the activity of enzymes other than CYP2D6 would be a re-equilibration of *R/S* enantiomer ratios. The *R/S* ratios observed for HMMA would support indirectly the formation of the enzyme-metabolite complex until now hypothesized based on *in vitro* studies.

Conclusions

This study described a GC-MS method for the simultaneous quantitation of MDMA and its main metabolites in plasma and urine samples of healthy volunteers. Subjects were given a single oral dose of 100 mg MDMA. Following the urine sample preparation for GC-MS analysis except for the derivatization step, a CE method for enantiomeric resolution of these compounds was developed. Stereoselective disposition of MDMA and MDA was confirmed ratio close to 1 and constant over the time seems reflect CYP2D6 enzyme inhibition reported *in vitro*.

Acknowledgments

This study was supported by grants FIS 97/1198, FIS 98/0181, CIRIT 1997SGR00077, CIRIT 1999-SGR-00246, ISCIII 97/4344, and Plan Nacional sobre Drogas (PNSD), Madrid, Spain. We thank E. Menoyo and I. Sánchez for assistance in clinical studies and Marta Pulido, M.D., for editing the manuscript and editorial assistance.

References

1. R. Holden and M.A. Jackson. Near-fatal hyponatraemic coma due to vasopressin over-secretion after "ecstasy" (3,4-MDMA) (letter). *Lancet* **13**: 1052 (1996).
2. J.R. Coore. A fatal trip with ecstasy: a case of 3,4-methylenedioxymethamphetamine/3,4-methylenedioxyamphetamine toxicity. *J. R. Soc. Med.* **89**: 51–52 (1996).
3. P.D. Mueller and W.S. Korey. Death by "ecstasy": the serotonin syndrome? *Ann. Emerg. Med.* **32**: 377–380 (1998).
4. J.A. Henry, K.S. Jeffreys, and W. Loumberg. Toxicity and deaths from 3,4-methylenedioxyamphetamine. *Lancet* **340**: 384–387 (1992).
5. A.R. Green and G.M. Goodwin. Ecstasy and neurodegeneration. *Br. Med. J.* **312**: 1493–1494 (1996).
6. K. Verebey, J. Alrazy, and J.H. Jaffe. The complications of "ecstasy" (MDMA). *J. Am. Med. Assoc.* **259**: 1649–1650 (1988).
7. H.-J. Helmlin, K. Bracher, D. Bourquin, D. Volanthen, and R. Brenneisen. Analysis of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) and its metabolites in plasma and urine by HPLC-DAD and GC-MS. *J. Anal. Toxicol.* **20**: 432–440 (1996).
8. J.A. Henry, J.K. Fallon, A.T. Kicman, A.J. Hutt, D.A. Cowan, and M. Forsling. Low-dose MDMA ("ecstasy") induces vasopressin secretion. *Lancet* **351**: 1784 (1998).
9. M. Mas, M. Farré, R. de la Torre, P.N. Roset, J. Ortuño, J. Segura, and J. Camí. Cardiovascular and neuroendocrine effects and pharmacokinetics of 3,4-methylenedioxyamphetamine in humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **136**: 136–145 (1999).
10. R. de la Torre, M. Farré, P.N. Roset, C. Hernández-López, M. Mas, J. Ortuño, E. Menoyo, N. Pizarro, J. Segura, and J. Camí. Pharmacology of MDMA in humans. *Ann. NY Acad. Sci.* **914**: 225–237 (2000).
11. M. Johnson, A.A. Letter, K. Merchant, G.R. Hanson, and J.W. Gibb. Effects of 3,4-methylenedioxyamphetamine and 3,4-methylenedioxyamphetamine isomers on central serotonin-ergic, dopaminergic and nigral neurotensin systems of the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **244**: 977–982 (1988).
12. H.K. Lim, Z. Su, and R.L. Foltz. Stereoselective disposition: enantioselective quantitation of 3,4-(methylenedioxy)methamphetamine and three of its metabolites by gas chromatography/electron capture negative ion chemical ionization mass spectrometry. *Biol. Mass Spectrom.* **22**: 403–411 (1993).
13. K. Matsushima, T. Nagai, and S. Kamiyama. Optical isomer analysis of 3,4-methylenedioxyamphetamine analogues and their stereoselective disposition in rats. *J. Anal. Toxicol.* **2**: 33–39 (1998).
14. D. de Boer, L.P. Tan, P. Gorter, R. M.A. van de Wal, J.J. Kettenevan den Bosch, E.A. De Bruijn, and R.A.A. Maes. Gas chromatographic/mass spectrometric assay for profiling the enantiomers of 3,4-methylenedioxyamphetamine and its chiral metabolites using positive chemical ionization ion trap mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **32**: 1236–1246 (1997).
15. K.A. Moore, A. Mozayani, M.F. Fierro, and A. Poklis. Distribution of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) and 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) stereoisomers in a fatal poisoning. *Forensic Sci. Int.* **83**: 111–119 (1996).
16. M. Lanz, R. Brenneisen, and W. Thormann. Enantioselective determination of 3,4-methylenedioxyamphetamine and two of its metabolites in human urine by cyclodextrin-modified capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* **18**: 1035–1043 (1997).
17. D. Hensley and J.T. Cody. Simultaneous determination of amphetamine, methamphetamine, methylenedioxyamphetamine (MDA), methylenedioxyamphetamine (MDMA), and methylenedioxyethylamphetamine (MDEA) enantiomers by GC-MS. *J. Anal. Toxicol.* **23**: 518–523 (1999).
18. J.K. Fallon, A.T. Kicman, J.A. Henry, P.J. Milligan, D.A. Cowan, and A.J. Hutt. Stereospecific analysis and enantiomeric disposition of 3,4-methylenedioxyamphetamine (ecstasy) in humans. *Clin. Chem.* **45**: 1058–1069 (1999).
19. N. Pizarro, R. de la Torre, M. Farré, J. Segura, A. Llebaria, and J. Joglar. Synthesis and capillary electrophoresis analysis of enantiomerically enriched reference standards of MDMA and its main metabolites. *Bioorg. Med. Chem.* **10(4)**: 1085–1092 (2002).
20. B. Schmid, J. Bircher, R. Preisig, and A. Kupfer. Polymorphic dextrometorphan metabolism: co-segregation of oxidative O-demethylation with debrisoquin hydroxylation. *Clin. Pharmacol. Ther.* **38**: 618 (1985).
21. J. Ortuño, N. Pizarro, M. Farré, M. Mas, J. Segura, J. Camí, R. Brenneisen, and J. de la Torre. Quantification of 3,4-methylenedioxyamphetamine and its metabolites in plasma and urine by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *J. Chromatogr. B* **723**: 221–232 (1999).
22. R.C. Shumaker. A basic interactive computer program for statistical and pharmacokinetic analysis of data. *Drug Metabol. Rev.* **17**: 331–348 (1986).
23. R. de la Torre, M. Farré, J. Ortuño, M. Mas, R. Brenneisen, J. Segura, and J. Camí. Non-linear pharmacokinetics of MDMA ("ecstasy") in humans. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **49**: 104–109 (2000).
24. J. Mendelson, R.T. Jones, R. Upton, and P. Jacob, III. Methamphetamine and ethanol interactions in humans. *Clin. Pharmacol. Ther.* **57**: 559–568 (1995).
25. H.K. Ensslin, H.H. Maurer, E. Gouzoulis, L. Hermle, and K.-A. Kovar. Metabolism of 3,4-methylenedioxyethylamphetamine. *Drug. Metab. Dispos.* **24**: 813–820 (1996).
26. G.T. Tucker, M.S. Lennard, S.W. Ellis, H.F. Woods, A.K. Cho, L.Y. Lin, A. Hiratsuka, D.A. Schmitz, and T.Y.Y. Chu. The demethylation of methylenedioxyamphetamine ("ecstasy") by debrisoquine hydroxylase (CYP2D6). *Biochem. Pharmacol.* **47**: 1151–1156 (1994).
27. H.H. Maurer. On the metabolism and the toxicological analysis of

- methylenedioxyphenylalkylamine designer drugs by gas chromatography–mass spectrometry. *Ther. Drug Monitor.* **18**: 465–470 (1996).
28. K.-P. Kreth, K.-A. Kovar, M. Schwab, and U.M. Zanger. Identification of the human cytochrome P450 involved in the oxidative metabolism of “Ecstasy” related designer drugs. *Biochem. Pharmacol.* **59**: 1563–1571 (2000).
 29. J.T. Cody and R. Schwarzhoff. Interpretation of methamphetamine and amphetamine enantiomer data. *J. Anal. Toxicol.* **17**: 321–326 (1993).
 30. R. de la Torre, J. Ortuño, M. Mas, M. Farré, and J. Segura. Fatal MDMA intoxication. *Lancet* **353**: 593 (1999).
 31. D. Wu, V. Otton, T. Inaba, W. Kalow, and E.M. Sellers. Interactions of amphetamine analogs with human liver CYP2D6. *Biochem. Pharmacol.* **53**: 1605–1612 (1997).
 32. M. Delaforge, M. Jaouen, and G. Bouille. Inhibitory metabolite complex formation of methylenedioxymethamphetamine with rat and human cytochrome P450. Particular involvement of CYP 2D. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **7**: 153–158 (1999).

Manuscript received February 20, 2001;
revision received October 17, 2001.

Pizarro N; Llebaria A; Cano S; Joglar J; Farré M; Segura J; de la Torre R. *Stereochemical analysis of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and its main metabolites by gas chromatography/mass spectrometry.* **Rapid communications in mass spectrometry : RCM** 2003; 17 (4), pp. 330-6. .
Copyright 2003

Copyright Joan Wiley & Sons Limited. Reproduced with permission

Stereochemical analysis of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and its main metabolites by gas chromatography/mass spectrometry

Nieves Pizarro¹, Amadeu Llebaria², Silvia Cano¹, Jesús Joglar², Magí Farré^{1,3}, Jordi Segura^{1,4} and Rafael de la Torre^{1,4*}

¹Pharmacology Research Unit, Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM), Dr. Aiguader 80, 08003 Barcelona, Spain

²RUBAM, Department of Biological Organic Chemistry, Institut d'Investigacions Químiques i Ambientals de Barcelona (IIQAB-CSIC), Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain

³Universitat Autònoma de Barcelona, Dr. Aiguader 80, 08003, Barcelona, Spain

⁴Universitat Pompeu Fabra, Dr. Aiguader 80, 08003 Barcelona, Spain

Received 25 September 2002; Revised 10 December 2002; Accepted 10 December 2002

3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy) is consumed as the racemate but some metabolic steps are enantioselective. In addition, chiral properties are preserved during MDMA biotransformation. A quantitative analytical methodology using gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) to determine enantioselective disposition in the body of MDMA and its main metabolites including 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA), 4-hydroxy-3-methoxymethamphetamine (HMMA), and 4-hydroxy-3-methoxyamphetamine (HMA) was developed. Plasma and urine samples were collected from a male volunteer. The analysis of MDMA, MDA, and 4-hydroxy-3-methoxy metabolites by GC/MS required a two-step derivatization procedure. The first step consisted of derivatization of the amine with enantiomerically pure Mosher's reagent ((R)-MTPCI). Triethylamine was used as a base to neutralize hydrochloric acid formed during the reaction allowing quantitative derivatization, which resulted in a substantial improvement in the sensitivity of the method compared with other previously described techniques. Further treatment with ammonium hydroxide was required since both amine and hydroxyl groups underwent derivatization in the reaction. Ammonium hydroxide breaks bonds formed with hydroxyl groups without affecting amine derivatives. The second derivatization step using hexamethyldisilazane was needed for metabolites containing phenol residues. This derivatization method permitted the stereochemically specific study of MDMA and its main monohydroxylated metabolites by GC/MS. A detailed study of the chemical reactions involved in the derivatization steps was indispensable to develop a straightforward, sensitive, and reproducible method for the analysis of the parent drug compound and its metabolites. Copyright © 2003 John Wiley & Sons, Ltd.

3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy) is a methamphetamine derivative extensively used among youth. Although amphetamine and mescaline possess obvious structural similarities, MDMA has specific pharmacological properties that have led to categorization of this compound into a new drug group of substances known as entactogens.¹ MDMA in humans is responsible for acute intoxication cases and ultimately death.^{2–5} The main concern, however, relates to medium- and long-term serotonergic neurotoxicity.^{6,7}

The main metabolic reactions of MDMA in humans include O-demethylenation followed by O-methylation (mainly in position 3 of the benzene ring), and conjugation with glucuronic acid and sulfate. N-Demethylation is a minor

metabolic pathway. Major metabolites found in biological fluids are 3,4-dihydroxymetamphetamine (HHMA) and 4-hydroxy-3-methoxymethamphetamine (HMMA). 3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDA) and 4-hydroxy-3-methoxyamphetamine (HMA) are minor metabolites.^{8–14}

Oxidative O-demethylenation of MDMA to HHMA is an enantioselective pathway, favored for the (S)-(+)-MDMA stereoisomer, mainly catalyzed by the isoenzyme of cytochrome P450, CYP2D6.^{8,9,15–20} The higher affinity of (S)-(+)-MDMA for CYP2D6 results in a R/S ratio >1 for MDMA (consumed as the racemate) in biological fluids.^{9,19,21–23} R/S ratios reported for MDA are lower than 1. Some authors explain these ratios as a result of diminished bioavailability of (S)-(+)-MDMA.^{17,19} In a recent study conducted by our group,²³ including monitoring a major MDMA metabolite (HMMA), it was observed that the HMMA R/S ratio was constant and close to 1, although it might have been expected

*Correspondence to: R. de la Torre, PharmD, Pharmacology Research Unit, Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM), Doctor Aiguader 80, 08003 Barcelona, Spain.
E-mail: rtorre@imim.es

that HMMA enantiomeric ratios would be clearly in the opposite direction to those found for MDMA. This observation may be explained by catalysis of the MDMA biotransformation to HHMA by P450 isoenzymes other than CYP2D6 (e.g., CYP1A2, CYP2B6 and CYP3A4) which are not enantioselective for MDMA.¹³ Consequently, the *R/S* ratio for HMMA is balanced whereas the MDMA *R/S* ratio is >1 but lower than expected.²³ If CYP2D6 was the only cytochrome P450 involved in the *O*-demethylation of MDMA, higher MDMA *R/S* ratios than those determined experimentally would be observed.

Most pharmacokinetic data available for the MDMA enantioselective disposition have been focused on MDMA and MDA. Nevertheless, it has been postulated that the neurotoxicity of MDMA is mainly related to metabolites other than these compounds.²⁴ The (*S*)-enantiomers of MDA and MDMA are more potent than the (*R*)-enantiomers as inducers of the release of both serotonin and dopamine, and as inhibitors of serotonin reuptake.^{25,26} On the other hand, both enantiomers have shown similar activity in inhibiting monoamine oxidase type A.²⁷ According to recent observations for the two enantiomers of the MDMA-like drug 3,4-methylenedioxyethylamphetamine (MDE),²⁸ the so-called entactogenic effects are likely to be caused by the (*S*)-enantiomer, whereas (*R*)-MDE appears to be responsible for neurotoxic effects. Therefore, the availability of analytical methods for stereoselective detection of MDMA and its main metabolites in biological fluids, especially in plasma, is highly relevant for pharmacological and toxicological characterization of the drug effects.

Drug analysis by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) cannot distinguish between enantiomers unless their chemical transformation into diastereoisomers is performed. This reaction is usually carried out with an enantioselectively pure reagent. When metabolites bear other functional groups not involved in their chirality, a second derivatization reaction is required in order to make the compound amenable to GC analysis. The aim of this study was to develop a GC/MS method that would allow assessment of the enantioselective disposition of MDMA in humans. The presence of different chemical groups susceptible to derivatization before chromatography prompted us to conduct a detailed study of reactions that resulted in significant improvements of the analytical method compared to previous reports.¹⁹ This GC/MS method permitted the determination of MDMA, HMMA, MDA, and HMA in plasma and urine human samples.

EXPERIMENTAL

Materials

MDMA, MDA, HMMA, HMA and MDMA-D₅ (1-[3,4-(methylenedioxy)phenyl]-2-[1,2-dideutero-3,3,3-trideutero-methylaminopropane]) were purchased from Lipomed (Arlesheim, Switzerland); MDA-D₅ (1-[3,4-(methylenedioxy)phenyl]-2-[1,2,3,3,3-pentadeuteroaminopropane]) was obtained from Cerilliant (Austin, TX, USA); and pholedrine (4-hydroxymethamphetamine) was kindly supplied by the Deutsche Sporthochschule, Biochemistry Department (Cologne, Germany). Enantiomerically enriched standards

(*S*)-MDMA and (*S*)-HMMA were previously synthesized by our group.²⁹

(*R*)-(-)- α -Methoxy- α -trifluoromethylphenylacetyl chloride (Mosher's reagent, (*R*)-MTPCl; 98% ee/GLC) and 1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazane (HMDS; 99.9%) were purchased from Aldrich (Steinheim, Germany). *N*-Methylbis(trifluoroacetamide) (MBTFA; GC grade) was purchased from Macherey-Nagel (Düren, Germany). Triethylamine (Et₃N; 99%) and β -glucuronidase from *Helix pomatia* (HP-2) were supplied by Sigma (St. Louis, MO, USA). Ethyl acetate (HPLC grade), phosphorus pentoxide (extra pure) and ammonium hydroxide (NH₃; 25%, analysis grade) were obtained from Merck (Darmstadt, Germany), and hexane (HPLC grade) was from Sharlau Chemie (Barcelona, Spain).

Plasma and urine samples

Plasma and urine samples analyzed by the present analytical methodology were collected from a volunteer who participated in a clinical trial.³⁰ The dose administered was 100 mg of (*R,S*)-MDMA-HCl.

Instrumentation

A gas chromatograph (6890 N; Agilent Technologies, Wilmington, DA, USA) equipped with a mass selective detector (5973 Network, AT) and an autosampler injector (7683 series, AT) was used. Enantiomeric separation of analytes was performed on a cross-linked 5% phenylmethylsiloxane column, 12 m \times 0.22 mm \times 0.33 μ m film thickness (Ultra 2, AT). The temperature program was as follows: from 150°C (starting temperature maintained during 1 min) to 290°C at 20°C/min. Final temperature was maintained for 7 min. 2 μ L of sample were injected in the split mode (1:10).

The mass spectrometer was operated in electron impact ionization (70 eV) mode, using selected ion monitoring (SIM). Three *m/z* values were selected for the identification of each analyte (ion ratios were checked for each analysis and were considered acceptable when there was <20% deviation), although only one *m/z* value was used for their quantification (see Table 1). Dwell time per SIM channel was 30 ms in all

Table 1. GC/MS parameters for the enantiomeric analysis of MDMA and its metabolites. The *m/z* values in bold font are those used for quantification. For compounds for which no enantiomeric standards were available, enantiomers are labeled 1 and 2 corresponding to their elution order

rt (min)	Derivatized enantiomer	Ions
6.47	(1)-MDA-D ₅ - <i>N</i> -MTP	136, 167 , 264
	(1)-MDA- <i>N</i> -MTP	135, 162 , 260
6.60	(2)-MDA- <i>N</i> -MTP	135, 162 , 260
	(2)-MDA-D ₅ - <i>N</i> -MTP	136, 167 , 264
6.82	(1)-PHOLEDRINE- <i>N</i> -MTP- <i>O</i> -TMS	206 , 179, 274
	(1)-HMA- <i>N</i> -MTP- <i>O</i> -TMS	209, 236 , 469
6.91	(2)-PHOLEDRINE- <i>N</i> -MTP- <i>O</i> -TMS	206 , 179, 274
6.94	(1)-MDMA-D ₅ - <i>N</i> -MTP	136, 164, 278
	(<i>R</i>)-MDMA- <i>N</i> -MTP	135, 162 , 274
7.00	(2)-MDMA-D ₅ - <i>N</i> -MTP	136, 164, 278
	(<i>S</i>)-MDMA- <i>N</i> -MTP	135, 162 , 274
7.02	(2)-HMA- <i>N</i> -MTP- <i>O</i> -TMS	209, 236 , 469
7.22	(<i>R</i>)-HMMA- <i>N</i> -MTP- <i>O</i> -TMS	236 , 274, 483
7.35	(<i>S</i>)-HMMA- <i>N</i> -MTP- <i>O</i> -TMS	236 , 274, 483

cases, and effective resolution of the mass spectrometer was 0.5 u (specified by high-resolution parameters from the tune file of the mass spectrometer).

Working standards

Solutions of racemic MDMA, MDA, HMMA, and HMA (1 mg/mL) were prepared by dissolving 10 mg of each substance in 10 mL methanol. Working solutions of 0.1, 1, and 10 µg/mL of each compound were prepared by further diluting the corresponding starting solutions. MDMA and MDA deuterated analogues (D₅) were used as internal standards (IS) for their analysis. Pholedrine (4-hydroxymethamphetamine) was used as IS in HMMA and HMA analyses. A mixture (20 µL) containing 10 µg/mL of both MDMA-D₅ and pholedrine, and 1 µg/mL of MDA-D₅, were added to each sample. Enantiomerically enriched standard solutions of 100 µg/mL of (S)-MDMA and (S)-HMMA were used for enantiomeric identification.²⁹

Calibration and sample preparation quality control

Calibration curves were prepared by adding appropriate volumes of working solutions to test tubes each containing 1 mL of drug-free plasma. Final concentrations were 25, 100, 200, 300, and 400 µg/L of racemic MDMA and HMMA, and 2.5, 10, 20, 30 and 40 µg/L of racemic MDA and HMA. Control plasma samples containing appropriate analytes at different concentrations were prepared in drug-free plasma and kept frozen at -20°C in 1-mL aliquots. Control concentrations were as follows: 30, 150 and 350 µg/L of racemic MDMA; 30 and 350 µg/L of racemic HMMA; 3, 15 and 35 µg/L of racemic MDA; and 3 and 35 µg/L of racemic HMA. Control samples were prepared with working standard solutions different from those used for the preparation of calibration curves.

Hydrolysis and extraction procedures

Both hydrolysis and extraction procedures were performed as described previously.^{23,31} In summary, samples were subjected to an enzymatic hydrolysis using β-glucuronidase from *Helix pomatia* (HP-2). Samples were extracted using a solid-phase extraction procedure using Bond Elut Certify columns (BEC[®]). Compounds of interest were eluted using 2 mL of ethyl acetate with 2% NH₃. Eluates were evaporated to dryness under a nitrogen steam in a water-bath at 23°C and 10 psi (in order to avoid analyte losses by evaporation).

Chiral derivatization procedure

Two derivatization steps were required. Initially extracts were reconstituted in 2 mL of a mixture of ethyl acetate/hexane (1:1) which contained Et₃N (0.015%). Then, 20 µL of a 190 mM solution of (R)-MTPCl in hexane were added, and the tubes were capped and incubated for 20 min at 80°C. After reaching room temperature, 10 µL of NH₃ were added and a new incubation was performed for 20 min at 80°C. Tubes were then centrifuged at 3500 rpm for 5 min, and the organic phase was separated from salt precipitates and transferred to a new tube. Samples were then taken to dryness under a N₂ stream at 40°C, and kept in a vacuum oven in the presence of phosphorus pentoxide for 1 h at 50°C. Finally, a second

derivatization step was performed by adding 50 µL of HMDS and incubating for 1 h at 80°C. Extracts were injected directly into the chromatographic system.

Achiral analysis

Compounds in plasma and urine samples were also analyzed following an achiral analysis as previously published.²³ Briefly, achiral quantification consisted of the same sample preparation procedure used for chiral analysis except for the derivatization step, which was performed by incubating extracts with MBTFA at 70°C for 45 min. Trifluorosilyl derivatives of the corresponding compounds (a mixture of enantiomeric pairs) were analyzed by GC/MS.

Validation procedure

The analytical chiral methodology was validated following a 3-day protocol. Calibration curve linearity was tested over the range 12.5–200 µg/L for MDMA and HMMA enantiomers, and over the range 1.25–20 µg/L for MDA and HMA enantiomers. Peak area ratios between compounds and the IS were used for calculations. A weighted (1/concentration) least-squares regression analysis was used (SPSS, version 9.0.1 for Windows). Three replicates of each level of the quality control samples were analyzed. Three and ten standard deviations (SD) of the calculated concentrations for the low control level were used to estimate the limits of detection and quantification, respectively. Intermediate precision was calculated as the relative SD of concentrations calculated for quality control samples. Inter-assay accuracy is expressed as the relative error with respect to the calculated concentrations.

RESULTS AND DISCUSSION

A unified approach for the detection and quantification in plasma of the enantiomers of MDMA, MDA, HMMA, and HMA, to be used in clinical studies of the enantiomeric disposition of MDMA in humans, was developed. It was the purpose of the present study to develop an analytical methodology for the chiral analysis of MDMA and metabolites in biological fluids. Only validation results in plasma are presented here as sensitivity requirements are more demanding for this biological fluid. However, similar validation results were obtained for urine.

By analyzing enantiomerically enriched (S)-MDMA and (S)-HMMA standards, it was observed that each (S)-enantiomer eluted after its corresponding (R)-enantiomer. Because of the lack of the appropriate enantiomeric standards, MDA and HMA enantiomers could not be assigned to the corresponding chromatographic peaks. Thus, for these two metabolites, the members of each pair of enantiomers were identified and designed using their elution order, as the (1)- and (2)-enantiomers.

The enantioselective determination of MDMA and some analogues, such as MDEA and its metabolites, has been achieved by applying different analytical approaches. GC/MS and capillary electrophoresis (CE) are the most common methods used for that purpose,^{19,21,23} although HPLC has also been used with some success. Both GC/MS and CE have some advantages and disadvantages. On the one hand, CE

does not require a very demanding sample preparation because the derivatization step is not required since working buffers can provide chiral conditions. In contrast, since enantiomers have identical behavior under chromatographic conditions, conventional GC/MS requires specific enantiomer derivatization to diastereoisomers, that are chromatographically distinguishable. On the other hand, GC/MS provides a sensitivity that is difficult to reach by CE methods, although some strategies to decrease limits of detection have been developed for electrophoresis.^{32,33} With regard to HPLC, enantiomers of amphetamine-like compounds are usually separated with the use of specific chiral columns, resulting in a substantial increase in cost.

Recently, a method for the analysis of MDEA and its main metabolites by chiral HPLC has been developed.³⁴ However, two chromatographic phases (β -cyclodextrin in the mobile phase for MDEA and MDA and a chiral protein phase, chiral-CBH, for the remaining compounds) and two types of detector (fluorescence and electrochemical detectors) were required for analysis. A useful method to analyze urine samples by CE has been recently developed.²³ MDMA, MDA and HMMA enantiomers could be analyzed but MDA required further concentration of samples. Also, the electrophoretic conditions for enantiomeric analysis of MDMA and HMMA were slightly different, and two runs were required for quantification of all analytes. When considering analysis of plasma samples, a higher turnaround compared with urine samples, and a further increase in sensitivity, are required. As current CE developments did not meet these criteria, we turned our attention to GC/MS methodology, and therefore the derivatization of enantiomeric analytes to its diastereoisomers was required.

