

# LSD DETERMINATION USING HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH FLUORESCENCE SPECTROSCOPY

Wojciech LECHOWICZ  
*Institute of Forensic Research, Cracow*

**ABSTRACT:** The confirmation and definition of the quantity of LSD in biological fluids can be performed successfully by high performance liquid chromatography and fluorescence spectroscopy. The application of microextraction for this purpose makes analysis simpler and more reliable, and control over each step of the extraction process is easier. This paper presents one such method. It must be remembered that preliminary (screening) tests should be performed prior to definition of quantity. In this method n-butyl chloride was applied as the extracting of LSD from an alkaline pH = 9 solution. Lysergic acid methylpropylamide (LAMPA) as the internal standard was added to a small volume (0.2 ml) of the specimen (blood or urine). The LSD recovery was 63% and the detection limit (S/N = 3) was 130 pg/ml. No interfering peaks from the matrix were observed during analysis. One case of LSD intoxication with 10.8 ng/ml in urine has been described.

**KEY WORDS:** LSD; Fluorescence detection; HPLC; Blood; Urine.

*Z Zagadnień Nauk Sądowych, z. XXXIX, 1999, 54–64*  
*Received 9 September 1998; accepted 23 February 1999*

## INTRODUCTION

LSD – lysergic acid diethylamide – is one of the strongest psychoactive substances, which produce hallucinations and vision and hearing distortion (Figure 1). Almost as soon as it had been synthesised, this compound became the subject of great interest both among psychologists and persons using previously available addictive substances [5].

LSD was first synthesised by Albert Hoffman in 1938 at the Sandoz pharmaceutical laboratory in Basel.

The semisynthetic derivative of lysergic acid – an alkaloid occurring in ergot (*Claviceps purpurea*) and wood rose (*Ipomea violacea*) – was named LSD 25, since it was the twenty-fifth compound in that series synthesised by Hoffman [3]. Soon after the synthesis was completed, the compound was marketed as Delysid, and was very popular, especially among psychiatrists, for a long time. They administered Delysid in the treatment of certain illnesses, e.g. schizophrenia. The spread of the abuse, or use of LSD for

non-medical purposes, led to its being outlawed by the United States Federal government in 1965, and in Great Britain it was placed on the list of controlled substances in 1971. In Poland, the Act on the Counteraction of Drug Addiction, which was amended in 1997, describes LSD as an I-P classified controlled psychoactive substance. It is most commonly distributed in the form of impregnated blotting papers, but also in the form of stamps with LSD in the glue (Figure 2). Impregnated sugar cubes or chewing gum can be found on the street market as well [2].

These media contain 20–200 µg of LSD as a base, although usually it is

Fig. 1. Chemical structure of lysergic acid diethylamide (LSD) and lysergic acid methylpropylamide (LAMPA).

50–100 µg. This means that the ingested dose of LSD is on average 1 mg/kg body weight. Such low doses and fast metabolism (N-demethylation, N-deethylation, and hydroxylation) considerably complicate the identification and definition of the quantity of the compound in body fluids and tissues [2]. Additional factors that make the analysis of LSD difficult are its sensitivity to ultraviolet light and increased temperature which induce isomerisation or even thermal dissociation. This is especially important in the storage and preparation of the material for further tests.

LSD is ingested with drinks spiked with the media mentioned above or by placing the media on parts of the body covered with mucosa or thin epiderma, for example under the tongue, upper eyelid or prepuce. They can also be introduced vaginally or anally.

Fig. 2. Examples of LSD-containing papers.

The concentrations of LSD in the blood and urine in case of intoxication are nano- or pikograms, i.e. low, particularly more than twelve hours after ingestion [6].

Unlike the analysis of biological samples, the analysis of LSD-containing media does not present significant problems. Such analysis can be conducted using thin layer chromatography or high-pressure liquid chromatography spectrophotometric detection.

