

Validation of two methods for the determination of LSD and its major blood metabolite: Screening and confirmation by LC-MS/MS

Margherita Salesini, Alexandra Dimitrova, Valentina Martini, Gaia Iaquinta, Natalia Chmielowiec, Emma Croce, Giulia Milazzo e Fabio Vaiano

INTRODUZIONE

La dietilamide dell'acido lisergico (LSD) è un allucinogeno semisintetico tra i più potenti mai conosciuti. Divenuta popolare tra gli anni '60 e '80 quale droga ricreativa, ne vengono oggi indagate le potenzialità come coadiuvante nella cura dei disturbi psichiatrici. L'analisi dell'LSD e del suo principale metabolita, 2-osso-3-idrossi-LSD (O-H-LSD), rappresenta una sfida di grande interesse per la Tossicologia Forense a causa delle sue basse concentrazioni rilevabili nelle diverse matrici biologiche. La tecnica di cromatografia liquida-spettrometria di massa *tandem* (LC-MS/MS) ha dimostrato di avere un'elevata specificità ed accuratezza in fase preliminare di *screening* e di possedere elevate sensibilità e selettività analitiche, nella successiva fase di conferma, che permettono quindi di avere un risultato quantitativo e ancor più di qualità. Il presente studio si propone di sviluppare una strategia che permetta la duplice determinazione, quali- e quantitativa, con tecnica LC-MS/MS, dell'LSD e dell'O-H-LSD, nella matrice ematica. Tale strategia si suddivide in due fasi: 1) *screening* qualitativo, per 163 sostanze di interesse tossicologico forense, e 2) analisi di conferma.

MATERIALI E METODI

ANALISI QUALITATIVA

200 μ L di sangue sono stati addizionati con 600 μ L di acetonitrile (0°C) e 10 μ L di soluzione IS (LSD-D3, 0,005 ng/ μ L). Il surnatante è portato a secco sotto flusso di azoto (40°C), ripreso con 100 μ L di acqua e 7 μ L sono stati iniettati nel sistema LC-MS/MS. Le analisi sono state condotte utilizzando un sistema HPLC Agilent 1290 Infinity (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) interfacciato con un triplo quadrupolo LC/MS Agilent 6460, dotato di una sorgente ionica electrospray (ESI) operante in modalità positiva. La separazione cromatografica è stata eseguita tramite colonna Zorbax Eclipse Plus C18 (2.1 \times 100 mm, 1.8 μ m, Agilent Technologies), impiegando un gradiente di eluizione precedentemente ottimizzato^[1]. Venivano monitorare le seguenti transizioni in *multiple reaction monitoring* (MRM): 324 \rightarrow 223, 208 m/z per l'LSD; 356 \rightarrow 237, 222 m/z per l'O-H-LSD; 327 \rightarrow 226, 208 m/z per l'LSD-D3. Queste transizioni, più quelle di altre 163 sostanze sono state acquisite in Dynamic MRM.

ANALISI QUANTITATIVA

200 μ L di sangue e 10 μ L di soluzione IS sono stati estratti due volte con 2 ml di una miscela di diclorometano/isopropanolo (9:1, v/v) a pH 8 (500 μ L di tampone fosfato). Il surnatante veniva portato a secco sotto flusso di azoto (40°C) e ripreso con 100 μ L di acqua; 9 μ L venivano poi iniettati nello stesso sistema LC-MS/MS. La separazione cromatografica è stata ottenuta con la medesima tipologia di colonna, ma con lunghezza di 50 mm. Il gradiente di eluizione prevedeva una iniziale fase mobile costituita da acido formico 5 mM in acqua (A) ed acetonitrile (B) 99:1 che veniva portata a 50% di B in 3 min e a 100% in 2 min; veniva poi mantenuta isocratica per 1 min.

I metodi sono stati validati secondo le linee guida dell'American Academy of Forensic Sciences (AAFS)^[2] valutando i seguenti parametri: specificità/selettività, linearità, sensibilità (limite di rilevamento - LOD, limite di quantificazione - LOQ), accuratezza (bias), precisione (%CV), recupero (RR), effetto matrice (EM) e carry over.