There are several chiral derivatizing reagents, of high purity, which have been used for the stereochemical study of amphetamine-like compounds: (*R*)-(-)- α -methoxy- α -trifluoromethylphenylacetyl chloride (Mosher's reagent, (*R*)-MTPCI),¹⁹ *N*-trifluoroacetyl-L-prolyl chloride (LTPCI),^{35,36} 1*R*,2*S*,5*R*-(-)-menthylchloroformate (MCF),³⁷ and *N*-heptafluorobutyryl-L-prolyl chloride (HFBPCI).^{9,22} Some studies indicate that LTPCI and HFBPCI can undergo an unpredictable racemization.¹⁹ In addition, HFBPCI has to be synthesized as it is not commercially available. MCF has successfully been used for amphetamine and methamphetamine derivatization. Mosher's reagent is stereochemically stable and readily available commercially, and has been successfully used in a study of MDMA stereochemical metabolism.¹⁹ These reasons led us to select it as the derivatization reagent for the present study.

For our purposes, a second derivatization step was required for metabolites bearing hydroxyl groups. In related studies, both *N*-methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA) and *N*-methyl-bis(trifluoroacetamide) (MBTFA) have previously been used.^{9,22} More reproducible results and a higher detector response were observed with silyl derivatives.²²

The derivatization procedures previously described in the literature for MDMA and related compounds are simple and faster than the method reported here. However, taking into account some chemical considerations, important improvements over previously described methods were obtained.¹⁹ Firstly, with our method, higher chiral reaction yields compared with other reported procedures are obtained. Secondly, when hydroxylated metabolites are also target compounds, previously published methodologies were of limited usefulness. However, by following the present method, these metabolites were suitably derivatized and quantified.

Validation results

Calibration curves were linear in the concentration range tested for each enantiomer, with correlation coefficients (R^2) higher than 0.99 in all cases. Detection and quantification limits were appropriate for every enantiomer (lower than the corresponding first concentration calibration level). Precision and accuracy were always lower than 20%, values that satisfied standard acceptance criteria. Validation data for each enantiomer are summarized in Table 2.

Sample analysis

MDMA, MDA, HMMA, and HMA enantiomers were analyzed using the present chiral methodology in both plasma and urine samples from a healthy volunteer. Figures 1 and 2 show the selected ion chromatograms for chiral analysis of plasma and urine samples, respectively. Results obtained by analyzing samples following both achiral and chiral methodologies were compared and were found to be consistent for both plasma and urine samples (see Table 3).

Primary and secondary amines derivatization

Amines were derivatized with the enantiomerically pure reagent (*R*)-MTPCI (Mosher's reagent) using an improved procedure (see Experimental section). Accordingly, enantiomeric pairs, which are not separated with a non-chiral procedure, were converted into diastereoisomers that could be easily separated and analyzed in a conventional capillary column by GC/MS. Two important considerations in the amine derivatization step should be considered. These involve the role of two of the reagents, triethylamine and NH_3 .

Table 2. Validation data for chiral analysis of MDMA and its metabolites

	R^2	Detection limit ($\mu\text{g/L}$)	Quantification limit ($\mu\text{g/L}$)	Precision (RSD, %)	Accuracy (error %)
(<i>R</i>)-MDMA	0.998	2.4	7.3	4.2	6.1
(<i>S</i>)-MDMA	0.996	3.1	9.3	4.5	5.4
(1)-MDA	0.998	0.3	1.0	11.8	13.8
(2)-MDA	0.996	0.2	0.8	14.6	17.7
(<i>R</i>)-HMMA	0.996	1.3	4.1	14.8	14.0
(<i>S</i>)-HMMA	0.994	0.9	2.8	14.0	15.6
(1)-HMA	0.993	0.2	0.5	13.1	18.2
(2)-HMA	0.992	0.2	0.6	14.4	14.9

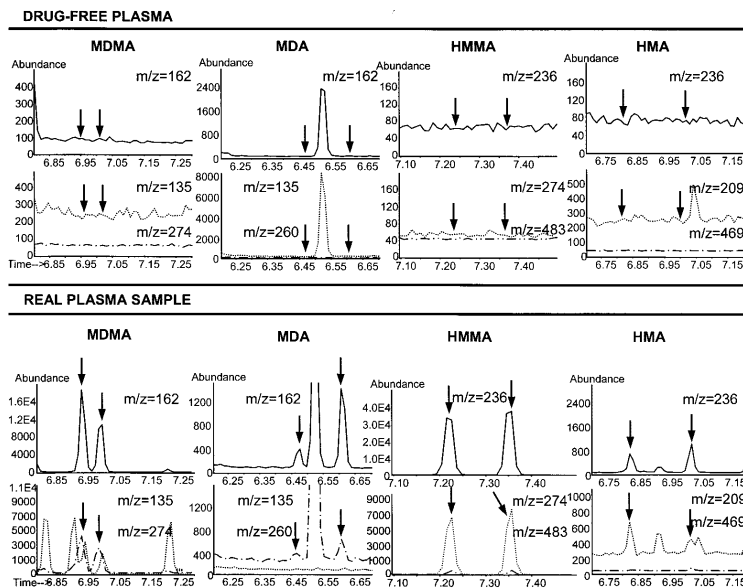


Figure 1. SIM chromatograms for plasma samples using the chiral GC/MS methodology. In each case the top chromatogram is that used for quantification, and arrows indicate the retention times of the target analytes. The top set of chromatograms corresponds to drug-free plasma (control) and the bottom set to a plasma sample from the dosed volunteer subject.

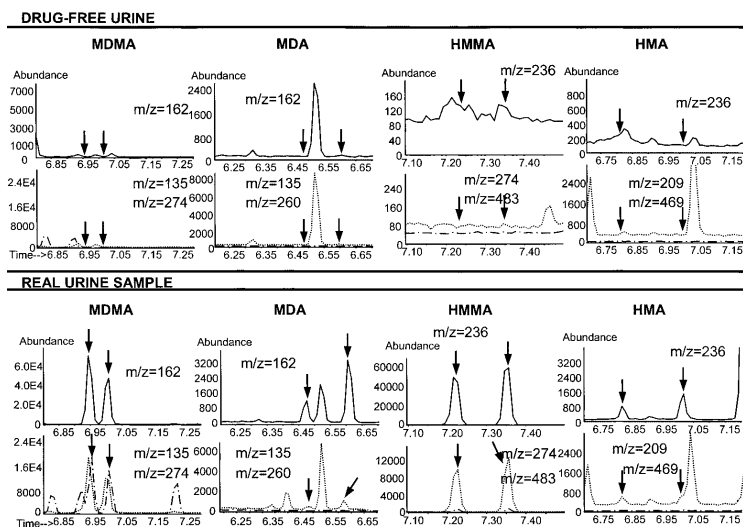


Figure 2. SIM chromatograms for urine samples using the chiral GC/MS methodology. In each case the top chromatogram is that used for quantification, and arrows indicate the retention times of the target analytes. The top set of chromatograms corresponds to drug-free plasma (control) and the bottom set to a urine sample from the dosed volunteer subject.

Table 3. Results obtained using both chiral and achiral methodologies for plasma and urine samples from a healthy volunteer dosed with 100 mg of racemic MDMA

Compound	Plasma sample*			Urine sample*		
	Chiral Analysis	Achiral analysis	Ratio R/S	Chiral analysis	Achiral analysis	Ratio R/S
(<i>R,S</i>)-MDMA		98.7			449.8	
(<i>R</i>)-MDMA	53.1	(92.1)**	1.36	265.3	(466.9)**	1.32
(<i>S</i>)-MDMA	39.0			201.6		
(<i>R,S</i>)-MDA		3.1			7.8	
(1)-MDA	0.6	(2.1)**	0.43	2.2	(7.9)**	0.39
(2)-MDA	1.4			5.7		
(<i>R,S</i>)-HMMA		173.0			326.7	
(<i>R</i>)-HMMA	83.6	(169.7)**	0.97	154.5	(324.2)**	0.91
(<i>S</i>)-HMMA	86.1			169.7		
(<i>R,S</i>)-HMA		0			0	
(1)-HMA	0			0	(2.7)**	
(2)-HMA	0			2.7		

*Concentrations in $\mu\text{g/L}$.

**Sum of both enantiomer determinations.

With respect to triethylamine, as a result of the reaction of every primary and secondary amine with the Mosher reagent, an amide bond is formed and HCl is produced. HCl is neutralized by the amines present forming the corresponding hydrochlorides, since protonated amines are unable to react with (*R*)-MTPCl. Thus, an additional base is required to neutralize the HCl formed and to allow complete reaction of the analytes. Pyridine and Et_3N were tested at different amounts, incubation times and temperatures. Both bases significantly improved the analytes' response (increasing with derivatization temperature), but better results were obtained with Et_3N (data not shown). When Et_3N (0.015%) was added to the derivatization mixture and incubation was performed at 80°C for 20 min, the response was twice that obtained in the absence of base for MDMA (see Figs. 3(a) and 3(b)). With regard to HMMA in the presence of Et_3N , the amide bond was formed in a quantitative way from the amine group. Nevertheless, in addition, the formation of an ester bond with the phenol group by Mosher's reagent was also observed (see Figs. 3(a) and 3(b)).

Thus, in the presence of Et_3N , a considerable number of target compounds reacted their amine and phenol groups with (*R*)-MTPCl, producing an amide and an ester (see Fig. 3(b)), respectively. Gentle amine derivatization conditions avoided formation of esters, but lower responses were obtained. NH_3 was able to reconvert all esters to their original hydroxyl groups without affecting the amides (Fig. 3(c)). When adding NH_3 , ammonium chloride precipitates interfere with the next derivatization step. Solids were efficiently removed by centrifugation for 5 min at 3500 rpm, and the remaining supernatant was transferred to another tube and taken to dryness under a nitrogen stream at 40°C and 20 psi.

Phenol derivatization

The common silylation agents, such as *N*-methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA), produced the desired *O*-TMS derivatives but also to some extent the *N*-TMS derivatives for primary amines which, after amide formation via Mosher's reagent, still had a proton available for reaction. Hexamethyldisilazane (HMDS), a mild silylation reagent, allowed alcohol derivatization without affecting

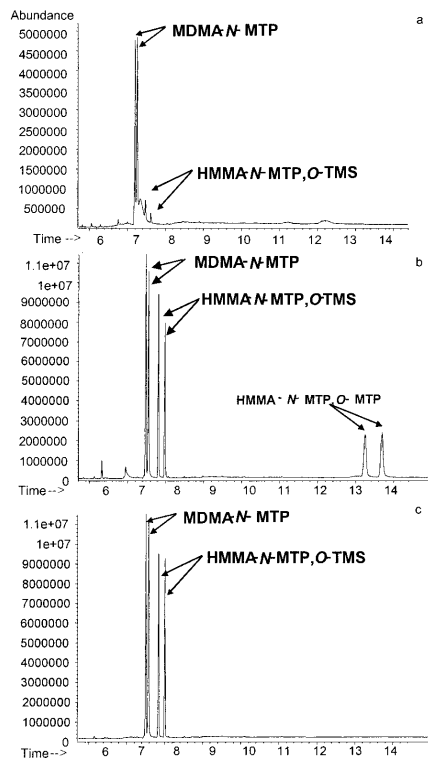


Figure 3. Chiral GC/MS analyses of MDMA and HMMA using different derivatizing conditions. (a) Mosher's reagent with no added base; (b) Mosher's reagent with triethylamine added, using optimized conditions (see text); and (c) Mosher's reagent with triethylamine, followed by a second incubation with ammonia to reconvert *O*-MTP esters to the hydroxyl groups (see text). HMDS was used for alcohol derivatization to *O*-TMS derivatives.

primary amines, and the most suitable reaction conditions were found to involve heating for 60 min at 80°C (see Fig. 3(c)).

Sample quantification

One plasma sample from a volunteer dosed with 100 mg of (R,S)-MDMA-HCl was analyzed by both chiral and achiral methods. The sample selected for illustration of the results corresponds to 90 min after drug ingestion, close to peak MDMA plasma concentration values. Good agreement between the two methodologies is observed, particularly for major compounds. HMA concentrations were below the limit of quantification in both chiral and achiral analytical approaches. A urine sample from the same volunteer, corresponding to the 0–2-h collection period after MDMA ingestion, was analyzed under chiral and achiral conditions.

Plasma and urine chiral analysis confirmed the stereoselective disposition of MDMA,²³ that is, MDMA R/S enantiomeric ratios were >1 (1.36 and 1.32 for plasma and urine samples, respectively), and HMMA enantiomeric ratios were close to 1 (0.97 and 0.91 for plasma and urine samples, respectively).

CONCLUSIONS

The derivatization procedure described here allows the stereochemical study of MDMA and its main monohydroxylated metabolites using GC/MS. A detailed study of all chemical reactions involved in derivatization steps allowed us to develop a straightforward, sensitive, and reproducible analytical method for these compounds.

Acknowledgements

This study was funded by research grants FIS 98/0181, FIS 01/1336, and CIRIT 2001SGR00407. Rafael de la Torre is currently recipient of a NATO senior fellowship at the School of Pharmacy, Center of Molecular and Cellular Toxicology, University of Texas, Austin. We thank Marta Pulido for editing the manuscript and editorial assistance.

REFERENCES

- Nichols DE. *J. Psychoactive Drugs* 1986; **18**: 305.
- Holden R, Jackson MA. *Lancet* 1996; **347**: 1052.
- Coore JR. *J. R. Soc. Med.* 1996; **89**: 51.
- Mueller PD, Korey WS. *Ann. Emerg. Med.* 1998; **32**: 377.
- Henry JA, Jeffreys KJ, Dawling S. *Lancet* 1992; **340**: 384.
- Green AR, Goodwin GM. *Br. Med. J.* 1996; **312**: 1493.
- McCann UD, Eligulashvili V, Ricaurte GA. *Neuropsychobiology* 2000; **42**: 11.
- Lim HK, Foltz RL. *Chem. Res. Toxicol.* 1989; **2**: 142.
- Lim HK, Su Z, Foltz RL. *Biol. Mass Spectrom.* 1993; **22**: 403.
- Helmlin H-J, Bracher K, Bourquin D, Vonlanthen D, Brenneisen R. *J. Anal. Toxicol.* 1996; **20**: 432.
- de la Torre R, Farré M, Roset PN, Hernández López C, Mas M, Ortuño J, Menoyo E, Pizarro N, Segura J, Camí J. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2000; **914**: 225.
- de la Torre R, Farré M, Ortuño J, Mas M, Brenneisen R, Roset PN, Segura J, Camí J. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2000; **49**: 104.
- Kreth K-P, Kovar K-A, Schwab M, Zanger UM. *Biochem. Pharmacol.* 2000; **59**: 1563.
- Kraemer T, Maurer HH. *Ther. Drug Monit.* 2002; **24**: 277.
- Kumagai Y, Lin LY, Hiratsuka A, Narimatsu S, Suzuki T, Yamada H, Oguri K, Yoshimura H, Cho AK. *Mol. Pharmacol.* 1994; **45**: 359.
- Tucker GT, Lennard MS, Ellis SW, Woods HF, Cho AK, Lin LY, Hiratsuka A, Schmitz DA, Chu TYY. *Biochem. Pharmacol.* 1994; **47**: 1151.
- Hensley D, Cody JT. *J. Anal. Toxicol.* 1999; **23**: 518.
- Cho AK, Hiramatsu M, Distefano EW, Chang AS, Jenden DJ. *Drug Metab. Dispos.* 1990; **18**: 686.
- Fallon JK, Kicman AT, Henry JA, Milligan PJ, Cowan DA, Hutt AJ. *Clin. Chem.* 1999; **45**: 1058.
- Fitzgerald RL, Blanke RV, Poklis A. *Chirality* 1990; **2**: 241.
- Lanz M, Brenneisen R, Thormann W. *Electrophoresis* 1997; **18**: 1035.
- de Boer D, Tan LP, Gorter P, van de Wal RMA, Kettenes-van den Bosch JJ, de Bruijn EA, Maes RAA. *J. Mass Spectrom.* 1997; **32**: 1236.
- Pizarro N, Ortuño J, Farré M, Hernández-López C, Pujadas M, Llebaria A, Joglar J, Roset PN, Mas M, Segura J, Camí J, de la Torre R. *J. Anal. Toxicol.* 2002; **26**: 157.
- Esteban B, O'Shea E, Camarero J, Sanchez V, Green AR, Colado MI. *Psychopharmacology* 2001; **154**: 251.
- Azmitia EC, Murphy RB, Whitaker-Azmitia PM. *Brain Res.* 1990; **510**: 97.
- McKenna DJ, Guan XM, Shulgin AT. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1991; **38**: 505.
- Leonardi ETK, Azmitia EC. *Neuropsychopharmacology* 1994; **10**: 231.
- Spitzer M, Franke B, Walter H, Buechler J, Wunderlich AP, Schwab M, Kovar K-A, Hermle L, Grön G. *Neuropharmacology* 2001; **41**: 263.
- Pizarro N, de la Torre R, Farré M, Segura J, Llebaria A, Joglar J. *Bioorg. Med. Chem.* 2002; **10**: 1085.
- Hernández-López C, Farré M, Roset PN, Menoyo E, Pizarro N, Ortuño J, Torrens M, Camí J, de la Torre R. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002; **300**: 236.
- Ortuño J, Pizarro N, Farré M, Mas M, Segura J, Camí J, Brenneisen R, de la Torre R. *J. Chromatogr.* 1999; **723**: 221.
- Verleysen K, Sandra P. *Electrophoresis* 1998; **19**: 2798.
- Vespalec R, Bocek P. *Electrophoresis* 1999; **20**: 2579.
- Brunnenberg M, Kovar K-A. *J. Chromatogr.* 2001; **751**: 9.
- Fitzgerald RL, Blanke RV, Glennon RA, Yousif MY, Rosecrans JA, Poklis A. *J. Chromatogr.* 1989; **490**: 59.
- Moore KA, Mozayani A, Fierro MF, Poklis A. *Forensic Sci. Int.* 1996; **83**: 111.
- Hughes RO, Bronner WE, Smith ML. *J. Anal. Toxicol.* 1991; **15**: 256.

Pizarro N, Farre M, Pujadas M, Peiro AM, Roset PN, Joglar J, de la Torre R.

Stereochemical analysis of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and its main metabolites in human samples including the catechol-type metabolite (3,4-dihydroxymethamphetamine).

Drug Metabolism and Disposition. 2004 Sep;32(9):1001-7.

Reprinted with permission of the American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics. All rights reserved.

DRUG METABOLISM AND DISPOSITION

A Publication of the American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics

James R. Halpert, Editor

The University of Texas Medical Branch
Department of Pharmacology & Toxicology
301 University Boulevard
Galveston, TX 77555-1031
Phone: 409-772-9678
Fax: 409-772-5732
dmd.pharm@utmb.edu

Garold S. Yost, Associate Editor

University of Utah
Department of Pharmacology and Toxicology
30 South 2000 East, Room 201
Salt Lake City, UT 84112-5820
Phone: 801-581-7956
Fax: 801-585-3945
gyost@pharm.utah.edu

Rafael de la Torre, PharmD, Ph.D.
Pharmacology Research Unit
Institut Municipal d'Investigació Mèdica
Doctor Aiguader 80
E-08003 Barcelona
Spain
rtorre@imim.es

Dear Dr. Torre:

Your manuscript (DMD #1432) entitled "Stereochemical analysis of MDMA and its main metabolites in human samples including the catechol-type metabolite (HHMA)" has been accepted for publication in *Drug Metabolism and Disposition*.

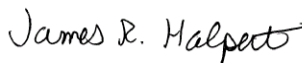
You will be receiving page proofs from the compositor. The compositor will send you an e-mail message with a user name, password, and a link to a PDF file of your page proofs. Please print out your proofs, make all necessary corrections, and return the corrected proofs within 48 hours to the compositor. Please note that only typographical errors will be changed at the proof stage. Rewriting is not permitted. If you have any difficulty with your page proofs, please contact the production editor who will be assigned to your paper. His or her name and contact information will be supplied with your proofs. Delay in returning your page proofs in a timely manner may result in delay of publication of your article.

Thank you for submitting your manuscript to *Drug Metabolism and Disposition*.

Sincerely,



Garold S. Yost, Ph.D.
Associate Editor



James R. Halpert, Ph.D.
Editor

STEREOCHEMICAL ANALYSIS OF 3,4-METHYLENEDIOXYMETHAMPHETAMINE AND ITS MAIN METABOLITES IN HUMAN SAMPLES INCLUDING THE CATECHOL-TYPE METABOLITE (3,4-DIHYDROXYMETHAMPHETAMINE)

Nieves Pizarro, Magí Farré, Mitona Pujadas, Ana M^a Peiró, Pere N Roset, Jesús Joglar, and Rafael de la Torre

Pharmacology Research Unit, Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM), Universitat Autònoma de Barcelona and Universitat Pompeu Fabra (N.P., M.F., M.P., A.M^a.P., P.N.R., R.d.l.T.); and Department of Biological Organic Chemistry, Institut d'Investigacions Químiques i Ambientals, Consell Superior d'Investigacions Científiques (IIQAB-CSIC) (J.J.), Barcelona, Spain

Received March 3, 2004; accepted May 24, 2004

This article is available online at <http://dmd.aspetjournals.org>

ABSTRACT:

3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDMA; "ecstasy") is a designer drug commonly misused in large segments of young populations. MDMA is usually formulated in tablets of its racemate (1:1 mixture of its enantiomers) in doses ranging from 50 to 200 mg. MDMA has an enantioselective metabolism, the (S)-enantiomer being metabolized faster than the (R)-enantiomer. Different pharmacologic properties have been attributed to each enantiomer. The carbon responsible for MDMA chirality is preserved along its metabolic disposition. An analytical method has been developed to determine MDMA enantiomers and those from its major metabolites, 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA), 3,4-dihydroxymethamphetamine (HHMA), and 4-hydroxy-3-methoxymethamphetamine (HMMA). It has been applied to the analysis of plasma and

urine samples from healthy recreational users of MDMA who participated voluntarily in a clinical trial and received 100 mg (R,S)-MDMA · HCl orally. (R)/(S) ratios both in plasma (0–48 h) and urine (0–72 h) for MDMA and MDA were >1 and <1, respectively. Ratios corresponding to HHMA and HMMA, close to unity, deviate from theoretical expectations and are most likely explained by the ability of MDMA to autoinhibit its own metabolism. The short elimination half-life of (S)-MDMA (4.8 h) is consistent with the subjective effects and psychomotor performance reported in subjects exposed to MDMA, whereas the much longer half-life of the (R)-enantiomer (14.8 h) correlates with mood and cognitive effects experienced on the next days after MDMA use.

3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDMA; "ecstasy") is a synthetic amphetamine derivative, commonly misused recreationally due to its entactogenic properties (Nichols, 1986). MDMA is an indirect serotonin agonist and a potent inducer of dopamine and norepinephrine release (White et al., 1996). The pharmacology of this compound has been extensively described in an excellent review (Green et al., 2003). MDMA has four different substituents in the α -carbon of its chemical structure that define a chiral center, preserved in all methylenedioxy amphetamine derivatives. MDMA and related compounds are consumed as racemates, a 1:1 mixture of its enantiomers. Experimental studies have shown that whereas the (S)-enantiomers of methylenedioxy amphetamines are more potent dopa-

mine releasers, (R)-enantiomers show higher affinity to serotonin receptors and, then, higher potency as psychostimulants (Johnson et al., 1986). In mice and rhesus monkeys (Fantegrossi et al., 2002, 2003; Meyer et al., 2002a,b), the MDMA enantiomers showed heterogeneous pharmacologic effects, including elevation of body temperature, induction of locomotor activity, and reinforcing properties. In humans, a study performed with 3,4-methylenedioxyethylamphetamine (MDEA) enantiomers, administered separately, showed that the (S)-enantiomer was associated with entactogen effects, whereas the (R)-enantiomer was responsible for dysphoria and somatic complaints (Spitzer et al., 2001).

The MDMA major metabolic pathway includes its *O*-demethylation to 3,4-dihydroxymethamphetamine (HHMA) (a reaction mainly regulated by CYP2D6) followed by *O*-methylation to 4-hydroxy-3-methoxymethamphetamine (HMMA) (a reaction regulated by cate-

This work was supported by Fonds de Investigaciones Sanitarias (98/0181, 00/0777, 01/1325 and 01/1336) and Generalitat de Catalunya-Department de Recerca i Societat de la Informació (1999/SGR/0242 and 2001/SGR/00407).

ABBREVIATIONS: MDMA, 3,4-methylenedioxyamphetamine; MDA, 3,4-methylenedioxyamphetamine; MDEA, 3,4-methylenedioxyethylamphetamine; HHMA, 3,4-dihydroxymethamphetamine; HMMA, 4-hydroxy-3-methoxymethamphetamine; HMA, 4-hydroxy-3-methoxyamphetamine; MDMA-D₅, 1-[3,4-(methylenedioxy)phenyl]-2-(1,2-dideutero-3,3,3-trideuteromethylaminopropane); MDA-D₅, 1-[3,4-(methylenedioxy)phenyl]-2-(1,2,3,3,3-pentadeuteroaminopropane); MTP, (R)-(-)- α -methoxy- α -trifluoromethylphenylacetyl derivative; TMS, trimethylsilyl derivative; DHBA, 3,4-dihydroxybenzylamine; GC/MS, gas chromatography/mass spectrometry; CE, capillary electrophoresis; SCX, strong cation exchange; BEC, bond elut certify; IS, internal standard; COMT, catechol-*O*-methyltransferase; C_{max}, maximum concentration; t_{max}, maximum time; AUC, area under the curve; AUC_{0–48 h}, area under the curve from 0 to 48 h; AUC_{total}, area under the curve from 0 to infinity; k_e, elimination rate constant; t_{1/2}, elimination half-time.

chol-methyltransferase). At a lower rate, MDMA is *N*-demethylated to 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) (a reaction regulated by CYP2B6), which is further metabolized to the catechol intermediate (3,4-dihydroxyamphetamine) and finally *O*-methylated to 4-hydroxy-3-methoxyamphetamine (HMA) (Maurer et al., 2000; Segura et al., 2001; de la Torre et al., 2004). Similar metabolic pathways have been reported for other methylenedioxy derivatives of amphetamine, such as MDEA (Ensslin et al., 1996). In both cases, and along these metabolic pathways, the α -carbon responsible for stereochemical properties is not affected and all the metabolites are chiral compounds that may be presented as a mixture of their enantiomers. In addition to these major compounds, some other minor metabolites derived from the activity of MAO on the amine residue are also formed.

