

**UNIVERZITA PARDUBICE**  
**FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

2017

Michaela Válková

**UNIVERZITA PARDUBICE**  
**FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ**

**EXTRAKCE A STANOVENÍ LSD**  
**A JEHO METABOLITŮ**

Michaela Válková

Bakalářská práce

2017

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2016/2017

**ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**  
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Michaela Válková**  
Osobní číslo: **C14540**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**  
Název tématu: **Extrakce a stanovení LSD a jeho metabolitů**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Proveďte literární rešerši zabývající se LSD (diethylamid kyseliny lysergové). Dále se zaměřte na extrakci LSD a jeho metabolitů z různých matric s následným stanovením pomocí chromatografických technik. Shrňte i zdravotní důsledky vyplývající z užívání LSD.
2. Závěry kriticky zhodnoťte

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.**

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Petra Bajerová, Ph.D.**

Katedra analytické chemie

Konzultant bakalářské práce: **Ing. Aleš Eisner, Ph.D.**

Katedra analytické chemie

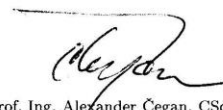
Datum zadání bakalářské práce: **28. listopadu 2016**

Termín odevzdání bakalářské práce: **7. července 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mě požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 19. 6. 2017

.....  
Michaela Válková

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Petře Bajerové, Ph.D. za vedení bakalářské práce, užitečné a cenné rady, připomínky, trpělivost a příjemnou spolupráci. Také děkuji svoji rodině za podporu během studia.

## **ANOTACE**

Tato bakalářská práce se zabývá extrakcí a stanovením LSD a jeho metabolitů. První část je zaměřena na historii a vývoj, strukturu, farmakokinetiku, farmakodynamiku, toleranci, biochemické změny a účinky LSD. V druhé části je věnována pozornost extrakcím a následné analýze LSD a jeho metabolitů v biologických materiálech (tzn. moč, plná krev, sérum a vlasy) a blotech. V závěru práce jsou umístěny tabulky shrnující informace o stanoveních v jednotlivých biologických materiálech.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

LSD, metabolity, biologické materiály, bloty, extrakce, kvantitativní analýzy

## **TITLE**

Determination and extraction of LSD and metabolites

## **ANNOTATION**

This bachelor thesis deals with extraction and determination of LSD and its metabolites. In the first chapter, the author focuses on history and evolution (development), structure, pharmacokinetics, pharmacodynamics, tolerance, biochemical changes and effects of LSD. In the second part, she pays attention to the extractions and following analysis of LSD and its metabolites in biological materials (i.e. urine, whole blood, serum and hair) and blotters. At the end of the work, the tables summarize the information about determinations in individual's biological materials.

## **KEYWORDS**

LSD, metabolites, biological materials, blotters, extraction, quantitative analyses

## Obsah

Úvod.....	12
1. Diethylamid kyseliny lysergové .....	13
1.1. Historie a vývoj .....	13
1.2. Chemická struktura .....	14
2. Farmakokinetika LSD .....	14
2.1. Resorpce .....	14
2.2. Distribuce .....	15
2.3. Metabolismus a vylučování.....	16
3. Farmakodynamika LSD.....	17
3.1. Interakce s receptory .....	17
3.1.1. Serotonin .....	18
3.2. Interakce s dalšími látkami.....	18
3.3. Tolerance.....	19
4. Farmakologie LSD .....	20
4.1. Biochemické změny .....	20
4.2. Somatické účinky .....	20
4.2.1. Sympatická stimulace .....	21
4.2.2. Parasympatická stimulace.....	21
4.3. Psychologické účinky.....	21
4.3.1. Akutní neurokognitivní efekty.....	22
5. Toxikologické údaje .....	22
6. Analýza LSD v biologických materiálech a blotech .....	23
6.1. Odběr vzorků.....	23
6.2. Extrakce.....	24
6.2.1. Extrakce kapalina-kapalina.....	24
6.2.1.1. Provedení.....	24
6.2.1.2. Mikroextrakce jednou kapkou.....	26
6.2.1.3. Mikroextrakce dutým vláknem .....	26
6.2.1.4. Disperzní mikroextrakce kapalina-kapalina.....	26
6.2.2. Extrakce tuhou fází .....	27
6.2.2.1. Provedení.....	28



6.2.2.2. Sorbent .....	30
6.2.2.3. Mikroextrakce tuhou fází .....	31
6.2.2.4. Molekulárně vtisknuté polymery .....	33
6.3. Kvantitativní analýza .....	34
6.3.1. Vysokoučinná kapalinová chromatografie .....	34
6.3.1.1. Ultra vysokoučinná kapalinová chromatografie .....	35
6.3.2. Plynová chromatografie .....	36
7. Kazuistika .....	37
7.1. Univerzitní Nemocnice Basel ve Švýcarsku - 1. část .....	37
7.1.1. Pacient 1 .....	37
7.1.2. Pacient 2 .....	37
7.1.3. Pacient 3 .....	37
7.1.4. Pacient 4 .....	38
7.1.5. Pacient 5 .....	38
7.2. Univerzitní Nemocnice Basel ve Švýcarsku - 2. část .....	38
7.2.1. Zdraví účastníci .....	38
7.2.2. Podávané drogy .....	39
7.2.3. Shrnutí studie .....	39
7.3. Univerzitní nemocnice ve Francii .....	39
7.3.1. Pacient 1 .....	39
7.3.2. Pacient 2 .....	40
8. Souhrnné tabulky .....	41
9. Závěr .....	45
10. Literární zdroje .....	46

# Seznam ilustrací a tabulek

## Seznam obrázků

Obrázek 1: Strukturní vzorec diethylamidu kyseliny lysergové.....	14
Obrázek 2: Metabolity LSD .....	17
Obrázek 3: Strukturní vzorec chlorpromazinu .....	19
Obrázek 4: Strukturní vzorec tricyklického antidepresiva imipraminu .....	19
Obrázek 5: Schéma somatických účinků způsobené LSD .....	21
Obrázek 6: Zabavené 2 vzorky blotů, které byly následně analyzovány .....	26
Obrázek 7: Schéma disperzní mikroextrakce kapalina-kapalina (DLLME) .....	27
Obrázek 8: Tři typy SPE .....	27
Obrázek 9: Schéma extrakce tuhou fází .....	28
Obrázek 10: Deska s jamkami pro aplikaci 96 vzorků .....	29
Obrázek 11: Vzhled mikroextrakce tuhou fází .....	32
Obrázek 12: Strukturní vzorec ergonovinu .....	33
Obrázek 13: Schéma základního principu molekulárního vtisknutí .....	34
Obrázek 14: Kolony pro kapalinovou chromatografii od společnosti Agilent .....	35
Obrázek 15: Kapilární GC kolona od RTX® .....	36
Obrázek 16: Náplňová GC kolona od Sigma – Aldrich .....	36

## Seznam tabulek

Tabulka 1: Klinická farmakokinetika LSD s odlišnými způsoby aplikace .....	15
Tabulka 2: Přehled sorbentů využívající se v SPE .....	30
Tabulka 3: Přehled sorbentů využívající se v SPME .....	31
Tabulka 4: Naměřené koncentrace LSD a iso-LSD ve vzorku séra a moči u jednotlivých pacientů .....	38
Tabulka 5: Naměřené koncentrace LSD a iso-LSD ve vzorku plazmy a moči u jednotlivých pacientů .....	40
Tabulka 6: Předúprava a detekce LSD a jeho metabolitů ve vzorcích moči .....	41-42
Tabulka 7: Předúprava a detekce LSD a jeho metabolitů ve vzorcích vlasů .....	42
Tabulka 8: Předúprava a detekce LSD a jeho metabolitů ve vzorcích plné krve a séra ....	43-44
Tabulka 9: Předúprava a detekce LSD a jeho metabolitů v blotu .....	44

## Seznam zkratek

LSD	Diethylamid kyseliny lysergové
NSDUH	Národní průzkum o užívání drog a zdraví
p.o.	Perorální podání
i.v.	Intravenózní podání
i.m.	Intramuskulární podání
LAE	Ethylamid kyseliny lysergové
Iso-LSD	2-oxo-diethylamid kyseliny lysergové
O-H-LSD	2-oxo-3-hydroxy-diethylamid kyseliny lysergové
LEO	Ethyl-2-hydroxy-ethylamid kyseliny lysergové
Nor-LSD	N-desmethyl-diethylamid kyseliny lysergové
5-HT	5-hydroxytryptamin; Serotoninový receptor
CPZ	Chlorpromazin
LD <sub>50</sub>	Střední smrtelná (letální) dávka
LOQ	Limit kvantifikace
LOD	Limit detekce
SPE	Extrakce tuhou fází
SPME	Mikroextrakce tuhou fází
LLE	Extrakce kapalina – kapalina
SDME	Mikroextrakce jednou kapkou
HF-LPME	Mikroextrakce dutým vláknem
DLLME	Disperzní mikroextrakce kapalina-kapalina
PDMS	Polydimethylsiloxan
PA	Polyakrylát
DVB	Divinylbenzen

CW	Carbowax
TPR	Templátová pryskyřice
MIPs	Molekulárně vtisknuté polymery
LC	Kapalinová chromatografie
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UHPLC	Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie
GC	Plynová chromatografie
MS	Hmotnostní spektrometrie (detektor)
MTBE	Metyl terc. butyl éter (Methyl tert - butyl ether)
THC	Kanabinol
THC-COOH	Karboxy-tetrahydrokanabinol
THC-OH	Hydroxy-tetrahydrokanabinol

# Úvod

Tato práce se zabývá diethylamidem kyseliny lysergové (ve zkratce LSD) a jeho metabolity. Hlavním cílem je vytyčení možností jejich extrakce a stanovení z biologických materiálů (krev, moč a vlasy) a blotů. Toto téma jsem si vybrala z důvodu zvyšující se ho prodeje a užívání drog. Konkrétně LSD je po marihuaně druhou nejlevnější a dostupnou drogou u nás (1 dávka: 200-350 Kč), můžeme tedy hovořit o rekreačním užívání. Vzhledem k tomu, jak často je LSD užíváno, tak doposud nebyl zaznamenán smrtelný případ způsobený jeho předávkováním [57].

V první části jsou shrnuty obecné informace o LSD. Těmi jsou historie a vývoj (kdo ho poprvé syntetizoval, odkud může být izolováno, postupný vývoj a rozšíření do celého světa, apod.), chemická struktura, farmakokinetika (resorpce, distribuce, metabolismus a vylučování) a farmakodynamika (interakce s receptory a dalšími látkami, vznik tolerance). Mimo jiné stojí za zmínku také biochemické a somatické změny (sympatická, parasympatická stimulace), a psychologické účinky, které tato halucinogenní droga vyvolává. V závěru první části jsou uvedeny ve zkratce informace o toxikologických údajích týkající se LSD.

Druhá část je o samotné analýze LSD a jeho metabolitů v biologických materiálech (moč, krev a vlasy) a blotech. Nejprve jsem se zaměřila na odběr vzorků a následnou extrakci (LLE a SPE), která je důležitá pro zakoncentrování a přečištění analytu ze vzorku. U extrakcí jsou uvedené jednotlivé typy a provedení u odebraných materiálů. V závěru této části popisují kvantitativní analýzy, kam jsem zařadila plynovou a vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii, které se pro stanovení LSD a jeho metabolitů používají nejčastěji.

V závěru práce je uvedena kazuistika, kde jsou uvedeny případy jednotlivých pacientů ošetřovaných na pohotovosti v Univerzitní nemocnici ve Francii a v Univerzitní nemocnici Basel ve Švýcarsku, kde je zmíněna i provedená studie. Na konci práce se vyskytují tabulky shrnující veškeré informace týkající se analýzy LSD a jeho metabolitů ve vzorcích plné krve (příp. séra), moči, vlasů a blotu.

# 1. Diethylamid kyseliny lysergové

## 1.1. Historie a vývoj

Diethylamid kyseliny lysergové (LSD) je semisyntetický produkt kyseliny lysergové. Jedná se o přírodní látku produkovanou plísní Paličkovicí nachovou (*Claviceps purpurea*) parazitující na žitě [5]. V dnešní době je LSD považováno za jednoho z nejsilnějších halucinogenních drog. Už malé dávky vedou k řadě psychotropních účinků [11]. Na trhu jsou prodávány různé formy obsahující LSD, jako jsou papírové dávkové jednotky (papírové bloty), malé tabletky (velikost v řádech mm) a méně časté gelové matrice [13].

