

THE DETECTION AND DETERMINATION OF NEW LSD DERIVATIVES IN BIOLOGICAL MATERIAL USING THE LC-MS/MS TECHNIQUE

Piotr ADAMOWICZ¹ , Karolina MULKA²

¹ Institute of Forensic Research, Kraków, Poland

² University of Silesia in Katowice, Katowice, Poland

Abstract

Psychedelics derived from lysergic acid diethylamide (LSD) represent one of the groups of new psychoactive substances (NPS) that have been gaining popularity in recent years. Due to their very high potency, they are taken in small doses and their identification in biological material is problematic. The compounds from this group, which appear in low concentrations in biological material and metabolise rapidly, require sensitive and selective analytical methods if they are to be detected. A method for the detection and determination of LSD and its new derivatives (ALD-52, 1P-LSD, 1cP-LSD, and 1B-LSD) in whole blood using the LC-MS/MS technique was therefore developed and validated. The analytes were isolated from the blood (0.2 mL) by liquid-liquid extraction with ethyl acetate and acetate buffer (pH 5.5). The method developed was linear in the range of 0.5–10 ng/mL. The limit of detection (LOD) was 0.01 ng/mL for each analyte and the lowest point on the calibration curve was taken as the limit of quantification (LOQ). The method developed is sensitive and samples can be prepared for analysis quickly and easily. The procedure can be applied widely in the analysis of LSD derivatives in biological material – for forensic or clinical purposes, for example – and can easily be expanded for use with further LSD derivatives.

Keywords

LSD; Derivatives; New psychoactive substances; Blood screening analysis; LC-MS/MS.

Received 25 November 2021; accepted 9 March 2022

1. Introduction

Lysergic acid diethylamide (LSD, LSD-25) is a semi-synthetic compound derived from lysergic acid (Figure 1), which occurs naturally in ergot – in the spore of the parasitic rye fungus *Claviceps purpurea* (Passie, Halpern, Stichtenoth, Emrich, Hintzen, 2008; Barceloux, 2012). LSD was first synthesised by the Swiss chemist Albert Hoffman at Sandoz laboratories (now Novartis) in Basel in 1938. The aim of synthesising LSD was to obtain a compound that acts in a way similar to nikethamide, which stimulates the respiratory and circulatory systems. The psychoactive properties for which it is known today were discovered

accidentally in 1943. Before becoming popular as a psychedelic substance in the 1960s and 1970s, LSD was applied in psychiatry in the 1940s and the 1950s (Barceloux, 2012). LSD is an agonist of the 5-HT_{2A} receptor, which is regarded as essential to the hallucinogenic effects. LSD alters consciousness considerably (Passie et al., 2008; Liester, 2014); its users experience transcendental or mystical phenomena (Liester, 2014). When this narcotic is ingested, the principal changes in perception induced are visual – mainly in the form of hallucinations, illusions, and distortions (Liester, 2014; Halberstadt, Geyer, 2013). Coloured or patterned geometric figures are often seen. There may also be changes in the shapes of objects, which

may additionally move or dissolve, and changes in the appearance of human faces. Other symptoms include distortion of three-dimensional space, blurred vision, and changes in colour perception. The auditory changes induced by LSD mainly involve auditory hallucinations, reduced or increased sensitivity to sound, difficulty in locating the sources of sounds, and an inability to understand sounds (Liester, 2014). LSD also produces a blending of sensory stimuli – so-called synesthesia or cross-modal perception. Here, the principal effects are seeing sounds and hearing colours (Barceloux, 2012). Changes in perceptions of touch, smell, and taste may also occur (Halberstadt, Geyer, 2013). The major cognitive effects are depersonalisation, impaired concentration, a sense that time is slowing down, an inability to control thoughts, and new ways of looking at the self and others.

LSD can also induce effects opposite to those intended. During what are termed ‘bad trips’, people experience a state of unpleasant, anxiety-filled feelings and hallucinations or terrifying thoughts, while the hallucinogenic effects can return months or even years after the narcotic was first ingested in the form of what are known as ‘flashbacks’ (brief, episodic states mainly involving visual hallucinations, such as colourful geometric patterns or flashes of colour). In addition to those associated with the nervous system, physical symptoms can appear too. Dilated pupils is a typical symptom that often occurs after LSD ingestion. Increased body temperature and pulse, higher blood pressure, and tachycardia are some of the other signs of LSD use. Somatic effects, such as a general feeling of being unwell, weakness, fatigue, headache, nausea, vomiting, diarrhoea, hypersalivation, sweating, and watering eyes can also occur (Passie et al., 2008; Barceloux, 2012; Halberstadt, Geyer, 2013; Liester, 2014).

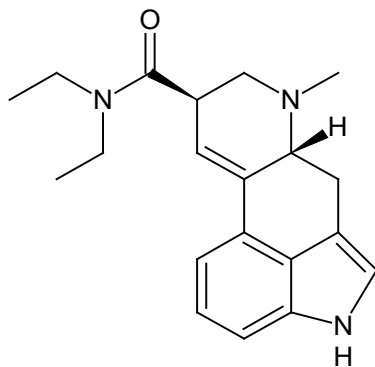


Figure 1. The chemical structure of LSD.

The introduction of derivatives of already-existing compounds, such as the classic narcotics, is one of the ways in which the number of psychoactive substances on the narcotics market increases. New synthetic substances began to enter mass circulation at the beginning of the twenty-first century. Some of the names used to denote these new psychoactive substances (NPS) include (in Polish) *dopalacze* (afterburners) and *nowe narkotyki* (new narcotics) and their universally-used English counterparts: legal highs, designer drugs, boosters, and research chemicals. In terms of their chemistry, NPSs very often constitute simple modifications of controlled substances. This is because they are synthesised to circumvent existing anti-narcotic law, which is usually achieved by changing the structure of known narcotic drugs and psychotropic substances by, for example, adding a further chemical group, such as a methyl group.

LSD derivatives have recently begun to appear on the NPS market (Figure 2). They include compounds with a substituent in the form of an acyl group on indole nitrogen, such as 1-acetyl-LSD (ALD-52), 1-propionyl-LSD (1P-LSD), 1-cyclopropionyl-LSD (1cP-LSD), and 1-butanoyl-LSD (1B-LSD) (Brandt et al., 2016; Brandt et al., 2019; Brandt et al., 2020; Halberstadt et al., 2019). Other derivatives are the compounds in which the substituent has been modified in position N⁶, which in the case of LSD is the methyl group. Examples include N⁶-allyl-nor-LSD (AL-LAD) and N⁶-ethyl-nor-LSD (ETH-LAD) (Brandt et al., 2017; Wagmann et al., 2019). 1-propionyl-N⁶-ethyl-nor-LSD (1P-ETH-LAD) combines changes in both of these positions (Wagmann et al., 2019). Derivatives such as N-ethyl-N-cyclopropyllysergamide (ECPLA), lysergic acid 2,4-dimethylazetidide (LSZ), and N-morpholinyllysergamide (LSM-775) are also known (Brandt et al., 2017; Wagmann et al., 2019; Grumann et al., 2019).

Derivatives substituted with an acyl group at the N¹ position show less potency than the parent compound. Their affinity for monoamine receptors, mainly dopaminergic or serotonergic, including 5-HT_{2A}, which is the most important for the effect of LSD, is lower (Halberstadt et al., 2019; Brandt et al., 2020; Elliott, Holdbrook, Brandt, 2020). Homologues of LSD with substituents in the N⁶ position can show a greater potency in the case of ethyl, n-propyl, or allyl substituents or a lesser potency in the case of longer substituents, such as the n-butyl group or the isopropyl group. It should be noted, however, that there have been considerably fewer studies of the effects of LSD derivatives than of LSD itself (Brandt et al., 2017).