Studies in rats have shown an enantioselective metabolism in MDMA *N*-demethylation to MDA, the elimination half-life of the (*R*)-MDMA being shorter than the (*S*)-enantiomer, as opposed to MDA, in which the elimination half-life of the (*S*)-enantiomer is shorter than that of the (*R*)-enantiomer (Fitzgerald et al., 1990). These data are not consistent with enantioselectivity studies of MDMA in humans carried out in cases of MDMA intoxication (Moore et al., 1996; de Boer et al., 1997; Hensley and Cody, 1999) and in controlled settings (Lanz et al., 1997; Fallon et al., 1999; Pizarro et al., 2002b). This is mainly due to the fact that enantioselectivity in rats is associated with *N*-demethylation, a metabolic pathway that accounts for only 8 to 9% of the MDMA concentration in human beings (de la Torre et al., 2000a). In humans, the enantioselective step is the *O*-demethylation, mainly regulated by CYP2D6.

The study of the enantioselective disposition of MDMA has been limited to the determination of MDMA and MDA. However, MDA is not involved in the *O*-demethylation pathway. Chiral analysis of the more polar metabolites HHMA and HMMA would be more relevant because these metabolites are involved in the *O*-demethylation pathway. The unavailability of reference substances and the physicochemical properties of HHMA and HMMA render difficult the application of the same analytical strategy followed for MDMA and MDA. Additionally, the fact that in animal models, MDMA-related neurotoxic effects are not produced after intracerebral injection of the drug and only develop after systemic administration further increases the interest in the assessment of the enantioselective disposition of MDMA metabolites (Green et al., 2003), as well as its relationship with mid-long-term neurotoxic effects. The present study was therefore designed to determine the concentrations of enantiomers of MDMA and its metabolites in plasma and urine samples from healthy volunteers. To this purpose a modification of a previously described GC/MS chiral method (Pizarro et al., 2003) was developed to be able to quantify simultaneously the enantiomers of MDMA, HHMA, HMMA, MDA, and HMA. Pharmacokinetic data of all determined enantiomers are reported.

Materials and Methods

Plasma and Urine Samples. Biological samples were obtained from seven male healthy volunteers who were recreational users of MDMA who were given a single 100-mg oral dose of (*R,S*)-MDMA · HCl. All participants gave written informed consent to participate in the study, which was approved by the institutional review board and authorized by the Spanish Ministry of Health. MDMA was obtained from the Spanish Ministry of Health and MDMA soft gelatin capsules were prepared and supplied by the Department of Pharmacy of Hospital del Mar (Barcelona, Spain). Participants were phenotyped with dextromethorphan for CYP2D6 enzyme activity and all were categorized as extensive metabolizers (Schmid et al., 1985).

Blood samples were obtained before drug administration (baseline) and at 20, 40, 60, and 90 min and at 2, 3, 4, 6, 8, 10, 24, 28, and 48 h after drug administration. The heparinized blood was centrifuged at 1100g for 10 min,

and plasma was transferred to polypropylene tubes containing 30 μ l of sodium bisulfite (250 mM) and stored at -20°C until analysis. Urine samples were collected before and after drug administration at 0- to 2-, 2- to 6-, 6- to 12-, 12- to 24-, 24- to 48-, and 48- to 72-h time periods, acidified with HCl, and stored at -20°C until analysis.

Materials and Reagents. All chemicals (analysis or reagent grade) were obtained from Lipomed (Arlesheim, Switzerland), Radian Research (Lafayette, IN), Aldrich Chemical (Steinheim, Germany), Merck (Darmstadt, Germany), Scharlab Chemie (Barcelona, Spain), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), and Varian, Inc. (Palo Alto, CA). Pholedrine (4-hydroxymethamphetamine) was generously given by the Deutsche Sporthochschule, Biochemistry Department (Cologne, Germany). Enantiomerically enriched standards for (*S*)-MDMA, (*S*)-HMMA, and (*S*)-HHMA were synthesized in our laboratory (Pizarro et al., 2002a). Drug-free plasma was supplied by the blood bank of our hospital and drug-free urine was obtained from healthy volunteers.

Working Standards. Solutions of racemic MDMA, MDA, HMMA, and HHMA (1 mg/ml) were prepared by dissolving 10 mg of each substance in 10 ml of methanol. Working solutions of 0.1, 1, and 10 μ g/ml of each compound were prepared by further diluting the corresponding starting solutions. MDMA and MDA pentadeuterated (D_5) analogs were used as internal standards (ISs) for their analysis. Pholedrine (4-hydroxymethamphetamine) was used as IS in HMMA analyses and 3,4-dihydroxybenzylamine (DHBA) was the IS for HHMA. A total of 20 μ l of a mixture containing 5 μ g/ml of both MDMA- D_5 and pholedrine, and 0.5 μ g/ml MDA- D_5 , and 40 μ l of a 1 μ g/ml solution of DHBA were added to each sample. Enantiomerically enriched standard solutions of 100 μ g/ml (*S*)-MDMA, (*S*)-HMMA, and (*S*)-HHMA were used for enantiomeric identification. MDA and MDA- D_5 enantiomers were identified as 1 and 2 according their elution order.

Calibration and Quality Control Samples. Calibration curves and quality control samples were prepared by adding appropriate volumes of working racemic solutions to test tubes, each containing 1 ml of drug-free plasma or urine. Quality control samples were prepared with solutions different from those used for the preparation of calibration curves. Final racemate concentrations in the calibration curves were 0.01, 0.05, 0.1, 0.15, and 0.2 μ g/ml (plasma) and 0.2, 0.5, 1, 1.5, and 2 μ g/ml (urine) for MDMA and HMMA; 0.001, 0.005, 0.01, 0.015, and 0.02 μ g/ml (plasma) and 0.02, 0.05, 0.1, 0.15, and 0.2 μ g/ml (urine) for MDA; and 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, and 0.15 μ g/ml (plasma) and 0.1, 0.25, 0.5, 1, and 1.5 μ g/ml (urine) for HHMA. Control plasma and urine samples containing appropriate racemic analytes at different concentrations were prepared in drug-free samples and kept frozen at -20°C in 1-ml aliquots. The concentrations of quality control samples were as follows: 0.012, 0.08, and 0.16 μ g/ml (plasma) and 0.3, 0.8, and 1.6 μ g/ml (urine) for MDMA and HMMA; 0.0012, 0.008, and 0.016 μ g/ml (plasma) and 0.03, 0.08, and 0.16 μ g/ml (urine) for MDA; and 0.012, 0.04, and 0.12 μ g/ml (plasma) and 0.12, 0.4, and 1.2 (urine) for HHMA.

Instrumentation. A gas chromatograph (6890 N; Agilent Technologies, Palo Alto, CA), equipped with a mass selective detector (5973 Network; Agilent Technologies), and an autosampler injector (7683 series; Agilent Technologies) were used. Gas chromatography conditions for chiral analysis included splitless injection mode (1 min); column, Phenomenex (Torrance, CA) cross-linked 5% phenyl/95% dimethylpolysiloxane (15 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m film thickness); injection port temperature, 280 $^{\circ}\text{C}$; carrier gas, helium; flow rate, 1 ml/min; temperature program, from 150 $^{\circ}\text{C}$ to 290 $^{\circ}\text{C}$ at 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$; initial time, 1 min; final time, 7 min; and injection volume, 3 μ l. Mass spectrometry conditions were: selected ion monitoring mode; electron impact, 70 eV; ion source temperature, 280 $^{\circ}\text{C}$. Mass/charge (m/z) values selected for identification of analytes were as follows: 136, 264, 167 (quantification) for MDMA-*N*-MTP; 135, 260, 162 (quantification) for MDA-*N*-MTP; 274, 483; 236 (quantification) for HMMA-*N*-MTP-*O*-TMS; 222; 267, 295 (quantification) for HHMA-*N*-MTP-*O*-bis-TMS; 136, 164, 278 (quantification) for MDMA- D_5 -*N*-MTP; 136, 264, 167 (quantification) for MDA- D_5 -*N*-MTP; 179, 274, 206 (quantification) for pholedrine-*N*-MTP-*O*-TMS; and 179, 499, 268 (quantification) for DHBA-*N*-MTP-*O*-bis-TMS.

Plasma and Urine Sample Preparation. Achiral sample preparation and quantification were performed as described previously (Pizarro et al., 2002b). Chiral quantification was performed by GC/MS after a chiral derivatization. Sample volumes were 500 μ l for plasma and 100 μ l for urine; final volumes of 1 ml were obtained by dilution with the corresponding blank. Extraction was

done as described by Segura et al. (2001). To reconstituted extracts (in 200 μ l of methanol), 4 ml of ethyl acetate/ NH_3 (2%) and an excess of Na_2SO_4 anhydrous were added. Tubes were stacked in an end-to-end mixer at 40 movements per min for 20 min and then centrifuged at 3500 rpm for 10 min. The solvent phase was transferred to a clean tube. This procedure was repeated twice and the final volume of solvent was taken to dryness under nitrogen steam at 40°C, 15 psi. Dried extracts were kept in a vacuum oven (40°C) for 30 min. Finally, derivatization was performed with minor modifications following a previously described procedure (Pizarro et al., 2003): the amine was derivatized using (*R*)-(-)- α -methoxy- α -trifluoromethylphenylacetyl chloride in ethyl acetate/hexane (50:50) that contained 0.015% triethylamine, and phenols were derivatized with 1,1,1,3,3,3-hexamethylidisilazane at 60°C for 1 h.

Validation Procedure. Validation of the GC/MS chiral method was performed according to a 4-day protocol. Linearity of the method was evaluated in the working ranges described previously. Calculations were performed with peak area ratios between compounds and internal standard. A weighted (1/concentration) least-squares regression analysis was used (SPSS computer software package, version 11.5 for Windows; SPSS Inc., Chicago, IL). By quantifying a quadruplicate of the lower concentration of the calibration curves, we estimated the limits of detection and quantification as 3 and 10 S.D. of the calculated concentrations, respectively. Intermediate precision was calculated with the relative S.D. of concentrations calculated for quality control samples, and the interassay accuracy was the relative error of the calculated concentrations.

Pharmacokinetic Data. The noncompartmental analysis (estimation of C_{max} , t_{max} , $\text{AUC}_{0-48 \text{ h}}$ and $\text{AUC}_{\text{total}}$, k_e , and $t_{1/2}$) was performed using Microsoft Excel (PK Functions for Microsoft Excel, Joel I. Usansky, Ph.D., Atul Desai, M.S., and Diane Tang-Liu, Ph.D., Department of Pharmacokinetics and Drug Metabolism, Allergan, Irvine, CA; <http://www.boomer.org/pkin/soft.html>). Pharmacokinetic parameters were estimated separately for each subject and the mean of these estimations (and the standard deviation) are presented in Table 1. Pharmacokinetic data were calculated for mixture of enantiomers obtained with the achiral procedure and also for separated enantiomers. Although the method allowed quantification of MDMA and all its metabolite enantiomers, pharmacokinetic data were only calculated for MDMA, MDA, HHMA, and HMMA.

Results

The pharmacokinetics of MDMA and its main metabolites (MDA, HHMA, and HMMA) after both achiral and chiral quantification in plasma and urine samples from seven healthy volunteers are reported. With regard to the achiral analysis of HHMA, plasma concentrations are not reported since there was not enough of a sample volume to perform GC/MS analysis of MDMA and metabolites except HHMA (Pizarro et al., 2002b). Chiral quantification was performed combining the extraction procedure described for HHMA (Segura et al.,

2001) with the modified two-step chiral derivatization procedures developed for noncatechol MDMA main metabolites (Pizarro et al., 2002b). After extraction, samples were taken to dryness, and an intermediate treatment of the precipitated salts with a mixture of ethyl acetate that contained NH_3 (2%) was needed. A baseline enantiomeric separation was obtained for all the studied compounds in a single run (see Fig. 1).

Validation results were as follows: limits of detection and quantification of MDMA, HMMA, and HHMA enantiomers in plasma were lower than 0.014 and 0.041 $\mu\text{g/ml}$, respectively, and lower than 0.0016 and 0.0047 $\mu\text{g/ml}$ for MDA. For urine analysis, limits of detection and quantification were lower than 0.03 and 0.09 $\mu\text{g/ml}$, respectively, for MDMA, HMMA, and HHMA enantiomers, and lower than 0.002 and 0.007 $\mu\text{g/ml}$ for the enantiomers of MDA. Intermediate precision and interassay accuracy for all quantified enantiomers in plasma were lower than 15.5% and 19.5%, respectively. For urine analysis, intermediate precision was lower than 19.4% and interassay accuracy lower than 15.6% in all cases.

To check the appropriate fitting between chiral and achiral approaches, results obtained using the achiral method were compared with data of chiral analysis [sum of the corresponding (*R*)- and (*S*)-enantiomers] by correlation analysis. For all compounds for which this analysis was performed (MDMA, MDA, and HMMA), the correlation coefficient was higher than $r = 0.92$ both in plasma and urine samples.

Calculated pharmacokinetic parameters for MDMA and its main metabolites as a mixture of its enantiomers and also as each enantiomer taken separately are presented in Table 1. The time course of plasma concentrations of MDMA, MDA, HMMA, and HHMA was monitored for 48 h (see Fig. 2). Urine collection was performed until 72 h post-ingestion, and recoveries of MDMA and metabolites are reported in Table 2. The variability observed is quite acceptable, taking into account enzymes involved in MDMA disposition in humans and not attributable to chemical assays that meet international requirements for bioanalytical method validation. Two enzymes crucial in the metabolic disposition of MDMA, CYP2D6 and COMT, are highly polymorphic in humans. Subjects participating in the study were all phenotypically extensive metabolizers for CYP2D6, whereas COMT phenotype was not examined. Because within the phenotypic label of extensive metabolizers we are including subjects 1) homozygous for the wild-type allele, 2) heterozygous for a mutant and a wild-type allele, and finally, 3) heterozygous/homozygous for less functional alleles *10, *17, and *41, a relatively high variability in

TABLE 1
Pharmacokinetic parameters

	C_{max}	t_{max}	$\text{AUC}_{0-48 \text{ h}}$	$\text{AUC}_{\text{total}}$	k_e	$t_{1/2}$
	ng/ml	h	ng/ml \cdot h ⁻¹	ng/ml \cdot h ⁻¹	h ⁻¹	h
Achiral Results						
MDMA	208.7 \pm 17.1	1.6 \pm 0.4	3108.5 \pm 329.8	3223.4 \pm 425.5	0.07 \pm 0.03	11.8 \pm 4.4
MDA	13.0 \pm 2.3	6.6 \pm 1.9	308.4 \pm 73.1	361.8 \pm 90.9	0.04 \pm 0.01	17.7 \pm 6.2
HMMA	163.8 \pm 71.4	2.8 \pm 0.8	2293.2 \pm 881.5	2293.2 \pm 881.5	0.07 \pm 0.01	10.4 \pm 2.4
Chiral Results						
(<i>R</i>)-MDMA	116.7 \pm 14.3	3.5 \pm 2.1	2158.8 \pm 297.5	2292.8 \pm 490.8	0.06 \pm 0.04	14.8 \pm 9.2
(<i>S</i>)-MDMA	88.8 \pm 17.0	1.9 \pm 0.5	773.0 \pm 83.3	773.0 \pm 83.3	0.16 \pm 0.07	4.8 \pm 1.7
(1)-MDA	1.7 \pm 0.6	15.9 \pm 10.5	52.6 \pm 22.0	52.6 \pm 22.0	0.05 \pm 0.03	18.3 \pm 10.6
(2)-MDA	7.7 \pm 3.9	6.7 \pm 2.5	130.6 \pm 43.4	145.2 \pm 37.2	0.07 \pm 0.04	11.9 \pm 5.4
(<i>R</i>)-HHMA	38.9 \pm 12.4	2.4 \pm 1.9	653.5 \pm 22.2	1104.3 \pm 362.2	0.06 \pm 0.05	42.6 \pm 56.3
(<i>S</i>)-HHMA	90.9 \pm 38.8	2.3 \pm 1.8	999.2 \pm 459.0	1099.7 \pm 538.7	0.10 \pm 0.04	7.9 \pm 2.7
(<i>R</i>)-HMMA	65.0 \pm 26.1	2.9 \pm 0.7	868.9 \pm 453.3	946.2 \pm 501.3	0.06 \pm 0.02	13.5 \pm 4.1
(<i>S</i>)-HMMA	62.1 \pm 21.6	2.6 \pm 0.6	585.3 \pm 216.6	588.2 \pm 216.0	0.12 \pm 0.02	5.9 \pm 1.0

(1)-MDA, first eluted MDA enantiomer; (2)-MDA, second eluted MDA enantiomer.

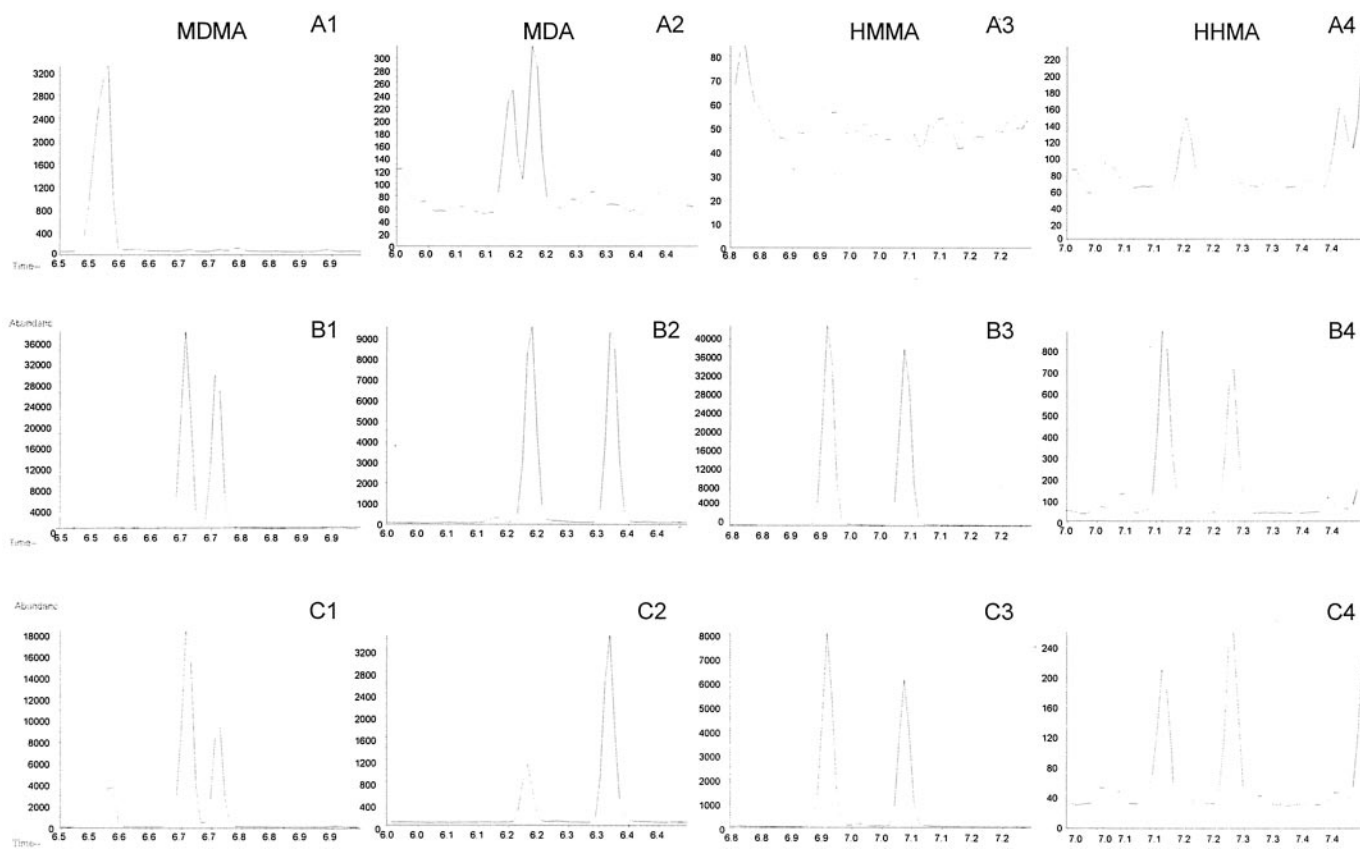


FIG. 1. GC/MS plasma chromatograms of $m/z = 162$ corresponding to MDMA enantiomers (1) and MDA enantiomers (2), $m/z = 236$ corresponding to HMMA enantiomers (3), and $m/z = 295$ corresponding to HHMA enantiomers (4) in plasma blank (A), plasma spiked with 0.2 $\mu\text{g/ml}$ MDMA, 0.02 $\mu\text{g/ml}$ MDA, 0.2 $\mu\text{g/ml}$ HMMA, and 0.15 $\mu\text{g/ml}$ HHMA, and 10 h after drug administration to plasma of a volunteer (C) (calculated concentrations: 0.090 $\mu\text{g/ml}$ and 0.043 $\mu\text{g/ml}$ (*R*)- and (*S*)-MDMA, respectively; 0.0023 $\mu\text{g/ml}$ and 0.0044 $\mu\text{g/ml}$ (*R*)- and (*S*)-MDA, respectively; 0.030 $\mu\text{g/ml}$ and 0.016 $\mu\text{g/ml}$ of (*R*)- and (*S*)-HMMA, respectively; or 0.013 $\mu\text{g/ml}$ and 0.0015 $\mu\text{g/ml}$ of (*R*)- and (*S*)-HHMA, respectively).

drugs in which metabolism is regulated by CYP2D6 is expected. The picture is further compounded by the contribution of COMT.

Enantiomeric ratios for MDA have been calculated assuming that peaks identified as 1 and 2 correspond to the (*R*)- and (*S*)-enantiomer (as for MDMA and other metabolites measured).

Discussion

Chiral analysis of plasma and urine samples was carried out by combining the extraction procedure developed for the high performance liquid chromatography analysis method for HHMA quantification (Segura et al., 2002) and derivatization steps developed for GC/MS determination of enantiomers of MDMA, MDA, HMMA, and HMA (Pizarro et al., 2003). Extraction and derivatization coupling was not achieved easily because chemical properties of extracted samples make it impossible for the target compounds to be derivatized. The presence of considerable amounts of HCl in the elution mixture was responsible for the formation of the corresponding amine chlorhydrate salts making amine reaction unfeasible. Various attempts to neutralize acid excess with different types of bases (organic and inorganic, and also a basic functionalized resin) were unsuccessful (data not shown). The evaporation of extracts to eliminate HCl before the first derivatization step gave rise to the precipitation of antioxidant (metabisulphite) and antichelant (EDTA) reagents required for the extraction. These reagents were insoluble in the mixture of solvents required for derivatization and compounds were still in their chlorhydrate form, preventing the correct reaction. All these findings resulted in the development of a procedure that could eliminate the salts before

derivatization and was able to return all substances to their corresponding alkaline structures. Treatment of the precipitated salts with a mixture of ethyl acetate that contained NH_3 (2%) allowed the recovery of the target compounds and made them ready for the derivatization procedure.

Pharmacokinetic data of the achiral analysis of MDMA and its main metabolites are similar to those in previous reports (de la Torre et al., 2000a). Nevertheless, to our knowledge this is the longest period of time (48 h) ever studied for these compounds and, also, the first time that kinetics of HHMA and HMMA enantiomers have been reported.

The enantiomeric ratios (*R*)/(*S*) for MDMA is around 2.9, and this result is very close to the ratio of 2.4 reported in a previous study (Fallon et al., 1999). The elimination half-life of the (*R*)-enantiomer is 3 times higher than that of the (*S*)-enantiomer (14.8 h versus 4.8 h) and quite similar to the elimination half-life calculated under achiral conditions (11.8 h). This result confirms that (*R*)-MDMA is the major component of the calculated racemic MDMA elimination half-life. Moreover, the half-life of the (*S*)-enantiomer fits very well with the kinetics of subjective effects, psychomotor performance, neuroendocrine-induced changes, and cardiovascular effects observed in humans after the use of MDMA in controlled studies (Mas et al., 1999; Camí et al., 2000). In contrast, the longer half-life calculated for the (*R*)-enantiomer may explain mood and cognitive effects experienced by MDMA consumers on the next days after ingestion (Curran and Travill, 1997). Our current knowledge on the pharmacological activity of MDMA major metabolites HHMA and HMMA is very limited and

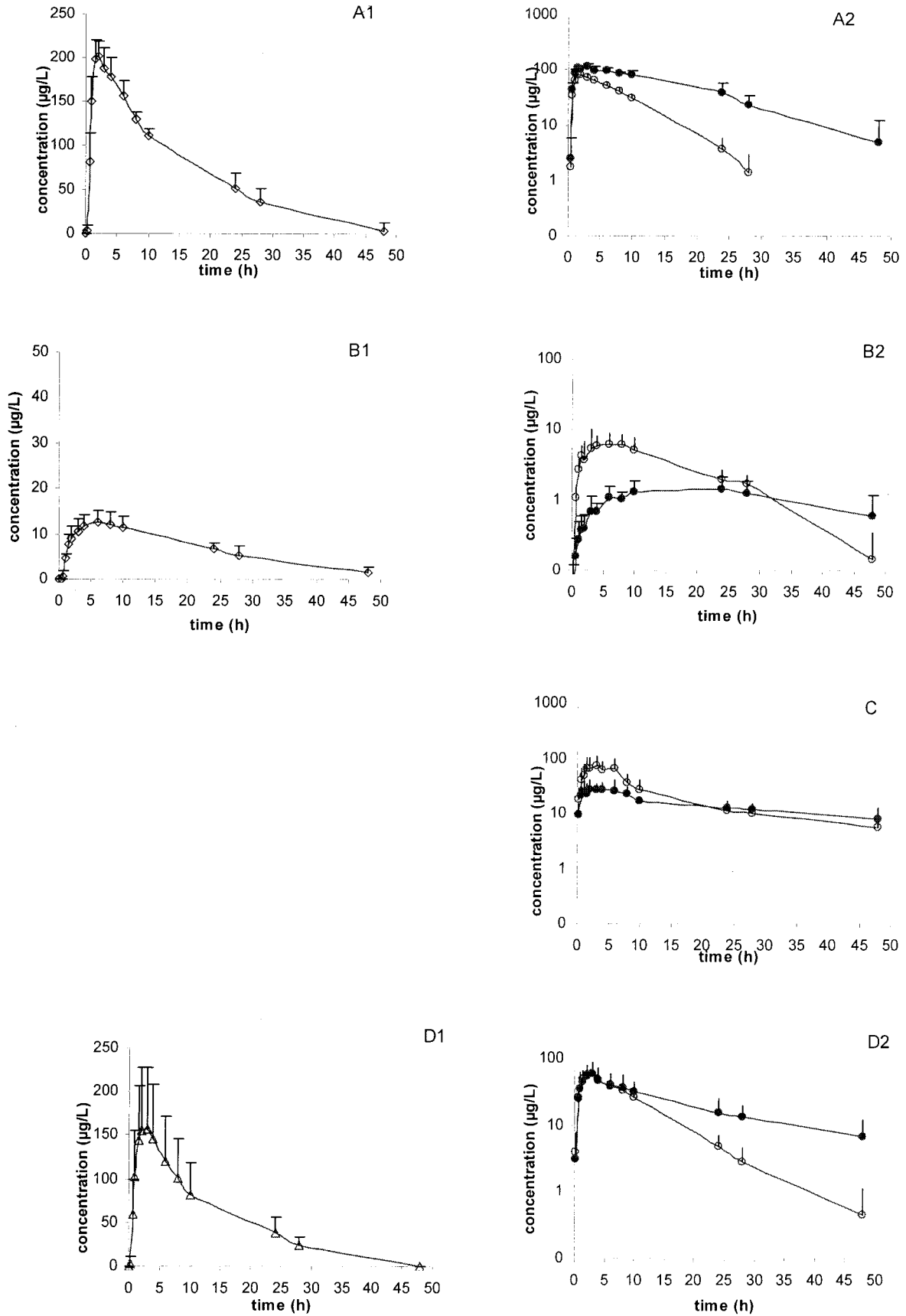


FIG. 2. Time course of MDMA analyzed by the GC/MS achiral method (A1) and its enantiomers analyzed by the GC/MS chiral method (A2), MDA analyzed by the GC/MS achiral method (B1) and its enantiomers analyzed by the GC/MS chiral method (B2), HHMA-separated enantiomers analyzed by the GC/MS chiral method (C), and HMMA analyzed by the GC/MS achiral method (D1) and its enantiomers analyzed by GC/MS chiral method (D2).