Švýcarský chemik Albert Hoffmann (\*11. 1. 1906 - † 29. 4. 2008) tuto látku, jako první syntetizoval v roce 1938. Kratší forma LSD pochází z jeho dřívějšího krycího názvu LSD-25, který je německou zkratkou pro „Lysergsäure-diethylamid“ následovanou pořadovým číslem [13]. V roce 1943 náhodně objevil dramatické psychologické efekty této látky. Ačkoliv syntetizoval mnoho derivátů kyseliny lysergové, tak žádný z těch derivátů neměl typickou škálu psychologických efektů. Během roku 1950 bylo LSD uvedeno do lékařské komunity, jako experimentální prostředek způsobující dočasné psychotické stavy a později zlepšil psychoterapeutické účinky [5].

V polovině roku 1960 se zvýšila popularita LSD, jako rekreační drogy a hlavně k vytvoření tzv. „psychedelické aktivity“ během období mezinárodních studentských protestů. Ačkoliv se výskyt protestů snižoval, tak užívání LSD pokračovalo. National Survey on Drug Use and Health (NSDUH) sleduje, například LSD v každoročním přehledu od roku 1970, jako hlavní zneužívanou drogu. Navzdory popularitě LSD a bezpečnému užívání psychoterapeutických doplňků a experimentálních prostředků nelegální klinické výzkumy s LSD existovaly od roku 1970 [1,5].

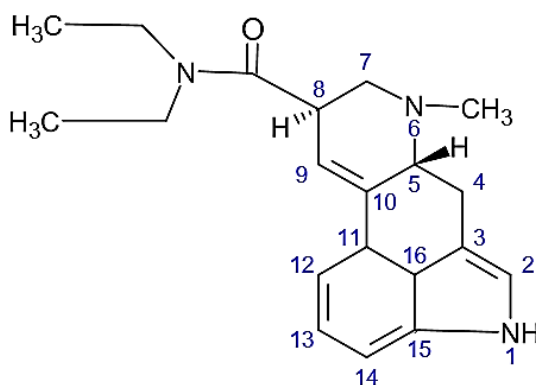
Přestože jsou dávky od roku 1970 téměř neměnné, tak množství komplikací spojené s užíváním této drogy kleslo. Dnes je pravděpodobně lepší informovanost a duševní vyspělost uživatelů této drogy (přestože jeden záznam tvrdí, že dávka LSD zůstává téměř neměnná od roku 1970 [49]). Dále je zvyšující se zájem o užívání LSD při studii mozku, léčbě intenzivní bolesti hlavy a jako pomoc v psychoterapeutické léčbě nevyléčitelných nemocí [5].

V roce 2013, podle NSDUH bylo ve Spojených státech zaznamenáno užívání LSD u více než 24,8 miliónů lidí a to ve věkové kategorii od 12 let a výš. Nejvíce této drogy bylo přivezeno ze Severní Ameriky nebo Evropy. Nicméně, v průběhu posledních desítek let,

mezinárodní kontrola LSD efektivně přispěla k poklesu spotřebě LSD v největších částech světa [1].

## 1.2. Chemická struktura

Molekula se skládá z indolového systému s čtyřcyklým kruhem (Obr. č. 1) a sumárním vzorcem  $C_{20}H_{25}ON_3$ . Uhlíky 5 a 8 jsou asymetrické: z tohoto důvodu, jsou známé a možné čtyři isometrické, opticky aktivní isomery. Existují d- a l-LSD a diethylamid kyseliny l- a d-lysergové. Jen d-LSD isomer má psychoaktivní vlastnosti. Z benzenu je d-LSD schopno krystalizovat do krystalového hranolu. Ve vodě je rozpustný a jeho bod varu je 83 °C. LSD je obvykle stabilní ve formě soli, jako jeho vinanová sůl. Molární hmotnost je 323,42 g/mol [5].



Obr. č. 1: Strukturální vzorec diethylamidu kyseliny lysergové. Převzato z[5].

Existuje velké množství obdůb LSD. Tyto deriváty se skládají z obměn substituentů na amidové skupině, někdy vznikají doplněním substituentů na indolovém pyrolovém kruhu. Až na substituované deriváty na N-6, žádné další deriváty nevykazují účinnost srovnatelnou s LSD [5].

## 2. Farmakokinetika LSD

### 2.1. Resorpce

Po perorálním (p.o.) požití je LSD kompletně vstřebáno v trávicím traktu. Po požití 100-250  $\mu$ g LSD perorálně psychologické a sympatomimetické účinky trvají 30-45 minut, dosahující vrcholu po 1,5 - 2,5 hodině [5].

Upshall a Wailling [25] dospěli k závěru, že množství jídla, stejně tak pH žaludku a dvanáctníku budou ovlivňovat vstřebávání LSD. Hoch [26] nenalezl žádné kvalitativní rozdíly týkající se psychologických účinků LSD, bez ohledu na způsobu podání. Rozdíly byly především kvantitativní povahy a v rychlosti nástupu účinků. Klinická data o odlišných způsobech aplikace LSD jsou uvedena v Tab. č. 1 [5].

**Tabulka č. 1: Klinická farmakokinetika LSD s odlišnými způsoby aplikace. Převzato z [5]**

Způsob aplikace	Dávka ( $\mu\text{g}$ )	Začátek symptomů (min)	Maximální účinek (h)*	Celková doba trvání (h)*
Perorální	100-250	30-45	1,0 - 2,5	9-12
Intramuskulární	100-250	15-20	1,0	9-10
Intravenózní	40-180	3-5	1,0	9-10
Intraspinální	20-60	<1	1,0	9-10

\* Hodiny po aplikaci LSD

## 2.2. Distribuce

Distribuce LSD tkáněmi a orgány je vyčíslena, jak pro lidský, tak pro zvířecí organismus. U myši (50  $\mu\text{g}$  i.v.) nebylo LSD v prvních minutách detekováno z krve, ale během 10 minut bylo detekováno v blízkosti všech orgánů. V dvanáctníku, dosahuje aktivita maxima po 2 hodinách. LSD je pak transportováno v trávenině přes trávicí trakt a oblast maxima nastává v tračniku přibližně po 3 hodinách. Trávicí trakt obsahuje 70-80 % z koncentrace po 3-12 hodinách po požití. Největší množství LSD bylo nalezeno v játrech, kde pomalu mizelo během prvních 12 hodin, jako významná část enterohepatického cyklu [5].

V mozku krysy byla nalezena velmi nízká koncentrace LSD v porovnání s hladinami v krevní plazmě. LSD mizí z mozku krysy mnohem rychleji než z krevní plazmy. Další vědci (Freedman a Coquet [50]) našli vysoké množství koncentrovaného LSD (500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i.v.) v hypofýze krys stejně tak u opic (2  $\text{mg}/\text{kg}$  i.v.) [50]. U koček (1  $\text{mg}/\text{kg}$  i.v. LSD) byla nejvyšší koncentrace detekována ve žlučníku a krevní plazmě. Nízké koncentrace byly nalezeny v plicích, játrech, mozku, trávicím traktu, slezině a svalech. Nejnižší koncentrace byla nalezena v tukové tkáni. Přítomnost značného množství drogy v mozku a mozkomíšním moku krys a koček ukazují, že LSD může jednoduše přejít přes hematoencefalickou bariéru [5].

Přesný mechanismus zodpovědný za prostup xenobiotik například do vlasů nebyl ještě kompletně objasněn. Nicméně se předpokládá, že sloučeniny pronikají do matrice keratinu



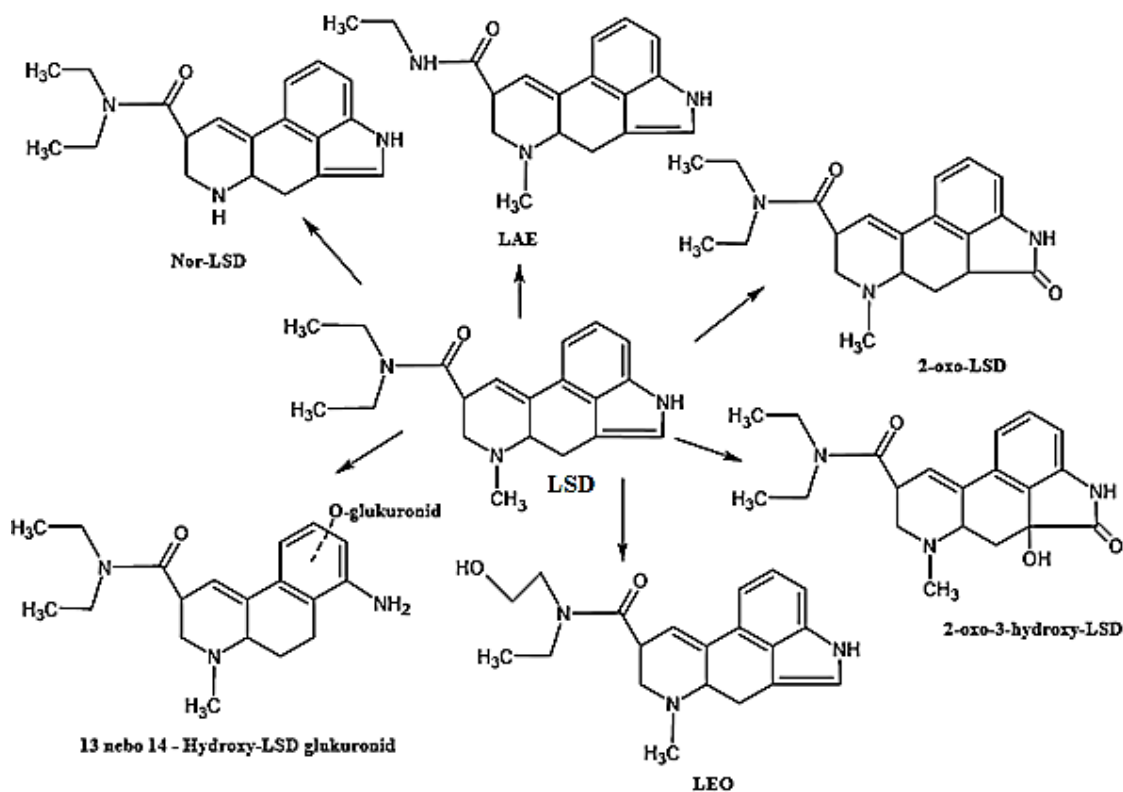
zejména pasivní difúzí z krve kapilár a mohou být rovněž uloženy ve vlasovém kanálku difúzí potu mazovou sekrecí nebo během tvorby vlasů z buněk. Uložení xenobiotik ve vlasech z krevního oběhu je vysoce závislé na povaze užití látky (struktura, chemické vlastnosti) a individuálních fyzických/psychologických charakteristikách. Ze strukturálního hlediska je toto zabudování ovlivňováno melaninem obsaženým v matrici a regulováno farmakologickými principy distribuce látek. [16].

### **2.3. Metabolismus a vylučování**

LSD je rychle a ve velké míře metabolizováno. Metabolity jsou často získány při N-dealkylaci nebo oxidačních procesech a obvykle si zachovávají velkou část ze struktury původní sloučeniny [4].

Po orálním podání je LSD do značné míry metabolizováno v játrech a menší, než 1 % drogy je vyloučeno močí v nezměněném stavu. Koncentrace v krvi je velmi nízká. Maximální koncentrace v plazmě po dávce 70  $\mu\text{g}/\text{kg}$  poklesne na 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Biologický poločas je udáván v rozmezí 3-6 hodin. Vzhledem k tomu, že koncentrace LSD v krevní plazmě je nízká, tak jeho analýza je často prováděna v moči [11,23].

U lidí je LSD rychle metabolizováno do strukturně podobných metabolitů, které byly prvně detekovány v moči pomocí infračervené spektroskopie. Klette a spol. [29] a Canezin a spol. [30] (Obr. č. 2) našli v lidské moči následující metabolity: nor-LSD, ethylamid kyseliny lysergové (LAE), 2-oxo-LSD (iso-LSD), 2-oxy-3-hydroxy-LSD, 13- a 14-hydroxy LSD (jako glukuronidy) a ethyl-2-hydroxyethylamid kyseliny lysergové (LEO). 2-oxo-LSD je diastereoizomer LSD, který se tvoří během přeměny LSD a je proto markerem užívání LSD [5]. Nor-LSD, 2-oxo-3-hydroxy-LSD a konjugát glukuronidu 13-hydroxy-LSD mohou být detekovány v moči po 96 hodinách po požití, zatímco LSD může být detekováno pouze 12-24 hodin po požití [6,23]. Pravděpodobná maximální koncentrace je 4-6 hodin po podání. Poločas vylučování je 3,6 hodiny [5].