The analytical techniques at present used for the analysis of LSD in biological samples include radioimmunoassay (RIA), enzymeimmunoassay (EIA) [1], gas chromatography mass spectrometry (GC-MS, GC-MS-MS) and high-pressure and liquid chromatography fluorescence detection (HPLC/FL) and mass spectrometry (LC-MS, LC-MS-MS).

Although the LC-MS technique seems to be the most appropriate, GC-MS is regarded as the reference method in LSD analysis. High-pressure liquid chromatography fluorescence detection is a technique that can be applied successfully for the confirmation and quantification of LSD. Although it is regarded as less accurate by comparison with mass spectrometric methods, it is equally sensitive.

The low costs of analysis and easy access to appropriate equipment give this technique distinct advantages over those mentioned above.

The aim of the research presented here was to develop a method of determining the presence of LSD in blood and urine using liquid-liquid micro-extraction and high-pressure liquid chromatography fluorescence detection.

## MATERIALS AND METHODS

Extraction was conducted using 0.2 ml samples of blank blood spiked with appropriate quantities of standard solutions: 20 ng/ml LSD (Sigma) and 50 ng/ml LAMPA – lysergic acid methylpropylamide (Radian) – as the internal standard. The appropriate acidity (pH) of the material under examination was achieved by the addition of 0.2 ml of a solution of saturated buffer carbonates ( $0.1 \text{ M Na}_2\text{CO}_3/1 \text{ M NaHCO}_3$ ). This mixture was extracted in Ependorff phials with 1 ml of n-butyl chloride (Baker) using vortex at vibration frequencies of 50 Hz. If necessary the organic phase was cleaned with 0.4 ml of saturated buffer carbonates. Extracts were evaporated in a stream of air at 37°C.

Dry residues were dissolved in 50 µl of mobile phase. The same procedure is applied for samples for evidence submitted for examination.

A LaChrom D-7000 System liquid chromatographer with an L-7480 (Merck-Hitachi) fluorescence detector were used in the analysis. The separation was carried out using a LiChroCART 125 x 4 column with LiChrospher 60 RP select-B (Merck) packing. As a mobile phase a mixture of acetonitrile and acetate buffer solution of pH = 8.0 was used. This buffer so-

lution was obtained in the following way: 3.85 g of ammonium acetate was dissolved in 450 ml water, then adding triethylamine pH = 8.0 was achieved; this solution was filled with water up to 500 ml of volume and mixed with 220 ml of acetonitrile. The wavelengths of the excitation and the emission light were: 320 nm and 400, respectively [6].

## RESULTS AND DISCUSSION

In order to carry out bioanalysis using high-performance fluorescence detection, the extracts must usually be cleaned prior to the analysis, or a special extraction process must be used. This is connected with the possible occurrence of co-eluting substances with the compound under examination. The removal of such substances facilitates the best possible exploitation of the sensitivity of the fluorescence detector.

In the case of LSD and LAMPA extraction, n-butyl chloride was found to give "clean extracts". None of the co-extracted compounds interfered with the analysis of the LSD.

Fig. 3. Comparison of two chromatograms obtained after analysis of blood and urine spiked with LSD 4 ng/ml and LAMPA 5 ng/ml.

The use of saturated carbonate buffer of pH = 9 achieved a satisfactory LSD extraction rate. The relatively low inter-group recovery of LSD and LAMPA – average 63% (SD = 13%, n = 3) – was compensated for by a good

rate of LSD/LAMPA recoveries. The standard deviation of intra-group recovery was 6.5% for an LSD concentration of 0.5 ng/ml ( $n = 5$ ), and the coefficient of variance was less than 14%. This proves that the two substances have similar properties. The LSD recovery was calculated by the comparison of the height of the LSD peak obtained from the analysis of the spiked material of known concentration with the height of the LSD peak of appropriate concentration calculated from the calibration curve. Despite the minor difference between the LSD and LAMPA retention times, which suggests their similarity, separation was still possible. There were no significant differences between the recovery of LSD and LAMPA extracted from blood and urine (Figure 3).