TABLE 2
 Urinary recovery

 Values are μmol with percentage of dose recovered calculated in parentheses.

	0–2 h	2–6 h	6–12 h	12–24 h	24–48 h	48–72 h	Overall (0–72 h)
Achiral Results							
MDMA	9.0 \pm 4.1 (1.7)	28.0 \pm 11.0 (5.4)	22.9 \pm 12.4 (4.4)	31.4 \pm 16.6 (6.1)	20.0 \pm 13.5 (3.9)	3.4 \pm 5.2 (0.6)	114.2 \pm 38.1 (22.0)
MDA	0.2 \pm 0.2 (0.04)	1.3 \pm 0.5 (0.3)	1.6 \pm 1.0 (0.3)	2.9 \pm 1.4 (0.6)	2.8 \pm 1.6 (0.5)	0.7 \pm 1.0 (0.1)	9.5 \pm 4.24 (1.8)
HMMA	7.7 \pm 4.0 (1.5)	16.2 \pm 5.3 (3.1)	14.3 \pm 11.2 (2.8)	14.0 \pm 7.8 (2.7)	13.8 \pm 7.2 (2.7)	8.4 \pm 4.8 (1.4)	74.4 \pm 32.7 (14.1)
Chiral Results							
(R)-MDMA	5.6 \pm 2.6 (1.1)	18.9 \pm 7.0 (3.6)	13.9 \pm 6.1 (2.7)	24.8 \pm 14.5 (4.8)	17.1 \pm 11.8 (3.3)	3.5 \pm 5.8 (0.6)	83.1 \pm 28.9 (16.0)
(S)-MDMA	4.6 \pm 2.3 (0.9)	12.8 \pm 4.7 (2.5)	7.3 \pm 2.7 (1.4)	7.2 \pm 4.1 (1.4)	2.3 \pm 1.3 (0.4)	2.3 \pm 4.2 (0.4)	36.1 \pm 10.5 (7.0)
(1)-MDA	0.03 \pm 0.02 (0.01)	0.2 \pm 0.1 (0.05)	0.5 \pm 0.3 (0.09)	1.4 \pm 0.6 (0.3)	2.0 \pm 1.4 (0.4)	0.6 \pm 0.7 (0.1)	4.7 \pm 2.7 (1.0)
(2)-MDA	0.2 \pm 0.1 (0.04)	1.0 \pm 0.4 (0.2)	1.2 \pm 0.8 (0.2)	1.9 \pm 1.1 (0.4)	0.8 \pm 0.5 (0.2)	0.05 \pm 0.07 (0.01)	4.0 \pm 2.5 (1.1)
(R)-HHMA	3.3 \pm 2.1 (0.6)	6.3 \pm 4.9 (1.2)	8.8 \pm 9.0 (1.7)	10.2 \pm 10.2 (2.0)	13.3 \pm 7.4 (2.6)	3.8 \pm 3.8 (0.6)	45.2 \pm 25.5 (8.7)
(S)-HHMA	8.9 \pm 3.2 (1.7)	14.6 \pm 9.5 (2.8)	15.0 \pm 9.1 (2.9)	12.5 \pm 12.0 (2.4)	5.0 \pm 5.1 (1.0)	1.1 \pm 1.5 (0.2)	57.0 \pm 24.2 (11.0)
(R)-HMMA	5.2 \pm 5.1 (1.0)	8.8 \pm 3.8 (1.7)	6.3 \pm 4.3 (1.2)	9.9 \pm 5.4 (1.9)	10.5 \pm 7.7 (2.0)	3.5 \pm 3.8 (0.6)	44.2 \pm 23.8 (8.5)
(S)-HMMA	3.9 \pm 1.8 (0.8)	8.8 \pm 3.8 (1.7)	5.9 \pm 3.7 (1.1)	5.6 \pm 2.7 (1.1)	0.9 \pm 0.9 (0.2)	0.2 \pm 0.1 (0.02)	25.2 \pm 9.9 (4.9)

(1)-MDA, first eluted MDA enantiomer; (2)-MDA, second eluted MDA enantiomer.

their impact on its pharmacology is unknown. Therefore, it would be very speculative to correlate their enantiomers with any pharmacological effect. Thioether adducts derived from HHMA may play a role not only in the development of neurotoxicity but also in some behavioral effects. Their formation in vivo has been reported very recently (Monks et al., 2004), and further studies are guaranteed to investigate their involvement in the pharmacology of MDMA in humans, including chiral aspects of their biological activity and disposition.

MDA enantiomeric ratios <1 are opposed to those observed for MDMA. These results most probably reflect changes in the availability of MDMA enantiomers rather than to an enantioselectivity of this metabolic pathway. Urinary recoveries at 24 h and up to 72 h are close to unity, further confirming the lack of enantioselectivity of this pathway.

Enantiomeric ratios for HHMA are, as expected, just the reverse of those observed for MDMA. However, they are lower (around 0.65) than expected. This observation is most likely related to the nonlinearity of MDMA pharmacokinetics (de la Torre et al., 2000b) due to inhibition of the CYP2D6 enzyme (responsible for enantioselectivity) as a result of the formation of an enzyme-metabolite complex (Delaforge et al., 1999). When CYP2D6 becomes inactivated, the enantioselectivity of the pathway is lost because other cytochrome P450 isoenzymes (CYP1A2, CYP3A4, and CYP2B6) that begin to be involved in the reaction (Kreth et al., 2000) probably lack this chiral selectivity. In fact, enantiomeric ratios observed for MDMA should be greater than those observed in the absence of this process of autoinhibition of the enantioselective pathway.

HMMA enantiomeric ratios should follow the same trend as those of HHMA: (R)/(S) ratio <1 . In practice, however, they follow a trend close to that observed for MDMA [(R)/(S) ratio >1]. In a recent report in which enantiomeric ratios of MDMA and HMMA in urine were determined (Pizarro et al., 2002b), results confirmed MDMA enantioselective disposition, but HMMA (R)/(S) ratios were also close to 1 (first 24 h). Both results may be explained by the autoinhibition of CYP2D6 that, over time and after several metabolic steps (O-demethylation and O-methylation), make differences between enantiomers minimal. Studies in humans, in which racemic MDEA was

administered and MDEA, MDA, and 4-hydroxy-3-methoxyethylamphetamine (the equivalent compound to HMMA in MDMA metabolism) and enantiomers were measured, found that 4-hydroxy-3-methoxyethylamphetamine ratios were lower than 1, although only the first 0 to 4 h in blood samples were assessed (Brunnenberg and Kovar, 2001). This finding is similar to ratios <1 found in our study. The shift in the R/S ratios in the last phase of the kinetics and in urinary recoveries may indicate a certain degree of enantioselectivity of the catechol methyl transferase, an assumption that has to be further substantiated experimentally.

Acknowledgments. We thank Dr. Marta Pulido for editing the manuscript and for editorial assistance.

References

- Brunnenberg M and Kovar K-A (2001) Stereospecific analysis of ecstasy-like *N*-ethyl-3,4-methylenedioxyamphetamine and its metabolites in humans. *J Chromatogr B* **751**:9–18.
- Camí J, Farré M, Mas M, Roset PN, Poudevida S, Mas A, San L, and de la Torre R (2000) Human pharmacology of 3,4-methylenedioxyamphetamine (“Ecstasy”): psychomotor performance and subjective effects. *J Clin Psychopharmacol* **20**:455–466.
- Curran HV and Travill RA (1997) Mood and cognitive effects of \pm 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA, ecstasy): week-end “high” followed by mid-week low. *Addiction* **92**:821–831.
- de Boer D, Tan LP, Gorter P, van de Wal RM, Kettenes-van den Bosch JJ, de Bruijn EA, and Maes RA (1997) Gas chromatographic/mass spectrometric assay for profiling the enantiomers of 3,4-methylenedioxyamphetamine and its chiral metabolites using positive chemical ionization ion trap mass spectrometry. *J Mass Spectrom* **32**:1236–1246.
- Delaforge M, Jaouen M, and Bouille G (1999) Inhibitory metabolite complex formation of methylenedioxyamphetamine with rat and human cytochrome P450. Particular involvement of CYP2D. *Environ Toxicol Pharmacol* **7**:153–158.
- de la Torre R, Farré M, Roset PN, Pizarro N, Segura J, and Camí J (2000a) Pharmacology of MDMA in humans. *Ann NY Acad Sci* **914**:225–237.
- de la Torre R, Farré M, Ortuño J, Mas M, Brenneisen R, Segura J, and Camí J (2000b) Non-linear pharmacokinetics of MDMA (“ecstasy”) in humans. *Br J Clin Pharmacol* **49**:104–109.
- de la Torre R, Farré M, Roset PN, Pizarro N, Abanades S, Segura M, Segura J, and Camí J (2004) Human pharmacology of MDMA: pharmacokinetics, metabolism and disposition. *Ther Drug Monit* **26**:137–144.
- Ensslin HK, Maurer HH, Gouzoulis E, Hermle L, and Kovar K-A (1996) Metabolism of racemic 3,4-methylenedioxyamphetamine in humans. Isolation, identification, quantification and synthesis of urinary metabolites. *Drug Metab Dispos* **24**:813–820.
- Fallon JK, Kicman AT, Henry JA, Milligan PJ, Cowan DA, and Hutt AJ (1999) Stereospecific analysis and enantiomeric disposition of 3,4-methylenedioxyamphetamine (ecstasy) in humans. *Clin Chem* **45**:1058–1069.
- Fantegrossi WE, Godlewski T, Karabenick RL, Stephens JM, Ullrich T, Rice KC, and Woods JH (2003) Pharmacological characterization of the effects of 3,4-methylenedioxyamphetamine

- amine ("ecstasy") and its enantiomers on lethality, core temperature and locomotor activity in singly housed and crowded mice. *Psychopharmacology* **166**:202–211.
- Fantegrossi WE, Ullrich T, Rice KC, Woods JH, and Winger G (2002) 3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDMA, "ecstasy") and its stereoisomers as reinforcers in rhesus monkeys: serotonergic involvement. *Psychopharmacology* **161**:356–364.
- Fitzgerald RL, Blanke RV, and Poklis A (1990) Stereoselective pharmacokinetics of 3,4-methylenedioxyamphetamine in the rat. *Chirality* **4**:241–248.
- Green AR, Mechan AO, JM Elliott, O'Shea E, and Colado MI (2003) The pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA, "Ecstasy"). *Pharmacol Rev* **55**:463–508.
- Hensley D and Cody JT (1999) Simultaneous determination of amphetamine, methamphetamine, methylenedioxyamphetamine (MDA), methylenedioxyamphetamine (MDMA) and methylenedioxyethylamphetamine (MDEA) enantiomers by GC-MS. *J Anal Toxicol* **23**:518–523.
- Johnson MP, Hoffman AJ, and Nichols DE (1986) Effects of the enantiomers of MDA, MDMA and related analogues on [3H]serotonin and [3H]dopamine release from superfused rat brain slices. *Eur J Pharmacol* **132**:269–276.
- Kreth K, Kovar K, Schwab M, and Zanger UM (2000) Identification of the human cytochrome P450 involved in the oxidative metabolism of "Ecstasy" related designer drugs. *Biochem Pharmacol* **59**:1563–1571.
- Lanz M, Brenneisen R, and Thormann W (1997) Enantioselective determination of 3,4-methylenedioxyamphetamine and two of its metabolites in human urine by cyclodextrin-modified capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* **18**:1035–1043.
- Mas M, Farré M, de la Torre R, Roset PN, Ortuño J, Segura J, and Camí J (1999) Cardiovascular and neuroendocrine effects and pharmacokinetics of 3,4-methylenedioxyamphetamine in humans. *J Pharmacol Exp Ther* **290**:136–145.
- Maurer HH, Bickeboeller-Friedrich J, Kraemer T, and Peters FT (2000) Toxicokinetics and analytical toxicology of amphetamine-derived designer drugs ("ecstasy"). *Toxicol Lett* **112–113**:133–142.
- Meyer A, Mayerhofer A, Kovar K-A, and Schmidt WJ (2002a) Enantioselective metabolism of the designer drugs 3,4-methylenedioxyamphetamine ("ecstasy") and 3,4-methylenedioxyethylamphetamine ("eve") isomers in rat brain and blood. *Neurosci Lett* **330**:193–197.
- Meyer A, Mayerhofer A, Kovar K-A, and Schmidt WJ (2002b) Rewarding effects of the optical isomers of 3,4-methylenedioxyamphetamine ("ecstasy") and 3,4-methylenedioxyethylamphetamine ("eve") measured by conditioned place preference in rats. *Neurosci Lett* **330**:280–284.
- Monks TJ, Jones DC, Bai F, and Lau SS (2004) The role of metabolism in 3,4(±)-methylenedioxyamphetamine and 3,4(±)-methylenedioxyamphetamine (ecstasy) toxicity. *Ther Drug Monit* **26**:132–136.
- Moore KA, Mozayani A, Fierro MF, and Poklis A (1996) Distribution of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) and 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) stereoisomers in a fatal poisoning. *Forensic Sci Int* **83**:111–119.
- Nichols DE (1986) Differences between the mechanism of action of MDMA, MBDB and the classic hallucinogens. Identification of a new therapeutic class: entactogens. *J Psychoactive Drugs* **18**:305–313.
- Pizarro N, de la Torre R, Farré M, Segura J, Llebaria A and Joglar J (2002a) Synthesis and capillary electrophoretic analysis of enantiomerically enriched reference standards of MDMA and its main metabolites. *Bioorg Med Chem* **10**:1085–1092.
- Pizarro N, Llebaria A, Cano S, Farré M, Segura J, and de la Torre R (2003) Method development for stereochemical analysis of MDMA and its main metabolites by GC-MS. *Rapid Commun Mass Spectrom* **17**:330–336.
- Pizarro N, Ortuño J, Farré M, Hernández-López C, Pujadas M, Llebaria A, Joglar J, Roset PN, Mas M, Segura J, et al. (2002b) Determination of MDMA and its metabolites in blood and urine by gas chromatography-mass spectrometry and analysis of enantiomers by capillary electrophoresis. *J Anal Toxicol* **26**:157–165.
- Schmid B, Bircher J, Preisig R, and Kupfer A (1985) Polymorphic dextromethorphan metabolism: co-segregation of oxidative O-demethylation with debrisoquin hydroxylation. *Clin Pharmacol Ther* **38**:618–624.
- Segura M, Ortuño J, Farré M, McLure JA, Pujadas M, Pizarro N, Llebaria A, Joglar J, Roset PN, Segura J and de la Torre R (2001) 3,4-Dihydroxyamphetamine (HHMA). A major in vivo 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) metabolite in humans. *Chem Res Toxicol* **14**:1203–1208.
- Segura M, Ortuño J, McLure JA, Pujadas M, Pizarro N, Farre M, Llebaria A, Joglar J, Segura J, and de la Torre R (2002) High-performance liquid chromatography with electrochemical detection applied to the analysis of 3,4-dihydroxyamphetamine in human plasma and urine. *J Chromatogr B* **769**:313–321.
- Spitzer M, Franke B, Walter H, Buechler J, Wunderlich AP, Schwab M, Kovar K-A, Hermle L, and Grön G (2001) Enantio-selective cognitive and brain activation effects of N-ethyl-3,4-methylenedioxyamphetamine in humans. *Neuropharmacology* **41**:263–271.
- White SR, Obradovic T, Imel KM, and Wheaton MJ (1996) The effects of methylenedioxyamphetamine (MDMA, "Ecstasy") on monoaminergic neurotransmission in the central nervous system. *Prog Neurobiol* **49**:455–479.

Address correspondence to: Dr. Rafael de la Torre, Pharmacology Research Unit, Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM), Doctor Aiguader 80, E-08003 Barcelona, Spain. E-mail: rtorre@imim.es

5. DISCUSSIÓ

Els principals resultats han estat presentats com a articles independents en l'apartat 4 d'aquesta memòria. A continuació es discutirà els aspectes més importants de cadascun dels articles agrupats en tres apartats:

Apartat 5.1: LA SÍNTESI

Síntesi orgànica de materials de referència enantiomèricament enriquits.

Apartat 5.2: L'ANÀLISI

Desenvolupaments analítics per a l'anàlisi diastereoselectiva i enantioselectiva de la MDMA i els seus principals metabòlits en fluids biològics.

Apartat 5.3: ELS RESULTATS

Aplicació de la metodologia analítica desenvolupada i els materials de referència a estudis d'administració controlada de la MDMA en humans per tal d'estudiar la farmacocinètica dels enantiòmers de la MDMA i dels seus principals metabòlits.

5.1 LA SÍNTESI

Síntesi orgànica de materials de referència enantiomèricament enriquits.

Per a la quantificació analítica de compostos presents a mostres biològiques es fan servir patrons analítics. Aquests patrons s'afegeixen en concentracions conegudes a una mostra de matriu biològica lliure de fàrmacs i s'analitzen en les mateixes condicions que les mostres reals. D'aquesta manera s'assigna el temps de retenció dels pics dels compostos que es volen estudiar i es mesuren les concentracions *presentes* a les mostres problema.

En el cas de l'anàlisi de compostos quirals, prèviament a la quantificació s'ha de decidir si es tindrà en compte l'estereoquímica dels compostos o bé es farà servir una metodologia convencional que quantifiqui la suma de les parelles d'enantiòmers. Aquestes dues aproximacions analítiques poden ser molt diferents i en cas de fer-se una anàlisi enantioselectiva, un cop separats els enantiòmers cal conèixer la correspondència entre l'ordre d'elució de cada parella de pics cromatogràfics i l'enantiòmer *R* o *S*. *Com que no existeix cap propietat físico-química que permeti predir l'ordre d'elució d'una parella d'enantiòmers i per tant, la inequívoca identificació dels seus pics cromatogràfics requereix de patrons analítics dels enantiòmers per separat o bé de mesclures enantiomèricament enriquides.*

Davant de la quantificació dels enantiòmers de la MDMA i dels seus metabòlits en les mostres biològiques del present estudi, es va haver de tenir en compte que no existeixen patrons comercials dels enantiòmers purs dels compostos que es volien estudiar, de manera que tot i que es va plantejar fer la quantificació dels enantiòmers utilitzant els patrons dels corresponents racemats, el primer problema a resoldre va ser la identificació inequívoca dels diferents enantiòmers.

L'assignació dels pics dels enantiòmers de la MDMA podria fer-se de manera indirecta considerant dades analítiques d'altres autors (Fallon i cols., 1999). L'assumpció d'un determinat ordre d'elució dels enantiòmers tenint en compte els resultats d'altres estudis no és correcta, com no sigui que es reproduïxin exactament les mateixes condicions analítiques. El que sí que es pot fer és, independentment de la metodologia utilitzada, considerar el fet que aquests estudis demostren que la MDMA té un metabolisme enantioselectiu en humans, afavorit per a la (*S*)-MDMA. Així doncs, en els estudis enantioselectius de determinació de la MDMA en fluids biològics humans s'observa que el pic corresponent a la (*S*)-MDMA és més petit que el del seu enantiòmer *R* i segons aquesta dada, una anàlisi enantioselectiva de les mostres ha de donar lloc a dos pics cromatogràfics

en el mateix temps de retenció que un patró racèmic però amb un dels pics més gran que l'altre, de manera que es pot deduir el temps de retenció dels dos enantiòmers de la MDMA.

La mateixa estratègia utilitzada per als enantiòmers de la MDMA es pot utilitzar per deduir el temps de retenció dels enantiòmers de la MDA. El metabolisme enantioselectiu de la MDMA també fa que la relació enantiomèrica de la MDA sigui la contrària que la de la MDMA, al menys durant les primeres hores després de la ingestió del fàrmac. Per a la MDA doncs, es pot assumir que a l'anàlisi d'una mostra de plasma i/o orina corresponent a les primeres hores de l'assaig clínic, el pic més petit i més gran corresponen a la (*R*)-MDA i (*S*)-MDA, respectivament.

L'assignació indirecta dels pics cromatogràfics corresponents als enantiòmers de la MDMA i la MDA però, no es pot fer extensiva als metabòlits majoritaris i tampoc pot ser considerada exhaustiva des del punt de vista científic. Pels metabòlits HHMA i HMMA, no hi ha disponibles patrons de l'HHMA racèmic ni dels enantiòmers de l'HHMA ni de l'HMMA. Per tant, l'assignació inequívoca dels enantiòmers dels metabòlits majoritaris només es pot fer sintetitzant els patrons analítics adients.

En un primer moment, es va plantejar la síntesi de (*R,S*)-HHMA, (*S*)-HHMA i (*S*)-HMMA. Es van triar els enantiòmers *S* pel fet que se'ls hi suposa responsables d'una major activitat al sistema nerviós central. La síntesi dels corresponents enantiòmers *R* es va descartar ja que, coneixent el temps de retenció dels dos pics del racemat i el temps de retenció de l'enantiòmer *S*, es podia conèixer el temps de retenció del corresponent enantiòmer *R* per eliminació. *Pels enantiòmers es va plantejar fer una síntesi de mescles enantiomèricament enriquides i no pas sintetitzar enantiòmers purs, degut al fet que aquests patrons tindrien només una funció d'identificació dels pics cromatogràfics i la quantificació dels enantiòmers a les mostres reals es faria amb el corresponent patró del racemat.*

SÍNTESI DE (*S*)-HHMA

Per a la síntesi de (*S*)-HHMA es van seguir els passos descrits per Pratesi i cols. (1964) per a la síntesi de l'(*S*)-HHA (3,4-dihidroxiamfetamina).

Bàsicament, el procediment consisteix en la síntesi de (*R,S*)-HHA i la resolució del racemat per precipitació amb un àcid tartàric enantiomèricament pur (àcid dibenzoil-D-(+)-tartàric). Les sals obtingudes dels dos enantiòmers són diastereoisomèriques (tenen propietats físiques diferents), de manera que un d'ells precipita de manera selectiva mentre que l'altre roman en dissolució. Per filtració se separen els diastereoisòmers i posteriorment,

es reverteix a l'enantiòmer de la sal que ha precipitat i es continua la síntesi amb aquest enantiòmer. Després de metilar l'amina i desprotegir els grups benzil, s'obté l'(*S*)-HHMA.

Segons el que es descriu a l'article de Pratesi i cols. (1964), la rotació òptica de la sal de l'àcid tartàric és de signe negatiu i l'amina corresponent és de signe positiu. Quan es va intentar reproduir la resolució descrita a la publicació fent servir l'àcid dibenzoil-D-(+)-tartàric, els signes tant del tartrat com de l'amina van resultar de signe contrari als descrits. La utilització de l'àcid dibenzoil-L-(-)-tartàric va donar una sal de signe (+) i una amina de signe (-). Un cop descartats possibles errors en la correcta elecció dels reactius i, en concret, en el signe de l'àcid tartàric, es va suposar que hi devia haver hagut un error dels autors de la publicació que es volia reproduir (Pratesi i cols., 1964), possiblement una equivocació en el moment de triar o etiquetar l'enantiòmer de l'àcid tartàric. Malgrat la sospita, no hi havia cap evidència científica que pogués confirmar cap dels dos resultats i no era factible demostrar per aquesta via quin dels dos enantiòmers de l'àcid tartàric era l'ídoni per a l'obtenció de l'(*S*)-HHMA.

CORRELACIÓ QUÍMICA DE MDMA I HHMA

Es va sintetitzar l'enantiòmer de l'HHMA resultant de la utilització de l'àcid dibenzoil-L-(-)-tartàric i es va mesurar la seva activitat òptica, que va donar signe +. La inequívoca assignació del signe de l'activitat òptica d'aquest enantiòmer es va fer per correlació química amb la MDMA, de la qual estan descrits el signe i la magnitud de l'activitat òptica dels seus enantiòmers. Així doncs, *es va destinar una petita part de l'enantiòmer sintetitzat de l'HHMA a la síntesi de MDMA, que va resultar amb rotació òptica de signe (+) i, per tant, es podia afirmar que es tractava de (S)-(+)-MDMA. Com els passos de síntesi no afecten el centre quiral, es pot concloure que l'enantiòmer de l'HHMA també correspon a l'(*S*)-(+)-HHMA.* Amb aquesta correlació es va poder demostrar que realment hi havia hagut un error a la referència de Pratesi (1964).

Com a conseqüència de la correlació, es va sintetitzar (*S*)-(+)-MDMA, que es va poder fer servir per confirmar de manera directa l'assignació dels pics cromatogràfics dels enantiòmers de la MDMA.