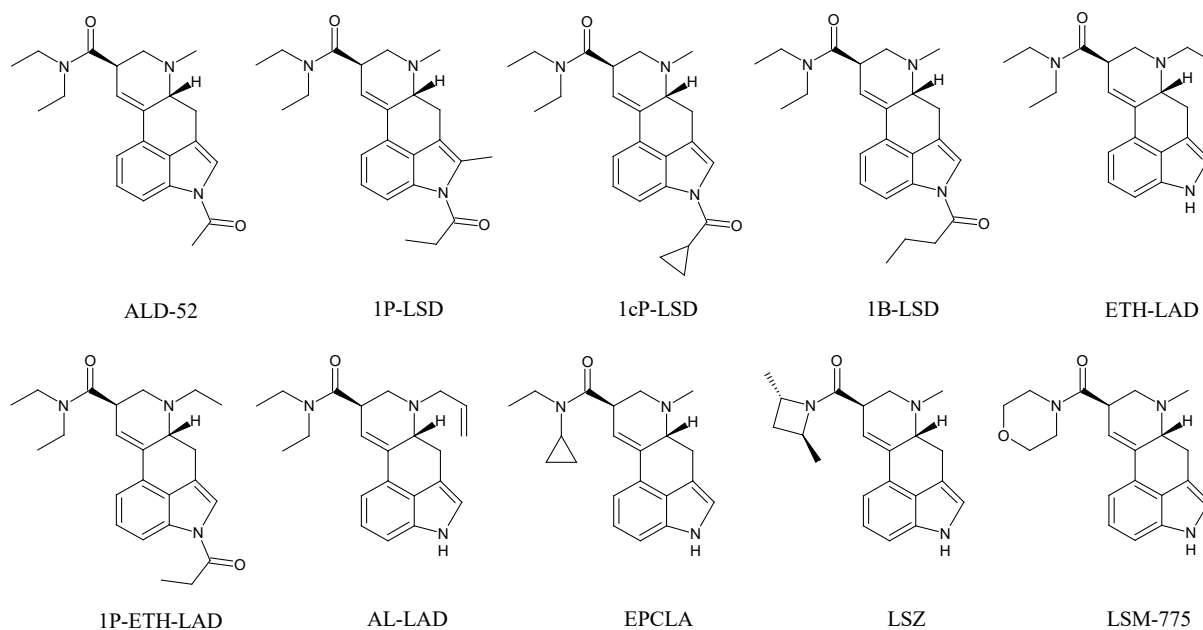


Figure 2. The chemical structures of LSD derivatives.

Compounds with a modified structure in the N¹ position are rapidly hydrolysed to LSD in the body (Brandt et al., 2020; Elliott et al., 2020; Grumann et al., 2020). 1P-ETH-LAD metabolises to ETH-LAD (Brandt et al., 2017; Brandt et al., 2020; Elliott et al., 2020), which makes it difficult to identify in the biological material the psychoactive substance administered – as the parent substance may go undetected. One of the areas in which this is significant is the law: in some countries, LSD derivatives are legal – unlike LSD, which is regulated at the international level. The possibility to detect LSD derivatives in biological material is also influenced by the route they are ingested, the time at which samples are taken, and the way in which samples are stored. When administration is intravenous there is a greater chance of detecting the parent compound. Following oral ingestion it is more difficult to detect LSD derivatives in biological material due to the hydrolysis mentioned above. The shorter the time elapsing between sample collection and analysis, the greater the chance of detecting the relevant compound. Storage of biological samples at a suitably low temperature and, primarily, shielding them from light, can protect the analytes from degradation, because – just as with LSD itself – the derivatives can be sensitive to storage conditions (Grumann et al., 2019, 2020).

Very low active doses, low concentrations in bio-samples and rapid metabolism in the body pose major analytical problems. The detection, identification and

determination of LSD derivatives requires the use of very sensitive analytical methods. The aim of the present study is therefore to develop and validate a method for the detection and determination of new LSD derivatives in blood using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).

2. Method

2.1. Materials and reagents

The certified reference materials ALD-52, 1P-LSD, 1cP-LSD, and 1B-LSD were purchased from the Cayman Chemical Company (USA). LSD and LSD-D₃ were obtained from the Cerilliant Corporation (USA). Acetonitrile, ethyl acetate, and formic acid (98–100%) were bought from Merck in Warsaw, Poland. The analyte-free blood samples used in the development and validation of the method were obtained from a blood donor centre. No narcotics, including NPSs and the LSD derivatives covered by the analytical procedure used, were detected in the screening of this blood. The biological material was stored at a temperature of -20°C before analysis.

2.2. Preparation of the samples for analyses

Internal standard LSD-D₃ was added to blood samples (0.2 mL) placed in Eppendorf vials in such a way

that a concentration of 10 ng/mL was achieved. Next, 0.2 mL of acetate buffer (pH 5.5) and 1 mL of ethyl acetate were added. The samples were shaken for five minutes and then centrifuged for five minutes at 12,700 rpm, after which the organic phase (800 μ L) was transferred to glass vials and evaporated to dryness at 37°C. The dry residue was dissolved in 100 μ L of a 1 : 1 (v/v) mixture of mobile phase components: 0.1% formic acid in acetonitrile and 0.1% of formic acid in water. After shaking them for ten minutes, the contents of the vials were transferred to polypropylene inserts. Before placing them in an automatic sampler, the vials with inserts were protected from the light. The volume of a injected sample was 10 μ L.

2.3. Apparatus and conditions of analysis

An Agilent Technologies 1200 Series liquid chromatograph coupled to an Agilent Technologies 6460 Triple Quad mass spectrometer was used in the analyses. The instrument operated in positive ionisation mode (+ESI). Separation was carried out on a Kinetex C18 column (4.6 \times 100 mm, 2.6 μ m) produced

by Phenomenex. The mobile phase, flowing through the column at a rate of 0.5 mL/min, was a mixture of 0.1% formic acid in water and 0.1% formic acid in acetonitrile. The following gradient program was used (in relation to the acetonitrile content): 0 min – 15%; 1 min – 15%; 13 min – 90%; 14.0 min – 90%; 14.5 min – 15%; 17 min – 15%. The analysis lasted for a total of 17 minutes. The retention times of the analytes, the monitored ion MRM transitions (m/z), and the collision energies and voltages are set out in Table 1. The remaining parameters of the mass detector were as follows: capillary voltage: 3000 V, gas (N_2) flow rate: 10 L/min, gas temperature: 325°C, sheath gas (N_2) flow rate: 11 L/min, temperature of sheath gas: 325°C, nebulizer pressure: 40 psi. Data collection and analysis were performed using MassHunter software from Agilent Technologies.