Obr. č. 2: Metabolity LSD (Canezin a spol. [30]). Převzato z [5]

### 3. Farmakodynamika LSD

#### 3.1. Interakce s receptory

Komplexní receptorové interakce LSD jsou důležitou oblastí v experimentální činnosti a zkoumání probíhajícího mechanismu LSD. S objevem serotoninu, jako biologicky aktivní látky bylo chemikům zřejmé, že LSD a serotonin jsou strukturně podobné. Nicméně, nebylo okamžitě jasné zdali LSD napodobuje nebo blokuje účinky serotoninu. V podstatě, počáteční experimenty Johna Gadduma a spol. [31,32] argumentovaly pro mechanismus akce, ve kterém LSD blokuje účinky serotoninu. A však od této hypotézy bylo opuštěno. Převládající hypotéza na to, jak indolové halucinogeny účinkují na serotonin (5-HT; 5-hydroxytryptamin) jsou shrnuty, jako následující: LSD působením přednostně inhibuje propouštění serotoninových buněk, zatímco šetří postsynaptické serotoninové receptory od up-regulace/down-regulace [5,21].

Halucinogenní účinky LSD bývají spojovány s afinitou k 5-HT<sub>2</sub> receptoru, kde působí jako 5-HT<sub>2</sub> agonista, a to díky podobné struktuře se serotoninem a výskytem fenylethylaminové a indolaminové skupiny (halucinogenní skupiny) [5].

Je známa interakce LSD s dopaminergními systémy. V porovnání s jinými halucinogeny (meskalin, aj.) jsou interakce LSD s centrálními dopaminovými D<sub>1</sub> a D<sub>2</sub> receptory, agonistické a antagonistické. Není prokázáno, jak jsou tyto interakce zapojeny v psychoaktivních účincích LSD, ale výzkumy ukazují zvýšené uvolnění dopaminu, což přispívá k obrovské škále účinků, které u lidí vyvolává LSD [5,33].

Na biologické úrovni, LSD zvyšuje plazmatický oxytocin a markery související se stresem. Tyto postřehy mohou indikovat (ukazovat) něco užitečného pro léčbu LSD v psychotherapeutických nastavení [20].

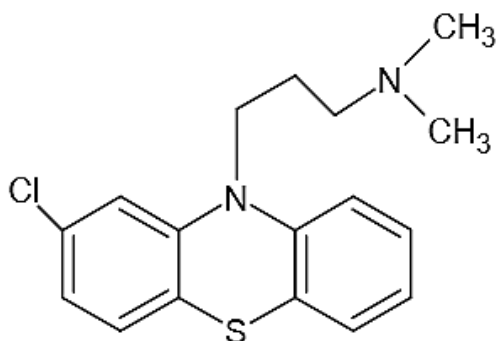
### **3.1.1. Serotonin**

Serotonin (5-hydroxytryptamin; 5-HT) je produkován pomocí malého množství neuronů, které vzájemně stimulují nejméně 500 000 dalších neuronů. Hlavním úkolem je kontrola uvolňování norepinefrinu (noradrenalinu), který reguluje sympatický nervový systém. Všeobecně, 5-HT může být vnímán hlavně, jako transmitterový inhibitor. Tudíž když je jeho aktivita snížena, tak další neuron v řetězci je uvolněný z inhibice a stává se více aktivní. Serotonergní systémy jsou úzce zapletené do oblasti kontroly pocitů, spánku, nebezpečí a nálady. To může být možným vysvětlením aktivity LSD a dalších halucinogenů v rámci jejich disinhibice [5].

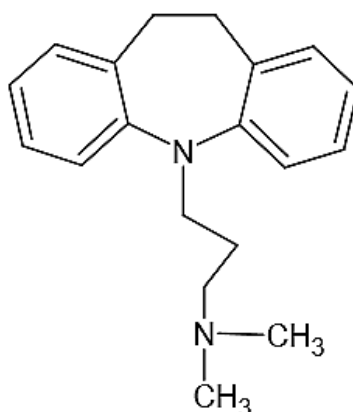
## **3.2. Interakce s dalšími látkami**

Různé studie vyhodnotily interakci droga-droga v rámci LSD. První klinické studie byly zaměřeny zejména na interakci LSD s neuroleptiky, zvláště s chlorpromazinem (CPZ, Obr. č. 3). CPZ se ukázal, jako neúplný antagonist LSD. Když bylo lidem podáno méně než 0,4 mg/kg CPZ současně s malým množstvím LSD, tak to nevyvolalo žádné změny v účincích LSD. Při vyšších dávkách (0,7 mg/kg) CPZ byly vyvolány vedle toho účinky, jako jsou žaludeční nevolnost, zvracení, závrať, snížená motorická aktivita nebo úzkost, které se postupně snižují a mizí. CPZ výrazně neměnil tvorbu halucinací nebo klamů, ale souvisel s nepříjemnými pocity, které byly zredukovány nebo odstraněny. Hypnotická sedativa, jako je diazepam (5 mg p.o./i.m.) jsou často užívána v prostředí lékařské pohotovosti při akutní intoxikaci LSD, kde pomáhá redukovat paniku a úzkost [5].

Lithium a některá tricyklická antidepresiva (Obr. č. 4) byla podána pro zvýšení účinků LSD. Je třeba uvést, že LSD v kombinaci s lithiem drasticky zvyšuje reakci LSD a to může vést k přechodným komatózním stavům, jak naznačují nepředložené lékařské zprávy [5].



Obr. č. 3: Strukturální vzorec chlorpromazinu [37]



Obr. č. 4: Strukturální vzorec tricyklického antidepresiva Imipraminu [38]

### 3.3. Tolerance

Tolerance je definována, jako snížení schopnosti reagovat na drogu po opakovaném podání. Odolnost vůči účinkům LSD se vyskytuje u lidí i zvířat. Tolerance k autonomním a psychologickým účinkům LSD nastává u lidí po přiměřených denních dávkách LSD. Abramson a spol. [34] podávali 5-100 µg LSD p.o. po dobu 3-6 dní zdravému dobrovolníkovi. Po 2-3 dnech, se rozvinula solidní rezistence, jak ukazovaly psychologické a fyziologické testy. Bylo dosaženo odolnosti vůči LSD a, tak místo LSD bylo podáváno placebo, po další 3 dny. Typické účinky LSD se nakonec znovu opakovaly 4. den [5].

## 4. Farmakologie LSD

### 4.1. Biochemické změny

Klinická podávaná dávka LSD (0,5 až 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  p.o.) snižuje vylučování anorganického fosfátu (známé také pro další halucinogeny, jako je meskalin a psylocybin), což způsobuje možné působení LSD na enzymatický systém, usnadňující tak vazbu fosfátu. Nicméně toto snížení je stále zkoumáno. LSD vyvolává slabé snížení clearance kreatininu, ale žádnou změnu clearance vápníku a hladiny vápníku v séru. Také nebyly zdokumentovány žádné změny pro kreatin v séru, moči, sodíku v plazmě, chloridu a cholesterolu v séru, celkových lipidů a osmotického tlaku. Hodnoty transamináz byly v podstatě neměnné. Další nález (v souladu s účastí psychologického stresu) je získáván z volných mastných kyselin po příjmu 1-1,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  p.o. LSD [5].

### 4.2. Somatické účinky

Prahová dávka pro znatelné sympatomimetické efekty u lidí je 0,5 - 1,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  LSD p.o. Přiměřenou dávkou LSD pro člověka je odhadem tak 75-150  $\mu\text{g}$  p.o. Velmi vysoké dávkování LSD, což je více jak 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i.v., vede u zvířat (kočky a krysy) ke slabým autonomním změnám, jako je mydriáza (rozšíření zorniček), tachykardie (zvýšená tepová frekvence), tachypnea (abnormálně zrychlené dýchání), hypertermie (zvýšená teplota), hypertonie (zvýšené napětí např.: svalstva) a hyperglykémie (zvýšená hladina cukru v krvi). Snižující se krevní tlak a bradykardie (zpomalení srdeční frekvence) byla nalezena u postižených zvířat. Autonomní změny odráží stimulaci obou větví autonomního nervového systému [5].

Sympatikotonie obvykle převažují, ale existují velké individuální odchylky a u některých subjektů byla zaznamenána zřetelná parasympatikotonie s bradykardií a hypotenzí. Často bývá zaznamenána přechodná (dočasná) bolest hlavy a mdloba. Změna hladiny adrenalinu kvůli LSD může vyvolat individuální změny sympatikotonie. Účinky LSD na krevní tlak jsou pravděpodobně komplexní, protože jeho akce je v místě krevní cévy, srdečního a dalších svalových systémů, plic (respirace) a stejně tak účinkuje na centrální nervový systém a krční dutinu [5].

Sokoloff a spol. [27] se domnívají, že vysoký krevní tlak a hemokoncentrace mohou vysvětlovat zvýšenou motorickou aktivitu jejich subjektů užívající LSD. Většina somatických

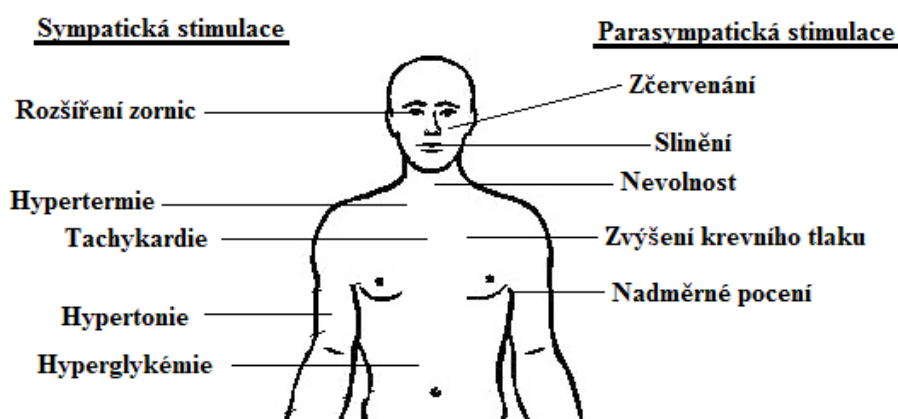
efektů přičítající se LSD mohou být způsobené sekundárními efekty nebo-li psychologickou reakcí na drogu [5].

#### 4.2.1. Sympatická stimulace

Je dokazována u mnoha subjektů pomocí pupilární dilatace (rozšiřování zorniček) a přiměřeného zvětšení srdeční frekvence a krevního tlaku. Více proměnlivými znaky jsou také drobné výkyvy hladiny cukru v krvi a výjimečně zvýšení teploty těla. Dýchání zůstává obvykle neměnné (Obr. č. 5) [5].

#### 4.2.2. Parasympatická stimulace

Hlavní symptomy spadající do parasympatické stimulace jsou diaforéza (vyvolávání pocení) a slinění, dále žaludeční nevolnost, výjimečně zvracení a více častým je zrudnutí obličeje než bledost (Obr. č. 5) [5].



Obr. č. 5: Schéma somatických účinků způsobené LSD [39]

### 4.3. Psychologické účinky

LSD je považováno za vysoce nebezpečnou drogu s tendencí vytvářet paniku, delirium a bizarní chování, což má někdy za následek iracionální a škodlivé činy. Přiměřená dávka má význam ve změně stavu vědomí. Zvláště pozoruhodné jsou změny vnímání, jako jsou iluze, pseudohalucinace, synesthesie a zážitek se střídáním myšlení a času. Vyskytují se také často změny vzhledu a vlastní funkce těla [5,23].

Akutní psychologické efekty LSD trvají mezi 6 až 10 hodinami, ale záleží to také na podané dávce. Traumatické zkušenosti (nazývané se „bad trips“) mohou mít dlouhodobé

účinky na uživatele LSD, jako jsou například prudké změny nálad a výjimečně vzpomínkový fenomén (pohled do minulosti). Naopak, pod kontrolou zdravotního stavu mohou mít zkušenosti s LSD trvalé pozitivní účinky na daného jedince [5].