SÍNTESI DE (*R,S*)-HHMA

El mateix procediment utilitzat per a la síntesi de l'(*S*)-HHMA però obviat el pas de resolució es va seguir per sintetitzar el corresponent racemat. En aquest cas, el compost es volia

utilitzar com a patró analític per quantificar aquest compost en fluids biològics amb metodologies enantioselectives i diastereoselectives. Al mètode enantioselectiu també es va poder utilitzar amb finalitats identificatives de l'enantiòmer *R*, coneixent el temps de retenció del corresponent enantiòmer *S*.

SÍNTESI DE (*S*)-HMMA

L'(*S*)-HMMA es va sintetitzar segons una aproximació descrita l'any 1973 per a compostos anàlegs (fenilisopropilamines substituïdes a l'anell) (Nichols i cols., 1973). En aquest cas, la formació de diastereoisòmers es fa per enllaç covalent (síntesi asimètrica) amb (*S*)- α -benzilamina i la separació té lloc en columna de cromatografia. Un cop separats els diastereoisòmers de l'intermedi de reacció, es continua la síntesi fins a obtenir el producte desitjat.

CORRELACIÓ QUÍMICA D'HMMA, MDMA I HHMA

Tot i la viabilitat de la síntesi per a la formació d'HMMA, descrita per a compostos similars (Nichols i cols., 1973), la síntesi d'aquest compost en concret no estava descrita a la literatura i es plantejava un problema d'assignació del signe de la rotació òptica. Com es coneixien els signes de rotació òptica per a la MDMA i l'HHMA, es va decidir sintetitzar el compost dimetoxilat (MMMA) (3,4-dimetoximetanfetamina) des de dues vies paral·leles: *partint per una banda de l'HHMA (metilant els dos grups hidroxil) i per una altra banda de l'HMMA (metilant el seu únic grup hidroxil), es van poder correlacionar químicament els enantiòmers de MMMA, HHMA i HMMA.* Amb la correlació de (+)-MMMA amb (*S*)-HMMA es va poder deduir que el signe (+) corresponia a l'enantiòmer *S* de la MMMA. La MMMA sintetitzada a partir de l'(*S*)-HMMA tenia el mateix signe de rotació òptica que la sintetitzada a partir de l'(*S*)-HHMA i es va poder concloure que l'(*S*)-HMMA també té signe (+).

Emprant diverses aproximacions sintètiques i estudis de correlació, fou possible la preparació dels materials de referència enantiomèricament enriquits, necessaris per als desenvolupaments analítics emprats en els estudis metabòlics en humans.

5.2. L'ANÀLISI.

Desenvolupaments analítics per a l'anàlisi diastereoselectiva i enantioselectiva de la MDMA i els seus principals metabòlits en fluids biològics.

ANÀLISI DIASTEREOSELECTIVA DE LA MDMA I DELS SEUS METABÒLITS PER GC/MS

Els estudis d'administració controlada de MDMA en voluntaris sans s'han portat a terme en la Unitat de Recerca en Farmacologia de l'Institut Municipal d'Investigació Mèdica (URF, IMIM) des de l'any 1997 i des de llavors, s'han posat a punt diferents metodologies (no enantioselectives) per a l'anàlisi de MDMA i els seus metabòlits en fluids biològics.

El primer mètode de quantificació desenvolupat permetia l'anàlisi de MDMA i MDA en plasma i de MDMA, MDA, HMMA i HMA en orina, tots dos casos fent servir GC/NPD (Ortuño i cols., 1999). Més endavant es va incloure la hidròlisi de les mostres de plasma per a la quantificació dels metabòlits hidroxilats (de la Torre i cols., 2000a).

La metodologia desenvolupada per als propòsits del present estudi, que permet l'anàlisi de MDMA, MDA, HMMA i HMA en fluids biològics per GC/MS, va significar un pas endavant respecte del mètode de GC/NPD. Es va mantenir el procediment d'extracció sòlid-líquid i l'acilació dels grups funcionals amino i hidroxil dels analits (Ortuño i cols., 1999). En canvi, *es va decidir canviar de detector cromatogràfic per augmentar la sensibilitat del mètode i eliminar alguns interferents molt comuns en les mostres biològiques* com era el cas de la cotinina, principal metabòlit de la nicotina. L'increment de sensibilitat no fou especialment significativa (en alguns casos es va millorar dos cops els límits de quantificació) però, *es va poder garantir la quantificació dels metabòlits minoritaris MDA i HMA en plasma* de forma rutinària. Pel fet de treballar en GC/MS monitoritzant tres ions específics per a cada analit, es va guanyar en especificitat del mètode en eliminar interferents que no compartien els ions seleccionats en els temps de retenció de referència.

El mètode de GC/MS desenvolupat es va convertir en el mètode de referència per a totes les publicacions que s'han fet sobre el metabolisme i la farmacocinètica de la MDMA i els seus metabòlits en diferents protocols d'assaig clínic en humans. Addicionalment, es va utilitzar com a mètode de referència per tal de validar les determinacions realitzades en els nous desenvolupaments per a l'anàlisi dels enantiòmers de la MDMA i dels seus metabòlits.

ANÀLISI ENANTIOSELECTIVA DE LA MDMA I DELS METABÒLITS MDA I HMMA PER CE/UV

Per a l'estudi del metabolisme enantioselectiu de la MDMA en humans es va triar inicialment utilitzar l'electroforesi capil·lar amb detecció a l'ultraviolat (CE/UV).

Els estudis relacionats amb el metabolisme enantioselectiu de la MDMA publicats a la literatura fan servir majoritàriament la GC/MS per a l'anàlisi de les mostres. Moore i cols., 1996, de Boer i cols, 1997, Hensley i Cody, 1999, i Fallon i cols, 1999 analitzen plasma i/o orina humanes on estudien el perfil enantiomèric de la MDMA i el seu metabòlit MDA. En cap d'aquestes publicacions però, es donen resultats referents als enantiòmers del metabòlit majoritari HMMA. Lanz i cols. (1997) van publicar els primers resultats de l'aplicació d'un mètode d'CE fent servir ciclodextrines com a selector quiral per a l'anàlisi dels enantiòmers de MDMA, MDA i, per primer cop, HMMA. Els resultats de l'HMMA no van ser concloents, ja que només van analitzar l'orina de dos voluntaris i es van arribar a resultats contradictoris. A més a més, els investigadors no comptaven amb patrons dels enantiòmers purs d'HMMA per poder identificar els pics corresponents als seus enantiòmers.

La CE és una metodologia que requereix relativament poc tractament de les mostres i permet treballar amb els compostos sense derivatitzar. Tenint en compte les diferències de polaritat entre els compostos que es volien analitzar i la complexitat inherent als estudis enantioselectius, es va considerar oportú utilitzar aquesta aproximació relativament senzilla per a l'anàlisi de les mostres biològiques del present estudi.

Es va desenvolupar doncs, un mètode d'anàlisi dels enantiòmers de la MDMA, MDA i HMMA en orina. Per a l'anàlisi dels enantiòmers de la MDMA i dels seus metabòlits amb la CE es van tractar les mostres de la mateixa manera que per a una anàlisi convencional. Bàsicament, es va fer una hidròlisi enzimàtica i una extracció sòlid-líquid amb columnes de fase reversa i bescanvi iònic (Bond Elut Certify®), eluint amb acetat d'etil/amoníac (2%). A diferència de l'anàlisi per GC/MS, s'elimina l'eluent amb un corrent de nitrogen controlant la pressió i la temperatura del bany (per tal d'evitar pèrdues dels compostos) i l'extracte es pot analitzar sense posteriors tractaments, només reconstituïnt-lo en 50 µL d'H₃PO₄.

La resolució analítica de les parelles d'enantiòmers és possible gràcies a la presència d'una quantitat determinada de ciclodextrines (CD) en dissolució en el tampó de treball. Es van estudiar diferents tipus de ciclodextrines i diferents condicions de treball per tal d'aconseguir la separació dels enantiòmers de tots els compostos que es volien estudiar (MDMA, MDA, HMMA i HMA). Amb la hidroxipropil-β-ciclodextrina es van poder separar correctament els enantiòmers de la MDMA, HMMA i MDA. No es va aconseguir una separació

idònia dels enantiòmers del metabòlit HMA en cap dels casos. De totes maneres, degut a la major rellevància farmacològica/toxicològica de la resta de metabòlits i a la baixa concentració de l'HMA en fluids biològics, es va decidir no dedicar més esforços en l'estudi enantioselectiu d'aquest compost.

Va ser necessari treballar amb diferents concentracions de CD per a la separació a línia de base dels enantiòmers de la MDMA, MDA i HMMA. Amb una concentració de només 10 mM va ser possible una separació dels enantiòmers de la MDMA i MDA mentre que amb 50 mM d'hidroxiopropil- β -ciclodextrina es van separar els enantiòmers de l'HMMA. Els enantiòmers *R* van eluir primer que els corresponents enantiòmers *S* tant a la MDMA com a l'HMMA. Per a la MDA no es va poder comptar amb els patrons necessaris per a la inequívoca identificació dels seus enantiòmers i en aquest cas, als enantiòmers se'ls hi va assignar un número en funció dels seu ordre d'elució ((1)-MDA i (2)-MDA)).

La presència dels metabòlits de la MDMA en els fluids biològics en diferents concentracions va fer que les mostres requerissin de l'anàlisi de cadascuna d'elles per duplicat. La MDA està present en orina en unes quantitats que van requerir de l'anàlisi d'un mil·lilitre de mostra. En aquestes condicions però, la MDMA i l'HMMA tenen una concentració massa elevada per a la seva correcta quantificació sense saturar el detector. Així doncs, per a la quantificació dels enantiòmers d'aquests dos analits es van diluir 100 μ L d'orina problema en 900 μ L de blanc d'orina.

La metodologia desenvolupada permetia doncs, l'anàlisi dels enantiòmers de la MDMA, MDA i, per primer cop s'aportaven dades dels enantiòmers de l'HMMA. Cada mostra requeria de quatre condicions analítiques: 100 μ L de mostra diluïda a 10 i 50 mM de CD i 1 mL de mostra a 10 i 50 mM de CD.

La informació aportada per la mostra diluïda sobre la MDA però, no es va considerar prou important com per justificar l'esforç i temps requerits per a la obtenció d'aquestes dades, pel que es va decidir descartar la quantificació dels enantiòmers de la MDA a totes les mostres de l'estudi. Malgrat tot, abans de descartar aquesta segona anàlisi es va voler confirmar que els resultats obtinguts fent el duplicat de les mostres requerit per a l'anàlisi dels enantiòmers de tot tres compostos amb les mostres d'un voluntari, es reproduïen els resultats esperats descrits a la bibliografia sobre els enantiòmers de la MDA a d'altres estudis i altres metodologies (Lanz i cols., 1997; Hensley i Cody, 1999; Fallon i cols., 1999). Un cop observat un comportament dels enantiòmers de la MDA com el descrit per a d'altres autors, es van centrar els esforços en els compostos majoritaris MDMA i HMMA.

Tenint en compte totes aquestes consideracions, es van quantificar els enantiòmers de la MDMA, MDA i HMMA de les mostres d'orina d'un voluntari sa que havia pres 100 mg de (*R,S*)-MDMA·HCl. Es van quantificar els enantiòmers de la MDMA i HMMA en les mateixes condicions en l'orina de cinc voluntaris més.

La primera aproximació a l'anàlisi enantioselectiu de la MDMA i de la HMMA va proporcionar dades preliminars d'interès i per primer cop es va validar un mètode per a la seva determinació en orina, disposant de materials de referència adequats per aquest pòsit.

ANÀLISI ENANTIOSELECTIVA PER GC/MS. DESENVOLUPAMENT METODOLÒGIC.

En paral·lel al desenvolupament de la metodologia per CE, a la URF es va desenvolupar un mètode per a la determinació de la HMMA per cromatografia líquida i detector electroquímic (Segura i cols., 2001). El procediment d'extracció de la mostra incloïa l'ús de columnes d'extracció en fase sòlida de bescanvi iònic.

Es va intentar compatibilitzar el mètode d'extracció desenvolupat per a l'HPLC/EC amb l'anàlisi per CE/UV però, l'eluent emprat per a l'extracció, una mescla de metanol amb clorhídric concentrat (1%) i la presència de antioxidants i antiqelants (EDTA i metabisulfit de sodi) es va mostrar incompatible amb la metodologia desenvolupada per CE/UV.

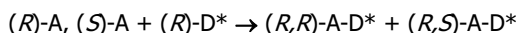
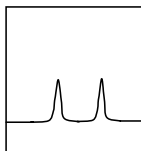
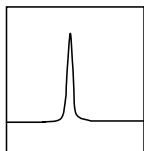
A més a més, tot i que la CE és una metodologia senzilla i que s'ha demostrat la seva aplicabilitat per a l'estudi dels enantiòmers de la MDMA i dels seus principals metabòlits en orina, no és prou sensible per a la quantificació d'aquests compostos en plasma. Malgrat existeixen diferents estratègies analítiques per millorar la sensibilitat de la tècnica, el volum de mostres plasmàtiques disponible al present estudi no permetia analitzar les mostres per duplicat per poder quantificar els compostos presents als fluids biològics en concentracions més elevades (MDMA i HMMA) per separat dels compostos més diluïts a la mostra (MDA). A més a més, el número de mostres per analitzar era elevat i el mètode de CE desenvolupat requereix d'una anàlisi de les mostres en dues condicions analítiques diferents. L'extensió en el temps de l'anàlisi suposa dubtes sobre l'estabilitat de les substàncies al llarg de les dues anàlisis requerides, ja que les mostres s'analitzen sense cap tractament posterior a l'extracció (sense derivatitzar). Tenint en compte tots aquests aspectes, es va considerar oportú centrar els esforços en el desenvolupament d'una metodologia d'anàlisi dels enantiòmers fent servir la GC/MS. La GC/MS és una metodologia idònia per a l'anàlisi de

mostres biològiques perquè el detector és prou selectiu com per poder quantificar els nivells plasmàtics (i urinaris) de les substàncies que es volen analitzar.

Si bé els resultats obtinguts per CE/UV van ser prou interessants (veure més endavant en altres apartats), la sensibilitat obtinguda no va ser l'adequada per a l'anàlisi de mostres de plasma i el procediment d'extracció per a la determinació de la HHMA desenvolupat contemporàniament amb el mètode de CE no va ser compatible amb aquesta metodologia. Tots aquests fets van suggerir prosseguir amb aproximacions analítiques alternatives.

Estratègia de derivatització dels compostos

La GC enantioselectiva de manera directa utilitza columnes capil·lars enantioselectives, que són suficientment inestables com per no considerar el seu ús per a l'estudi de les mostres del present estudi. En aquest cas es va dissenyar un mètode de GC enantioselectiva de manera indirecta, convertint els enantiòmers en diastereoisòmers per reacció amb un derivatitzant enantiomèricament pur (D^*).

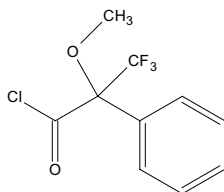


Per a la MDMA i els seus metabòlits, hi ha dos grups funcionals a la molècula susceptibles de ser derivatitzats: un grup amino (primari per a MDA i HMA i secundari per a MDMA i HMMA) i un grup hidroxil (per a l'HMA i HMMA). La transformació d'enantiòmers a diastereòmers es va aconseguir per derivatització dels grups amino amb un reactiu quiral enantiomèricament pur, mentre que es va plantejar la derivatització dels grups hidroxil amb un agent siliant convencional.

Derivatització dels grups amino

Els reactius de derivatització quiral més habituals per a les amfetamines són clorurs d'àcid i, entre ells, el reactiu de Mosher (clorur de $(R)\text{-}(-)\text{-}\alpha\text{-metoxi-}\alpha\text{-trifluorometilfenilacetil}$, $(R)\text{-MTPCI}$) compleix els requisits d'estabilitat necessaris. Aquest derivatitzant es va utilitzar amb

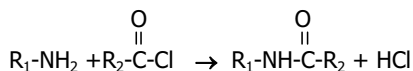
èxit pels autors de les primeres dades farmacocinètiques de MDMA i MDA en humans (Fallon i cols., 1999).



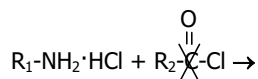
(R)-MTPCI

La MDMA i MDA es diferencien de la HMMA i HMA en els substituents de l'anell benzènic. La part de la molècula amb els grups amino però, és idèntica en la MDMA i HMMA (amines secundàries) i en la MDA i HMA (amines primàries). Des d'aquest punt de vista i malgrat Fallon i cols. (1999) no donen dades relacionades amb els metabòlits hidroxilats, tot fa pensar que la derivatització de les amines dels compostos hidroxilats hauria de funcionar de la mateixa manera que en el cas dels compostos amb anell metilendioxi. Així doncs, es va intentar derivatitzar la HMMA i HMA en les mateixes condicions que els altres compostos tot i que no es va obtenir cap pic cromatogràfic corresponent a aquests dos metabòlits.

La raó per la qual no va funcionar la reacció de derivatització dels compostos hidroxilats és pel fet que la reacció de formació de l'enllaç amida entre l'amina del compost i el clorur d'àcid dona com a subproducte HCl.



Per tal que la reacció funcioni correctament, l'amina ha d'estar com a base lliure i no com a clorhidrat.



A mesura que van formant-se enllaços amida també es va generant HCl, de manera que es forma el clorhidrat de les amines que encara no han reaccionat, disminuint així el rendiment de derivatització.

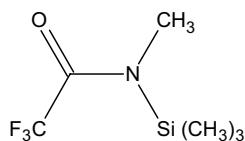
La neutralització de l'HCl que es va formant a la pròpia derivatització es va aconseguir afegint trietilamina (base orgànica) en un percentatge molt baix (0.015%) al medi de reacció. La presència de trietilamina en el procés de derivatització de les amines va provocar

la derivatització dels enantiòmers de l'HMMA i una millora considerable del rendiment de derivatització dels enantiòmers de la MDMA.

La trietilamina en el moment de la reacció de derivatització també va afavorir la reacció incompleta no desitjada dels grups hidroxil de l'HMMA i HMA amb el reactiu de Mosher donant els corresponents èsters (HMMA-*N*-MTP-*O*-MTP i HMA-*N*-MTP-*O*-MTP). Es van provar estratègies de reacció que evitessin la formació de l'enllaç ester (menys temps de derivatització i/o menys proporció de trietilamina) o bé la completa derivatització dels grups hidroxil amb el reactiu de derivatització quiral (augmentant el temps de reacció i/o la proporció de base orgànica), sent totes dues opcions insuficients per als propòsits buscats. L'opció que finalment va donar bons resultats va ser la reacció de completa derivatització de les amines, malgrat es formaven derivats dels hidroxils, per després fer una reversió de la formació d'enllaços èster sense afectar els enllaços amida. Aquesta reversió es va aconseguir amb tractament amb amoníac al 2% durant 20 minuts a 80°C (altres bases, solucions d'amoníac més diluïdes i altres condicions de reacció no van tenir èxit). Com a subproductes van precipitar sals d'amoni que van ser eliminades mitjançant una centrifugació prèvia a la següent derivatització.

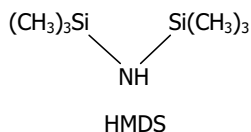
Derivatització dels grups hidroxil

La derivatització dels grups hidroxil de l'HMMA i l'HMA es va fer inicialment amb un agent sililant convencional, el *N*-metil-*N*-trimetilsililtrifluoroacetamida, MSTFA.



MSTFA

Les condicions de sililació dels grups hidroxil amb MSTFA van comportar la sililació de les amines que encara tenien una possibilitat de reacció lliure després de la reacció anterior, les amines de la MDA i HMA. Unes condicions de reacció més suaus no van ser suficient per evitar la formació dels subproductes i es va optar per un agent sililant menys reactiu que la MSTFA, l'hexametildisilazà (HMDS), que va fer la sililació desitjada a 80°C durant 60 minuts.



Aquest desenvolupament analític fou el primer en avaluar de forma sistemàtica les reaccions secundàries a la reacció de derivatització que limitaven d'una banda el rendiment de la reacció i de l'altra la possibilitat de derivatitzar el metabòlits més polars de la MDMA.

ANÀLISI ENANTIOSELECTIVA PER GC/MS. MODIFICACIONS PER A L'INCLUSIÓ DE L'HHMA.

La rellevància de les dades obtingudes de l'intermedi metabòlic HHMA amb la metodologia d'HPLC/EC (Segura i cols., 2002) va fer que es fes l'esforç d'adaptar les metodologies enantioselectives desenvolupades per tal d'incloure l'anàlisi dels enantiòmers d'aquest compost però, es van trobar incompatibles els extractes obtinguts via l'extracció d'HHMA (Segura i cols., 2001) amb el procediment de derivatització descrit (apartat 5.2.3.). Les modificacions necessàries per estudiar els enantiòmers l'HHMA juntament amb els dels altres metabòlits i l'aplicació del mètode d'anàlisi a l'estudi de plasma i orina procedent de voluntaris sans que havien consumit MDMA, han estat acceptades per a la seva publicació a la revista *Drug Metabolism and Disposition*:

Pizarro, N., Farré, M., Pujadas, M., Peiró, A., Roset, P. N., Joglar, J. and de la Torre, R. (2004) Stereochemical analysis of MDMA and its main metabolites in human samples including the catechol-type metabolite (HHMA). *Drug Metab. Disp. (in press)*.

L'HHMA té una estructura tipus catecolamina i, per tant, la seva anàlisi comporta la dificultat pròpia de les propietats físico-químiques d'aquest tipus de compostos. Per a l'estudi simultani dels enantiòmers de tots els compostos, es va acoblar l'extracció dissenyada per a l'anàlisi de l'HHMA per HPLC amb el procediment de derivatització desenvolupat per a l'anàlisi enantioselectiva de la resta de compostos d'interès.

La metodologia de tractament de les mostres per a l'anàlisi no enantioselectiva d'HHMA per HPLC/EC consisteix bàsicament, en un hidròlisi àcida de la mostra amb HCl (0.5N pel plasma i 6N per l'orina) seguida d'una extracció sòlid-líquid amb columnes de

bescanvi catiònic (Strong Cation eXchange®). L'extracció es fa amb una mescla de metanol/HCl (99/1) que conté un 3% Na₂S₂O₅ (antiquelant) i un 3% EDTA (antioxidant). Amb aquest procediment s'extreuen també la MDMA i els altres metabòlits, tot i que l'HPLC/EC no és el mètode més adequat per a l'anàlisi de tots els compostos.

El procés de derivatització desenvolupat per a la quantificació dels enantiòmers de la MDMA, MDA, HMMA i HMA (Pizarro i cols., 2003) va resultar òptim per a la derivatització dels patrons dels enantiòmers del metabòlit tipus catecol HHMA. Quan es va intentar derivatitzar els extractes obtinguts però, les sals necessàries per a la manipulació de l'HHMA suposaven un impediment. Tot i això, el principal problema de l'extracte va ser el fet que l'HCl imprescindible per a l'extracció impossibilitava la derivatització (les amines estaven en forma de clorhidrat).

Es van provar diferents maneres d'eliminar l'antioxidant, l'antiquelant i, especialment l'HCl. Només el tractament de l'extracte dissolt en metanol amb una barreja d'acetat d'etil amb NH₃ (2%) va aconseguir separar els compostos en forma de bases lliures de les sals no desitjades i poder portar a terme el procés de derivatització. La derivatització es va fer tal i com està descrit prèviament (Pizarro i cols., 2003) però modificant la temperatura de la segona derivatització per a la correcta reacció de l'HHMA (HMDS, 60°C, 60 minuts).

La impossibilitat de derivatitzar adequadament la HHMA degut al seu procediment d'extracció (el descrit per el mètode de HPLC/EC) va fer necessari introduir algunes millores en el procediment de derivatització descrit. El desenvolupament final va permetre analitzar per GC/MS els enantiòmers de la MDMA i tots els seus metabòlits en fluids biològics amb un únic procediment d'extracció i de derivatització. Es va aconseguir una molt bona correlació en els resultats obtinguts en la determinació diastereoselectiva de la MDMA i els seus metabòlits i els resultats emprant la metodologia analítica enantioselectiva.

5.3 ELS RESULTATS

Aplicació de la metodologia analítica desenvolupada i els materials de referència a estudis d'administració controlada de la MDMA en humans per tal d'estudiar la farmacocinètica dels enantiòmers de la MDMA i dels seus principals metabòlits.

DADES DELS MÈTODES ENANTIOSELECTIUS VS. DADES DELS MÈTODES DIASTEREOSELECTIUS

Les mostres de plasma i orina analitzades per al present estudi procedeixen d'estudis dissenyats per a altres propòsits. Dificilment fóra justificable fer un estudi específic només per tal d'avaluar la farmacocinètica dels enantiòmers de la MDMA i els seus metabòlits en humans. Per tant, per a l'anàlisi enantioselectiva del plasma hi havia un volum de mostra limitat i en alguns casos no va ser possible analitzar les mostres per duplicat amb les aproximacions enantioselectiva i convencional. Per exemple, l'HHMA només es va poder analitzar en plasma per la metodologia enantioselectiva en l'estudi de MDMA administrat a dosis repetides. Els problemes de limitació de mostra no es van donar en el cas de l'orina, però aquest fluid biològic només pot aportar una informació metabòlica limitada i complementària a les dades farmacocinètiques obtingudes en plasma.

Tot i les limitacions lògiques dels volums de mostra, es van poder realitzar les anàlisis necessàries dels diferents fluids biològics mitjançant les aproximacions convencional i enantioselectiva, que van permetre comparar les diferents metodologies tant en plasma com en orina. L'anàlisi convencional de les mostres es va fer amb 1 mL de plasma i 100 µL d'orina (+900 µL de blanc). Per a l'anàlisi enantioselectiva es van necessitar 500 µL de plasma i 100 µL d'orina, als que es va afegir blanc de la corresponent matriu fins a un mil·lilitre.

Juntament amb l'anàlisi enantioselectiva, les mostres de plasma i orina es van analitzar també des d'un punt de vista convencional. Es van calcular dades farmacocinètiques de la suma dels enantiòmers i dels enantiòmers individuals de la MDMA, MDA i HMMA fins a 48 h post ingesta de 100 mg de (*R,S*)-MDMA·HCl. De l'HHMA només es van calcular dades farmacocinètiques dels enantiòmers pel fet que el volum limitat de plasma disponible va impedir que es pogués fer també l'anàlisi per HPLC.