RISULTATI E DISCUSSIONE

OTTIMIZZAZIONE STRUMENTALE LC-MS/MS

Le transizioni MRM sono state ottenute tramite lo studio delle frammentazioni generate a diverse energie di collisione (CE) di standard certificati delle singole sostanze, individuando anche gli opportuni valori di *fragmentor*, *capillary* e *nozzle*.

Oltre alla determinazione degli MRM, si è in aggiunta reso necessario ottimizzare la separazione cromatografica inerentemente la metodica quantitativa. Le migliori prestazioni cromatografiche sono state raggiunte impiegando il gradiente su indicato.

OTTIMIZZAZIONE DELLE PROCEDURE ESTRATTIVE

Per quel che riguarda il metodo qualitativo, si è proceduto all'applicazione del medesimo protocollo analitico senza alcuna modifica. Il metodo quantitativo, invece, è stato ottimizzato nel presente studio valutando i recuperi e gli effetti matrice per diverse estrazioni liquido-liquido. Sono stati quindi testate diversi solventi organici e loro miscele. I migliori risultati sono stati riscontrati nei campioni ottenuti con la miscela su descritta.

VALIDAZIONE DEI METODI

I metodi si sono rivelati altamente specifici e selettivi per l'analisi dei composti in quanto non sono stati osservati picchi di interferenza endogeni ed esogeni. Entrambi i metodi si sono dimostrati lineari per gli intervalli di calibrazione: LOQ-10 ng/ml per l'LSD (0,025 e/o 0,0375, 0,25, 0,375, 0,5, 1, 5 e 10 ng/ml) e LOQ-10 ng/ml per l'O-H-LSD (0,0125 e/o 0,01875, 0,125, 0,1875, 0,25, 0,5, 5 e 10 ng/ml); $R^2 > 0.9900$. Confrontando i valori di sensibilità ottenuti, con quelli di altri metodi precedentemente pubblicati^[3, 4, 5], si è notata una sostanziale concordanza. La metodica quantitativa si è rivelata più sensibile (LOQ pari a 0,025 ng/ml LSD e 0,0125 ng/ml O-H-LSD) rispetto a quella qualitativa (LOQ 0,0375 ng/ml LSD e 0,01875 ng/ml O-H-LSD). I valori di accuratezza (bias) e precisione (%CV) sono rientrati nei criteri di accettazione ($\leq \pm 20\%$ e $\leq 20\%$, rispettivamente). L'effetto matrice non è risultato significativo ($ME \leq 25\%$), eccetto che per l'analisi qualitativa del metabolita (ion enhancement $> 100\%$). RR era $> 83,5\%$ tranne che nel caso dell'O-H-LSD con la precipitazione proteica per la qualitativa ($< 31,5\%$). Alla luce di questi risultati, possiamo notare come il metodo quantitativo si dimostra effettivamente più sensibile ed idoneo all'impiego come procedura di conferma/quantificazione. Il carry over non è stato osservato.

CONCLUSIONI

Il presente studio ha consentito di sviluppare e validare una nuova strategia analitica che permette la rilevazione dell'LSD e dell'O-H-LSD nel sangue, dapprima tramite una procedura di *screening* (già in uso e che permette la rilevazione di 163 sostanze di interesse tossicologico forense) e successivamente di conferma con una metodologia *ad hoc*. Entrambi i metodi proposti, quali- e quantitativo, risultano contraddistinti da rapidità di analisi ed inoltre si sono rivelati economici e di facile esecuzione, peculiarità che li rendono adottabili da qualsiasi laboratorio tossicologico-forense. La strategia descritta e validata è pertanto applicabile a tutti i casi forensi in cui sia richiesta l'identificazione e la quantificazione dell'LSD e del suo principale metabolita.

SOSTANZA	FRAG. (V)	[M+H] ⁺	MRM (m/z)	CE (V)*	RT (MIN)*
LSD	113	324	223 208	25 33	15.270
LSD D3	118	327	226 208	25 33	15.270
OH-LSD	98	356	237 222	25 35	8.810

Transizioni e condizioni MS/MS utilizzate per la rilevazione delle molecole in esame. In grassetto, le transizioni più abbondanti. *CE: energia di collisione; *RT: tempo di ritenzione.