2.4. Validation of the method

Validation of the method developed to determine the new LSD derivatives in the biological material was conducted based on the recommendations prepared by

Table 1

List of the compounds covered by the method developed with their molecular formulas, ions, mass spectrometry parameters, and retention times

Compound	Molecular formula	Precursor ion	Product ions	Fragmentor voltage [V]	Collision energy [V]	Retention time [min]	Relative retention time RRT [min]
LSD-D ₃ (ISTD)	C ₂₀ H ₂₂ D ₃ N ₃ O	237.2	208.1	93	28	7.52	–
			210.1		48		
			226.1		20		
LSD	C ₂₀ H ₂₅ N ₃ O	324.2	180.1	99	36	7.52	1.00
			207.1		44		
			223.1		16		
ALD-52	C ₂₂ H ₂₇ N ₃ O ₂	366.2	207.1	120	56	7.76	1.03
			223.1		32		
			265.1		20		
1P-LSD	C ₂₃ H ₂₉ N ₃ O ₂	380.2	208.4	130	40	8.34	1.11
			223.1		32		
			279.2		20		
1cP-LSD	C ₂₄ H ₂₉ N ₃ O ₂	392.2	207.1	118	64	8.55	1.14
			208.1		40		
			223.1		32		
1B-LSD	C ₂₄ H ₃₁ N ₃ O ₂	394.2	208.1	118	40	8.89	1.19
			223.1		32		
			293.2		20		

the American Academy of Forensic Science (AAFS) (ANSI/ASB Standard 036; AAFS, 2019). Five-point (0.5 ng/mL; 1 ng/mL; 2 ng/mL; 5 ng/mL; 10 ng/mL) calibration curves ($n = 5$) were prepared for all of the analytes. The limits of detection (LOD) were set using the MassHunter software based on the lowest concentration for which the signal-to-noise (S/N) ratio for the selected MRM pair (with the lowest intensity of the three monitored) was 3. The lowest point on the calibration curve was taken as the limit of quantification (LOQ). Repeatability ($n = 3$), intermediate precision ($n \geq 11$), and bias were also determined. The above parameters were established for three levels of concentration: 0.1 ng/mL, 1 ng/mL, and 10 ng/mL. The repeatability and intermediate precision of the method were expressed as the coefficient of variation %CV, as described by the formula:

$$\%CV = \left(\frac{\text{standard deviation}}{\text{mean analyte concentration}} \right) \cdot 100\%.$$

The bias of the method was expressed as relative error (%) calculated according to the formula below:

$$\text{Relative error} = \left(\frac{\text{mean analyte concentration} - \text{theoretical analyte concentration}}{\text{theoretical analyte concentration}} \right) \cdot 100\%.$$

Three series of samples were analysed to determine the matrix effect, recovery, and process efficiency. The tests were carried out at two levels of concentration: 1 ng/mL and 5 ng/mL (for each level $n = 5$). The matrix effect was determined based on the ratio of the mean peak area of the analytes added after the extraction process (B) to the mean peak area of neat solution of analytes (A). The matrix effect, expressed in percentages, was calculated according to the formula below:

$$\text{Matrix effect} [\%] = \left(\frac{B}{A} \right) \cdot 100\%.$$

The ratio of the mean peak area of the substances analysed in the blood samples spiked before extraction (C) to the mean peak area of the compounds in the blood samples spiked following extraction (B) was established to determine recovery. Recovery, expressed in percentages, was calculated according to the formula below:

$$\text{Recovery} [\%] = \left(\frac{C}{B} \right) \cdot 100\%.$$

Process efficiency was determined by the ratio of the mean peak area of the substances analysed in the blood samples spiked before extraction (C) to the mean

peak area of neat solution of analytes (A). The values for process efficiency, expressed in percentages, were calculated using the following formula:

$$\text{Process efficiency} [\%] = \left(\frac{C}{A} \right) \cdot 100\%.$$

Blood samples from cases analysed at the Institute of Forensic Research in which LSD and its derivatives were not detected were used to check the specificity of the method ($n = 12$). The carryover effect was also examined. To this end, blood samples with analytes at a concentration of 10 ng/mL ($n = 3$) and blood samples without added analytes ($n = 3$) were analysed alternately. The stability was also tested. Blood samples spiked with analytes to a concentration of 1 ng/mL ($n = 3$) and blood samples spiked with analytes to a concentration of 10 ng/mL ($n = 3$) were prepared. The samples were analysed after preparation and after twenty-four, forty-eight, and seventy-two hours had elapsed. The samples remained in an automatic sampler at room temperature throughout. Changes in the peak areas for each of the analytes at each time interval were then compared. The peak areas for samples measured immediately after preparation (at hour zero) were taken as the 100% values, while the values for subsequent days served as their proportional points of reference.

3. Results

The results of the validation are set out in Tables 2–6. It should be noted that no interference was observed in specificity testing. Nor was there any carryover effect between the samples. The changes that took place in the samples stored in an automatic sampler for seventy-two hours showed that they were stable over that time period. Example chromatograms of blood spiked with the LSD derivatives analysed at a concentration of 5 ng/mL are showed in Figure 3.

Table 2
Parameters of calibration curves, limits of detection (LOD), and limits of quantification (LOQ)

Compound	Regression line equation	R2	LOD [ng/mL]	LOQ [ng/mL]
LSD	$y = 0.0679x - 0.0099$	0.9969	0.01	0.5
ALD-52	$y = 0.0756x - 0.0082$	0.9925	0.01	0.5
1P-LSD	$y = 0.0689x + 0.0027$	0.9865	0.01	0.5
1cP-LSD	$y = 0.0641x - 0.0048$	0.9922	0.01	0.5
1B-LSD	$y = 0.0813x - 0.0050$	0.9871	0.01	0.5

Table 3
Repeatability and bias values at three concentration levels (0.1 ng/mL, 1 ng/mL, and 10 ng/mL)

Compound	Nominal concentration [ng/mL]	n [repetitions]	Mean concentration [ng/mL]	Standard deviation	Repeatability CV [%]	Bias [%]
LSD	0.1	3	0.21	0.01	6.1	111.8
	1	3	0.98	0.09	9.5	-1.7
	10	3	10.18	0.33	3.2	1.8
ALD-52	0.1	3	0.16	0.01	2.5	60.7
	1	3	0.89	0.04	4.8	-11.0
	10	3	10.52	1.03	9.8	5.2
1P-LSD	0.1	3	0.10	0.04	37.7	-3.4
	1	3	0.90	0.09	10.3	-9.7
	10	3	9.35	0.24	2.5	-6.5
1cP-LSD	0.1	3	0.13	0.01	3.1	33.6
	1	3	1.07	0.14	12.8	6.9
	10	3	10.10	0.29	2.9	0.9
1B-LSD	0.1	3	0.11	0.01	6.0	13.1
	1	3	1.01	0.03	3.3	1.3
	10	3	8.90	0.19	2.1	-11.0

Table 4
Intermediate precision and bias values at the three concentration levels (0.1 ng/mL, 1 ng/mL, and 10 ng/mL)

Compound	Nominal concentration [ng/mL]	n [repetitions]	Mean concentration [ng/mL]	Standard deviation	Intermediate precision CV [%]	Bias [%]
LSD	0.1	11	0.21	0.01	3.3	116.5
	1	14	0.94	0.08	8.4	-5.8
	10	11	10.53	0.52	4.9	5.3
ALD-52	0.1	13	0.18	0.02	9.1	79.1
	1	12	0.96	0.13	14.0	-3.9
	10	13	10.55	1.47	13.9	5.5
1P-LSD	0.1	11	0.06	0.03	58.7	-42.8
	1	11	0.89	0.16	17.5	-10.5
	10	11	11.18	1.68	15.0	11.8

Compound	Nominal concentration [ng/mL]	n [repetitions]	Mean concentration [ng/mL]	Standard deviation	Intermediate precision CV [%]	Bias [%]
1cP-LSD	0.1	11	0.14	0.01	9.2	37.3
	1	13	0.88	0.16	18.7	-12.3
	10	12	10.51	1.37	13.0	5.1
1B-LSD	0.1	12	0.13	0.01	11.4	29.1
	1	11	0.95	0.09	9.4	-5.2
	10	12	10.53	1.74	16.6	5.3