The limit of LSD detection ( $S/N = 3$ ) was on average 130 pg/ml. The calibration curve was linear ( $R^2 = 0.9968$ ) in the examined range of concentrations, i.e. 125–4000 pg/ml for blood (Figure 4) and 0.5–10 ng/ml for urine ( $R^2 = 0.9976$ ).

The mobile phase used for separation (by HPLC) gave repeatable retention times on the day of its preparation. However, the same mobile phase used again on the next day gave considerably longer retention times. This was probably caused by the presence of volatile triethylamine, which partly evaporates in the night, causing changes to the mobile phase composition and consequently to the retention times.

Fig. 4. Calibration curve of LSD extracted from spiked blood (0–4000 pg/ml).

The phenomenon is well known, however it is worth emphasising, especially when analysing substances which are particularly sensitive pH changes in a mobile phase. Mobile phases containing volatile substances should be stored in full containers to prevent evaporation.

The use of a relatively simple extraction procedure lasting a short time and using only automatic pipettes to measure volume made control over the extraction process easy, gave a high degree of precision, and consequently a good level of repeatability of the results of the analysis.

The procedure was applied in a case of a man captured by the police during crime. During obstruction in the hospital, the man was found to have hallucinations. His pupils were slightly enlarged but its reaction on light

was maintained. Forensic specimen (urine) taken from the suspect was undergone toxicological analysis.

Result of the examination was the presence of LSD in urine in concentration of 10.8 ng/ml  $\pm$ 0,9 ng/ml (Figure 5).

Fig. 5. Comparison of chromatograms obtained during analysis of the suspect's urine, spiked urine with LSD (4 ng/ml) and blank urine. Concentration of internal standard LAMPA was 5 ng/ml for all samples.

## CONCLUSIONS

This method facilitates the confirmation of the presence of lysergic acid diethylamide in blood and urine and its quantification in urine in concentrations occurring up to 48 hours after ingestion (0,5 ng/ml).

N-butyl chloride used in extraction gave "clean extracts", which is important especially during bioanalysis with fluorescence detection. This solvent is particularly useful in the extraction of weak polar or non-polar compounds.

A considerable problem could be the accidental contamination of examined samples of evidence material by traces of LSD transferred on protective gloves, pipettes and other laboratory equipment. Therefore, the sequence and methods for carrying out the various steps of the analytical process should always be strictly followed.

This problem can be partly resolved by handling any LSD solutions only after the specimens have been prepared.

## References:

1. Cody J. T., Valtier S., Immunoassay analysis of lysergic acid diethylamide, *Journal of Analytical Toxicology* 1997, vol. 21, pp. 459–454.
2. Folz R. L., Foltz R. B., Advances in analytical toxicology, vol. 2, Year Book Medical Publishers Inc., New York 1989, pp. 140–158.
3. Freedman D. X., Pechnick R. N., Lysergic acid diethylamide (LSD) and psychedelics, [in:] *Encyclopedia of drugs and alcohol*, Macmillan Library Reference, New York 1995, pp. 647–652.
4. Karch S. B., Pathology of drugs of abuse, CRC Press Inc., Boca Raton 1996, pp. 267–270.
5. Poisoning & drug overdose, Olson K. R. [ed.], Prentice-Hall International Inc., San Francisco 1990, pp. 191–194.
6. Twitchett P. J., Fletcher S. M., Sullivan A. T. [et al.], Analysis of LSD in human body fluids by High Performance Liquid Chromatography, fluorescence spectroscopy and radioimmunoassay, *Journal of Chromatography* 1978, vol. 150, pp. 73–84.

# OZNACZANIE LSD METODĄ WYSOKOCIŚNIENIOWEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ Z DETEKcją FLUORESCENCYJNĄ

Wojciech LECHOWICZ

## WSTĘP

LSD – dietyloamid kwasu lizergowego jest jedną z najsilniej działających substancji psychoaktywnych, które wywołują halucynacje, wizje lub doznania dźwiękowe (rycina 1). Niemal od chwili dokonania jego syntezy znalazł się w kręgu zainteresowania nie tylko psychologów, ale również osób sięgających po znane już wcześniej środki uzależniające [5].