Pel que fa al mètode de determinació dels enantiòmers de la MDMA, MDA i HMMA en orina per CE, la suma dels nivells urinaris obtinguts per a cadascun dels enantiòmers es va comparar amb les concentracions obtingudes per GC/MS amb la metodologia no enantioselectiva. Es va trobar una molt bona correlació pels nivells urinaris de la MDMA i una

bona correlació pel cas de l'HMMA, sent normalment més petits els nivells d'HMMA obtinguts per CE. La bona correlació entre les concentracions obtingudes per MDMA pels dos mètodes es deu al fet que es tracta d'una molècula molt estable. En el cas del compost hidroxilat HMMA, les petites diferències són causades pel fet que per l'anàlisi per CE no es derivatitza la mostra i el compost en dissolució en el tampó de treball pot patir una petita degradació abans de la seva anàlisi. Aquesta degradació que no s'observa amb la metodologia de GC/MS perquè l'HMMA està derivatitzat i en dissolució en el reactiu de derivatització, sent per tant considerablement més estable.

En el cas del mètode de quantificació dels enantiòmers de la MDMA, MDA, HMMA i HHMA en plasma i orina hi ha una correlació amb els valors obtinguts amb la metodologia no enantioselectiva lleugerament més petita que al cas anterior. Tot i això, es va observar una correlació superior a 0.92 per a la MDMA i HMMA tant al plasma com a l'orina. No es van poder comparar els valors obtinguts per a l'HHMA al plasma perquè el volum de mostra no va ser suficient per realitzar la quantificació per HPLC/EC. Les diferències en les correlacions dels nivells de MDMA i HMMA obtinguts comparant aquestes dues metodologies són fonamentalment degudes a la manipulació a la que se sotmeten les mostres que són analitzades amb la metodologia enantioselectiva. Així, mentre que les mostres que s'analitzen per GC/MS convencional pateixen un tractament de 7-8 h després de la hidròlisi, es triguen aproximadament 12 h per obtenir les mostres correctament derivatitzades per a la determinació dels enantiòmers, a més a més del fet que el tractament requerit per a la quantificació enantioselectiva és més agressiu que per a l'anàlisi convencional. Per una banda, l'eluent utilitzat per a l'extracció s'ha d'evaporar i l'extracte es renta dos cops amb una barreja d'acetat d'etil/amoníac (2%) per tal d'eliminar l'HCl que impedeix la correcta derivatització però provoca una disminució de la recuperació dels analits. Per altra banda, el procés de derivatització necessari per a l'anàlisi enantioselectiva consisteix en tres passos de reacció, clarament en desavantatge respecte a la única derivatització amb MBTFA que requereixen els extractes que s'analitzen amb cromatografia convencional.

PERFILS ENANTIOMÈRICS OBTINGUTS PER CE/UV

Amb la determinació enantioselectiva per CE, es van analitzar les mostres d'orina de 6 voluntaris sans fins a 24h després de l'administració de 100 mg de (*R,S*)-MDMA·HCl i es van mesurar les concentracions dels enantiòmers de MDMA i HMMA. Només en un voluntari es van determinar les concentracions dels enantiòmers de la MDA. En paral·lel, es van fer

determinacions dels nivells plasmàtics i urinaris de MDMA, MDA, HMMA i HMA per GC/MS (metodologia convencional).

Els nivells plasmàtics obtinguts per GC/MS van demostrar que l'HMMA és el metabòlit majoritari en el plasma amb uns nivells superiors en un 5% a la pròpia MDMA (per comparació de AUCs). Aquests nivells però, només s'obtenen després d'hidrolitzar la mostra, ja que està present al plasma com a conjugats glucurono i/o sulfat i en mostres no hidrolitzades, l'HMMA és pràcticament indetectable. Pel que fa a la MDA i HMA, aquests metabòlits representen un 8 i 5%, respectivament, de la concentració de MDMA (també per comparació de AUCs). Es confirma doncs, *que la via majoritària de metabolisme de la MDMA és l'O-demetilació*, a diferència del cas del model de rata, on altres vies són també prou rellevants (p.e. N-demetilació a MDA).

Els nivells urinaris de MDMA, MDA, HMMA i HMA obtinguts per GC/MS confirmen les dades obtingudes al plasma. Tan sols el 44.7% de la dosi administrada és recuperada en forma de MDMA inalterada i metabòlits a l'orina després de 24 h de l'administració. Les determinacions urinàries obtingudes amb les mostres de l'estudi publicat el 2004 demostren que aquesta recuperació no augmenta significativament un cop han transcorregut 72 h (fins a un 58%) després de l'administració del fàrmac. Això en part es degut al fet que els productes metabòlics resultants de la oxidació de la amina no han estat mesurats i es desconeix la seva rellevància des de un punt de vista quantitatiu, tampoc mai s'ha comprovat de forma efectiva el rendiment de la hidròlisi dels conjugats del metabòlits majoritaris ni mai tampoc s'ha avaluat la potencial contribució dels metabòlits resultants de la formació d'adductes amb els compostos dihidroxilats (HHA i fonamentalment HHMA) en la depuració metabòlica de la MDMA en humans. Respecte els metabòlits mesurats, la MDA va suposar un 1.8% de la dosi de MDMA administrada (7.4% de la concentració de MDMA), un percentatge pràcticament idèntic a l'obtingut al plasma. L'HMMA va ser una mica més petita de l'esperada segons els valors plasmàtics, representant un 17.1% dosi (71.7% de la concentració de MDMA), mentre que per contrapartida, l'HMA va ser una mica més alta que al plasma (1.9% dosi, 7.8% de la concentració de MDMA). Aquestes diferències dels metabòlits hidroxilats entre el plasma i l'orina s'explicarien per un metabolisme de l'HMMA cap a HMA, tal i com s'havia suggerit en publicacions anteriors (de la Torre i cols., 2000b).

Amb els nivells dels enantiòmers obtinguts per CE es van calcular les relacions R/S i es va estudiar l'evolució d'aquests perfils enantiomèrics al llarg del temps després de l'administració de la dosi. Per definició, la MDMA administrada és racèmica; és a dir, que la seva relació enantiomèrica és $R/S=1$, dada que es va confirmar experimentalment analitzant

una dissolució metanòlica d'una de les càpsules preparades per a la seva administració als voluntaris.

La relació (R)-MDMA/(S)-MDMA obtinguda a l'orina va resultar >1 i en augment al llarg de tots els períodes de temps de les mostres d'orina de manera exponencial, tal i com s'esperava. Altres autors (Lanz i cols., 1997; Hensley i Cody, 1999; Fallon i cols., 1999) ja van donar dades en humans similars a les presentades en aquest estudi, apuntant cap el metabolisme enantioselectiu de la MDMA afavorit per a l'enantiòmer S.

En el cas del metabòlit minoritari MDA, *la relació d'enantiòmers (1)-MDA/(2)-MDA a l'orina va ser <1 en totes les fraccions urinàries estudiades i en augment fins a l'últim període d'orina estudiada (10-24 h post administració).* Segons els resultats descrits per d'altres autors de l'anàlisi de mostres biològiques d'humans que comptaven amb patrons analítics dels enantiòmers de la MDA (Fallon i cols., 1999; Hensley i Cody, 1999) , el perfil enantiomèric de la MDA correspon a una relació (R)-MDA/(S)-MDA <1. D'aquesta manera, es pot deduir que els enantiòmers 1 i 2 corresponen als enantiòmers (R)-MDA i (S)-MDA, respectivament. Un altre aspecte molt important del perfil enantiomèric de la MDA és el fet que la relació (R)/(S) pateix inversions de signe al llarg del temps. Així doncs, Hensley i Cody (1999) van estudiar el perfil enantiomèric de la MDA de l'orina de voluntaris sans recollida fins a 72 h posteriors a la ingesta del fàrmac i vam poder observar que la relació inicial (R)/(S) <1 d'aquest metabòlit es va transformar en una relació >1 en tots els casos dintre de les 36 h després del consum de la MDMA. Aquesta inversió de la relació (R)/(S) no va poder confirmar-se al present estudi, ja que només es va analitzar l'orina fins a 24h posteriors a la ingestió de la MDMA. En qualsevol cas, el que es va poder observar és una tendència a una relació dels enantiòmers propera a la unitat que fa pensar en la més que probable inversió de la relació en cas que s'haguessin estudiat períodes de temps més enllà de les 24h.

Pel que fa a les dades sobre l'HMMA, s'ha de tenir present que el metabolisme de la MDMA és enantioselectiu en humans i el pas metabòlic responsable d'aquesta depuració enantioselectiva és l'O-demetilenció de la MDMA. L'O-demetilenció de la MDMA dóna l'intermedi metabòlic HHMA i aquest compost dihidroxilat es metila en la posició 3 de l'anell benzènic formant-se l'HMMA. Així doncs, si aquesta demetilenció està afavorida per a la (S)-MDMA, en fluids biològics s'observaran concentracions més elevades de l'enantiòmer R que del S. Tot i que no existeixen dades bibliogràfiques referents a la depuració dels enantiòmers de l'HMMA, la depuració enantioselectiva de la MDMA fa que sembli lògic esperar relacions enantiomèriques per la l'HHMA i HMMA inverses a les obtingudes per a la MDMA; és a dir, més enantiòmer S que R per a aquests dos metabòlits.

Les dades experimentals resultants de la quantificació dels enantiòmers de l'HMMA amb la metodologia de CE van ser prou sorprenents. La relació (R)-HMMA/(S)-HMMA va ser <1 però molt propera a la unitat i no pas, com s'esperava, una diferència de la mateixa magnitud que s'observa pels enantiòmers de la MDMA. La relació enantiomèrica de l'HMMA trobada experimentalment va plantejar diferents qüestions referents al metabolisme de la MDMA. En primer lloc, s'obria la incògnita del paper de l'HMMA en el perfil enantiomèric del metabolisme la MDMA. La relació (R)/(S) obtinguda per a la MDMA no es tradueix en una relació inversa per als enantiòmers de l'HMMA i la clau d'aquest fet podria estar en el perfil enantiomèric del metabòlit intermedi HHMA. En segon lloc, es posa de manifest la rellevància d'altres citocroms de la família P450 en el metabolisme de la MDMA. La pèrdua de les diferències enantiomèriques (conseqüència de l'enantioselectivitat del CYP2D6) en un dels metabòlits majoritaris d'aquesta substància demostren que els altres citocroms responsables de l'O-demetilació de l'anell metilendioxi de l'èxtasi són rellevants en la seva biotransformació i es desconeix si aquests altres enzims tenen o no un comportament enantioselectiu pel metabolisme de la MDMA.

Es va tenir la oportunitat d'analitzar el perfil enantiomèric observat a l'orina d'un voluntari metabolitzador lent per al CYP2D6 (CYP2D6 4*/4*). Es va observar que l'O-demetilació, via majoritària de metabolisme de la MDMA, es dona en un percentatge molt més petit que en el cas dels metabolitzadors ràpids. Aquesta O-demetilació és possible gràcies als altres citocroms de la família CYP i es va observar un perfil enantioselectiu del mateix ordre que pels MR, tot i que de menor magnitud. Tot i ser dades preliminars i que no són objecte dels objectius de la present memòria, aquests resultats plantegen noves incògnites sobre el metabolisme enantioselectiu de la MDMA i les seves implicacions en funció del perfil metabòlic dels seus consumidors.

DADES DELS MÈTODES DIASTEREOSELECTIUS DE GC/MS

L'estudi de determinació dels enantiòmers de MDMA, MDA, HMMA i HHMA en plasma i orina va aportar dades fins a 48 h després de l'administració de 100 mg de (R,S)-MDMA·HCl. Es van calcular els paràmetres farmacocinètics de MDMA, MDA, HMMA i HHMA analitzats amb una determinació diastereoselectiva per GC/MS i amb la quantificació enantioselectiva es van calcular els paràmetres farmacocinètics dels enantiòmers de la MDMA, MDA i, per primer cop, es van mesurar també els paràmetres farmacocinètics dels enantiòmers de l'HMMA i

HMMA. Totes aquestes dades mostren la gran complexitat del metabolisme enantioselectiu de la MDMA en humans.

Les dades obtingudes per GC/MS convencional són molt similars a les dades prèvies, amb HMMA i MDA representant el 73.8 i 9.9%, respectivament, de la concentració de MDMA (per comparació de AUCs). La disminució de percentatge en l'HMMA respecte les dades prèvies és deguda a la variabilitat interindividual pròpia del metabolisme de la MDMA. Tot i que l'enzim majoritàriament responsable del metabolisme de la MDMA a HMMA (intermedi metabòlic previ a l'HMMA) és el CYP2D6 i la població estudiada va ser catalogada com a metabolitzadora ràpida per a aquest enzim, el test de fenotipat utilitzat per avaluar la capacitat metabòlica CYP2D6 només és capaç de discernir entre metabolitzadors lents i altres metabolitzadors, que tot i que es cataloguen com a ràpids, dintre d'aquest subgrup s'inclouen també els metabolitzadors intermedis i els ultraràpids. Només amb un genotipat dels subjectes es podria arribar a discernir entre metabolitzadors intermedis, ràpids i ultraràpids.

Els nivells urinaris de MDMA, MDA, HMMA i HMA obtinguts per GC/MS no enantioselectiva confirmen novament les dades obtingudes al plasma. En aquest cas es recupera després de 48 h de l'administració el 37.9% de la dosi, en forma de MDMA inalterada (22% de la dosi), MDA (1.8% de la dosi ó 8.3% de la concentració de MDMA) i HMMA (14.1% de la dosi ó 65.1% de la concentració de MDMA).

DADES DELS MÈTODES ENANTIOSELECTIUS PER GC/MS

Pel que fa a les dades plasmàtiques dels enantiòmers, *la relació (R)-MDMA/(S)-MDMA és aproximadament 2.9 (relació de AUCs)*, valor molt similar al descrit a l'únic estudi previ relacionat (Fallon i cols., 1999). *Pel que fa als $t_{1/2}$, la (R)-MDMA té un valor tres vegades superior al del enantiòmer S (14.8h vs. 4.8h)*. Aquesta dada, mostra que la (S)-MDMA pràcticament desapareix del plasma transcorregudes 24 h (cinc temps de semivida d'eliminació) després de l'administració del fàrmac mentre que a les 48 h encara es detecten nivells de (R)-MDMA. Segons això, el $t_{1/2}$ calculat amb la metodologia diastereoselectiva està molt influenciada pels nivells de l'enantiòmer R de la MDMA.

Si es té en compte que després de les primeres 24 h de la ingesta el perfil farmacocinètic de la MDMA es podria associar al seu enantiòmer R, semblaria lògic associar els efectes indesitjats del fàrmac a curt termini (24h després de la seva administració) a efectes deguts a la (R)-MDMA. Spitzer i cols. (2001) van descriure una associació similar pels enantiòmers de la MDEA administrats separadament a humans, amb els que també van

trobar que els efectes buscats de la MDEA estarien lligats al seu enantiòmer *S*. Per altra banda, Anderson i cols., (1978) van fer un estudi d'autoadministració dels enantiòmers separats de la MDMA, descrivint que els efectes plaents de la substància només s'aconseguien amb el racemat.

Les relacions enantiomèriques del metabòlit minoritari MDA són oposades a les relacions enantiomèriques de la MDMA, amb un valor inicial <1 i amb tendència a la disminució d'aquestes diferències, tal i com s'ha descrit prèviament (Hensley i Cody, 1999; Fallon i cols., 1999). Aquesta relació enantiomèrica ha estat interpretada com una conseqüència del metabolisme enantioselectiu de la MDMA cap a MDA, tot i que amb les dades actuals dels perfils dels enantiòmers majoritaris, la relació enantiomèrica de la MDA pot ser interpretada més acuradament com un reflex dels canvis en la biodisponibilitat dels enantiòmers de la MDMA. Les dades urinàries de 48 i 72 h després de l'administració són coherents amb aquesta interpretació del perfil enantiomèric de la MDA.

Respecte de la relació enantiomèrica de l'HHMA, s'obté un valor de 0.65. Aquesta relació té una tendència de signe contrari de l'observada per a la MDMA conseqüència de l'enantioselectivitat en l'O-demetilació de la MDMA però és una relació molt més petita de la que es podria esperar si es té en compte la relació enantiomèrica de la MDMA. L'explicació més plausible d'aquesta observació, és que les diferències són més petites de les esperades degut a la farmacocinètica no lineal de la MDMA (de la Torre i cols, 2000b) que té lloc com a conseqüència de la formació d'un complex metabòlit-enzim (Delaforge i cols., 1999). La inactivació del CYP2D6 (enantioselectiu) fa que altres isoenzims CYP no enantioselectius (CYP1A2, CYP3A4 i CYP2B6) juguen un paper més important de l'esperable a partir de dades *in vitro* en la biotransformació de MDMA a HHMA (Kreth i cols., 2000). Aquesta autoinhibició seria la responsable de que les diferències enantiomèriques de la MDMA no siguin encara més significatives.

Finalment, *la relació enantiomèrica de l'HHMA hauria de ser idèntica a la del seu precursor HHMA, si se suposa que la COMT no és enantioselectiva. El que s'observa experimentalment és que aquesta relació enantiomèrica és propera a 1 les primeres 24 h (dades que confirmen les observades a l'orina a l'estudi anterior de determinació per CE) i >1 més tard de les 24 h. Aquesta observació experimental podria indicar una certa enantioselectivitat de la COMT, fet que s'hauria de confirmar amb els estudis pertinents*.

Les dades dels enantiòmers en orina confirmen els resultats obtinguts en plasma. Pel que fa a l'HHMA, la (R)-HHMA suposa el 54.4% de la concentració del seu precursor (R)-MDMA, mentre que el seu enantiòmers (S)-HHMA representa el 157.9% de la concentració

de (*S*)-MDMA, com a conseqüència de l'enantioselectivitat de la via metabòlica. Per a l'HMMA, en canvi, les diferències entre enantiòmers són més petites. Així, la (*R*)-HMMA i la (*S*)-HMMA són un 53.2% i un 69.8% de la concentració dels seus respectius precursors. Aquesta observació és coherent amb una pèrdua de l'enantioselectivitat de l'*O*-demetilenació juntament amb una enantioselectivitat de la reacció consecutiva d'*O*-metilació per part de la COMT. Respecte de la MDA, la (1)-MDA representa un 5.6% de la concentració de (*R*)-MDMA mentre que la (2)-MDA representa un 11.1% de la concentració de (*S*)-MDMA.

6. CONCLUSIONS

-
- La síntesi de materials de referència enantiomèricament enriquits de la MDMA i dels seus principals metabòlits és indispensable per a la inequívoca identificació dels pics cromatogràfics dels enantiòmers d'aquests compostos. Per als propòsits del present treball es van desenvolupar per primer cop la síntesi dels patrons enantiomèricament enriquits dels metabòlits majoritaris de la MDMA: l'HHMA i l'HMMA.
 - El mètode diastereoselectiu de GC/MS desenvolupat és el mètode de referència per a totes les publicacions que s'han fet sobre el metabolisme i la farmacocinètica de la MDMA i els seus metabòlits en diferents protocols d'assaig clínic en humans. Addicionalment, també ha servit com a mètode de referència per tal de validar les determinacions realitzades en els nous desenvolupaments per a l'anàlisi dels enantiòmers de la MDMA i dels seus metabòlits.
 - La metodologia de CE/UV per a la determinació dels enantiòmers de la MDMA i dels seus principals metabòlits aplicada a l'estudi de l'orina de voluntaris que havien consumit (*R,S*)-MDMA va aportar les primeres dades sobre el perfil enantiomèric de l'HMMA en humans. La sensibilitat limitada de la tècnica i la incompatibilitat dels extractes obtinguts per a l'extracció de l'HHMA van fer que no es pogués adaptar el mètode a l'anàlisi de plasma i va suggerir continuar la recerca amb aproximacions analítiques alternatives.
 - L'estudi exhaustiu dels processos de derivatització necessaris per a l'anàlisi enantioselectiva de la MDMA, MDA, HMMA i HMA per GC/MS va permetre la obtenció de derivats únics de l'HMMA, així com una millora considerable del rendiment de derivatització de la MDMA i la MDA. Tot i que el procés descrit també permetia la completa derivatització dels enantiòmers del compost dihidroxilat, HHMA, els extractes obtinguts durant el procés de tractament de la mostra van ser incompatibles amb els processos.
 - L'acoblament d'un mètode d'extracció descrit per a l'anàlisi de l'HHMA per HPLC/CE amb el procés de derivatització necessari per a l'anàlisi enantiomèrica de la MDMA i dels seus principals metabòlits per GC/MS va permetre la quantificació simultània de compostos de polaritats molt diferents i s'han pogut descriure els perfils

enantiomèrics de la MDMA, MDA, HHMA i HMMA en plasma i orina dels voluntaris sans que van participar en un estudi d'administració de MDMA.

- El metabolisme de la MDMA en humans és enantioselectiu, i es tradueix en unes relacions enantiomèriques en fluids biològics (*R*)-MDMA/(*S*)-MDMA més grans que la unitat i en augment al llarg del temps però, de manera continguda. Els fenòmens de la inhibició del metabolisme pel propi substrat (*O*-demetilenació regulada pel CYP2D6) i la implicació d'altres enzims en la mateixa via metabòlica fan que la relació *R/S* no augmenti de manera exponencial.
- L'estudi de la farmacocinètica dels enantiòmers de la MDMA fins a 48 h després de l'administració del fàrmac comparat amb la farmacocinètica obtinguda amb una metodologia que no té en compte les peculiaritats estereoquímiques de la molècula mostren que a partir de les primeres 12-24 h, els nivells plasmàtics de la MDMA són pràcticament deguts a l'enantiòmer *R*. Aquesta observació experimental permetria hipotetitzar en un intent de separar els efectes farmacològics d'ambdós enantiòmers que els efectes psicoactius buscats pels consumidors de MDMA (p.e. efectes entactogènics) segueixen la depuració metabòlica del enantiòmer *S* mentre que els no desitjats descrits després de les primeres 24 h transcorregudes des de la ingesta del fàrmac podrien ser deguts a la (*R*)-MDMA.
- La relació enantiomèrica dels principals metabòlits de la MDMA en fluids biològics, HHMA i HMMA és pràcticament constant i propera a la unitat. El fet que l'*O*-demetilenació tingui un component d'alta afinitat autoinhibible per el propi substrat (regulada pel CYP2D6) i un altre de baixa afinitat regulada per altres isoenzims del citocrom P450 que té rellevància un cop inhibit el CYP2D6 explicaria que la relació d'enantiòmers de l'HHMA i HMMA no sigui inversa a la relació *R/S* de la MDMA.
- La formació de les espècies metabòliques neurotòxiques derivades de la autooxidació dels metabòlits tipus catecol (HHMA i HHA) a les seves corresponents quinones amb posterior formació d'adductes amb nucleòfils tals com el glutatió i la cisteïna no ha estat evidenciada encara en humans a diferència del model de rata. Donada la enantioselectivitat del metabolisme de la MDMA i els diferents perfils farmacològics de cada enantiòmers, en el futur, caldria plantejar-se els aspectes

quirals que poden participar en el efectes neurotòxics dels diferents enantiòmers de les espècies neurotòxiques. Això es justificaria pel fet que el centre estereogènic que participa en la farmacologia diferencial dels enantiòmers està preservat en totes les espècies metabòliques.

7. BIBLIOGRAFIA

Aboul-Enein, H.Y. and Abou-Basha, L.I. (1997) Chirality of drugs hazards. In The impact of stereochemistry on drug development and use. Aboul-Enein, H.Y. and Wainer, I.W. (eds.) John Wiley, NY, 1-20.

Agranat, I. and Caner, H. (1999) Intellectual property and chirality of drugs. *Drug Discov. Today*, **4**, 313-321.

Allenmark, S.G. (1988) Chromatographic enantioseparations: methods and applications. Hellis Horwood Limited, John Wiley & Sons. Chichester, England.

Anderson, G.M. III, Braun, G., Braun, U., Nichols, D.E. and Shulgin, A.T. (1978) Absolute configuration and psychotomimetic activity. *NIDA Res. Mon.*, **22**, 8-15.

Änggård, E., (1977) Handbook of experimental pharmacology. Drug addiction II. Cap. General pharmacology of amphetamine-like drugs, Martin, W.R. and Springer-Verlas (eds.), Berlin, Heidelberg, NY, pp 3-31

Armstrong, D.W. and Jin H.L. (1990) Acylation effects on chiral recognition of racemic amines and alcohols by new polar and non-polar cyclodextrin derivative gas chromatographic phases, *J. Chromatogr.*, **502**, 154-159.

Armstrong, D.W., Li, W. and Pitha, J. (1990) Reversing enantioselectivity in capillary gas chromatography with polar and nonpolar cyclodextrin derivative phases. *Anal. Chem.*, **62**, 214-217.

Baggot J.D. and Davis, L.E. (1973) A comparative study of the pharmacokinetics of amphetamine. *Res. Vet. Sci.* **14**, 207-215.

Bai F., Lau, S.S. and Monks, T.J. (1999) Glutathione and N-acetylcysteine conjugates of alpha-methyltyramine produces serotonergic neurotoxicity: possible role in methylenedioxymphetamine-mediated neurotoxicity. *Chem. Res. Toxicol.*, **12**, 1150-1157.

Banitt, E.H., Schmidt, J.R. and Newmark, R.A. (1986) Resolution of flecainide acetate, N-(2-piperidylmethyl)-2,5-bis-(2,2,2-trifluoroethoxy)benzamide acetate and antiarrhythmic properties of the enantiomers. *J. Med. Chem.*, **29**, 299-302.

Bertilsson, L., Dahl, M.L. Dalén, P. and Al-Shurbaji, A. (2002) Molecular genetics of CYP2D6: clinical relevance with focus of psychotropic drugs. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **53**, 111-122.

Boot, B.P., McGregor, I.S., and Hall, W. (2000) MDMA (ecstasy) neurotoxicity: assessing and communicating the risks. *Lancet*, **355**, 1818-1821.

Brunnenberg, M. and Kovar, K.A. (2001) Stereospecific analysis of ecstasy like *N*-ethyl-3,4-methylenedioxyamphetamine and its metabolites in humans. *J. Chromatogr. B*, **751**, 9-18.

Buechler, J., Schwab, M., Mikus, G., Fisher, B., Hermle, L., Marx, C., Grön, G., Spitzar, M. and Kovar, K.A. (2003) Enantioselective quantitation of the ecstasy compound (*R*)- and (*S*)-*N*-ethyl-3,4-methylenedioxyamphetamine and its major metabolites in human plasma and urine. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **793**, 207-222.

Caldwell, J. (2001) Do single enantiomers have something special to offer? *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.*, **16**, S67-S71.

Camí, J., Farré, M., Mas, M., Roset, P.N., Poudevida, S., Mas, A., San, L. and de la Torre, R. (2000) Human pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy"): psychomotor performance and subjective effects. *J. Clin. Psychopharmacol.*, **20**, 455-466.

Camilleri, P. (ed.) (1994) Capillary electrophoresis. Theory and practice. 2nd ed. CRC press LLC. Florida, USA.