Table 5

Matrix effect, recovery, and process efficiency values of the analysed compounds at concentration levels of 1 ng/mL and 5 ng/mL

Compound	Concentration	Matrix effect	RSD	Recovery	RSD	Process efficiency	RSD
	[ng/mL]	[%]		[%]		[%]	
LSD	1	86.6	20.1	97.4	20.1	95.8	13.3
	5	99.0	17.2	92.1	21.0	81.9	16.7
ALD-52	1	79.4	5.6	106.3	6.3	84.1	3.1
	5	90.4	3.1	105.0	3.6	93.8	2.0
1P-LSD	1	92.5	5.6	102.3	5.6	94.5	2.3
	5	94.6	1.8	103.2	3.1	97.9	3.1
1cP-LSD	1	89.8	15.0	108.4	17.4	95.4	6.1
	5	94.7	5.7	101.5	7.5	95.2	4.2
1B-LSD	1	109.1	13.7	96.1	12.6	103.5	5.1
	5	104.8	1.0	99.5	3.2	104.0	3.6

Table 6

Peak areas [%] of the extracts of blood spiked with LSD derivatives to concentrations of 1 ng/mL and 10 ng/mL analysed immediately after preparation and after 24, 48 and 72 hours

Compound	Concentration [ng/mL]	Peak area compared to time zero [%]			
		0 h	24 h	48 h	72 h
LSD-D ₃	1	100.00	108.53	119.73	118.45
	10	100.00	105.62	121.34	134.33
LSD	1	100.00	109.98	118.68	116.26
	10	100.00	109.17	123.49	133.59
ALD-52	1	100.00	106.97	118.60	122.38
	10	100.00	103.96	123.07	134.90
1P-LSD	1	100.00	103.86	124.12	128.33
	10	100.00	101.69	123.22	132.65
1cP-LSD	1	100.00	98.79	118.89	126.70
	10	100.00	92.06	106.66	113.63
1B-LSD	1	100.00	94.34	116.60	123.62
	10	100.00	99.74	122.46	132.34

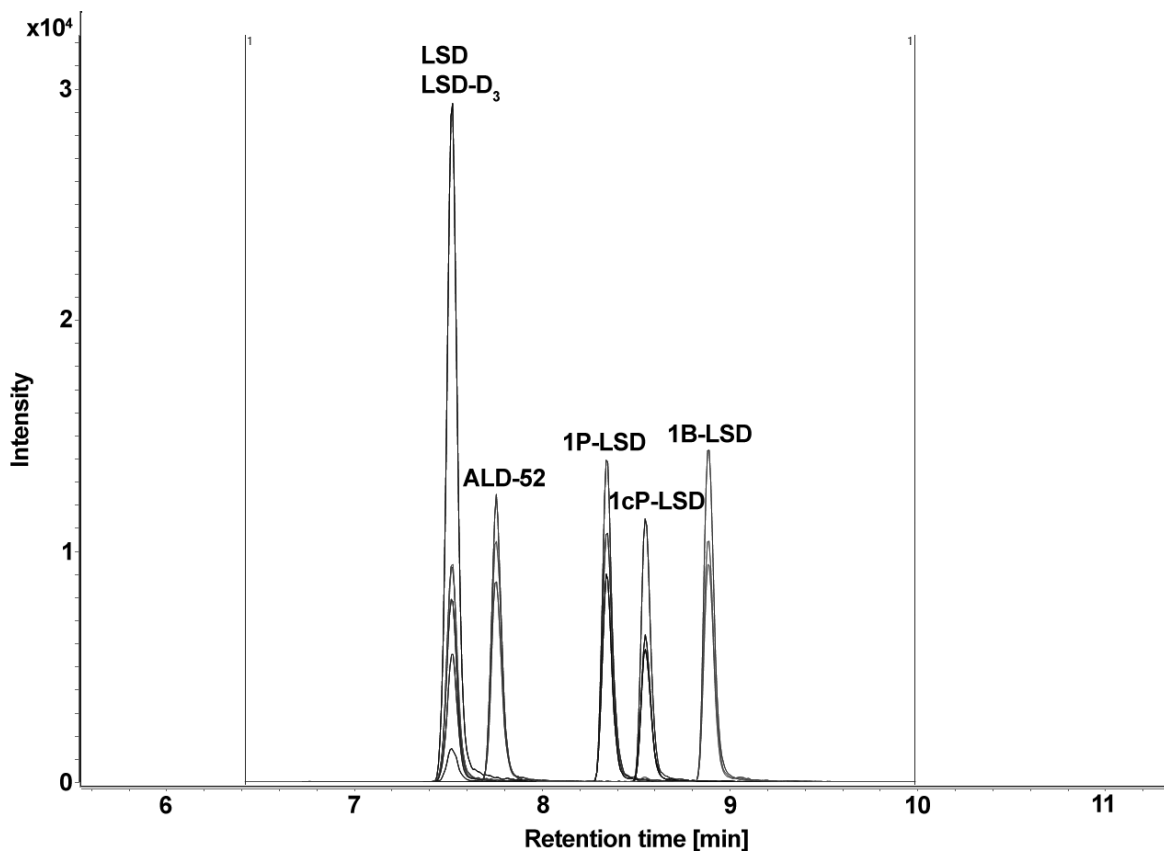


Figure 3. MRM chromatograms of the extract of blood spiked with LSD derivatives at a concentration of 5 ng/mL.

4. Discussion

The danger posed by the constant growth of the drugs market makes it necessary to solve problems at a number of levels, from saving human health and life to striving to develop the best possible methods for detecting psychoactive substances in biological material. Due to their low concentrations in biological material, as well as their rapid hydrolysis to LSD, which makes it possible that ingested psychoactive substances will not be detected, the group of LSD derivatives offers a perfect illustration of the difficulty of detecting NPSs in biological material. In cases of this kind it is necessary to apply highly sensitive techniques, of which LC-MS/MS is one.

Effort has been made in developing a method to determine new LSD derivatives in biological material to ensure that sample preparation is simple and can be done in as short a time as possible. This was achieved by applying liquid-liquid extraction using ethyl acetate and a buffer with a pH of 5.5. By optimising chromatographic conditions it was possible to conduct a chromatographic analysis and stabilise the

mobile phase in a time of 17 minutes. The selectivity and sensitivity of the method were increased by using a tandem mass analyser and operating in MRM mode. In the analyses, the parent ions and three product ions (three MRM pairs) were monitored for all analytes, which strengthen the identification.

The method developed was validated in accordance with AAFS guidance for screening methods and for quantitative analysis (AAFS, 2019). The LOD values obtained (0.01 ng/mL) were similar to those set out in methods developed by other authors (Grumann et al., 2019). The calibration curves prepared for LSD and its four derivatives maintained linearity in the range of concentrations 0.5–10 ng/mL. If the typical concentration of LSD in the blood of users is in the range 1–5 ng/mL, it can be concluded that the method developed is suitable for the detection and determination of this type of substance in biological material (Molina, 2010). Repeatability, intermediate precision, and bias were established at three levels of concentration: 0.1 ng/mL, 1 ng/mL, and 10 ng/mL. The values determined for concentrations lying within the range of the calibrated curves (1 ng/mL and 10 ng/mL) did not

exceed the acceptable level of 20%. Unacceptable results were noted only at the lowest level (0.1 ng/mL), which lay beyond the calibration curve and below the limit of quantification (LOQ).