#### **4.3.1. Akutní neurokognitivní efekty**

Problémy s akutními kognitivními testy je to, že po podání klinické dávky LSD (100 µg a více) se subjekty stávají příliš oslabenými pro spolupráci, v důsledku intenzity fyzických a percepčních změn. Nižší dávky nemusí vystihnout kognitivní efekty LSD, které by byly za vyšší dávky vyvolány. Psychomotorické funkce (orientace v čase) jsou často oslabeny po požití LSD [5].

## **5. Toxikologické údaje**

Hodnoty LD<sub>50</sub> pro LSD jsou různé, záleží na živočišném druhu. Nejvíce citlivým druhem je králík, který má LD<sub>50</sub> 0,3 mg/kg i.v. LD<sub>50</sub> krysa je o hodně vyšší a to 16,5 mg/kg i.v., zatímco myši mají toleranční dávku 46-60 mg/kg i.v. Tato zvířata umřela na následek paralýzy a respiračního selhání. Dosud nejsou žádné dokumenty o lidské smrti způsobené předávkováním LSD. Osm jednotlivců, kteří náhodně požívali ve vysokých dávkách LSD intranasálně měli v plazmě mezi 1000 - 7000 µg / 100 ml krevní plazmy LSD. Následně pak trpěli komatózními stavy, horečkou, zvracením, lehkým žaludečním krvácením a respiračními problémy. Nicméně, všichni přežili s pomocí nemocniční léčby a bez následků [5].

## 6. Analýza LSD v biologických materiálech a blotech

Detekce LSD v biologických materiálech je velmi složitá, kvůli nízkým užívaným dávkám a rozsáhlému metabolizování LSD. Po požití typické dávky (40-120  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) koncentrace LSD v moči klesne na  $<1,00 \mu\text{g}/\text{kg}$  během pár hodin [11].

LSD je zjiitelné v plazmě a moči (v  $\text{ng}/\text{ml}$ ) během pár hodin z požitých 100 - 200  $\mu\text{g}$ . Pro důkaz požití drogy je upřednostňována moč před krví, kvůli delšímu oknu detekce, vyšší koncentraci drogy (příp. metabolitů) a méně komplikovanému předčištění [1,13]. Nicméně screening v krvi má rozhodující výhodu v získání okamžité hladiny drogy [12].

Pokud je brzký odběr moči a krve u podezřelých osob nemožný, tak se jako alternativa využívají vlasy, sliny nebo pot. Tyto vzorky představují výhody jednoduššího sběru a těžšího zfalšování. Přesto však, koncentrace drog v těchto „alternativních vzorcích“ je obvykle nižší než v typických tekutinách, tudíž jejich použití s forenzním záměrem není nikdy možné bez použití vysoce citlivých analytických metod. Analýza vlasů je dnes rutinně používána k detekci chronicky či akutně užívaných drog. Z toho důvodu jsou vlasy brány, jako základní biologický vzorek při zneužívání drog nejen v oblasti forenzní toxikologie, ale také při detekci opiátů odhalených během těhotenství, díky schopnosti poskytovat zpětný údaj o droze požitou před několika měsíci či roky. Což pomáhá v diagnostice novorozeneckých abstinenčních příznaků a umožňuje sestavit opiátový profil expozice plodu. Při smrti oběti se pro zjištění koncentrace LSD využívá vzorek pubického ochlupení [1,15].

Souhrnné informace týkající se úpravy vzorků (moč, vlasy, plná krev/sérum a bloty), použité extrakce a vlastního stanovení jsou uvedeny v 8. kapitole (Tab. č. 6, 7, 8 a 9) na konci práce.

### 6.1. Odběr vzorků

Je možné analyzovat vzorky vlasů (20-200 mg), které jsou získány ustrižením z šíjové plochy zadního vrcholu hlavy, co nejbliže ke kořeni [16]. Dále vzorky krve a moči, které jsou odebírány v nemocnicích, většinou na lékařské pohotovosti. Krev je nejčastěji odebírána do heparinových zkumavek. V posledním případě je možné analyzovat i tzv. bloty (hmotnost okolo 17  $\mu\text{g}$ ), které jsou získány od policie, která je zabavila [13].



## 6.2. Extrakce

Jedná se o úpravu analytu před vlastní analýzou. Metody pro extrakci LSD biologických materiálů (krev, moč nebo vlasy) a blotů jsou náročné, protože požitá dávka je za normálních podmínek velmi nízká (menší než 250 µg) a droga je rychle metabolizována [9].

### 6.2.1. Extrakce kapalina-kapalina

Extrakce kapalina-kapalina (Liquid-Liquid Extraction, LLE) je metoda, která je založena na selektivním přechodu analytu z jednoho roztoku (voda, vodný roztok) do druhého (organické rozpouštědlo nemísitelné s vodou) [51].

Hlavními nevýhodami u tohoto typu extrakce je tvorba emulze, použití velkých objemů vzorku a toxických organických rozpouštědel. Z těchto důvodů se uvádí, že LLE je drahá a časově náročná metoda. V průběhu let vznikly nové tzv. miniaturizované extrakční techniky, u kterých jsou hlavní nevýhody LLE potlačeny. Z těchto technik se jedná např. o mikroextrakci jednou kapkou (Single-drop microextraction, SDME), mikroextrakci využívající duté vlákno naplněné vhodným sorbentem (Hollow fibre liquid phase microextraction, HF-LPME) a disperzní mikroextrakci kapalina-kapalina (Dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME) [51].

#### 6.2.1.1. Provedení

K extrakci je nutné použít dostatečné množství extrakčního rozpouštědla, aby došlo k přechodu veškerého analytu ze vzorku do organické fáze. Tato směs je pak míchána v dělicí nálevce nebo zkumavkách (na vortexu či speciální horizontální třepačce), aby došlo k promísení obou fází. Poté co se obě fáze oddělí, tak je vodná fáze odlita, a organická fáze s analytem je následně použita a zpracována [45]. Organická rozpouštědla, která se při této extrakci nejčastěji používají, jsou isopropanol, diethylether a ethylacetát. Pro extrakci LSD se nejčastěji využívá methylchlorid, butylchlorid, isopropanol, diethylether a ethylacetát [14].

#### Vzorky krve

Před extrakcí vzorků krve musí být provedeno enzymatické štěpení glukuronidů pomocí β-glukuronidasy. Ta je izolována z měkkýšů, a to konkrétně z *Helix pomatia* (šnek zahradní). V publikaci Anzillotti Luca a spol. [48] bylo přidáno 10 µl β-glukuronidasy, aby

došlo k enzymatickému štěpení glukuronidů. K takto upravenému vzorku se přidal vnitřní standard a organické rozpouštědlo (3 ml ethylacetátu). Vše probíhalo v kyselém prostředí, které bylo navozeno přidáním 100 µl kyseliny mravenčí [8,18,23]. V případě extrakce LSD ze vzorku séra byl k vzorku přidán vnitřní standard, uhličitanový pufr a butylchlorid [22]. Po těchto úpravách následovalo protřepání, centrifugace, odebrání organické fáze, její odpaření pod proudem dusíku a analýza na kapalinovém či plynovém chromatografu [8,18,22,23].

### **Vzorky vlasů**

Před extrakcí vlasů je nutná jejich dekontaminace, kdy se nastříhané vzorky vlasů promyjí ve vodě, methanolu a cyklohexanu (5 ml každého), aby došlo k odstranění zbytků mycích prostředků, barviv nebo stop mastnoty [10]. Mohou být také promyty v několika fázích jdoucích za sebou, kdy jsou nejprve inkubovány s 0,003 M Tween 80 (1 ml/20 mg vlasů). Následně opláchnuty ultra-čistou vodou (1 ml/20 mg vlasů) a acetonem pro snadné vysušení. Na závěr jsou vysušeny pod mírným proudem dusíku [15]. Další možností dekontaminace je provedení inkubace ve vodě, promytí směsí methanol/voda (50:50) a CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (dichlormethan) [1,3,19].

Takto připravené vzorky vlasů (cca 20 mg) jsou umístěny do nádobek, ke kterým je přidán acetonitril, methanol nebo dichlormethan. Nádobky jsou pak následně hermeticky uzavřeny a ultrazvukovány 2,5 h při 40 °C. Pomocí injekční stříkačky se odsaje organická fáze, která je přenesena do nové nádoby, a pod mírným proudem dusíku odpařena do sucha (při laboratorní teplotě). Zbytek je znovu rozpuštěn v H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pomocí ultrazvukové lázně a vortexu [1,3,12,15,].

### **Vzorky moči**

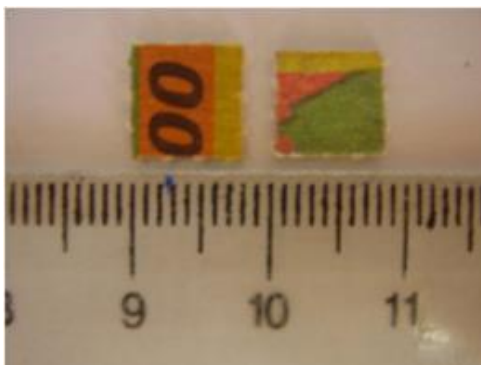
V rámci extrakce LSD ze vzorku moči musí být nejdříve provedeno enzymatické štěpení glukuronidů pomocí β-glukuronidasy [47]. Po enzymatickém štěpení může být LLE provedena dvěma možnostmi. První možností je přidání směsi dichlormethan (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)/ isopropanol (1:1, v:v) a vnitřního standardu ke vzorku moči, po kterém následuje centrifugace. Organická fáze je pak odebrána do nové nádoby, odpařena do sucha při 45 °C pod proudem dusíku a ke zbylé části je přidána mobilní fáze [1].

Druhou možností je zředění objemu moči octano-amonným pufrem (pH 4), přidání vnitřního standardu a organického rozpouštědla (např.: butyl acetátu). Vzorky jsou pak

dostatečně promíchány, centrifugovány po dobu 10 minut a supernatant je přenesen do autosamplerových nádobek [1,14,23].

### **Vzorky blotu**

Bloty jsou ponořeny do směsi methanol:voda (1:1) a umístěny do ultrazvukové lázně na dobu 20 minut. Poté následuje analýza na kapalinovém chromatografu. Obr. č. 6 [13].



Obr. č. 6: Zabavené 2 vzorky blotů, které byly následně analyzovány [13]

#### **6.2.1.2. Mikroextrakce jednou kapkou**

Mikroextrakce jednou kapkou (Single-Drop Microextraction, SDME) je velmi rychlá a levná extrakční technika. Probíhá prakticky bez použití rozpouštědel, na základě velkého snížení objemového podílu vzorku. Malá část analytu je extrahována (zakoncentrována) pro analýzu. [51].

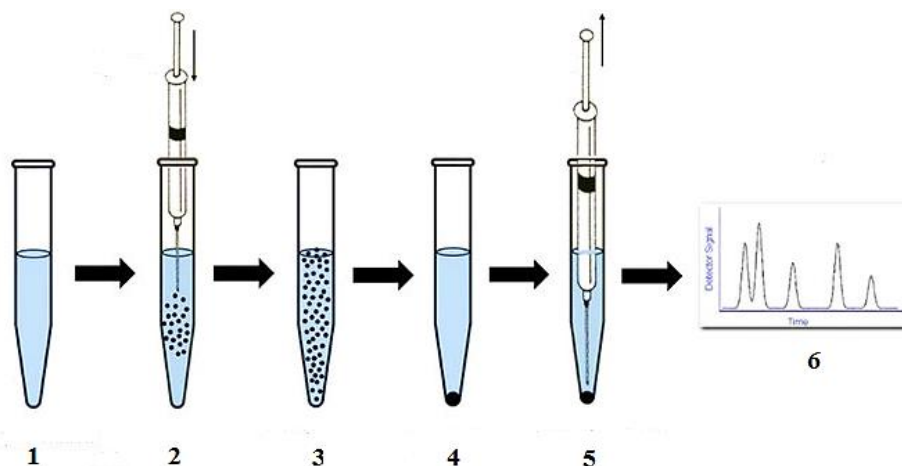
#### **6.2.1.3. Mikroextrakce dutým vláknem**

Mikroextrakce dutým vláknem (Hollow Fibre Liquid Phase Microextraction, HF-LPME) je technika, která umožňuje extrakci a zakoncentrování analytu z komplexních vzorků jednoduchým a levným způsobem. Ve dvoufázovém vzorkování (HF-LPME) je analyt extrahován z vodného vzorku do imobilizovaného nemísitelného extrakčního činidla uloženého v pórech dutého vlákna, vyrobeného z polypropylenu [51].