Carvalho, M., Milhazes, N., Remiao, F., Borges, F., Fernandes, E., Amado, F, Monks, T.J., Carvalho, F. and Bastos, M.L. (2004) Hepatotoxicity of 3,4-methylenedioxymphetamine and alpha-methyldopamine in isolated rat hepatocytes: formation of glutathione conjugates. *Arch. Toxicol.*, **78**, 16-24.

Chu, T., Kumagai, Y., DiStefano, E.W. and Cho, A.K. (1996) Disposition of methylenedioxymphetamine and three metabolites in the brains of different rat strains and their possible roles in acute serotonin depletion. *Biochem. Pharmacol.*, **51**, 789-796.

de Boer, D., Tan, L.P., Gorter, P., van de Wal, R.M.A., Kettenes-van den Bosch, J.J., de Bruijn, E.A. and Maes, R.A.A. (1997) Gas chromatographic/mass spectrometric assay for profiling the enantiomers of 3,4-methylenedioxymphetamine and its chiral metabolites using positive chemical ionization ion trap mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, **32**, 1236-1246.

Delaforge, M., Jaouen, M. and Bouille, G. (1999) Inhibitory metabolite complex formation of methylenedioxymphetamine with rat and human cytochrome P450. Particular involvement of CYP 2D. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **7**, 153-158.

de la Torre, R., Ortuño, J., Mas, M., Farré, M. and Segura, J. (1999) Fatal MDMA intoxication. *Lancet*, **13**, 593.

de la Torre, R., Farré, M., Ortuño, J., Mas, M., Brenneisen, R., Roset, P.N., Segura, J and Camí, J. (2000a) Non-linear pharmacokinetics of MDMA (ecstasy) in humans. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **49**, 104-109.

de la Torre, R., Farré, M., Roset, P.N., Hernández-López, C., Mas, M., Ortuño, J., Menoyo, E., Pizarro, N., Segura, J and Camí, J. (2000b) Pharmacology of MDMA in humans. *Ann. NY Acad. Sci.*, **26**, 157-165.

de la Torre, R., Farré, M., Ó Mathúna, B.P., Roset, P.N., Pizarro, N., Segura, M., Torrents, M., Ortuño, J., Pujadas, M. and Camí, J. (2004a) Insights into the involvement of CYP2D6 in MDMA pharmacology in humans . *J Pharmacol Experimental Therap* (submitted).

de la Torre, R. (2004b) Neurotoxicity of MDMA (ecstasy): the limitations of extrapolating from animals to humans. *Trends in Pharmacol. Sci.* (submitted).

Dowling, G.P., McDonough, E.T. and Bost, R.O. (1987). 'Eve' and 'Ecstasy': A Report of Five Deaths Associated with the Use of MDEA and MDMA. *JAMA*. **257**, 1615-1617.

Easson, L.H. and Steadman, E. (1933) Studies on the relationship between chemical constitution and physiological action. V. Molecular dissymmetry and physiological activity. *Biochem. J.* **27**, 1257-1266.

Eichelbaum, M. (1988) Pharmacokinetic and pharmacodynamic consequences of stereoselective drug metabolism in man. *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 93-96.

Eisner, B. (1994) Ecstasy. The MDMA story. Ronin Publishing

Eliel, E.L. and Wilen S.H., (1994) Stereochemistry of organic compounds. Editorial John Wiley and Sons, Inc. NY, USA.

Ensslin, H.K., Maurer, H.H., Gouzoulis, E., Hermle, L. and Kovar, K.A. (1996) Metabolism of 3,4-methylenedioxyethylamphetamine. *Drug Metab. Dispos.* **24**, 813-820.

Esteban, B., O'Shea, E., Camarero, J., Sánchez, V., Green, A.R. and Colado, M.I. (2001) 3,4-methylenedioxymethamphetamine induces monoamine release, but not toxicity, when administered centrally at a concentration occurring following a peripherally injected neurotoxic dose. *Psychopharmacology (Ber.)*, **154**, 251-260.

Fallon, J.K., Kicman, A.T. Henry, J.A., Milligan P.J., Cowan, D.A. and Hutt, A.J. (1999) Stereospecific analysis and enantiomeric disposition of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) in humans. *Clin. Chem.*, **45**, 1058-1069.

Fantegrossi, W.E., Godlewski, T., Karabenick, R.L., Stephens, J.M., Ullrich, T., Rice, K.C. and Woods, J.H. (2003) Pharmacological characterization of the effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") and its enantiomers on lethality, core temperature, and locomotor activity in singly housed and crowded mice. *Psychopharmacol.*, **166**, 202-211.

Fantegrossi, W.E., Woolverton, W.L., Kilbourn, M., Sherman, P., Yuang, J., Hatzidikitriou, G., Ricaurte, G.A., Woods, J.H. and Winger, G. (2004) Behavioural and neurochemical consequences of long-term intravenous self-administration of MDMA and its enantiomers by rhesus monkeys. *Neuropsychopharmacology.*, Feb 16 [Epub ahead of print].

Farré, M., de la Torre, R., Ó Mathúna, B., Roset, P.N., Peiró, A.M., Torrents, M., Ortuño, J., Pujadas, M., and Camí, J. (2004) Repeated doses administration of MDMA in humans: pharmacological effects and pharmacokinetics. *Psychopharmacol.*, **173**, 364-375.

Fitzgerald, R.L., Blanke, R.V. and Poklis, A. (1990) Stereoselective pharmacokinetics of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in the rat. *Chirality*, **2**, 241-248.

Fitzgerald, R.L., Blanke, R.V., Rosecrans, J.A. and Glennon, R.A. (1989) Stereochemistry of the metabolism of MDMA to MDA. *Life Sci.*, **45**, 293-301.

Forsling, M.L., Fallon, J.K., Shah, D., Tilbrook, G.S., Cowan, D.A., Kicman, A.T. and Hutt, A.J. (2002) The effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") and its metabolites on neurohypophysial hormone release from the isolated rat hypothalamus. *Br. J. Pharmacol.*, **135**, 649-656.

Gamella, J.F. y Álvarez, A. (1999) Las rutas del éxtasis. Editorial Ariel, SA. Barcelona.

Garret, E.R., Seyda, K. and Marroum, P. (1991) High performance liquid chromatographic assays of the illicit designer drug "ecstasy", a modified amphetamine with applications to stability, partitioning and plasma protein binding. *Acta Pharm. Nord.* **1**, 9-14.

Gilhooly, T.C. and Daly, A.K. (2002) CYP2D6 deficiency, a factor in ecstasy related deaths? *Br. J. Clin. Pharmacol.* **54**, 69-70.

Glennon, R.A., Little, P.J., Rosecrans, J.A. and Yousif, M. (1987) The effect of MDMA ("ecstasy") and its optical isomers on schedule-controlled responding in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **26**, 425-426.

Glennon, R.A. (1991) Discriminative stimulus properties of hallucinogens and related designer drugs. *NIDA Res. Mon.*, **116**, 25-44.

Gorog, S. and Gazdag, M. (1994) Enantiomeric derivatization for biomedical chromatography. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.*, **659**, 51-84.

Greene, S.L., Dargan, P.I., O'connor, N., Jones A.L. and Kerins, M. (2003) Multiple toxicity from 3,4-methylenedioxyamphetamine ("ecstasy"). *Am. J. Emerg. Med.*, **21**, 121-124.

Grob, C.S., Polans, R.E., Chang, R.E. and Ernst, T. (1996) Psychobiologic effects of 3,4-methylenedioxyamphetamine in humans: methodological considerations and preliminary observations. *Beh. Brain Res.*, **73**, 103-107.

Han, S.M. (1997) Direct enantiomeric separation by high performance liquid chromatography using cyclodextrins. *Biomed. Chromatogr.*, **11**, 259-271.

Han, S.M. and Armstrong, D.W. (1989) Chiral separations by HPLC. Ellis Horwood, Chichester, England. pp. 208-284.

Hardman, H.F., Haavik, C.O. and Seevers, M.H. (1973) Relationship of the structure of mescaline and seven analogs to toxicity and behaviour in five species of laboratory animals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **25**, 299-309.

Harrys, D.S., Baggott, M., Mendelson, J.H., Mendelson, J.E. and Jones, R.T. (2002) Subjective and hormonal effects of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) in humans. *Psychopharmacol.*, **162**, 369-405.

Hartung, T.K., Schofield, E., Short, A.I., Parr, M.J. and Henry, J.A. (2002) Hyponatraemic states following 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") ingestion. *Quart. J. Med.*, **95**, 431-437.

Holsten, D.W. and Schieser, D.W. (1986) Controls over the manufacture of MDMA. *J. Psychoactive Drugs*. **18**, 371-372.

Henry, J.A., Fallon, J.K., Kicman, A.T., Hutt, A.J., Cowan, D.A. and Forsling, M. (1998) Low-dose MDMA ("ecstasy") induces vasopressin secretion. *Lancet*, **351**, 1748.

Henry, J.A. and Hill, I.R. (1998) Fatal interaction between ritonavir and MDMA. *Lancet*, **352**, 1751-1752.

Hensley, D. and Cody, J.T. (1999) Simultaneous determination of amphetamine, methamphetamine, methylenedioxyamphetamine (MDMA) and methylenedioxyethylamphetamine (MDEA) enantiomers by GC-MS. *J. Anal. Toxicol.*, **23**, 518-523.

Hegadoren, K.M., Baker, G.B. and Coutts, R.T. (1995) Analysis of the enantiomers of 3,4-methylenedioxy-N-ethylamphetamine (MDE, "eve") and its metabolite 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) in rat brain. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, **34**, 117-123.

Hindmarch, I. (2001) The enantiomeric debate: current status and future directions. *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.*, **16**, S101-S104.

Hiramatsu, M. and Cho, A.K. (1990) Enantiomeric differences in the effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on extracellular monoamines and metabolites in the striatum of freely-moving rats: an *in vivo* microdialysis study. *Neuropharmacol.*, **3**, 269-275.

Hutt, A.J. and Caldwell, J. (1983) The importance of stereochemistry in the clinical pharmacokinetics of the 2-arylpropionic acid non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Clin. Pharmacokinet.*, **9**, 371-373.

Hutt, A.J. and Tan, S.C. (1996) La quiralidad de los medicamentos y su significación clínica. *Drugs*, **52**, 1-13.

Ichida, A., Shibata, T., Okamoto, I., Yuki, Y., Namikoshi, H. and Toga, Y. (1984) Resolution of enantiomers by HPLC on cellulose derivatives. *Chromatographia*, **19**, 280-284.

Infante, C., Barrio, G. y Martín, E. (2003) Tendencias, características y problemas asociados al consumo de drogas recreativas en España. *Adicciones*, **15**, 77-96.

Jeckins A.J. and Cone, E.J. (1998) Pharmacokinetics: drug absorption, distribution and elimination. *Drug Abuse Handbook*. Ed. Karch, S.B. CRC. Press, Boca Ratón, FL. pp.151-201.

Johnson, M.P., Hoffman, A.J. and Nichols, D.E. (1986) Effects of the enantiomers of MDA, MDMA and related analogues on [³H]serotonin and [³H]dopamine release from superfused rat brain slices. *European J. Pharmacol.*, **132**, 269-276.

König, W.A. (1993) Enantioselective gas chromatography. *Trends Anal. Chem.*, **12**, 130-137.

Kraemer, T. and Maurer, H.H. (2002) Toxicokinetics of amphetamines: metabolism and toxicokinetic data of designer drugs, amphetamine, methamphetamine, and their *N*-alkyl derivatives. *Ther. Drug Monitor.*, **24**, 277-289.

Kreth, K., Kovar, K.A., Schwab, M. and Zanger, U.M. (2000) Identification of the human cytochromes P450 involved in the oxidative metabolism of "ecstasy" related designer drugs. *Biochem. Pharmacol.*, **59**, 1563-1571.

- Lanz, M., Brenneisen, R. and Thormann, W. (1997) Enantioselective determination of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and two of its metabolites in human urine by cyclodextrin-modified capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*, **18**, 1035-1043.
- Liechti, M.E. and Vollenweider, F.X. (2001) Which receptor mediate subjective effects of MDMA in humans? A summary of mechanistic studies. *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.*, **16**, 589-598.
- Lim, H.K., Su, Z. and Foltz, R.L. (1993) Stereoselective disposition: enantioselective quantitation of 3,4-(methylenedioxy)methamphetamine and three of its metabolites by gas chromatography/electron capture negative ion chemical ionization mass spectrometry. *Biol. Mass Spectrom.*, **22**, 403-411.
- Lorenzo, P. y Lizasoain, I. (2003) Características farmacológicas de las drogas recreativas (MDMA y otras amfetaminas, ketamina, GHB, LSD y otros alucinógenos). *Adicciones*, **15**, 51-75.
- Marez, D., Legrand, M., Sabbagh, N., Lo Guidice, J.M., Spire, C., Lafitte, J.J., Meyer, U.A. and Broly, F. (1997) Polymorphism of the cytochrome P450 CYP2D6 gene in a European Population: characterization of 48 mutations and 53 alleles, their frequencies and evolution. *Pharmacogen.*, **7**, 193-202.
- McCann, U.D., Eligulashvili, V. and Ricaurte, G.A. (2000) (\pm) 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy")-induced serotonin neurotoxicity: clinical studies. *Neuropsychobiology*, **42**, 11-16.
- McCann, U.D. and Ricaurte, G.A. (1991) Major metabolites of (+/-)3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) do not mediate its toxic effects on brain serotonin neurons. *Brain Res.*, **545**, 279-282.
- Mas, M., Farré, M., de la Torre, R., Roset, P.N., Ortuño, J., Segura, J., and Camí. (1999) Cardiovascular and neuroendocrine effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **90**, 136-145.

Matsushima, K., Nagai, T. and Kamiyama, S. (1998) Optical isomer analysis of 3,4-methylenedioxyamphetamine analogues and their stereoselective disposition in rats. *J. Anal. Toxicol.*, **22**, 33-39.

Maurer, H.H. (1996) On the metabolism and the toxicological analysis of methylenedioxymethamphetamine designer drugs by gas chromatography-mass spectrometry. *Ther. Drug Monitor.*, **18**, 465-470.

Maurer, H.H., Bickeboeller-Friedrich, J., Kraemer, T., and Peters, F.T. (2000) Toxicokinetics and analytical toxicology of amphetamine-derived designer drugs (ecstasy). *Toxicol. Lett.*, **112-113**, 133-142.

Mendelson, J., Jones, R. Upton, T. and Jacob III, P. (1995) Methamphetamine and ethanol interactions in humans. *Clin. Pharmacol. Ther.* **57**, 559-568.

Menéndez, J.C. (1997) Introducción a la química farmacéutica. Avedaño, C. (ed.), Mc Graw-Hill Interamericana, pp.807-842.

Menges, R.A. and Armstrong, D.W. (1991) Chiral separations by liquid chromatography. American Chemical Society, Washington DC, USA. pp. 67-100.

Meyer, A., Mayerhofer, A., Kovar, K.A. and Schmidt, W.J. (2002) Enantioselective metabolism of the designer drugs 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") and 3,4-methylenedioxyethylamphetamine ("eve") isomers in rat brain and blood. *Neurosci.*, **330**, 193-197.

Mizutani, T. (2003) PM frequencies of major CYPs in Asians and Caucasians. *Drug Metab. Rev.*, **35**, 99-106.

Monks, T.J., Bai, F., Miller, R.T., Miller R.T. and Lau, S.S. (2001) Serotonergic neurotoxicity of methylenedioxyamphetamine and methylenedioxymethamphetamine. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **500**, 397-406.

Moore, K.A., Mozayani, A., Fierro, M.F. and Poklis, A. (1996) Distribution of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) stereoisomers in a fatal poisoning. *Forensic Sci. Int.*, **83**, 111-119.

Morgan, M.J. (2000) (MDMA): a review of its possible persistent psychobiological effects. *Psychopharmacology*, **152**, 230-248.

Musshoff, F. (2000) Illegal or legitimate use? Precursor compounds to amphetamine and methamphetamine. *Drug Metab. Rev.*, **32**, 15-44.

Nichols, D.E. (1986) Differences between the mechanism of action of MDMA, MBDB, and the classic hallucinogens. Identification of a new therapeutic class: entactogens. *J. Psychoactive Drugs*, **18**, 305-313.

Nichols, D.E., Barfknecht, C.F. and Rusterholz, D.B. (1973) Asymmetric synthesis of psychotomimetic phenylisopropylamines. *J. Med. Chem.*, **16**, 480-483.

Nichols, D.E., Lloyd, D.H., Hoffman, A.J., Nichols, M.B. and Yim, G.K.W. (1982) Effects of certain hallucinogenic amphetamine analogues on the release of [³H]serotonin from rat brain synaptosomes. *J. Med. Chem.*, **25**, 530-535.

Nichols, D.E. and Oberlender, R. (1989) Structure-activity relationships of MDMA-like substances. *NIDA Res. Mon.*, **94**, 1-29.

Nichols, D.E. and Shulgin, A.T. (1976) Sulfur analogs of psychotomimetic amines. *J. Pharm. Sci.*, **65**, 1554-1556.

Ortuño, J., Pizarro, N., Farré, M, Mas, M., Segura, J., Camí, J., Brenneisen, R. and de la Torre, R. (1999) Quantification of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and its metabolites in plasma and urine by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *J. Anal. Toxicol.*, **723**, 221-232.

Pacifici, R., Zuccaro, P., Farré, M., Pichini, S., Di Carlo, S., Roset, P.N., Hernández-López, C., Ortuño, J., Segura, J., Camí, J. and de la Torre, R. (2000) Immunomodulation activity of MDMA *Ann. NY Acad. Sci.*, **914**, 215-224.

Pacifici, R., Zuccaro, P., Farré, M., Pichini, S., Di Carlo, S., Roset, P.N., Ortuño, J., Pujadas, M., Bacosi, A., Menoyo, E., Segura, J. and de la Torre, R. (2001a) Effects of repeated doses of MDMA (ecstasy) on cell-mediated immune response in humans. *Life Sci.*, **69**, 2931-2941.

Pacifici, R., Zuccaro, P., Farré, M., Pichini, S., Di Carlo, S., Roset, P.N., Ortuño, J., Segura, J. and de la Torre, R. (1999) Immunomodulating properties of MDMA alone and in combination with alcohol: a pilot study. *Life Sci.*, **65**, 309-316.

Pacifici, R., Zuccaro, P., Farré, M., Pichini, S., Di Carlo, S., Roset, P.N., Palmi, I., Ortuño, J., Menoyo, E., Segura, J. and de la Torre, R. (2002) Cell-mediated immune response in MDMA users after repeated dose administration: studies in controlled versus noncontrolled settings. *Ann. NY Acad. Sci.*, **965**, 421-433.

Pacifici, R., Zuccaro, P., Hernández-López, C., Pichini, S., Di Carlo, S., Farré, M., Roset, P.N., Ortuño, J., Segura, J. and de la Torre, R. (2001b) Acute effects of MDMA alone and in combination with ethanol on the immune system in humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **296**, 207-215.

Peters, F.T., Kraemer, T. and Maurer, H.H. (2002) Drug testing in blood: validated negative-ion chemical ionization gas chromatography-mass spectrometric assay for determination of amphetamine and methamphetamine enantiomers and its application to toxicology cases. *Clin. Chem.*, **48**, 1472-1485.

Peters, F.T., Samyn, N., Wahl, M., Kraemer, T., De Boeck, G. and Maurer, H.H. (2003) Concentrations and ratios of amphetamine, methamphetamine, MDA, MDMA, and MDEA enantiomers determined in plasma samples from clinical toxicology and driving under the influence of drug cases by GC-NICI-MS. *J. Anal. Toxicol.*, **27**, 552-559.

Pizarro, N., de la Torre, R., Farré, M., Segura, J., Llebaria, A. and Joglar, J. (2002a) Synthesis and capillary electrophoretic analysis of enantiomerically enriched reference standards of MDMA and its main metabolites. *Bioorg. Med. Chem.*, **10**, 1085-1092.

Pizarro, N., Farré, M., Pujadas, M., Peiró, A., Roset, P. N., Joglar, J. and de la Torre, R. (2004) Stereochemical analysis of MDMA and its main metabolites in human samples including the catechol-type metabolite (HHMA). *Drug Metab. Disp.*, (in press).

Pizarro, N., Llebaria, A., Cano, S., Joglar, J., Farré, M., Segura, J. and de la Torre R. (2003) Stereochemical analysis of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and its main metabolites by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **17**, 330-336.

Pizarro, N., Ortuño, J., Farré, M., Hernández-López, C., Pujadas, M., Llebaria, A., Joglar, J., Roset, P.N., Mas, M., Segura, J., Camí, J. and de la Torre, R. (2002b) Determination of MDMA and its metabolites in blood and urine by gas chromatography-mass spectrometry and analysis of enantiomers by capillary electrophoresis. *J. Anal. Toxicol.*, **26**, 157-165.

Pratesi, P., La Manna, A. and Grana, E. (1964) Derivati della fenilisopropilamina. Preparazione e configurazione delle 3,4-diossiamfetamine otticamente attive. *Il Farmaco Ed. Sci.*, **19**, 529-536.

Reist, M., Carrupt, P.-A., Francotte, E. and Testa, B. (1998) Chiral inversion and hydrolysis of thalidomide: mechanisms and catalysis by bases and serum albumin, and chiral stability of teratogenic metabolites. *Chem. Res. Toxicol.*, **11**, 1521-1528.

Rodríguez, J., Agulló, E. y Agulló, M.S. (2003) Jóvenes, fin de semana y uso recreativo de drogas: evolución y tendencias del ocio juvenil. *Adicciones*, **15**, 7-32.

Sachse, C., Brokmoller, J., Bauer, S., and Roots, I. (1997) Cytochrome P450 2D6 variants in a caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am. J. Hum. Gen.*, **60**, 284-295.

Saíz, P.A., García-Portilla, P., Paredes, B. and Bobes, J. (2003) Evolución histórica del uso y abuso de MDMA. *Adicciones*, **15**, 35-49.

Schenkman, J.B. (2000) Cytochromes P450: historical overview. Levy, R.H., Thummel, K.E., Hausten, P.D. and Eichelbaum, M. (eds.) *Metabolic drug interactions*, Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, pp.51-60.

Schmidt, C.J. (1987) Neurotoxicity of the psychedelic amphetamine, methylenedioxymethamphetamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **240**, 1-7.

Shulgin A.T. and Nichols D.E. (1978) Characterization of three new psychotomimetics. The pharmacology of hallucinogens. From: *The Psychopharmacology of Hallucinogens*, Stillman, R. C. Willette, R. E. (Eds). New York; Pergamon.

Shulgin, S. and Shulgin, A. (1991) *PIHKAL: A Chemical Love Story*. Transform Press.

Segura, M., Ortuño, J., Farré, M., McLure, J.A., Pujadas, M., Pizarro, N., Llebaria, A., Joglar, J., Roset, P.N., Segura, J. and de la Torre, R. (2001) 3,4-dihydroxymethamphetamine (HHMA). A major in vivo 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) metabolite in humans. *Chem. Res. Toxicol.*, **14**, 1203-1208.

Segura, M., Ortuño, J., McLure, J.A., Pujadas, M., Pizarro, N., Farré, M., Llebaria, A., Joglar, J., Segura, J. and de la Torre, R. (2002) High-performance liquid chromatography with electrochemical detection applied to the analysis of 3,4-dihydroxymethamphetamine in human plasma and urine. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **769**, 313-321.

Skidmore M. W. (1993) Derivatization for chromatographic resolution of optically active compounds. *Handbook of derivatives for chromatography*. Blau, K. and Halket, J. (eds.). England, pp. 215-252.

Spitzer, M., Franke, B., Walter, H., Buechler, J., Wunderlich, A.P., Schwab, M., Kovar, K.A., Hermle, L. and Grön, G. (2001) Enantio-selective cognitive and brain activation effects of N-ethyl-3,4-methylenedioxyamphetamine in humans. *Neuropharmacol.*, **41**, 263-271.

Sun, X.X., Sun, L.Z., Aboul-Enein, H.Y. (2001) Chiral derivatization reagents for drug enantioseparation by high-performance liquid chromatography based upon pre-column derivatization and formation of diastereomers: enantioselectivity and related structures. *Biomer. Chromatogr.*, **15**, 116-132.

Sybilska, D. and Zukowski, J. (1989) Cyclodextrin additives in chiral separations by HPLC, Ellis Horwood Ltd., Chichester, pp. 147-172.

Toyo'oka, T., Liu, Y.M., Jinno, H., Hanioka, N. Ando, M. and Imai, K. (1994) Chiral separation of amines by high-performance liquid chromatography after tagging with 4-(*N,N*-dimethylaminosulphonyl)-7-(2-chloroformylpyrroli-2,1,3-benzoxadiazole). *Biomed. Chromatogr.*, **8**, 85-89.

Tucker, G.T. and Lennard, M.S. (1990) Enantiomer specific pharmacokinetics. *Pharmacol Ther.*, **45**, 309-329.

Tucker, G.T., Lennard, M.S., Ellis, S.W. Woods, H.F., Cho, A.K., Lin, L.Y., Hiratsuka, A., Schmitz, D.A. and Chu, T.Y.Y. (1994) The demethylenation of methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") by debrisoquine hydroxylase (CYP2D6). *Biochem. Pharmacol.*, **47**, 1151-1156.

Vlasses, P.H., Rotmensch, H.H., Swanson, B.N., Irving, J.D., Johnson, C.L., and Ferguson R.K. (1984) Indacrinone: nautriretic and uricosuric effects of various ratios of its enantiomers in healthy men. *Pharmacother.*, **4**, 272-277.

Vollenweider, F.X., Gamma, A., Liechti, M., Huber, T. (1988) Psychological and cardiovascular effects and short-term sequelae of MDMA ('ecstasy') in MDMA-naive healthy volunteers. *Neuropsychopharmacology.* **19**, 241-251.

Vollhardt K.P.C. (1992) Química orgánica. Ediciones Omega SA. Barcelona.

Wainer, I.W. (2001) The therapeutic promise of single enantiomers: introduction. *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.*, **16**, S73-S77.

Wozniak, T.J. Bopp, R.J. and Jensen, E.C. (1991) Chiral drugs; an industrial analytical perspective. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **9**, 363-382.

Wu, D., Otton, V., Inaba, I., Kalow, W. and Sellers, E.M. (1997) Interactions of amphetamine analogs with human liver CYP2D6. *Biochem. Pharmacol.*, **53**, 1605-1612.