The matrix effect values for most of the compounds analysed (except 1B-LSD) were slightly below 100%, indicating suppression of ionisation by the presence of co-eluting compounds, which are most likely endogenous compounds present in the blood. The values for recovery were close to 100%. A process efficiency of >80% was obtained for all analytes. Similar values for matrix effect and process efficiency for LSD and 1P-LSD in serum – of 81% – 94% and 58% – 77% respectively – were presented by Grumann et al. (2019). The method developed was specific and free of carryover. The stability testing showed that the blood samples with LSD and its derivatives were stable at room temperature for at least seventy-two hours. No reduction in the peak areas was observed in this time period. The increase in peak areas (>25%), which is difficult to explain, may have been connected with the apparatus used. The stability testing is particularly important due to the photolability of LSD and the use of the method developed in routine work, where samples are often analysed in batches many hours after preparation (Barceloux, 2012). The stability of new LSD derivatives is not well understood in this respect, but studies show that one of the derivatives, that is, 1P-LSD, does not degrade significantly even at room temperature and without protection from light (Grumann et al., 2019).

5. Conclusions

As a result of the analyses and research conducted, a sensitive method for the determination of new derivatives of LSD in biological material (blood) using the LC-MS/MS technique was developed and validated. The detection of LSD derivatives at low concentrations demonstrates that this methodology can be used successfully in the analyses of authentic blood samples. A further advantage is rapid and easy sample preparation with a small volume of biological material, as well as the short time required for the analysis itself. The procedure can be widely used in the detection and determination of LSD derivatives in biological material for forensic and clinical purposes, among others, and can be extended to include new compounds, both those currently known, not included in this study (due to the lack of availability of certified reference materials at the time the method was developed), and new ones appearing on the rapidly growing drug market.

References

1. AAFS Standards Board 2019. *Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology*. American Academy of Forensic Sciences, http://www.asbstandardsboard.org/wp-content/uploads/2019/11/036_Std_e1.pdf.
2. Barceloux, D. G. (2012). Lysergic acid diethylamide (LSD). (In) D. G. Barceloux, *Medical toxicology of drug abuse: synthesized chemicals and psychoactive plants* (pp. 452–466). Wiley.
3. Brandt, S. D., Kavanagh, P. V., Westphal, F., Elliott, S. P., Wallach, J., Stratford, A., Nichols, D. E., Halberstadt, A. L. (2017). Return of the lysergamides. Part III: Analytical characterization of N6-ethyl-6-norlysergic acid diethylamide (ETH-LAD) and 1 propionyl ETH-LAD (1P-ETH-LAD). *Drug Testing and Analysis*, 9(10), 1641–1649. DOI: 10.1002/dta.2196.
4. Brandt, S. D., Kavanagh, P. V., Westphal, F., Stratford, A., Elliott, S. P., Dowling, G., Wallach, J., Halberstadt, A. L. (2019). Return of the lysergamides. Part V: Analytical and behavioural characterization of 1-butanoyl-d-lysergic acid diethylamide (1B-LSD). *Drug Testing and Analysis*, 11(8), 1122–1133. DOI: 10.1002/dta.2613.
5. Brandt, S. D., Kavanagh, P. V., Westphal, F., Stratford, A., Elliott, S. P., Hoang, K., Wallach, J., Halberstadt, A. L. (2016). Return of the lysergamides. Part I: Analytical and behavioural characterization of 1-propionyl-d-lysergic acid diethylamide (1P-LSD). *Drug Testing and Analysis*, 8(9), 891–902. DOI: 10.1002/dta.1884.
6. Brandt, S. D., Kavanagh, P. V., Westphal, F., Stratford, A., Odland, A. U., Klein, A. K., Dowling, G., Dempster, N. M., Wallach, J., Passie, T., Halberstadt, A. L. (2020). Return of the lysergamides. Part VI: Analytical and behavioural characterization of 1-cyclopropanoyl-d-lysergic acid diethylamide (1CP-LSD). *Drug Testing and Analysis*, 12(6), 812–826. DOI: 10.1002/dta.2789.
7. Elliott, S. P., Holdbrook, T., Brandt, S. D. (2020). Prodrugs of new psychoactive substances (NPS): A new challenge. *Journal of Forensic Sciences*, 65(3), 913–920. DOI: 10.1111/1556-4029.14268.
8. Grumann, C., Henkel, K., Brandt, S. D., Stratford, A., Passie, T., Auwärter, V. (2020). Pharmacokinetics and subjective effects of 1P-LSD in humans after oral and intravenous administration. *Drug Testing and Analysis*, 12(8), 1144–1153. DOI: 10.1002/dta.2821.
9. Grumann, C., Henkel, K., Stratford, A., Hermanns-Clausen, M., Passie, T., Brandt, S. D., Auwärter, V. (2019). Validation of an LC-MS/MS method for the quantitative analysis of 1P-LSD and its tentative metabolite LSD in fortified urine and serum samples including stability tests for 1P-LSD under different storage conditions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 174, 270–276. DOI: 10.1016/j.jpba.2019.05.062.

10. Halberstadt, A. L., Chatha, M., Klein, A. K., McCorvy, J. D., Meyer, M. R., Wagmann, L., Stratford, A., Brandt, S. D. (2019). Pharmacological and biotransformation studies of 1-acyl-substituted derivatives of d-lysergic acid diethylamide (LSD). *Neuropharmacology*, 172, 107856. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2019.107856.
11. Halberstadt, A. L., Geyer, M. A. (2013). Neuropharmacology of lysergic acid diethylamide (LSD) and other hallucinogens. (In) P. M. Miller (Ed.), *Biological research on addiction* (pp. 625–635). Academic Press.
12. Liester, M. B. (2014) A review of lysergic acid diethylamide (LSD) in the treatment of addictions: historical perspectives and future prospects. *Current Drug Abuse Reviews*, 7(3), 146–156. DOI: 10.2174/1874473708666150107120522.
13. Molina, D. K. (2010). *Handbook of forensic toxicology for medical examiners*. Boca Raton: CRC Press.
14. Passie, T., Halpern, J. H., Stichtenoth, D. O., Emrich, H. M., Hintzen, A. (2008). The pharmacology of lysergic acid diethylamide: A review. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 14(4), 295–314. DOI: 10.1111/j.1755-5949.2008.00059.x.
15. Wagmann, L., Richter, L. H. J., Kehl, T., Wack, F., Bergstrand, M. P., Brandt, S. D., Stratfor, A., Maurer, H. H., Meyer, M. R. (2019). In vitro metabolic fate of nine LSD-based new psychoactive substances and their analytical detectability in different urinary screening procedures. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411(19), 4751–4763. DOI: 10.1007/s00216-018-1558-9.