#### **6.2.1.4. Disperzní mikroextrakce kapalina-kapalina**

Disperzní mikroextrakce kapalina-kapalina (Dispersive Liquid-Liquid Microextraction, DLLME) funguje na bázi tříložkových rozpouštědel. V podstatě se skládá z rychlého vstříknutí směsi extrakčního rozpouštědla (tetrachlormethan, chlorbenzen aj.)

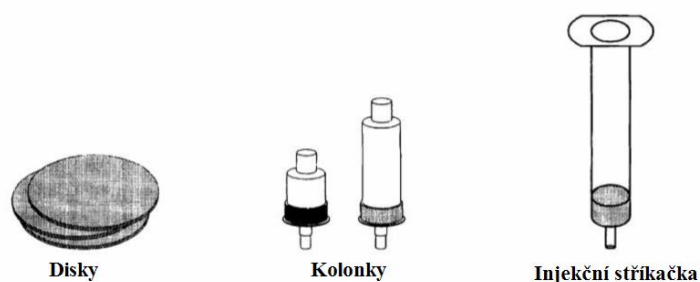
a disperzního rozpouštědla (aceton, acetonitril nebo methanol) do vodného vzorku, jehož výsledkem je vznik zakaleného roztoku [11]. Vzniklé a rozptýlené malé kapky se dále spojují centrifugací, která umožňuje velkou výtěžnost. Po centrifugaci se fáze obsahující analyt usadí na dno a po případné úpravě může být stanovena kapalinovou chromatografií (Obr. č. 7) [47].



Obr. č. 7: Schéma Disperzní mikroextrakce kapalina - kapalina (DLLME). Kde: 1 - Roztok vzorku, 2 - vstříknutí disperzního a extrakčního činidla, 3 - zakalený roztok (disperze), 4 - sedimentace (po centrifugaci), 5 - odpipetování extrakční fáze, 6 -analýza. Převzato z [42].

### 6.2.2. Extrakce tuhou fází

Extrakce tuhou fází (Solid Phase Extraction, SPE) je metoda úpravy vzorku, která koncentruje a čistí analyt z daných vzorků, a to pomocí kolonky obsahující tuhou fází (sorbet) a následným promýváním vhodným rozpouštědlem. Existují tři základní uspořádání SPE, a to disky, kolonky a injekční stříkačky (Obr. č. 8) [52].



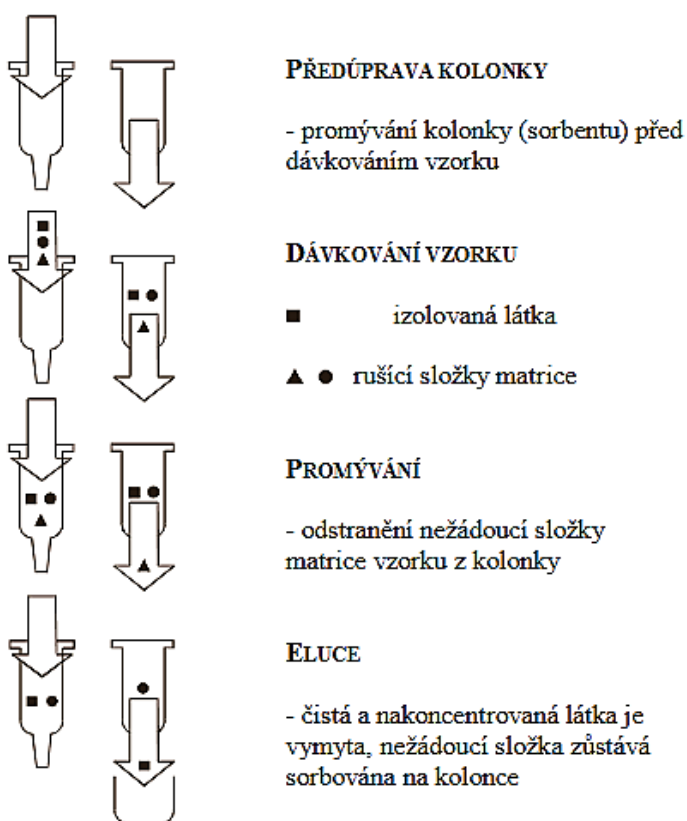
Obr. č 8: Tři typy SPE. [52]

### 6.2.2.1. Provedení

V prvním kroku je kolonka propláchnuta vhodným rozpouštědlem (methanol, diethylether, aceton, ethylacetát, benzen, aj.), aby došlo ke smočení sorbentu. Poté následuje proplach vodou nebo pufrem. Je třeba dbát na to, aby sorbent nebyl suchý [52,53].

Následuje druhý krok, kdy do takto připravené kolonky je aplikován vzorek obsahující příslušný analyt. V závislosti na typu vzorku může být vzorek aplikován pomocí gravitace, čerpadla, nasátím za použití vakua nebo pomocí automatického systému. Během tohoto kroku (retence) je zachytáván na sorbentu. Ve třetím kroku je kolonka propláchnuta, aby došlo k odstranění rušivých složek, a analyt stále zůstává zakotven na sorbentu [52].

V posledním kroku je analyt eluován ze sorbentu příslušným rozpouštědlem, které je zvoleno tak, aby byl analyt uvolněn ze sorbentu [52]. Všechny tyto kroky jsou zobrazeny na Obr. č. 9.



Obr. č. 9: Schéma extrakce tuhými fázemi [46]

### **Vzorky krve**

Po enzymatickém štěpení (podrobněji - viz vzorky krve v kapitole LLE) je přidáván vnitřní standard a organické rozpouštědlo (např.: methanol). Směs je poté centrifugována a supernatant je odpipetován do zkumavky obsahující látky (jako je voda, NaCl a pufr - uhličitanový, fosfátový, octano-amonný), které upraví pH vzorku [2,6]. Místo zkumavek se také využívá deska s 96 jamkami pro aplikaci vzorku (Obr. č. 10), která je pak tepelně hermeticky uzavřena (v posledním kroku jsou eluáty přeneseny do nové desky, která je znovu tepelně hermeticky uzavřena). Poté následuje protřepání a centrifugace. Usazená organická fáze se odpipetuje do nádobek a je do sucha odpařena pod proudem dusíku. K reziduím po odpařené organické fázi je následně přidána mobilní fáze [17].



Obr. č. 10: Deska s jamkami pro aplikaci 96 vzorků [40]

### **Vzorky moči**

Po již zmíněném enzymatickém štěpení (viz kapitola LLE) je ke vzorkům moči přidáván vnitřní standard a uhličitan sodný. Organické rozpouštědlo používající se pro promývání kolonky byl nejčastěji uváděn methanol. Poté následuje analýza kapalinou chromatografií [2,14].

### **Vzorky vlasů**

K dekontaminovanému vzorku vlasů (dekontaminace – viz kapitola LLE) je v případě použití molekulárně vtisknutých polymerů přidán 1 ml acetonitrilu. Poté následuje analýza kapalinou chromatografií [19].

### 6.2.2.2. Sorbent

Při výběru sorbentu je důležité se zaměřit na typ analytu, který chceme zakoncentrovávat, velikost a tvar částic, plocha povrchu, velikost pórů a chemická netečnost (Tab. č. 2). Při extrakci znečištěných vzorků, je třeba použít sorbent mající velké částice, aby bylo zabráněno vysokému zpětnému tlaku (protitlaku) a zanesení (ucpání) kolony. Sorbenty, které mají větší plochu povrchu, mají tudíž i vyšší množství aktivních míst a jsou z toho důvodu účinnější. Plocha povrchu může být zvýšena za použití porézní struktury sorbentu. Velikost pórů se odvíjí od velikosti absorbovaných molekul. Z toho vyplývá, že pokud jsou extrahovány molekuly o vysoké molekulové hmotnosti, tak zvolený sorbent by měl mít velké póry, a naopak [53]. Nejčastěji využívaný sorbent pro extrakci LSD je C-18 [2, 14].

**Tabulka č. 2: Přehled sorbentů využívající se v SPE [52]**

Sorbent	Typ analyzovaného analytu	Aplikace
C-18	Hydrofobní látky v roztocích	Izolace drog z plazmy, séra a moči; organických kyselin z vín, aj.
C-8	Hydrofobní látky v roztocích	Izolace drog z plazmy, séra a moči; peptidů ze séra a plazmy.
Styren-divinylbenzen	Hydrofobní látky v roztocích	Izolace polárních metabolitů drog
Křemičitan	Látky nízké až střední polarit v nevodných roztocích	Klasifikace lipidů, separace pigmentů rostlin, separace vitamínů rozpustných v tucích z lipidových extraktů.
Florisil	Látky nízké až střední polarit v nevodných roztocích	Izolace pesticidů v jídlech a krmivech, aj.
Oxid hlinitý	Hydrofilní látky v nevodných roztocích	Izolace vitamínů, antibiotik a dalších látek v krmivech a jídlech, aj.
Aminopropyl	Hydrofobní látky s nízkou až střední polaritou v roztocích	Izolace drog a jejich metabolitů z tělních tekutin, fenolů a rostlinných pigmentů.
Kyanopropyl	Hydrofobní látky ve vodných nebo organických rozpouštědlech	Izolace drog a jejich metabolitů z tělních tekutin.
Diol		

### 6.2.2.3. Mikroextrakce tuhou fází

Mikroextrakce tuhou fází (Solid-Phase Microextraction, SPME) byla vyvinuta Pawliszynem a Arthurem v roce 1990 [35]. Jde o rovnovážnou sorpci analytů na malé mikrovlákně, které je vyrobeno z křemenného vlákna potaženého polymerem – sorbentem (Tab. č. 3 – volba sorbentu závisí na povaze analytu) a je začleněno do stříkačky používající se v GC. SPME izoluje daleko menší množství analytu (2-20 %), než SPE (>90%), ale všechny vzorek je následně nadávkován do GC. Zatímco u SPE je vstříknuto pouze okolo 1-2 % analytu. Účinnost extrakce na vlákně je ovlivňována kombinací extrakčních časů, tloušťkou stacionární fáze a rozsahem rozdělovacího koeficientu pro stacionární fázi. Při SPME se může dosáhnout detekčního limitu 15 ng/l, jak pro těkavé, tak pro netěkavé sloučeniny [52].