Yang, J., Heydari, A., Yeo, K.R., Farre, M. and de la Torre, R. Rostami-Hodjegan A, Tucker GT. Mechanism-based inhibition of CYP2D6 by MDMA (Ecstasy): implications for the pharmacokinetics of MDMA Pharmacokinetics (UK) 2003 PKUK Meeting, Liverpool, 5-7 de November 2003.

Zhu, B.T. (2002) Catechol-*O*-methyltransferase (COMT)-mediated methylation metabolism of endogenous bioactive catechol and modulation by endobiotics and xenobiotics: importance in pathophysiology and pathogenesis. *Curr. Drug Metab.*, **3**, 321-349.

8. GLOSSARI

- Activitat òptica:** angle de rotació d'un plànol de llum polaritzada.
- Aquiral:** entitat superposable amb la seva imatge en un mirall.
- Asimètric:** sense elements de simetria.
- Carboni asimètric:** àtom de carboni amb quatre substituents diferents.
- Centre asimètric:** sinònim incorrecte de centre quiral.
- Centre estereogènic:** àtom, eix, pla o punt a l'espai responsable de l'estereoisomeria d'una estructura.
- Centre quiral:** àtom responsable de l'estereoisomeria d'una molècula.
- Cis-trans:** nomenclatura pels diastereoisòmers dels alquens i cicles.
- Configuració absoluta:** disposició tridimensional dels àtoms a la molècula.
- Configuració relativa:** disposició espacial dels elements estructurals d'una molècula per comparació entre ells.
- Diastereoisòmers:** estereoisòmers que no tenen relació d'un objecte i la seva imatge especular.
- d,l:** nomenclatura obsoleta de caracterització dels enantiòmers, actualment substituïda per (+) i (-), respectivament.
- D,L:** descriptors configuracionals pels carbohidrats i aminoàcids.
- Distòmer:** en un fàrmac quiral, l'enantiòmer menys actiu.
- Enantiòmers:** compostos que tenen la mateixa relació que un objecte i la seva imatge en un mirall.
- Enantiomèricament pur:** compost que té un 100% d'excés enantiomèric.
- Epimerització:** interconversió d'estereoisòmers mitjançant el canvi de configuració d'un o més elements estereogènics.
- Epímers:** diastereoisòmers amb diferents centres estereogènics que només es diferencien en la configuració d'un d'ells.
- Estereoespecificitat:** l'ús de precursors estereoquímicament diferents per donar productes finals també estereoquímicament diferents. Una reacció estereoespecífica és també estereoselectiva, però no és certa l'afirmació inversa. Aquesta definició es pot fer extensiva als termes *enantioselectivitat* i *diastereoselectivitat*.
- Estereoisòmers:** compostos que tenen la mateixa fórmula molecular, els seus àtoms estan enllaçats en el mateix ordre però amb diferent distribució espacial.
- Estereoquímica:** part de la química que estudia l'estructura en tres dimensions.

Esteroselectivitat: la selecció d'un estereoisòmer amb preferència a un altre possible estereoisòmer. Aquesta definició es pot fer extensiva als termes *enantioselectivitat* i *diastereoselectivitat*.

Èntomer: en un fàrmac quiral, l'èntomer més actiu.

Excés enantiomèric (e.e.): en una mescla d'un enantiòmer pur (*R* o *S*) amb un racemat (*RS*), l'e.e. es el percentatge d'excés de l'enantiòmer sobre el racemat.

$$e.e. = \frac{|R - S|}{R + S} \times 100 = |\%R - \%S|$$

Homoquiral: molècules o sistemes amb tots els seus centres estereogènics amb el mateix sentit de quiralitat (tots *R* o tots *S*). Aquest terme no és correcte utilitzar-lo per descriure substàncies enantiomèricament pures.

Inversió quiral: conversió d'una molècula en el seu enantiòmer en un procés de no equilibri químic.

Isòmers: compostos amb la mateixa fórmula molecular i el mateix tipus d'enllaç entre àtoms però, els àtoms estan disposats de diferent manera.

Isòmers òptics: terme incorrecte per definir diastereoisòmers.

Mescla racèmica: sinònim de racemat.

Meso: molècula aquiral membre d'un grup de diastereoisòmers i que té almenys un membre quiral.

Quiral: composts que no tenen cap pla ni centre de simetria. Dit d'una altra manera, compostos que no es poden superposar amb la seva imatge en un mirall.

Racemat: mescla 1:1 d'enantiomers.

Racemització: formació d'un racemat a partir d'un compost quiral no racèmic.


Resolució: separació d'un racemat en els enantiomers que el formen.

Rotació específica [α]: rotació òptica d'una substància quiral no racèmica en solució de concentració 1 g.mL⁻¹ en una cel·la de 10 cm, sota condicions específiques de temperatura i longitud ona d'una llum polaritzada utilitzada per a la mesura.

Rotació òptica: rotació d'un plànol de llum polaritzada.

***R,S*:** descriptors estereoquímics segons el sistema Cahn-Ingold-Prelog.

9. ANNEXES

 IMAS Institut Municipal d'Investigació Mèdica. IMIM	UNITAT DE FARMACOLOGIA	DIAGRAMA DE FLUJO
	LABORATORI D'ANÀLISI	

c/ Doctor Aiguader, 80. E-08003 Barcelona. NIF: P-5890004-D. Tel. (+34) 93 221 10 09. Fax (+34) 93 221 32 37. E-mail: postmaster@imim.es

DETERMINACIÓN: **CUANTIFICACIÓN DE MDMA, MDA, HMMA Y HMA EN PLASMA HUMANO**

CÓDIGO DET.: 7018	PNT: MF018E01	Voluntario: Sesión:
--------------------------	----------------------	------------------------


A. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

GRADILLA, identificar # lote

- 1__ +TUBO: identificar : **CI** (control inferior) [LOTE:]]
 2__ +TUBO: identificar : **CM** (control medio) [LOTE:]]
 3__ +TUBO: identificar : **CS** (control superior) [LOTE:]]
- 4__ +TUBO: identificar **BLR1** (blanco de reactivo)
 5__ + 1 ml de H₂O MilliQ [DI: 109]
 6__ +TUBO: identificar **BLP1** (blanco de plasma sin estándar interno)
 7__ + 1 ml de plasma blanco*
 8__ +TUBO: identificar **BLP2** (blanco de plasma con estándar interno)
 9__ + 1 ml de plasma blanco*
- 10__ +10 TUBOS: identificar:
 11__ **CA11** y **CA12**: + 1 ml plasma blanco* + 25 µl de solución 1 [LOTE:] [DI: 196]
 12__ **CA21** y **CA22**: + 1 ml plasma blanco* + 10 µl de solución 2 [LOTE:] [DI: 196]
 13__ **CA31** y **CA32**: + 1 ml plasma blanco* + 20 µl de solución 2 [LOTE:] [DI: 196]
 14__ **CA41** y **CA42**: + 1 ml plasma blanco* + 30 µl de solución 2 [LOTE:] [DI: 196]
 15__ **CA51** y **CA52**: + 1 ml plasma blanco* + 40 µl de solución 2 [LOTE:] [DI: 196]
- 16__ vórtex 10 seg (a todos los tubos)
- 17__ Adjuntar los TUBOS necesarios para las **muestras** e identificarlos con el código correspondiente.
 18__ + 1 ml de la muestra correspondiente en cada tubo [DI: 084]
 (Las muestras deben estar previamente homogeneizadas con vórtex)
- 19__ + 20 µl de la solución ISTD [LOTE:] [DI: 094] a todos los tubos **excepto al tubo BLP1**.
 20__ vórtex, 5 seg
- 21__ +1 ml de TAS 1M pH=5.2 [LOTE:] [DI: 228]
 22__ + 50µl de β-glucuronidasa HP-2. [LOTE:] [DI: 237]
 23__ vórtex, 5 seg.; tapar los tubos
- 24__ baño a 37°C durante 16 horas
- 25__ +1 ml de TFP 0.1M pH 6 [LOTE:] [DI: 182]
 26__ vórtex, 5 seg
- 27__ centrifugar 5 minutos a 3500 rpm.

PROCESADOR ESL, identificar # lote

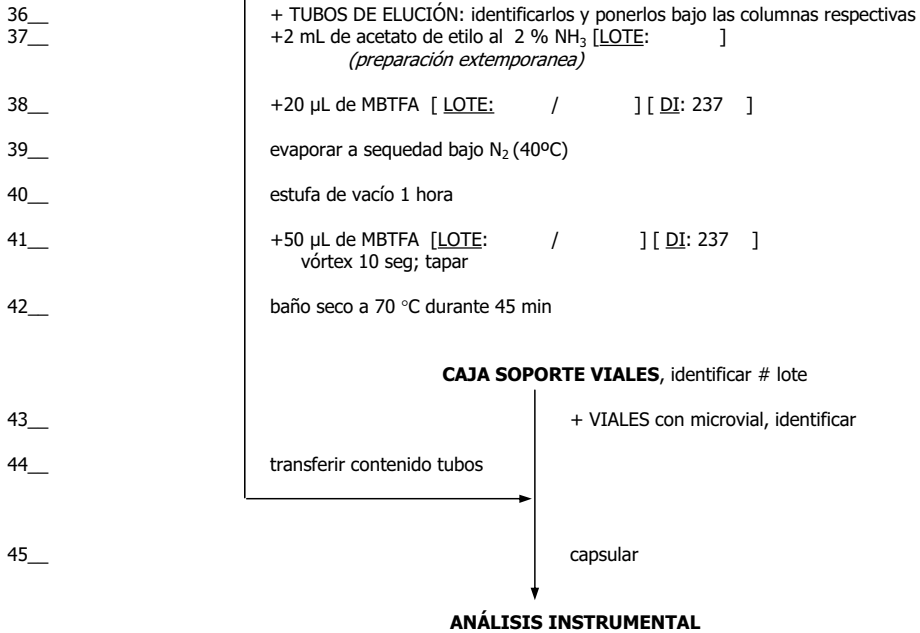
- 28__ + COLUMNAS BOND-ELUT CERTIFY [LOTE: /]; identificadas como
 los tubos.
 29__ +2 mL MeOH [LOTE: /] [DI: 163]
 30__ +2 mL TFP 0.1M pH 6 (*evitar secado columna*) [LOTE:] [DI: 182]
 31__ decantar muestra
 32__ → pasar la muestra lentamente
- 33__ +1 mL de ácido acético 1M [LOTE:] [DI: 177]
 34__ +6 mL MeOH [LOTE: /] [DI: 163]
 35__ secar las columnas 2 min. (*presión máxima*)

 IMAS Institut Municipal d'Investigació Mèdica. IMIM	UNITAT DE FARMACOLOGIA	DIAGRAMA DE FLUJO
	LABORATORI D'ANÀLISI	

c/ Doctor Aiguader, 80. E-08003 Barcelona. NIF: P-5890004-D. Tel. (+34) 93 221 10 09. Fax (+34) 93 221 32 37. E-mail: postmaster@imim.es

DETERMINACIÓN: CUANTIFICACIÓN DE MDMA, MDA, HMMA Y HMA EN PLASMA HUMANO

CÓDIGO DET.: 7018	PNT: MF018E01	Voluntario: Sesión:
--------------------------	----------------------	------------------------



B. ANÁLISIS INSTRUMENTAL

46__ Instrumento: CG/EM Código instrumento: _____


Método instrumental: _____

NOTA: Los viales de limpieza del inyector deben contener acetona.

* BLANCO DE PLASMA: [LOTE:] [DI: 084]

FECHA	OPERACIONES	NOMBRE	FIRMA

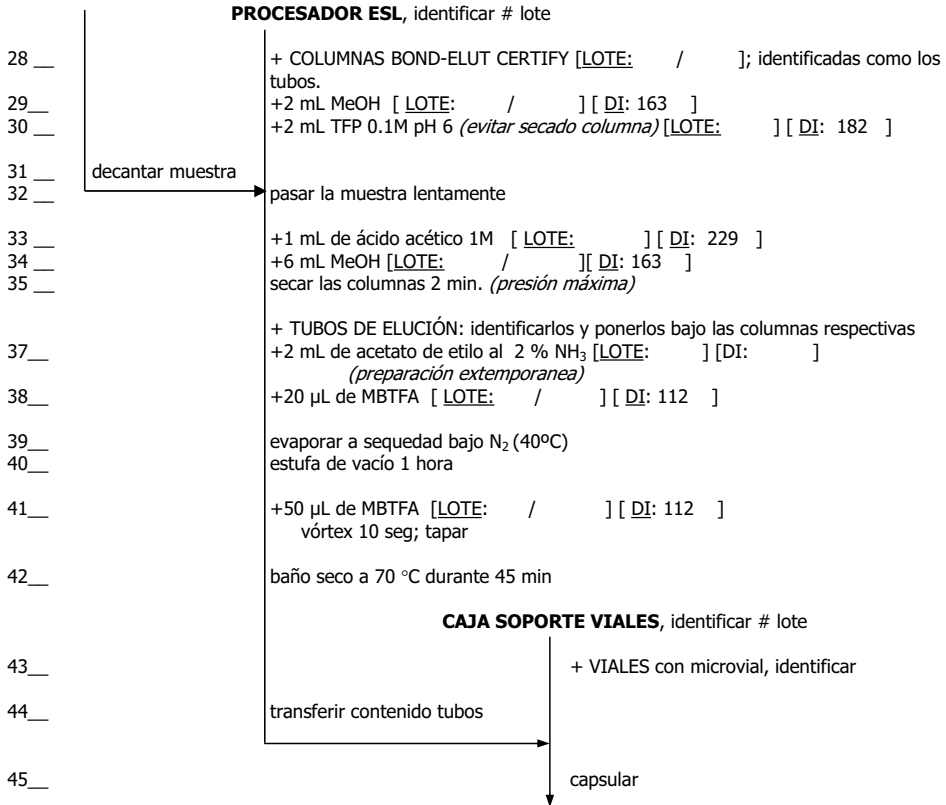
DIAGRAMA DE FLUJO CÓDIGO: MF018E01, 03/12/99

 IMAS Institut Municipal d'Investigació Mèdica. IMIM	UNITAT DE FARMACOLOGIA	DIAGRAMA DE FLUJO
	LABORATORI D'ANÀLISI	

c/ Doctor Aiguader, 80. E-08003 Barcelona. NIF: P-5890004-D. Tel. (+34) 93 221 10 09. Fax (+34) 93 221 32 37. E-mail: postmaster@imim.es

DETERMINACIÓN: CUANTIFICACIÓN DE MDMA, MDA, HMMA Y HMA EN ORINA HUMANO

CÓDIGO DET.: 7018	PNT: MF018E02	Voluntario: Sesión:
--------------------------	----------------------	------------------------



B. ANÁLISIS INSTRUMENTAL

46__ Instrumento: CG/EM Código instrumento: _____


Método instrumental: _____

NOTA: Los viales de limpieza del inyector deben contener acetona.

* BLANCO DE PLASMA: [LOTE: /] [DI: 029]

FECHA	OPERACIONES	NOMBRE	FIRMA

DIAGRAMA DE FLUJO CÓDIGO: MF018E02, 06/01/00

	IMAS	UNITAT DE FARMACOLOGIA	DIAGRAMA DE FLUJO
	Institut Municipal d'Investigació Mèdica. IMIM	LABORATORI D'ANÀLISI	


c/ Doctor Aiguader, 80. E-08003 Barcelona. NIF: P-5890004-D. Tel. (+34) 93 221 10 09. Fax (+34) 93 221 32 37

DETERMINACIÓN:	ENANTIÓMEROS DE MDMA, MDA, HMMA, HMA Y HHMA POR CG/EM EN PLASMA HUMANO
MUESTRAS	

A. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

GRADILLA

- 1__ +6 TUBOS: 2x **CI**, 2x **CM** y 2x **CS** (controles inferior, medio y superior [LOTE:])
- 2__ +TUBO: identificar **BLR** (blanco de reactivos)
- 3__ + 1 mL de agua calidad milliQ [DI:]
- 4__ +TUBO: identificar **BLP** (blanco de plasma sin estándar interno)
- 5__ + 1 mL de plasma blanco* [DI:]
- 6__ +TUBO: identificar **BLP+ISTD** (blanco de plasma con estándar interno)
- 7__ + 1 mL de plasma blanco* [DI:]
- 8__ +10 TUBOS: identificar:
- 9__ **CA11** y **CA12**: + 10 µL de solución HHMA 1 µg/mL
+ 10 µL de solució 1
- 10__ **CA21** y **CA22**: + 25 µL de solución HHMA 1 µg/mL
+ 50 µL de solució 1
- 11__ **CA31** y **CA32**: + 50 µL de solución HHMA 1 µg/mL
+ 10 µL de solució 2
- 12__ **CA41** y **CA42**: + 10 µL de solución HHMA 10 µg/mL
+ 15 µL de solució 2
- 13__ **CA51** y **CA52**: + 15 µL de solución HHMA 10 µg/mL
+ 20 µL de solució 2
- 14__ Adjuntar los TUBOS necesarios para las **muestras** e identificarlos con el código correspondiente.
- 15__ + 0.5 ml de la muestra correspondiente en cada tubo + 0.5 mL de plasma blanco [DI:]
(Las muestras deben estar previamente homogeneizadas con vórtex)
- 16__ llevar a sequedad a 23°C, 10 psi
- 17__ + 1 mL plasma blanco*
- 18__ +20 µL de la solución de MDMA-D5, MDA-D5 y pholedrine [DI:] a todos los tubos **excepto a los tubos BLR y BLP**
- 19__ +40 µL de la solución ISTD de 1 µg/mL de DHBA [DI:] a todos los tubos **excepto a los tubos BLR y BLP1**.
- 20__ +50 µL de la solución de metilcatecol 1mg/mL [DI:]
- 21__ +200 µL de metabisulfito de sodio 250 mM [LOTE:] [DI:]
- 22__ +50 µL de EDTA 250 mM [LOTE:] [DI:]
- 23__ vortex
- 24__ +1mL HCl 0.5M [LOTE:] [DI:]
- 25__ vórtex 5 seg; tapar los tubos
- 26__ baño a 100°C durante 30 minutos
- 27__ Dejar los tubos a temperatura ambiente
- 28__ +100µL de ácido perclórico concentrado [LOTE:] [DI:]
- 29__ vórtex, 5 seg
- 30__ Centrifugar 3000 rpm, 10 min
- 31__ Transferir sobrenadante a tubos nuevos convenientemente rotulados
- 32__ +1 ml de TFP 0.1M pH 6 [LOTE:] [DI:]
- 33__ vórtex, 5 seg
- 34__ Ajustar pH 5.5 – 6 (aprox. 120µL NaOH 10M [LOTE:] [DI:])
Papel de pH [LOTE:]

 IMAS Institut Municipal d'Investigació Mèdica. IMIM	UNITAT DE FARMACOLOGIA	DIAGRAMA DE FLUJO
	LABORATORI D'ANÀLISI	

c/ Doctor Aiguader, 80. E-08003 Barcelona. NIF: P-5890004-D. Tel. (+34) 93 221 10 09. Fax (+34) 93 221 32 37

DETERMINACIÓN:	ENANTIÓMEROS DE MDMA, MDA, HMMA, HMA Y HHMA POR CG/EM EN PLASMA HUMANO
MUESTRAS	

35 ___ 36 ___ 37 ___ 38 ___ 39 ___ 40 ___ 41 ___ 42 ___ 43 ___ 44 ___ 45 ___ 46 ___ 47 ___ 48 ___ 49 ___ 50 ___ 51 ___ 52 ___ 53 ___ 54 ___ 55 ___ 56 ___ 57 ___ 58 ___ 59 ___ 60 ___ 61 ___ 62 ___ 63 ___ 64 ___ 65 ___ 66 ___ 67 ___ 68 ___ 69 ___ 70 ___ 71 ___ 72 ___ 73 ___ 74 ___ 75 ___ 76 ___	<p style="text-align: center;">PROCESADOR ESL</p> <p>decantar muestra →</p> <p>→ pasar la muestra lentamente (<i>evitar secado columna</i>)</p> <p>+ COLUMNAS SCX [LOTE:]; identificadas como los tubos +2 mL MeOH [LOTE:] [DI:] +2 mL TFP 0.1M pH 6 (<i>evitar secado columna</i>) [LOTE:]</p> <p>+1 mL agua [DI:] +4 mL MeOH [LOTE:] [DI:] secar las columnas 2 min. (<i>presión máxima</i>) + TUBOS DE ELUCIÓN: identificarlos y ponerlos bajo las columnas respectivas +2 mL MeOH/HCl (99:1) conteniendo 3% v/v EDTA 250 mM y 3% v/v metabisulfito de sodio 250 mM [LOTE:] evaporar a sequedad bajo N₂ (40°C, 20 psi) (queda un precipitado blanco) reconstituir en 200 µL de MeOH y vortear vigorosamente [LOTE:] [DI:] + 4 mL Ae/NH₃ (2%) [LOTE:] añadir una punta de espátula de Na₂SO₄ anh. prev. atemperado [LOTE:] vortex agitador de balanceo durante 20 min. centrifugar 10 min a 3500 rpm pasar el sobrenadante a un tubo nuevo convenientemente rotulado + 4 mL Ae/NH₃ (2%) [LOTE:] añadir una punta de espátula de Na₂SO₄ anh. prev. atemperado [LOTE:] vortex agitador de balanceo durante 20 min. centrifugar 10 min a 3500 rpm añadir el sobrenadante al tubo correspondiente evaporar a 40°C, 15 psi dejar en la estufa de vacío al menos 30 min. +2mL Ae/hexano/Et₃N (1/1/0,0015) [LOTE:] +20 µL (R)-MTPCl [LOTE:] [DI:] incubar en baño seco a 80°C, 20 min atemperar +10 µL NH₃ [LOTE:] [DI:] incubar a 80°C, 20 min (aparece un precipitado) atemperar centrifugar 5 min a 3500 rpm transferir el sobrenadante a tubos nuevos rotulados evaporar a sequedad bajo N₂ (40°C, 20 psi) dejar en la estufa de vacío al menos 30min +50 µL HMDS [LOTE:] [DI:] incubar en baño seco a 60°C, 60 min</p> <p style="text-align: center;">CAJA SOPORTE VIALES</p> <p>→ + VIALES con microvial, identificar transferir contenido tubos capsular</p>
--	--


B2. ANÁLISIS INSTRUMENTAL: CG/EM

Código instrumento: _____

Método instrumental: _____

* BLANCO DE PLASMA: [LOTE:] [DI:]

FECHA	OPERACIONES	NOMBRE	FIRMA


 IMAS Institut Municipal d'Investigació Mèdica. IMIM	UNITAT DE FARMACOLOGIA	DIAGRAMA DE FLUJO
	LABORATORI D'ANÀLISI	

c/ Doctor Aiguader, 80. E-08003 Barcelona. NIF: P-5890004-D. Tel. (+34) 93 221 10 09. Fax (+34) 93 221 32 37

DETERMINACIÓN:	ENANTIÓMEROS DE MDMA, MDA, HMMA, HMA Y HHMA POR CG/EM EN ORINA HUMANO
MUESTRAS	

PROCESADOR ESL

- 30__
- 31__
- 32__
- 33__
- 34__
- 35__
- 36__
- 37__
- 38__
- 39__
- 40__
- 41__
- 42__
- 43__
- 44__
- 45__
- 46__
- 47__
- 48__
- 49__
- 50__
- 51__
- 52__
- 53__
- 54__
- 55__
- 56__
- 57__
- 58__
- 59__
- 60__
- 61__
- 62__
- 63__
- 64__
- 65__
- 66__
- 67__
- 68__
- + COLUMNAS SCX [LOTE:]; identificadas como los tubos
 +2 mL MeOH [LOTE:] [DI:]
 +2 mL TFP 0.1M pH 6 (*evitar secado columna*) [LOTE:]
 decantar muestra
 pasar la muestra lentamente (*evitar secado columna*)
 +1 mL agua [DI:]
 +4 mL MeOH [LOTE:] [DI:]
 secar las columnas 2 min. (*presión máxima*)
 + TUBOS DE ELUCIÓN: identificarlos y ponerlos bajo las columnas
 respectivas
 +2 mL MeOH/HCl (99:1) conteniendo 3% v/v EDTA 250 mM y 3% v/v
 metabisulfito de sodio 250 mM [LOTE:]
 evaporar a sequedad bajo N₂ (40°C, 20 psi) (queda un
 precipitado blanco)
 reconstituir en 200 µL de MeOH y vortear vigorosamente
 [LOTE:.....][DI:]
 + 4 mL Ae/NH₃ (2%) [LOTE:]
 añadir una punta de espátula de Na₂SO₄ anh. prev. atemperado
 vortex
 agitador de balanceo durante 20 min.
 centrifugar 10 min a 3500 rpm
 pasar el sobrenadante a un tubo nuevo convenientemente rotulado
 + 4 mL Ae/NH₃ (2%) [LOTE:]
 añadir una punta de espátula de Na₂SO₄ anh. prev. atemperado
 vortex
 agitador de balanceo durante 20 min.
 centrifugar 10 min a 3500 rpm
 añadir el sobrenadante al tubo correspondiente
 evaporar a 40°C, 15 psi
 dejar en la estufa de vacío al menos 30 min.
 +2mL Ae/hexano/Et₃N (1/1/0,0015) [LOTE]
 +20 µL (R)-MTPCl [LOTE:] [DI:]
 incubar en baño seco a 80°C, 20 min
 atemperar
 +10 µL NH₃ [LOTE:] [DI:]
 incubar a 80°C, 20 min (aparece un precipitado)
 atemperar
 centrifugar 5 min a 3500 rpm
 transferir el sobrenadante a tubos nuevos rotulados
 evaporar a sequedad bajo N₂ (40°C, 20 psi)
 dejar en la estufa de vacío al menos 30min
 +50 µL HMDS [LOTE:] [DI:]
 incubar en baño seco a 60°C, 60 min

 IMAS Institut Municipal d'Investigació Mèdica. IMIM	UNITAT DE FARMACOLOGIA	DIAGRAMA DE FLUJO
	LABORATORI D'ANÀLISI	

c/ Doctor Aiguader, 80. E-08003 Barcelona. NIF: P-5890004-D. Tel. (+34) 93 221 10 09. Fax (+34) 93 221 32 37

DETERMINACIÓN:	ENANTIÓMEROS DE MDMA, MDA, HMMA, HMA Y HHMA POR CG/EM EN ORINA HUMANA
MUESTRAS	

CAJA SOPORTE VIALES

69__
70__
71__

↓ + VIALES con microvial, identificar
transferir contenido tubos
↓ capsular

B2. ANÁLISIS INSTRUMENTAL: CG/EM

Código instrumento: _____

Método instrumental: _____

* BLANCO DE ORINA: [LOTE: _____] [DI: _____]

FECHA	OPERACIONES	NOMBRE	FIRMA