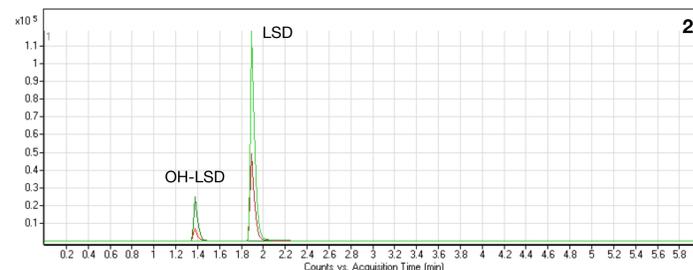
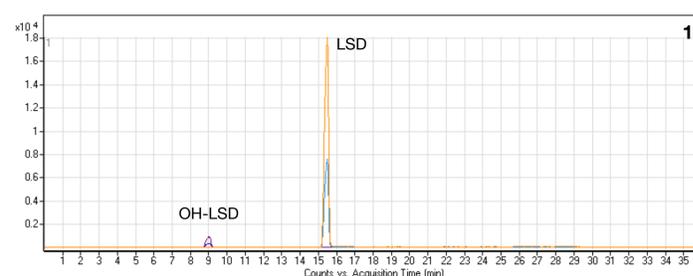
	METODO QUALITATIVO			METODO QUANTITATIVO		
	LOD ng/ml	LOQ ng/ml	R ²	Lod ng/ml	Loq ng/ml	R ²
LSD	0,01	0,0375	0,9918	0,005	0,025	0,9914
OH-LSD	0,005	0,0187	0,9995	0,0025	0,0125	0,9997

Valori di LOD, LOQ e R² per ciascuna sostanza secondo i due metodi.

	METODO QUALITATIVO							
	BIAS			% CV			% ME	% RR
	QC1	QC2	QC3	QC1	QC2	QC3		
LSD	2,5	-9,2	-3,3	5,4	3,9	1,7	9,5	85,5
OH-LSD	19,1	17,7	-5,8	3,1	1,6	0,9	156,1	31,5

	METODO QUANTITATIVO							
	BIAS			% CV			% ME	% RR
	QC1	QC2	QC3	QC1	QC2	QC3		
LSD	-10,1	-12,7	-3,4	17,9	7,1	1,2	9,7	83,5
OH-LSD	8,7	5,5	-15,5	17,7	5,5	0,8	18,5	93,1

Valori di precisione, accuratezza, effetto matrice e recupero relativa a ciascuna sostanza.



Cromatogrammi di LSD e OH-LSD con metodo qualitativo (1) e quantitativo (2) al QC3. Il picco più alto corrisponde alla transizione quantitativa, il più basso alla qualitativa.

^[1] Vaiano, Fabio et al., Development of a New LC-MS/MS Screening Method for Detection of 120 NPS and 43 Drugs in Blood, *Separations* vol 8,11 (2021) 221.

^[2] AAFS Standard Board, Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology, 2019, www.asbstandardsboard.org.

^[3] Libong, Danielle et al., A selective and sensitive method for quantitation of lysergic acid diethylamide (LSD) in whole blood by gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry, *Journal of analytical toxicology* vol. 27,1 (2003): 24-9.

^[4] Dolder, Patrick C et al., Development and validation of an LC-MS/MS method to quantify lysergic acid diethylamide (LSD), iso-LSD, 2-oxo-3-hydroxy-LSD, and nor-LSD and identify novel metabolites in plasma samples in a controlled clinical trial, *Journal of clinical laboratory analysis* vol. 32,2 (2018).

^[5] Favretto, Donata et al., LC-ESI-MS/MS on an ion trap for the determination of LSD, iso-LSD, nor-LSD and 2-oxo-3-hydroxy-LSD in blood, urine and vitreous humor, *Int J Legal Med*, 2017, 121(4): 259-65. doi: 10.1007/s00414-006-0078-x.