**Tabulka č. 3: Přehled sorbentů využívající se v SPME [54]**

Sorbent	Tloušťka (μm)	Typ analyzovaného analytu
Polydimethylsiloxan (PDMS)	7	Nepolární vysokomolekulární sloučeniny
	30	Nepolární méně těkavé organické sloučeniny
	100	Těkavé organické sloučeniny
Polyakrylát (PA)	85	Polární méně těkavé sloučeniny
DVB (divinylbenzen)-PDMS	60	Těkavé amino- nebo nitro- aromatické sloučeniny (výbušniny)
	65	
DVB-CW (Carbowax)	65	Alkohol a polární sloučeniny
	70	
Carboxen-PDMS	75	Plyny a nízkomolekulární sloučeniny (méně než 90 g/mol)
	85	
DVB/Carboxen-PDMS		
DVB-PDMS	50	Isopropylamin a těkavé či méně těkavé sloučeniny
DVB-Carboxen	30	
CW/TPR (Templátová pryskyřice)	50	Povrchově aktivní látky (tenzidy)

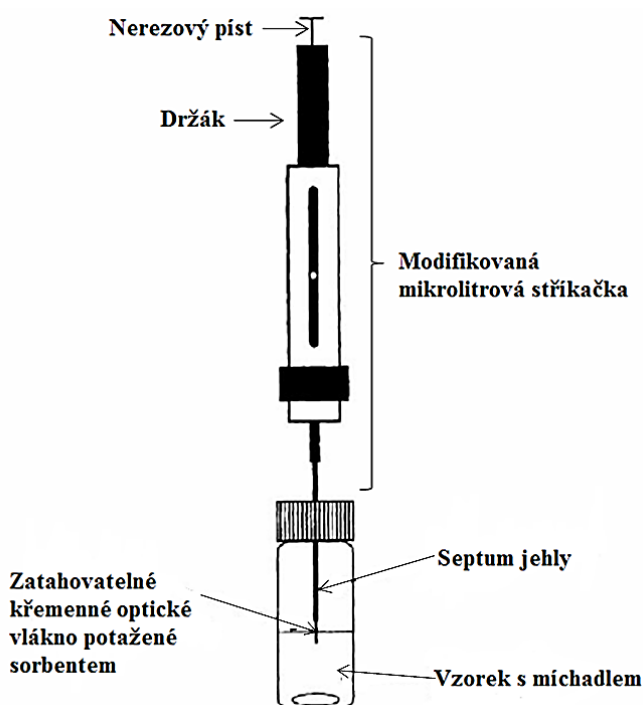


## Provedení

Extrakce může být provedena buď, přímo z kapalného vzorku, nebo z prostoru nad vzorkem (tzv. „headspace“). Při použití je vlákno zataženo do jehly, kterou je propíchnuto septum nádobky se vzorkem. Poté se vlákno pomocí pístu vysune a je buď ponořeno do vzorku, nebo je vzorkováno z prostoru nad vzorkem. K rychlejšímu dosažení rovnováhy při vzorkování pomáhá intenzivní míchání vzorku. Sorpce dosahuje rovnováhy v rozmezí 2 – 30 minut v závislosti na typu a povaze vzorku (analytu), který je sorbován. Po sorpci vzorku je křemenné vlákno vtáhnuto do jehly, která je následně vyjmuta z nádobky se vzorkem a zavedena do injektoru GC. Zde jsou sorbované analyty tepelně desorbovány a následně analyzovány. Vlákno je pak znovu použitelné [52].

## Schéma mikroextrakce tuhou fází

Zařízení SPME se skládá ze dvou částí: dlouhého křemenného vlákna navázaného na nerezový píst a držáku, který vypadá, jako modifikovaná stříkačka (Obr. č. 11). V rámci ochrany bývá vlákno vtaženo do těla jehly [52].



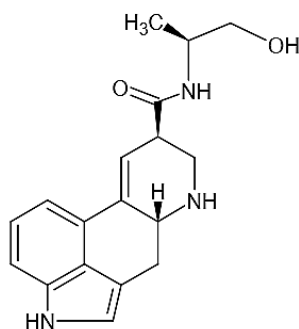
Obr. č. 11: Vzhled mikroextrakce tuhou fází. [52]

#### 6.2.2.4. Molekulárně vtisknuté polymery

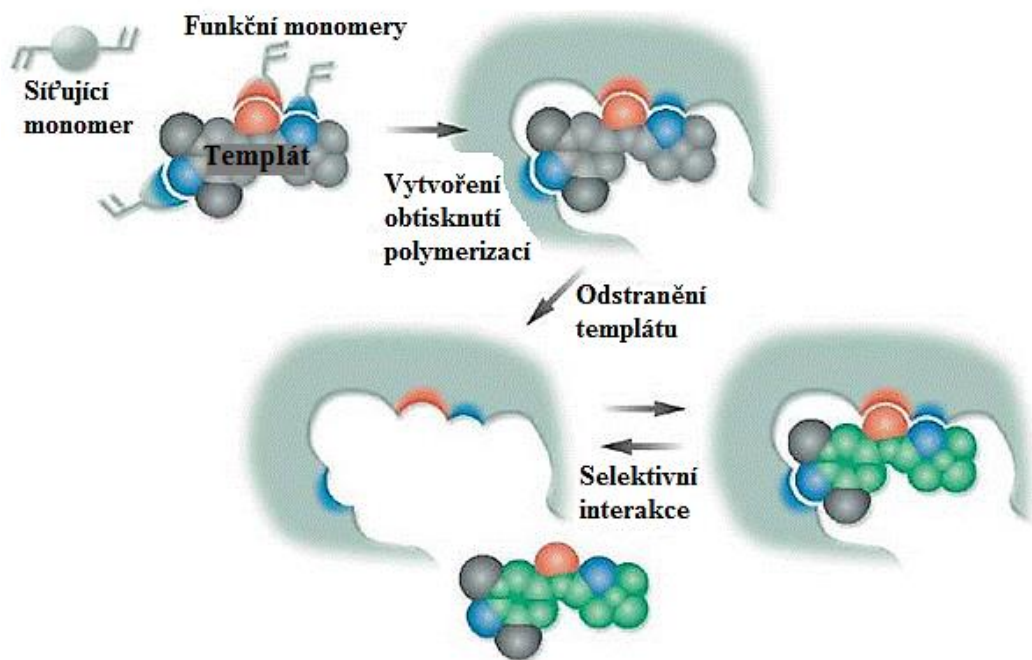
Zvláštním typem SPE sorbentů jsou tzv. molekulárně vtisknuté polymery, které jsou brány za selektivní sorbenty na základě mechanismu molekulárního rozpoznání. Tyto sorbenty mají specifické dutiny pro templátovou molekulu, a tak umožňují molekulární rozpoznávací mechanismus [19].

*Molekulární vtisknutí* (Obr. č. 13) je proces, kdy se cílová sloučenina (molekula) chová jako templát (šablona), kolem které jsou uspořádány interaktivní a síťující monomery, a ty kopolymerizují kvůli vytvoření podobného odlitku. Nejprve, monomery vytváří komplex s templátem skrz kovalentní nebo nekovalentní interakce. Pak polymerizací a odstraněním templátu jsou vazebná místa vystavena tak, že jsou komplementární k velikosti templátu, tvaru a pozici funkčních skupin, které jsou drženy na místě pomocí síťované struktury. V podstatě je molekulární paměť vtisknuta do polymeru, který je nyní schopen znovu navázat selektivně templát [24].

Tudíž, molekulárně vtisknuté polymery (MIPs) mají nejdůležitější vlastnost biologických receptorů, a to schopnost rozpoznání a navázání specifické cílové molekuly (sloučeniny). Pokud jde o jejich komercializaci, došlo k velkému pokroku během posledního desetiletí. Konkrétně v oblastech analytické chemie a biochemie (zejména pro stanovení sloučenin z biologických vzorků) [24]. Proto, aby mohlo být extrahováno LSD pomocí MIPs, byla připravena methylakrylátová báze s templátovým vzorem, kterým byl *ergonovin* (Obr. č. 12), strukturně obdobný LSD [19].



Obr. č. 12: Strukturní vzorec ergonovinu. Převzato z [19]



Obr. č. 13: Schéma základního principu molekulárního vtisknutí. Převzato z [41].

## 6.3. Kvantitativní analýza

Po výše uvedených metodách extrakce následuje kvantitativní analýza upraveného vzorku, aby bylo zjištěno množství sledované látky (LSD a jeho metabolitů). Pro kvantitativní analýzu LSD a jeho metabolitů se nejčastěji používají chromatografické metody (kapalinová a plynová chromatografie).

### 6.3.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je technika zajišťující separaci složek směsi, pomocí rozdílného pohybu a zadržování těchto složek. Rozpuštěné látky jsou transportovány pomocí proudu mobilní fáze (např.: hexan, tetrachlormethan, methylbenzen, acetonitril, aj.) skrz kolonu (Obr. č. 14), která je naplněna stacionární fází (např.: oktadecyl (C18), silikagel, aminopropyl, aj.). Kolony jsou vyráběny z nerezové oceli, a jejich běžné délky se pohybují v rozmezí 3 až 25 cm [55].

V poslední fázi putují separované složky do detektoru, kde v rámci kvantitativního vyhodnocení vyhodnocujeme plochy píků v chromatogramu, který vyjadřuje závislost odezvy detektoru na retenčním čase [55]. Limit detekce pro LSD a jeho metabolity ve vzorku moči

a plazmy se pohybuje mezi 0,1-10 ng/ml, v séru okolo 10 ng/ml a v blotu kolem 50 ng/ml [2,7,13].

Používanými detektory jsou spektrofotometrický (UV-VIS) a hmotnostní. Nejčastěji používaným v daných publikacích byl však hmotnostní detektor, který je univerzální, vysoce selektivní a citlivý. Pro analýzu LSD a jeho metabolitů jsou nejčastěji využívány kolony se sorbentem C8 a C18 [1,2,3,6,12,13,17,18,19]. Jako mobilní fáze bývají používány směsi acetonitril a kyselina mravenčí, methanol a mravenčan amonný [1,3,8,12,13,17,18,23].

#### **6.3.1.1. Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie**

Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC) využívá kolony s částicemi menšími než 2  $\mu\text{m}$ , což umožňuje extrémně rychlou separaci s vysokou citlivostí. Doba analýzy LSD (ve vzorku plné krve) bývá obvykle cca 5 minut. Limit detekce se při této analýze pohybuje okolo 0,0097 ng/ml a limit kvantifikace v rozmezí 0,036 - 2 ng/ml [8, 9, 12, 18].



Obr. č. 14: Kolony pro kapalinovou chromatografii od společnosti Agilent [43]

### 6.3.2. Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC) je separační technika, kde se těkavé, tepelně stabilní sloučeniny pohybují pomocí mobilní fáze (tzv. nosného plynu – helium, dusík nebo vodík) skrz kolonu obsahující stacionární fázi. Nakonec separované složky putují do detektoru (např.: hmotnostní, tepelně vodivostní, plamenově ionizační a detektor elektronového záchytu), kde nás v rámci kvantitativního vyhodnocení zajímají plochy píků v chromatogramu, který vyjadřuje závislost odezvy detektoru na retenčním čase. Aby byla zvýšena těkavost a citlivost stanovovaného analytu je potřeba před samotnou analýzou provést tzv. derivatizaci [22,55].

Kolony používané v GC jsou kapilární (Obr. č. 15) nebo náplňové (Obr. č. 16). Kapilární kolony jsou z oxidu křemičitého, mohou být 10-100 m dlouhé, s vnitřním průměrem 0,1-0,7 mm a uvnitř potažené velmi tenkou kapalnou vrstvou. Zatímco náplňové jsou nerezové nebo skleněné o délce 1-3 m, s vnitřním průměrem 2-3 mm a naplněné porézním adsorbentem. Výhoda kapilární kolony je ta, že má vysokou účinnost a rozlišovací schopnost pro komplexní vzorky obsahující 100 a více komponent, na rozdíl od náplňové, která je v tomto směru omezena na vzorky obsahující okolo 20 komponent [55].

Tato separační technika byla použita pro analýzu LSD ze vzorku séra, kde byla použita kapilární kolona o délce 30 m. Použitý nosný plyn nebyl v publikaci uveden [22].



Obr. č. 15: Kapilární GC kolona  
od společnosti Rtx® [44]



Obr. č. 16: Náplňová GC kolona  
od společnosti Sigma-Aldrich [56]

## **7. Kazuistika**

### **7.1. Univerzitní Nemocnice Basel ve Švýcarsku - 1. část**

V období od ledna do září roku 2014 bylo hospitalizováno 5 pacientů na pohotovosti ve Fakultní nemocnici Basel ve Švýcarsku s podezřením na intoxikaci LSD. Ve všech pěti případech bylo potvrzeno požití LSD. Naměřené koncentrace LSD a O-H-LSD jsou uvedeny v Tab. č. 4 [2].

#### **7.1.1. Pacient 1**

Dívka ve věku 17 let byla přivezena na pohotovost s akutním zmatením a ztrátou orientace v čase. Přiznala konzumaci 2 kostek cukru a 1 blotu s LSD (odhadovaná dávka byla 750 µg). Vzorek krve pro zjištění množství drog byl odebrán 3 hodiny po příjmu. Doplnková analýza LC-MS/MS ukázala přítomnost THC a trazadonu. Hladina LSD byla 14,70 ng/ml a O-H-LSD 0,99 ng/ml v séru [2].

#### **7.1.2. Pacient 2**

Muž ve věku 17 let byl přijat na pohotovost s tlakem na hrudi, neklidem a dušností. Přiznal požití 1 kostky cukru s LSD (odhadovaná dávka asi 250 µg) ve 20 hodin s doprovodnou konzumací konopí. Projevení účinků zaznamenal v 22 hodin, tudíž 2 hodiny po konzumaci. Na pohotovosti byl pacientovi podán lorazepam a paracetamol. Analýza séra odhalila 1,80 ng/ml LSD hodinu po příjmu a odebrání krve [2].