ORCIDPiotr Adamowicz  0000-0002-7830-9329**Corresponding author**

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

WYKRYWANIE I OZNACZANIE NOWYCH POCHODNYCH LSD W MATERIALE BIOLOGICZNYM TECHNIKĄ LC-MS/MS

1. Wprowadzenie

Dietyloamid kwasu D-lizergowego (LSD, LSD-25) jest półsyntetycznym związkiem otrzymywanym z kwasu lizergowego (Ryc. 1), który naturalnie występuje w sporyszu – przetrwalniku grzyba buławinki czerwonej (*Claviceps purpurea*; Passie, Halpern, Stichtenoth, Emrich, Hintzen, 2008; Barceloux, 2012). LSD został po raz pierwszy zsyntezowany w 1938 roku przez szwajcarskiego chemika Alberta Hofmanna w laboratoriach firmy Sandoz (obecnie Novartis). Celem syntezy LSD było uzyskanie związku działającego podobnie do niketamidu wykazującego działanie pobudzające na układ oddechowyy i układ krążenia. Działanie psychoaktywne, z którego LSD jest znane dzisiaj, zostało przypadkowo odkryte w 1943 roku. LSD było w latach 40. i 50. XX wieku stosowane w psychiatrii, a w latach 60. i 70. zyskało popularność jako substancja psychodeliczna (Barceloux, 2012). LSD jest agonistą receptora 5-HT_{2A} uważanego za kluczowy z punktu widzenia działania halucynogenego. Znacząco zmienia stan świadomości (Passie i in., 2008; Liester, 2014), jego użytkownicy doświadczają zjawisk transcendentnych lub mistycznych (Liester, 2014). Wśród zmian percepcyjnych wywołanych przez spożycie tego narkotyku wyróżnia się przede wszystkim zmiany wizualne, głównie w postaci halucynacji, iluzji i zniekształceń (Liester, 2014; Halberstadt, Geyer, 2013). Często widziane są kolorowe lub wzorzyste figury geometryczne. Mogą występować również zmiany w kształtach przedmiotów, które mogą się dodatkowo poruszać czy rozpuszczać, oraz zmiany w wyglądzie ludzkich twarzy. Do innych objawów należą: zniekształcenie trójwymiarowej przestrzeni, rozmycie widzenia i zmiany w postrzeganiu kolorów. Wśród zmian słuchowych, jakie wywołuje LSD, wymienia się przede wszystkim halucynacje słuchowe, zmniejszoną lub zwiększoną wrażliwość na dźwięk, problem z lokalizacją źródła dźwięku czy niemożność zrozumienia dźwięków (Liester, 2014). LSD wywołuje również mieszanie bodźców sensorycznych, czyli tzw. synestezję lub percepcję krzyżową. Wyróżnia się głównie widzenie dźwięków i słyszenie kolorów (Barceloux, 2012). Mogą również wystąpić zmiany percepcji dotykowej, węchowej czy smakowej (Halberstadt, Geyer, 2013). Wśród efektów poznawczych występują głównie depersonalizacja, zmniejszona koncentracja, uczucie spowolnienia czasu, niezdolność do kontrolowania myśli, nowe spojrzenie na siebie lub innych. LSD może również wywoływać skutki przeciwne do zamierzonych. W przypadku wystąpienia tzw. „złych podróży” (*bad trip*) człowiek doświadcza stanu nieprzyjemnych,

wypełnionych lękiem odczuć i halucynacji czy przerażających myśli. Efekty halucynogenne mogą powrócić nawet po miesiącach lub nawet latach od ostatniego przyjęcia narkotyku w postaci tzw. „odbić” (*flashbacks*), czyli epizodycznych, krótkotrwałych stanów, głównie w postaci omamów wzrokowych, np. barwnych wzorów geometrycznych czy błysków kolorów. Poza symptomami związanymi z układem nerwowym pojawiają się również symptomy fizyczne. Charakterystycznym, często występującym objawem po spożyciu LSD, są rozszerzone źrenice. Wśród innych powszechnych oznak użycia LSD wyróżnia się: wzrost temperatury ciała, tętna, ciśnienia krwi i tachykardię. Mogą występować również takie efekty somatyczne, jak: ogólne złe samopoczucie, osłabienie, zmęczenie, ból głowy, nudności, wymioty, biegunka, nadmierne ślinienie się, pocenie się i łzawienie oczu (Passie i in., 2008; Barceloux, 2012; Halberstadt, Geyer, 2013; Liester, 2014).

Jedną z dróg powiększania się liczby substancji psychoaktywnych na rynku narkotykowym jest wprowadzanie pochodnych znanych związków, np. klasycznych narkotyków. Zjawisko masowego wprowadzania do obrotu nowych syntetycznych substancji zaczęło się rozwijać na początku XXI wieku. Dopalacze, nowe narkotyki, a w powszechnie używanym języku angielskim m.in.: *legal highs*, *designer drugs*, *boosters* czy *research chemicals* to tylko niektóre nazwy określające takie nowe substancje psychoaktywne (*new psychoactive substances* – *NPS*). *NPS* bardzo często stanowią pod względem chemicznym proste modyfikacje substancji kontrolowanych, co jest spowodowane faktem, że substancje te są syntetyzowane w celu ominięcia obowiązujących przepisów antynarkotykowych, zwykle poprzez zmianę struktury znanych środków odurzających i substancji psychotropowych, np. dodatkowych grup chemicznych (np. metylowych).

W ostatnim czasie na rynku *NPS* zaczęły się pojawiać pochodne LSD (Ryc. 2). Wśród nich wyróżnia się m.in. związki z podstawnikiem w postaci grupy acylowej przy azocie indolowym. Należą do nich: 1-acetylo-LSD (ALD-52), 1-propionylo-LSD (1P-LSD), 1-cyklopropionylo-LSD (1cP-LSD), 1-butanoilo-LSD (1B-LSD) (Brandt i in., 2016, 2019, 2020; Halberstadt i in., 2019). Innymi pochodnymi są związki, w których nastąpiła modyfikacja podstawnika w pozycji N⁶, którym w przypadku LSD jest grupa metylowa. Przykładami są N⁶-allilonor-LSD (AL-LAD) oraz N⁶-etylnor-LSD (ETH-LAD) (Brandt i in., 2017; Wagmann i in., 2019). 1-propanoilo-N⁶-etylnor-LSD (1P-ETH-LAD) łączy zmiany w obu tych pozycjach (Wagmann i in., 2019). Znane są również

pochodne, takie jak: N-etylo-N-cyklopropylo-lizergamid (ECPLA), 2,4-dimetyloazetyd kwasu lizergowego (LSZ) i morfolid kwasu lizergowego (LSM-775) (Brandt i in., 2017; Wagmann i in., 2019; Grumann i in., 2019).

Pochodne podstawione grupą acylową w pozycji N¹ wykazują mniejszą siłę działania niż związek macierzysty. Ich powinowactwo do receptorów monoaminowych, głównie dopaminergicznych czy serotonergicznych, w tym najważniejszego w przypadku działania LSD 5-HT_{2A}, jest mniejsze (Halberstadt i in., 2019; Brandt i in., 2020; Elliott, Holdbrook, Brandt, 2020). Homologi LSD z podstawnikami w pozycji N⁶ mogą wykazywać wyższą siłę działania w przypadku podstawników etylowych, n-propylowych czy alilowych bądź niższą w przypadku podstawników dłuższych, jak np. grupa n-butylova czy izopropylowa. Należy jednak zaznaczyć, że badań dotyczących działania pochodnych LSD jest znacznie mniej niż tych dotyczących samego LSD (Brandt i in., 2017).