Synteza LSD została przeprowadzona po raz pierwszy przez Alberta Hoffmana w roku 1938 w laboratorium firmy farmaceutycznej Sandoz w Bazylei. Półsyntetyczna pochodna kwasu lizergowego, alkaloidu występującego m.in. w buławince czerwonej (*Claviceps purpurea*) czy nasionach wilca (*Ipomea violacea*), została określona nazwą LSD 25, gdyż była z kolei dwudziestą piątą pochodną tego kwasu otrzymaną przez Hoffmana [3]. Wkrótce związek ten został zarejestrowany jako lek pod nazwą Delysid i przez długi okres czasu cieszył się dość dużą popularnością w środowisku psychiatrów, stosowano go bowiem w leczeniu niektórych schorzeń, np. schizofrenii.

Rozszerzające się zjawisko pozamedycznego stosowania LSD jako środka odurzającego doprowadziło do uznania go w 1965 roku przez rząd federalny Stanów Zjednoczonych za nielegalny. Wielka Brytania umieściła ten środek wśród substancji kontrolowanych w roku 1971. Polska „Ustawa o przeciwdziałaniu narkomanii” znowelizowana w 1997 roku, kwalifikuje LSD do grupy I-P, czyli substancji psychotropowych znajdujących się pod kontrolą.

LSD jest rozprowadzane najczęściej w impregnowanych roztworem tego związku papierkach z bibuły lub cienkiej tektury, a także na znaczkach (LSD znajduje się w kleju, rycina 2). Spotyka się również kostki cukru lub gumę do żucia nasączone roztworem tej substancji [2].

Nośniki te mogą zawierać 20–200 µg LSD w przeliczeniu na zasadę. Zazwyczaj jest to 50–100 µg. Przyjmowana dawka LSD wynosi więc około 1 µg/kg wagi ciała. Tak niskie dawki oraz szybki metabolizm (N-demetylacja, N-deetylacja, hydroksylacja) powodują, iż identyfikacja oraz oznaczenie tego związku w płynach ustrojowych czy tkankach jest dosyć skomplikowane [2]. Dodatkowymi czynnikami utrudniającymi identyfikację i oznaczenie LSD jest jego wrażliwość na promieniowanie ultrafioletowe oraz podwyższoną temperaturę, które to czynniki powodują jego izomerizację lub rozkład. Ma to szczególne znaczenie w procesie przechowywania i przygotowywania materiału do późniejszych badań.

LSD jest wprowadzane do organizmu wraz z napojami, do których dodaje się wspomniane wyżej nośniki albo poprzez umieszczenie ich w miejscach pokrytych śluzówką lub cienkim naskórkiem, np. pod językiem, powieką czy napletkiem. Można je również stosować dopochwowo oraz doodbytniczo.



Poziomy stężenie LSD we krwi lub moczu w przypadkach przyjęcia tego związku są bardzo niskie, rzędu nanogramów lub pikogramów, szczególnie po upływie kilkunastu godzin od chwili wprowadzenia go do organizmu [6].

W przeciwieństwie do analizy materiałów biologicznych, badanie nośników LSD nie nastręcza większych trudności. Takie analizy można z powodzeniem wykonać metodami chromatografii cienkowarstwowej lub wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną.

Spośród technik analitycznych stosowanych obecnie w przypadkach badań płynów ustrojowych na zawartość LSD należy wymienić metody radioimmunologiczne (RIA), immunoenzymatyczne (EIA) [1], chromatografię gazową z spektrometrią masową (GC/MS, GC/MS/MS) oraz z detekcją masową (LC/MS, LC/MS/MS). Jakkolwiek najodpowiedniejszą metodą wydaje się LC/MS, to jednak za metodę referencyjną uważa się GC/MS.