#### **7.1.3. Pacient 3**

Muž ve věku 21 let byl přivezen záchranou službou za doprovodu policistů na pohotovost, kvůli agresivnímu a nespolupracujícímu chování, které způsobila údajná konzumace blotu LSD. Informace o době požití LSD nebyly k dispozici. Hladina LSD v séru byla 6,10 ng/ml a hladina O-H-LSD 0,45 ng/ml. Analýza LC-MS/MS prokázala také přítomnost THC, kokainu a amfetaminu [2].

#### 7.1.4. Pacient 4

Muž, ve věku 45 let se sám dostavil na pohotovost s rozrušením, dezorientací a intenzivními vizuálními halucinacemi. Oslavoval 2 dny a konzumoval alkohol, LSD, kokain a konopí. LC-MS/MS analýza potvrdila požití THC a kokainu. Ve vzorku séra byla detekována koncentrace LSD, a to 4,10 ng/ml, ale žádné měřitelné množství O-H-LSD [2].

#### 7.1.5. Pacient 5

Muž ve věku 36 let se dostavil na pohotovost s hmatovými a zrakovými halucinacemi po konzumaci alkoholických nápojů v klubu. Měl podezření na to, že mu někdo přidal drogy do pití. Testování moči na LSD prokázalo 1,30 ng/ml a 9,70 ng/ml O-H-LSD. Doplnková analýza moči také potvrdila přítomnost THC. Nebyla známa doba konzumace pití, ani začátek účinku LSD [2].

**Tabulka č. 4: Naměřené koncentrace LSD a O-H-LSD ve vzorku séra a moči u jednotlivých pacientů**

	Pacient 1	Pacient 2	Pacient 3	Pacient 4	Pacient 5
Sérum LSD	14,70 ng/ml	1,80 ng/ml	6,10 ng/ml	4,10 ng/ml	N/A
Sérum O-H-LSD	0,99 ng/ml	<LLOQ	0,45 ng/ml	<LLOQ	N/A
Moč LSD	N/A	N/A	N/A	N/A	1,30 ng/ml
Moč O-H-LSD	N/A	N/A	N/A	N/A	9,70 ng/ml

N/A - matrice nebyla k dispozici z pohotovosti, <LLOQ hodnota byla pod nízkým kvantifikačním limitem

## 7.2. Univerzitní Nemocnice Basel ve Švýcarsku - 2. část

Šlo o představení farmakokinetického profilu, tedy farmakineticko-farmakodynamického vztahu diethylamidu kyseliny lysergové a jeho hlavních metabolitů, po požití perorální dávky LSD (200 µg) u 8 zdravých žen a mužů [7].

### 7.2.1. Zdraví účastníci

Bylo vybráno 16 zdravých subjektů (8 mužů a 8 žen) ve věku 25-51 let. Podle daných kritérií byli vyloučeni subjekty nespádající do věkové škály, těhotné ženy, výskyt lidské nebo rodinné (první příbuzenský stupeň) psychotické historie, pravidelně užívající léky, chronicky

nebo akutně fyzicky nemocní, převažující užití nezákonných drog více jak 10 krát za život a užití nezákonných drog v rámci posledních 2 měsíců. 9 subjektů nikdy nepožili halucinogeny, dalších 7 subjektů mělo předchozí zkušenost s halucinogenními drogami, včetně 1 subjektu, který požil LSD jednou a 2 subjekty dvakrát. Subjekty byly požádány, aby se zdržely nadměrného požívání alkoholu mezi testováním a mimořádný limit požití byl 1 drink den před testováním. 3 subjekty byly lehčí kuřáci, ale nekouřili během testování. Byly provedeny testy moči na drogy. Testy na přítomnost alkoholu nebyly provedeny [7].

### **7.2.2. Podávané drogy**

Byly podávány gelové kapsle, které obsahovaly 100 µg LSD a příslušné kapsle s placebem. LSD bylo podáváno v jednotlivých úplných dávkách 200 µg odpovídající dávce  $2,84 \pm 0,5$  µg/kg [7].

### **7.2.3. Shrnutí studie**

Koncentrace LSD byla měřitelná ( $>0,1$  ng/ml) u všech subjektů v průběhu 12 hodin po podání. Maximální koncentrace LSD bylo dosaženo 1,5 hodiny po podání. Při orálním podávání bylo močí během 24 hodin vyloučeno 1 % diethylamidu kyseliny lysergové (LSD) a 13 %, jako 2-oxo-3-hydroxy LSD. V rámci farmakokinetiky této drogy nebyly zjištěny žádné rozdíly mezi pohlavími. Akutní podnětové a sympatomimetické reakce trvaly až 12 hodin [7].

## **7.3. Univerzitní nemocnice ve Francii**

### **7.3.1. Pacient 1**

Vzorky krve a moči byly získány od 21 letého muže přivezeného na pohotovost do nemocnice 4 hodiny po požití blotu s LSD [4].

Kvantitativní analýza: testování moči na nezákonné drogy bylo provedeno pomocí LC-MS/MS. Nebyly prokázány opiáty, amfetaminy ani kokain. Byla však zjištěna nízká hladina kanabису (THC-COOH 30 µg/l, THC-OH 5 µg/l a THC 3 µg/l). Hladina LSD v moči byla 1,3 µg/l a 0,82 µg/l (postupně), v plazmě 0,31 µg/l a 0,27 µg/l. Vzorky byly odebírány s časovým odstupem. Naměřené koncentrace LSD a iso-LSD jsou uvedeny v Tab. č. 5 [4].



### 7.3.2. Pacient 2

Vzorek moči byl získán od 22 letého muže 7 hodin po požití LSD. Kvantitativní analýza: testování moči na nezákonné drogy bylo provedeno pomocí imunologických metod. Opiáty, amfetaminy a kokain nebyly prokázány. Detekce kanabису byla pozitivní (>50 µg/l), ale kvantitativní stanovení pomocí LC-MS/MS nebylo provedeno. Hladiny LSD a iso-LSD v moči byly 0,24 µg/l a 0,6 µg/l. Naměřené koncentrace LSD a iso-LSD jsou uvedeny v Tab. č. 5 [4].

**Tabulka č. 5: Naměřené koncentrace LSD a iso-LSD ve vzorku plazmy a moči u jednotlivých pacientů**

	Pacient 1	Pacient 1*	Pacient 2
Plazma LSD	0,31 µg/l	0,27 µg/l	-
Plazma Iso-LSD	-	-	-
Moč LSD	1,3 µg/l	0,82 µg/l	0,24 µg/l
Moč Iso-LSD	-	-	0,6 µg/l

\* Naměřené hodnoty s časovým odstupem

- Nebylo uvedeno

## 8. Souhrnné tabulky

Tyto tabulky souhrnně předkládají informace týkající se analýzy LSD a jeho metabolitů, kde jsou uváděny přípravy vzorků (moč, plná krev/sérum, vlasy a bloty), použité typy extrakce, vlastní kvantitativní stanovení a detekce, hodnoty naměřených koncentrací, limit kvantifikace a detekce.

**Tabulka č. 6: Před-úprava a detekce LSD a jeho metabolitů ve vzorcích moči**

Sloučenina	Příprava vzorku	Extrakce	Detekce	Naměřené koncentrace (ng/ml)	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	Zdroj
LSD	100 µl moči + 50 µl vnitřního standardu + 300 µl Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> + 1ml CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O	LLE	LC-MS/MS	0,48 a 2,70	0,01	0,025	[1]
O-H-LSD				4,19 a 25,2	0,025	0,01	
LSD	100 µl moči + 50 µl octano-amonného pufru (pH 4) + 10 µl vnitřního standardu	SPE	LC-MS/MS	1,25	*	0,1	[2]
LSD	1 ml moči	SPE	LC-MS/MS	*	0,4	0,52	[14]
LSD	1 ml moči + 500 µl amonného pufru (pH 9) + 6 ml diethylether	LLE	LC-MS/MS	*	0,015	0,75	
iso-LSD							
Nor-LSD							
O-H-LSD	5 ml moči	SPE	LC-MS/MS	*	0,4	0,52	
LSD	5 ml moči + 2 ml 100 Mm fosfátového pufru (pH 6)	SPE	LC-MS/MS	*	0,4	1,6	
O-H-LSD							
LSD	1 ml moči + HCl (pH 5,5)	MIPs (acetonitril metanol)	LC-MS/MS	0,5	*	0,0002	[19]

Sloučenina	Příprava vzorku	Extrakce	Detekce	Naměřené koncentrace (ng/ml)	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	Zdroj
LSD	1 ml vzorku moči + 20 µl vnitřního standardu + 1 ml butyl acetátu + 1 ml Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	LLE	LC-MS/MS	3·10 <sup>3</sup>	*	0,01	[23]
iso-LSD	1 ml vzorku moči + 20 µl vnitřního standardu + 1 ml butyl acetátu + 1 ml Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	LLE	LC-MS/MS	2,4·10 <sup>3</sup>	*	0,01	[23]

\* V rámci dané publikace nebyl tento parametr uveden.

**Tabulka č. 7: Před-úprava a detekce LSD a jeho metabolitů ve vzorcích vlasů**

Sloučenina	Příprava vzorku	Extrakce	Detekce	Naměřené koncentrace (ng/ml)	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	Zdroj
LSD O-H-LSD	10 mg vlasů + 2 ml methanolu + 50 µl vnitřního standardu	LLE	LC-MS/MS	0,00127 a 0,00095 (pro LSD)	0,00025 0,0005	0,0005 0,001	[1]
LSD	50 mg vlasů + vnitřní standard + 3 ml fosfátového pufru (pH 5) + 1 ml NaOH + 5 ml CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> + 50 µl amonného pufru	LLE	LC-MS/MS	0,00066	0,0001	0,0005	[3]
LSD	dekontaminované vzorky vlasů	MIPs (acetonitril)	LC-MS/MS	0,1	*	0,001	[19]

\* V rámci dané publikace nebyl tento parametr uveden.

**Tabulka č. 8: Před-úprava a detekce LSD a jeho metabolitů ve vzorcích plné krve a séra**

Sloučenina	Příprava vzorku	Extrakce	Detekce	Naměřené koncentrace (ng/ml)	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	Zdroj
O-H-LSD	100 µl séra + 10 µl vnitřního standardu	SPE (acetonitril)	LC-MS/MS	0,99	*	0,1	[2]
LSD	1 ml séra + 2 ml fosfátového pufru (pH 6)	SPE	LC-MS/MS	0,7	0,01	0,012	[6]
iso-LSD	1 ml séra + 2 ml fosfátového pufru (pH 6)	SPE	LC-MS/MS	0,04	0,011	0,016	
nor-LSD/ nor-iso-LSD	1 ml séra + 2 ml fosfátového pufru (pH 6)	SPE	LC-MS/MS	0,7	0,017	0,017	
O-H-LSD	1 ml séra + 2 ml fosfátového pufru (pH 6)	SPE	LC-MS/MS	0,0014	0,03	0,034	
LSD	500 µl vzorku krve + 10 µl vnitřního standardu + 500 µl methanolu + 100 µl uhličitanového pufru (pH 9)	DLLME	LC-MS/MS	5	0,5	2	[8]
LSD	500 µl vzorku krve + 50 µl vnitřního standardu + 60 µl uhličitano-amonného pufru (pH 3,1) + 2 ml MTBE	LLE	LC-MS/MS	1,1	0,0097	0,036	[18]

Sloučenina	Příprava vzorku	Extrakce	Detekce	Naměřené koncentrace (ng/ml)	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	Zdroj
LSD	1 ml vzorku krve + 20 µl vnitřního standardu + 1 ml butyl acetátu + 1 ml Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	LLE	LC-MS/MS	0,27	*	0,01	[23]
iso-LSD	1 ml vzorku krve + 20 µl vnitřního standardu + 1 ml butyl acetátu + 1 ml Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	LLE	LC-MS/MS	0,44	*		

\* V rámci dané publikace nebyl tento parametr uveden.

**Tabulka č. 9: Před-úprava a detekce LSD v blotu**

Sloučenina	Příprava vzorku	Extrakce	Detekce	Naměřené koncentrace (ng/ml)	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	Zdroj
LSD	Blot (0,5 µg) + 2 ml methanol:voda (1:1)	SPE	LC-MS/MS	50	10	50	[13]

\* V rámci dané publikace nebyl tento parametr uveden.