Związki o zmodyfikowanej strukturze w pozycji N¹ są w organizmie szybko hydrolizowane do LSD (Brandt i in., 2020; Elliott, Holdbrook, Brandt, 2020; Grumann i in., 2020). 1P-ETH-LAD metabolizuje do ETH-LAD (Brandt i in., 2017; Brandt i in., 2020; Elliott, Holdbrook, Brandt, 2020). Powoduje to trudności w identyfikacji w materiale biologicznym przyjętej substancji psychoaktywnej, gdyż substancja macierzysta może zostać niewykryta. Jest to istotne m.in. w świetle prawa, gdyż w niektórych krajach pochodne LSD są legalne w przeciwieństwie do LSD, kontrolowanego na arenie międzynarodowej. Na możliwość wykrycia pochodnych LSD w materiale biologicznym mają również wpływ: sposób przyjęcia, czas pobrania próbki oraz sposób jej przechowywania. Podanie dożylnie zwiększa szansę detekcji związku macierzystego. Po doustnym przyjęciu trudniej jest wykryć pochodne LSD w materiale biologicznym ze względu na wyżej wspomnianą hydrolizę. Im krótszy czas od pobrania, tym również większa szansa na wykrycie odpowiedniego związku. Przechowywanie próbek biologicznych w odpowiednio niskiej temperaturze, a przede wszystkim ochrona przed światłem, mogą uchronić anality przed degradacją, ponieważ pochodne mogą być wrażliwe na warunki przechowywania, podobnie jak LSD (Grumann i in., 2019, 2020).

Bardzo niskie dawki działające, niskie stężenia w biopróbkach oraz szybkie przemiany w organizmie stwarzają duże problemy analityczne. Wykrywanie, identyfikacja i oznaczanie pochodnych LSD wymaga użycia bardzo czułych metod analitycznych. W związku z powyższym celem niniejszych badań było opracowanie i walidacja metody wykrywania i oznaczania nowych pochodnych LSD we krwi przy użyciu chromatografii cieczowej połączonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS).

2. Metoda

2.1. Materiały i odczynniki

Certyfikowane wzorce ALD-52, 1P-LSD, 1cP-LSD oraz 1B-LSD zakupiono w firmie Cayman Chemical Company (USA). LSD i LSD-D₃ pochodziły z firm Cerilliant (USA). Acetonitryl, octan etylu i kwas mrówkowy (98–100%) zakupiono w firmie Merck (Warszawa, Polska).

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

2.2. Przygotowanie próbek do badań

Do próbek krwi (0,2 ml) umieszczonych we fiolkach typu Eppendorf dodawano standard wewnętrzny LSD-D₃, tak aby osiągnąć stężenie 10 ng/ml. Następnie dodawano 0,2 ml buforu octanowego o pH 5,5 oraz 1 ml octanu etylu. Próby wytrząsano przez 5 minut, a następnie wirowano przez 5 minut przy 12 700 obr./min, po czym fazę organiczną (800 µl) przenoszono do szklanych fiolek i odparowywano do sucha w temperaturze 37°C. Suchą pozostałość rozpuszczano w 100 µl mieszaniny 1 : 1 (v/v) składników fazy ruchomej: 0,1% kwasu mrówkowego w acetonitrylu oraz 0,1% kwasu mrówkowego w wodzie. Po wytrząsaniu przez 10 minut zawartość fiolek przenoszono do polipropylenowych wkładek (insertów). Fiolki z insertami przed umieszczeniem w automatycznym podajniku próbek chroniono przed światłem. Objętość dozowanej próbki wynosiła 10 µl.

2.3. Aparatura i warunki analizy

W badaniach wykorzystano chromatograf cieczowy serii 1200 sprzężony ze spektrometrem mas 6460 Triple Quad firmy Agilent Technologies. Aparat pracował w trybie jonizacji pozytywnej (+ESI). Rozdział prowadzono na kolumnie Kinetex C18 (4,6 × 100 mm, 2,6 µm) firmy Phenomenex. Fazę ruchomą przepływającą przez kolumnę z szybkością 0,5 ml/min stanowiła mieszanina 0,1% kwasu mrówkowego w wodzie oraz 0,1% kwasu mrówkowego w acetonitrylu. Zastosowano następujący program gradientowy (w odniesieniu do zawartości acetonitrylu): 0 min – 15%, 1 min – 15%, 13 min – 90%, 14,0 min – 90%, 14,5 min – 15%, 17 min – 15%. Całkowity czas analizy wynosił 17 minut. Czasy retencji analitów, monitorowane przejścia MRM jonów (*m/z*) oraz wartości energii kolizji i napięć zestawiono w tabeli 1. Pozostałe parametry detektora mas były następujące:

napięcie kapilary: 3000 V, przepływ gazu (N_2): 10 l/min, temperatura gazu: 325°C, przepływ gazu osłonowego (N_2): 11 l/min, temperatura gazu osłonowego: 325°C, ciśnienie rozpylacza: 40 psi. Zbieranie i analizę danych prowadzono za pomocą oprogramowania MassHunter firmy Agilent Technologies.

2.4. Walidacja metody

Walidacja opracowanej metody do oznaczania nowych pochodnych LSD w materiale biologicznym została przeprowadzona w oparciu o zalecenia opracowane przez Amerykańską Akademię Nauk Sądowych (*American Academy of Forensic Sciences, AAFS*) (ANSI/ASB Standard 036; AAFS, 2019).

Dla wszystkich analitów sporządzono pięciopunktowe (0,5; 1; 2; 5; 10 ng/ml) krzywe kalibracyjne ($n = 5$). Granice wykrywalności (LOD) wyznaczono przy użyciu oprogramowania MassHunter na podstawie najniższego stężenia, dla którego stosunek sygnału do szumu (S/N) dla wybranej pary MRM (o najniższej intensywności z trzech monitorowanych) był ≥ 3 . Jako granicę oznaczalności (LOQ) przyjęto najniższy punkt krzywej kalibracyjnej. Określono również powtarzalność ($n = 3$) i precyzję pośrednią ($n \geq 11$) oraz dokładność. Powyższe parametry wyznaczono dla trzech poziomów stężeń: 0,1 ng/ml, 1 ng/ml oraz 10 ng/ml.

Powtarzalność i precyzję pośrednią metody wyrażono jako współczynnik zmienności %CV, opisany wzorem:

$$\%CV = \left(\frac{\text{odchylenie standardowe}}{\text{średnie stężenie analitu}} \right) \cdot 100\%.$$

Dokładność metody została wyrażona jako błąd względny [%], obliczony według poniższego wzoru:

$$\text{Błąd względny} = \left(\frac{\text{średnie stężenie analitu} - \text{teoretyczne stężenie analitu}}{\text{teoretyczne stężenie analitu}} \right) \cdot 100\%.$$

W celu wyznaczenia efektu matrycy, wydajności ekstrakcji oraz wydajności procesu wykonano analizę trzech serii próbek. Badania prowadzono na dwóch poziomach stężeń: 1 i 5 ng/ml (dla każdego poziomu $n = 5$). Efekt matrycy określono na podstawie stosunku średniego pola powierzchni piku analitów dodanych po procesie ekstrakcji (B) do średniego pola powierzchni piku badanych substancji wzorcowych (A). Efekt matrycy, wyrażony w procentach, obliczono według poniższego wzoru:

$$\text{efekt matrycy} [\%] = \left(\frac{B}{A} \right) \cdot 100\%.$$

W celu określenia wydajności ekstrakcji (odzysku) określono stosunek średniego pola powierzchni piku badanych substancji w próbkach krwi wzbogaconych przed ekstrakcją (C) do średniego pola powierzchni piku tych

związków w próbkach krwi wzbogaconych po ekstrakcji (B). Wydajność ekstrakcji, wyrażoną w procentach, obliczono według poniższego wzoru:

$$\text{wydajność ekstrakcji} [\%] = \left(\frac{C}{B} \right) \cdot 100\%.$$

Wydajność procesu określono poprzez stosunek średniego pola powierzchni piku badanych substancji w próbkach krwi wzbogaconych przed ekstrakcją (C) do średniego pola powierzchni piku badanych substancji wzorcowych (A). Wartości wydajności procesu, wyrażone w procentach, obliczono korzystając ze wzoru:

$$\text{wydajność procesu} [\%] = \left(\frac{C}{A} \right) \cdot 100\%.$$

Do zbadania specyficzności metody użyto prób krwi pochodzących ze spraw analizowanych w Instytucie Ekspertyz Sądowych, w których nie wykazano LSD i jego pochodnych ($n = 12$). Zbadano również efekt przeniesienia – w tym celu prowadzono naprzemiennie pomiary prób krwi z analitami o stężeniu 10 ng/ml ($n = 3$) oraz prób krwi bez dodatku analitów ($n = 3$). Przeprowadzono także badania stabilności. Przygotowano próbki krwi wzbogacone analitami do stężenia 1 ng/ml ($n = 3$) oraz próbki krwi z analitami o stężeniu 10 ng/ml ($n = 3$). Próbkami były analizowane po przygotowaniu oraz po upływie 24, 48 i 72 godzin, pozostając cały czas w automatycznym podajniku próbek w temperaturze pokojowej. Następnie porównano zmiany pola powierzchni pod pikiem dla każdego z analitów w zależności od czasu analizy. Jako wartość 100% przyjęto pola powierzchni dla próbek mierzonych od razu po przygotowaniu (w czasie 0 godz.), a wartości z kolejnych dni były ich proporcjonalnym odniesieniem.

3. Wyniki

Wyniki walidacji przedstawiono w tabelach 2–6. Należy zaznaczyć, że w badaniach specyficzności nie zaobserwowano interferencji. Nie wystąpił również efekt przeniesienia pomiędzy próbkami. Zmiany zachodzące w próbkach przechowywanych w automatycznym podajniku próbek przez 72 godziny wskazały, że są one stabilne przez taki czas. Przykładowe chromatogramy krwi wzbogaconej analizowanymi pochodnymi LSD w stężeniu 5 ng/ml przedstawiono na rycinie 3.

4. Dyskusja

Niebezpieczeństwo związane z ciągłym rozwojem rynku narkotykowego niesie za sobą konieczność rozwiązywania problemów na wielu płaszczyznach, począwszy od ratowania zdrowia i życia człowieka po

dążenie do opracowywania jak najlepszych metod wykrywania substancji psychoaktywnych w materiale biologicznym. Grupa pochodnych LSD ze względu na niskie stężenia w materiale biologicznym, a także szybką hydrolizę do LSD, a tym samym możliwość niewykrycia przyjętej substancji psychoaktywnej, doskonale obrazuje problematykę wykrywania NPS w materiale biologicznym. W tym przypadku konieczne jest stosowanie technik o wysokiej czułości, do których należy LCMS/MS.

Opracowując metodę oznaczania nowych pochodnych LSD w materiale biologicznym, postarano się, aby przygotowanie próbki było procesem prostym w wykonaniu, jak najmniej czasochłonnym. Udało się to osiągnąć poprzez zastosowanie ekstrakcji ciecz-ciecz przy użyciu octanu etylu i buforu o pH 5,5. Optymalizacja warunków chromatograficznych pozwoliła na przeprowadzenie analizy chromatograficznej oraz stabilizacji fazy ruchomej w czasie 17 minut. Zastosowanie tandemowego analizatora mas i praca w trybie MRM zwiększyła czułość i selektywność metody. W prowadzonych badaniach dla wszystkich analitów monitorowane były jony macierzyste oraz po trzy jony potomne (trzy pary MRM), co wzmocniło identyfikację.

Opracowana metoda została zwalidowana zgodnie z zaleceniami AAFS dla metod przesiewowych oraz pod kątem analizy ilościowej (AAFS, 2019). Uzyskane wartości LOD (0,01 ng/ml) były zbliżone do tych przedstawionych w metodach opracowanych przez innych autorów (Grumann i in., 2019). Sporządzone krzywe kalibracyjne dla LSD oraz jego czterech pochodnych zachowywały liniowość w zakresie stężeń 0,5–10 ng/ml. Biorąc pod uwagę typowy zakres stężeń LSD we krwi osób przyjmujących tę substancję określany na 1–5 ng/ml, można wnioskować, że opracowana metoda jest odpowiednia do detekcji oraz oznaczania tego typu substancji w materiale biologicznym (Molina, 2010). Powtarzalność, precyzję pośrednią oraz dokładność wyznaczono na trzech poziomach stężeń: 0,1 ng/ml, 1 ng/ml oraz 10 ng/ml. Wyznaczone wartości dla stężeń mieszczących się w zakresie krzywych kalibracyjnych (1 i 10 ng/ml) nie przekraczały akceptowalnego poziomu $\pm 20\%$. Nieakceptowalne wyniki zanotowano tylko na najniższym poziomie (0,1 ng/ml) leżącym poza krzywą kalibracyjną (poniżej LOQ).

Wartości efektu matrycy dla większości badanych związków (z wyjątkiem 1B-LSD) były nieznacznie niższe niż 100%, co wskazuje na tłumienie jonizacji przez obecność związków koelujących, którymi są najprawdopodobniej endogenne związki obecne we krwi. Wartości wydajności ekstrakcji były zbliżone do wartości 100%. Dla wszystkich analitów uzyskano wydajność procesu na poziomie $>80\%$. Zbliżone wartości efektu matrycy i wydajności procesu zaprezentowali Grumann i in. (2019) dla LSD i 1P-LSD w surowicy, które wynosiły odpowiednio 81–94% i 58–77%. Opracowana metoda była

specyficzna i wolna od zjawiska przeniesienia. Przeprowadzone badanie stabilności wykazało, że próbki krwi z LSD i jego pochodnymi są stabilne w temperaturze pokojowej przez co najmniej 72 godziny. Nie zaobserwowano, aby pola powierzchni ulegały zmniejszeniu w tym czasie, a trudno wytłumaczalny wzrost powierzchni pików ($>25\%$) może mieć podłoże aparaturowe. Badanie stabilności jest szczególnie istotne ze względu na fotolabilność LSD oraz wykorzystanie opracowanej procedury w rutynowych pracach, gdzie próbki często są analizowane partiami po wielu godzinach od przygotowania (Barceloux, 2012). Stabilność nowych pochodnych LSD nie jest dobrze poznana w tym zakresie, ale badania wykazują, że jedna z pochodnych, tj. 1P-LSD, nie ulega znacznej degradacji nawet w temperaturze pokojowej i bez ochrony przed światłem (Grumann i in., 2019).

5. Wnioski

W wyniku przeprowadzonych badań opracowano i zwalidowano czułą metodę oznaczania nowych pochodnych LSD w materiale biologicznym (krew) techniką LC-MS/MS. Wykrywanie pochodnych LSD w niskich stężeniach świadczy o tym, że metodyka ta może być stosowana z powodzeniem w badaniach autentycznych prób krwi. Kolejną zaletą jest szybkość i łatwość przygotowania próbki przy małej objętości materiału biologicznego, a także krótki czas samej analizy. Procedura może mieć szerokie zastosowanie w wykrywaniu i oznaczaniu pochodnych LSD w materiale biologicznym m.in. dla celów sądowych oraz klinicznych i może być rozszerzona o nowe związki, zarówno te aktualnie znane, nieujęte w niniejszych badaniach (ze względu na brak dostępności wzorców w momencie opracowania metody), jak i nowe, pojawiające się na szybko rozwijającym się rynku narkotykowym.