Techniką, która może być z powodzeniem stosowana w celu potwierdzenia obecności LSD oraz jego oznaczania, jest wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa z detekcją fluorescencyjną (HPLC/FL). Mimo że jest ona uważana za mniej specyficzną w porównaniu z metodami wykorzystującymi spektrometrię masową, to jednak dorównuje im czułością. Przewaga tej techniki polega na niższych kosztach wykonywanych badań oraz łatwiejszym dostępie do aparatury.

Celem prezentowanych tu badań było opracowanie metody oznaczania LSD we krwi i moczu przy wykorzystaniu techniki mikroekstrakcji typu ciecz – ciecz oraz wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną.

#### MATERIAŁY I METODY

Ekstrakcję prowadzono używając 0,2 ml krwi lub moczu wolnych od LSD, do których dodano odpowiednie ilości roztworów wzorcowych: 20 ng/ml LSD (Sigma) i 50 ng/ml LAMPA – metylpropylamidu kwasu lizergowego (Radian) – jako standardu wewnętrznego. Odpowiedni odczyn pH badanego materiału uzyskano przez dodanie 0,2 ml nasyconego roztworu buforu węglanowego (0,1 mola  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ /1 mol  $\text{NaHCO}_3$ ). Tak przygotowaną mieszaninę ekstrahowano z 1 ml chlorku n-butyłu (Baker) w fiolkach Ependorffa przy częstotliwości wytrząsania 50 Hz, używając do tego celu workteksu. Fazę organiczną w razie potrzeby oczyszczano 0,4 ml nasyconego buforu węglanowego. Ekstrakty odparowywano w strumieniu powietrza w temperaturze 37°C. Suche pozostałości rozpuszczano w 50  $\mu\text{l}$  fazy ruchomej. W analogiczny sposób postępowano podczas przygotowywania materiału dowodowego dostarczanego do badań.

Do analiz wykorzystano chromatograf cieczowy LaChrom D-7000 System z detektorem fluorescencyjnym L-7480 (Merck-Hitachi). Rozdział prowadzono na kolumnie LiChroCART 125 x 4 z wypełnieniem LiChrospher 60 RP select-B (Merck). Jako fazę ruchomą zastosowano mieszaninę acetonitrylu oraz buforu octanowego o odczynie pH = 8,0 i przepływie 1 ml/min (3,85 g octanu amonu rozpuszczano w 450 ml wody, po czym używając trietyloaminy uzyskano pH = 8,0; tak przygotowany roztwór dopełniono wodą do objętości 500 ml i zmieszano z 220 ml acetonitrylu). Długość fali wzbudzenia wynosiła 320 nm, natomiast długość fali emisyjnej 400 nm [6].

## WYNIKI BADAŃ I ICH OMÓWIENIE

Analiza materiału biologicznego metodą wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną najczęściej wymaga wcześniejszego oczyszczenia ekstraktów lub zastosowania specyficznej ekstrakcji. Jest to związane z możliwością wystąpienia substancji koeluujących ze związkiem oznaczanym. Ich usunięcie stwarza możliwość pełnego wykorzystania czułości detektora fluorescencyjnego. W przypadku ekstrakcji LSD oraz LAMPA, chlorek n-butyłu okazał się rozpuszczalnikiem dającym tzw. „czyste ekstrakty”. Obecność współekstrahowanych substancji nie przeszkadzała w oznaczeniu LSD.