## 9. Závěr

Diethylamid kyseliny lysergové ve zkratce LSD je v dnešní době považován za jednoho z nejsilnějších halucinogenních drog, kdy i malé dávky vedou k psychotropním účinkům (např. změna vnímání okolí). Je produkován plísní Paličkovici nachovou, která parazituje na žitě. Poprvé bylo získáno v roce 1938. Od té doby se zvyšovala jeho popularita, až se z něj stala v 60. letech rekreační droga, která byla užívána během mezinárodních studentských protestů. Nicméně v 60. a 70. letech bylo Československo jedinou zemí, kde se mohlo LSD legálně vyrábět. Toho využili čeští lékaři a začali s ním experimentovat a sledovat u mnoha subjektů (např. umělci, vědci, studenti nebo vojáci) změny vnímání a prohlubování jejich myšlenek. Proto i v dnešní době je LSD využíváno při studii mozku [5].

Po požití, nejčastěji blotu (p.o.) je LSD resorbováno a distribuováno do krve trávicího traktu a dalších orgánů v těle. V rámci farmakokinetiky je největší množství LSD ukládáno v játrech, kde je po perorálním požití metabolizován na jednotlivé metabolity (např.: iso-LSD, LAE, aj.), které putují do ledvin, kde jsou močí eliminovány ven z těla. V rámci farmakodynamiky se krví dostává do mozku, kde interaguje se serotoninem a dopaminovými receptory. To se odráží na projevení halucinogenních účinků (iluze, panika, bizarní chování aj.). Z hlediska somatických účinků můžeme na daném subjektu pozorovat tachykardii, mydriázu, hypertonii, slinění, pocení, aj [5,21,23].

Vzorky, které jsou pro stanovení LSD a jeho metabolitů odebírány jsou moč, krev, vlasy, a pak bloty. Před vlastní analýzou vzorku musí být provedena extrakce, a to buď extrakce kapalina-kapalina (LLE) nebo extrakce tuhou fází (SPE). U vzorků moči a krve by mělo být provedeno, ještě před extrakcí enzymatické štěpení glukuronidů (použití  $\beta$ -glukuronidasy). U vzorků vlasů by měla být provedena jejich dekontaminace. Při LLE dochází k přechodu analytu z vodné do organické fáze. Organická fáze obsahující analyt je dále zpracována a použita pro analýzu [51]. V rámci SPE je analyt ze vzorků koncentrován pomocí kolonky, obsahující sorbent, a následným promytím organickým rozpouštědlem. Po promytí dochází k uvolnění analytu ze sorbentu ve formě eluátu, který je dále použit při analýze [52].

Pro vlastní kvantitativní analýzu LSD a jeho metabolitů se využívají chromatografické metody, a to kapalinová a plynová chromatografie, v nejčastější kombinaci s hmotnostním detektorem [55].

## 10. Literární zdroje

- [1] Jang, M.; Kim, J.; Han, I.; et al. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2015, **115**, 138-143
- [2] Dolder, P. C.; Liechti, M. E.; Rentsch, K. M. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2015, **407**(6), 1577-1584
- [3] Gaulier, J. M.; Maublanc, J.; Lamballais, F.; et al. *Forensic Science International* 2012, **218**(1-3), 25-27.
- [4] Canezin, J; Cailleux, A; Turcant, A; et al. *Journal of Chromatography B*. 2001, **765**(1), 25-27.
- [5] Passie, T., Halpern, J. H., Stichtenoth, D. O., Emrich, H. M. and Hintzen, A. *CNS Neuroscience & Therapeutics*. 2008, 295-314
- [6] Martin, R.; Schuerenkamp, J.; Gasse, A.; et al. *International Journal of Legal Medicine*. 2013, **127**(3), 593-601
- [7] Dolder, P. C.; Schmid, Y.; Haschke, M.; et al. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2016, **19**(1), 1-7.
- [8] Fisichella, M.; Odoardi, S.; Strano-Rossi, S. *Microchemical Journal*. 2015, **123**, 33-41.
- [9] Crews, C.. *Toxins*. 2015, **7**(6) 2024-2050.
- [10] Merli, D.; Zamboni, D.; Protti, S.; et al. *Talanta*, 2014, **130**, 456-461.
- [11] Airado-Rodriguez, D.; Cruces-Blanco, C.; Garcia-Campana, A. M. *Journal of Chromatography A*. 2012, **1267**, 189-197
- [12] Birkler, R. I. D.; Telving, R.; Ingemann-Hansen, O.; et al. *Forensic Science International*. 2012, **222** (1-3), 154-161.
- [13] Marinho, P. A.; Alvarez Leite, E. M. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010, **46**(4), 695-703.
- [14] Pizzolato, T. M.; Lopez de Alda, M. J.; Barcelo, D. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*. 2007, **26**(6), 609-624.
- [15] Airado-Rodriguez, D.; Cruces-Blanco, C.; Garcia-Campana, A. M. *Analytica Chimica Acta*. 2015, **866**, 90-98.
- [16] Vogliardi, S.; Tucci, M.; Stocchero, G.; et al. *Analytica Chimica Acta*. 2015, **857**, 1-27.

- [17] Pedersen, A. J.; Dalsgaard, P. W.; Rode, A. J.; et al. *Journal of Separation Science*. 2013, **36**(13), 2081-2089.
- [18] Berg, T.; Jorgenrud, B.; Strand, D. H. *Journal of Analytical Toxicology*. 2013, **37**(3), 159-165.
- [19] Chapuis-Hugon, F.; Cruz-Vera, M.; Savane, R.; *Journal of Separation Science*. 2009, **32**(19), 3301-3309.
- [20] Geyer, Mark A. *Biological Psychiatry*. 2015, **78**(8), 516-518.
- [21] Fantegrossi, W. E.; Murnane, K. S.; Reissig, Ch. J. *Biochemical Pharmacology*. 2008, **75**(1), 17-33.
- [22] Musshoff, F.; Daldrup, T. *Forensic Science International*. 1997, **88**(2), 133-140.
- [23] Johansen, SS; Jensen, JL. *Journal of Chromatography B-analytical technologies in the Biomedical and life Sciences*. 2005, **825** (1), 21-28.
- [24] Haupt, K.; Linares, A. V.; Bompert, M.; Tse Sum Bui, B. *Molecularly imprinted polymers*. 2011, 1-27.
- [25] Upshall, DG; Wailling, DG. *Clinica Chimica Acta*. 1972, **36**, 67-73
- [26] Hoch, PH. *Studies in routes of administration and counteracting drugs*. 1956, 8-12.
- [27] Sokoloff, L.; Perlin, S.; Kornetsky, C.; Kety, SS. *The effects of d-lysergic acid diethylamide on cerebral circulation and overall metabolism*. 1957, **66**, 468-477.
- [28] Abramson, HA; Jarvik, ME; Hirsch, MW. *Lysergic acid diethylamide (LSD-25): X. Effects on reaction time to auditory and visual stimuli*. 1955, **40**, 39-46.
- [29] Klette, KL; Anderson, CJ; Poch, GK; Nimrod, AC; ElSohly, MA. *Journal of Analytical Toxicology*, 2000, **24**, 550-556.
- [30] Canezin, J.; Cailleux, A.; Turcant, A.; Le Bouil, A.; Harry, P.; Allain, P. *Journal of Chromatography B Biomedical Sciences Applications*. 2001, **765**, 15-27.
- [31] Gaddum JH. *Antagonism between lysergic acid diethylamide and 5 hydroxytryptamine*. 1953, **121**(1), 15P.
- [32] Gaddum, JH; Hameed, KA. *British Journal Pharmacology*. 1954, **9**(2), 240-8.
- [33] Marona-Lewicka, D.; Kurrasch-Orbaugh, DM; Selken, JR; Cumbay, MG; Lisnicchia, JG; Nichols, DE. *Psychopharmacology*. 2002, **164**, 93-107



- [34] Abramson, HA; Jarvik ME; Govin, MH; Hirsch, MW. *Lysergic acid diethylamide (LSD-25): XVIII. Tolerance development and its relationship to a theory of psychosis*. 81–105.
- [35] Arthur, C. L.; Pawliszyn, J. *Analytical chemistry*. 1990, **62**, 2145–2148.
- [36] Rezaee, M.; Assadi, Y.; Milani Hosseini, M. R.; Aghaee, E.; Ahmadi, F.; Berijani, S. *Journal of Chromatography A*. 2006, 1116.
- [37] National Center for Biotechnology Information, *Pubchem Compound Database, Imipramine* [online]. [Cit. 5. 12. 2016]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2726>.
- [38] National Center for Biotechnology Information, *PubChem Compound Database, Imipramine* [online]. [Cit. 5. 12. 2016]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3696>.
- [39] I-Creative, *Lidské tělo obrázky* [online]. [Cit. 10. 12. 2016] Dostupné z: <http://www.i-creative.cz/2011/10/18/lidske-telo-obrazky/>.
- [40] VWR, We Enable Science. *Deep well plates, Eppendorf Deepwell plate 96 and 384*. [online]. [Cit. 25. 11. 2016]. Dostupné z: <http://au.vwr.com>.
- [41] Biotage, *MIPs - Molecularly Imprinted Polymers* [online]. [Cit. 20. 12. 2016]. Dostupné z: <http://www.biotage.com/product-page/mips---molecularly-imprinted-polymers>.
- [42] Scientific Reports, *Schematic illustration of DLLME* [online]. [Cit. 20. 12. 2016]. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/srep25228>.
- [43] Agilent Technologies, *Liquid chromatography columns* [online]. [Cit. 25. 11. 2016]. Dostupné z: <http://www.agilent.com/cs/agilent/en-us/products/liquid-chromatography/columns>.
- [44] Chromservis, *Rtx – Volatile Amine Capillary GC Column* [online]. [Cit. 28. 3. 2017]. Dostupné z: <https://www.chromservis.eu/p/rtx-volatile-amine-capillary-gc-column-30m-x-0-32mm>.
- [45] Chromacademy, *Sample Preparation Liquid-Liquid Techniques* [online]. [Cit. 22. 11. 2016]. Dostupné z [http://www.chromacademy.com/lms/sco59/Sample\\_Preparation\\_Liquid-Liquid\\_Extraction\\_Techniques.pdf](http://www.chromacademy.com/lms/sco59/Sample_Preparation_Liquid-Liquid_Extraction_Techniques.pdf).
- [46] Separační metody, *Extrakce* [online]. [Cit. 25. 11. 2016]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/extrakce.pdf>.

- [47] Sigma-Aldrich, *Enzyme Explorer  $\beta$ -glucuronidase* [online]. [Cit. 20. 12. 2016]  
Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/analytical-enzymes/beta-glucuronidase.html>.
- [48] Anzillotti, L.; Odoardi, S.; Strano-Rossi, S.. *Forensic Science International*. 2014, **243**, 99-106.
- [49] Henderson, LA; Glass, WJ. *LSD: Still with us after all these years*. New York: Macmillan, 1994
- [50] Freedman, DX; Coquet, CA. *Regional and subcellular distribution of LSD and effects on 5-HT levels*. 1965, **7**, 183
- [51] Pena-Pereira, F.; Lavilla, I.; Bendicho, Carlos. *Spectrochimica Acta part B-Atomic Spectroscopy*. 2009, **65**(1), 1-15.
- [52] Thurman, E. M.; MILLS M. S. *Solid-phase extraction: principles and practice*. New York: Wiley, c1998. ISBN 0-471-61422-x.
- [53] Liska, I.; Krupcik, J.; Leclercq, P.A.. *Journal of High Resolution Chromatography*. 1989, **12**, 577-590.
- [54] Mitra, S. *Sample preparation techniques in analytical chemistry*. Hoboken, N.J.: J. Wiley, 2003. ISBN 0-471-32845-6.
- [55] KEALEY, D.; P. J. HAINES. *Analytical chemistry*. Oxford: BIOS, 2002. ISBN 1859961894.
- [56] Sigma-Aldrich, *Packed GC Columns* [online]. [Cit. 28. 3. 2017]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/gas-chromatography/packed-gc-columns.html>.
- [57] Psychedelika, *LSD* [online]. [Cit. 5. 5. 2017]. Dostupné z: <http://lsd.cz/lsd/lsd1.html#papierky>.