Wykorzystanie nasyconego buforu węglanowego o odczynie  $\text{pH} = 9$  umożliwiło osiągnięcie zadawalającej wydajności ekstrakcji. Małą międzygrupową powtarzalność odzysku w przypadku LSD i LAMPA wynoszącą 63% ( $\text{SD} = 13\%$ ,  $n = 3$ ) rekompensowała bardzo dobra powtarzalność stosunku odzysku LSD/LAMPA. Odchylenie standardowe  $\text{SD}$  dla odzysku wewnątrzgrupowego wynosiło 6,5% dla 0,5 ng/ml ( $n = 5$ ), natomiast współczynnik zmienności  $\text{CV}$  poniżej 14%. Świadczy to o bardzo podobnych właściwościach tych dwóch substancji. Wyznaczanie odzysku LSD dokonano metodą porównania bezwzględnej wysokości pików uzyskanego podczas analizy materiału o znanym stężeniu z wysokością pików LSD obliczoną z równania krzywej kalibracyjnej. Pomimo niewielkiej różnicy czasów retencji między substancją badaną a wzorcem wewnętrznym, która potwierdziła ich podobieństwo strukturalne, ich rozdział był możliwy. Warty odnotowania jest fakt, iż nie występowały wyraźne różnice w odzysku LSD i LAMPA z krwi i moczu (rycina 3).

Granica detekcji LSD dla  $\text{S/N} = 3$  wynosiła 130 pg/ml. Krzywa kalibracyjna wykazywała liniowość ( $R^2 = 0,9968$ ) w badanym zakresie, tj. 125 pg/ml do 4000 pg/ml dla krwi (rycina 4) oraz 0,5 ng/ml do 10 ng/ml dla moczu ( $R^2 = 0,9976$ ).

Wykorzystywana do rozdziału metodą HPLC faza ruchoma dawała powtarzalne czasy retencji w dniu jej przygotowania. Jednak ponowne jej użycie w dniu następnym powodowało znaczne wydłużanie czasów retencji. Fakt ten spowodowany został prawdopodobnie obecnością lotnej trietyloaminy, której odparowywanie powoduje zmiany składu fazy i co za tym idzie, czasów retencji. Zjawisko to jest dobrze znane, jednak warto o nim wspomnieć szczególnie przy omawianiu analiz substancji szczególnie wrażliwych na zmiany  $\text{pH}$  fazy ruchomej. W przypadku wykorzystywania faz zawierających lotne dodatki, zaleca się przechowywanie ich w całkowicie wypełnionych pojemnikach.

Zastosowanie stosunkowo prostej procedury wyosobniania, automatycznych pipet przy operacjach odmierzenia płynów oraz krótkiego czasu postępowania, ułatwiło kontrolę ekstrakcji, wysoką precyzję, a co za tym idzie, powtarzalność wyników.

Procedurę tę wykorzystano praktycznie w przypadku mężczyzny zatrzymanego w związku z popełnionym przestępstwem. Podczas badania lekarskiego stwierdzono u niego halucynacje. renice podejrzanego były lekko rozszerzone, ale zachowywały reakcję na światło. Pobrany od podejrzanego mocz poddano analizie chemiczno-toksykologicznej. W wyniku badania opisaną wyżej metodą stwierdzono w moczu LSD w stężeniu 10,8 ng/ml  $\pm$  0,9 ng/ml (rycina 5).

## WNIOSKI

Opracowana metoda umożliwia potwierdzenie obecności dietyloamidu kwasu lizergowego we krwi lub moczu oraz jego oznaczenie w moczu w czasie do około 48 godzin po przyjęciu tego środka. Występujące wówczas stężenia LSD są bliskie granicy oznaczalności i wynoszą około 0,5 ng/ml.

Zastosowana ekstrakcja chlorkiem n-butyłu daje czyste ekstrakty, co jest bardzo istotnym czynnikiem podczas analiz próbek biologicznych z wykorzystaniem detekcji fluorescencyjnej. Rozpuszczalnik ten szczególnie nadaje się do ekstrakcji substancji o charakterze słabo polarnym i niepolarnym.

Istotny problem może stanowić przypadkowe zanieczyszczenie badanych próbek stanowiących materiał dowodowy śladowymi ilościami LSD przenoszonymi na rękawicach ochronnych, końcówkach do pipet automatycznych lub innym sprzęcie laboratoryjnym. Dlatego należy zwracać szczególną uwagę na kolejność i sposób wykonywania poszczególnych czynności. Częściowo problem ten można rozwiązać analizując badany materiał w pierwszej kolejności, zanim rozpocznie się manipulacje przy roztworach LSD.