

## Rilievo e dosaggio della salvinorina A in campioni di salvia divinorum mediante tecnica HPLC abbinata a spettrometria di massa

### *Identification and dosage of Salvinorina A in samples of salvia divinorum by HPLC method combined with mass spectrometry*

F. GIGLI<sup>1</sup>, D. DI CANDIA<sup>1</sup>, P. TIRELLI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Sezione di Tossicologia Forense, Istituto di Medicina Legale, Università degli Studi di Milano, Via Luigi Mangiagalli, 37 20133 Milano, tel. 02.50315641, fax 02.50315661.

#### Riassunto

Gli autori propongono una metodica per il rilievo quali-quantitativo della salvinorina A in foglie di salvia divinorum. Lo studio prevede un'estrazione del principio attivo attraverso una solubilizzazione in metanolo delle foglie essiccate e l'impiego di un sistema HPLC abbinato ad un rivelatore di massa di tipo "Ion Trap" per il rilievo ed il dosaggio della sostanza.

Parole chiave: Salvia divinorum, Salvinorina A, Hplc/ms-ms.

#### Abstract

The Authors propose a technique for the qualitative-quantitative identification of Salvinorina A in leaves of Salvia Divinorum plants. This study describes the solubilization in methanol of the dried leaves for the extraction of the active principle and the employment of HPLC method combined with a "Ion Trap" mass spectrometry for the identification and dosage of the substance.

Keywords: Salvia divinorum, Salvinorina A, Hplc/ms-ms.

#### Introduzione

La salvia divinorum è una pianta perenne appartenente alla famiglia delle Labiatae, originaria di alcune aree situate tra i 750 ed i 1500 metri d'altitudine della Sierra Mazateca di Oaxaca, Mexico. La pianta, di circa un metro d'altezza, presenta come caratteristiche componenti tassonomiche ampie foglie verdi, steli squadrati e cavi e fiori bianchi con calici color porpora. Benché l'uso di funghi e di semi quali quelli della *rivea corymbosa*, meglio nota come *morning glory*, fosse documentato sin dal XVI secolo dai conquistadores spagnoli, testimonianze riguardanti la salvia divinorum sono relativamente recenti. La ricostruzione del suo utilizzo attraverso i secoli ha presentato alcune difficoltà a causa dei diversi nomi attribuiti alla medesima pianta.

L'azione della salvinorina A è stata valutata su 42 biorecettori noti. Mediante l'utilizzo di marcatori radioattivi è stata evidenziata una forte interazione con i recettori K degli oppioidi. Tale interazione viene definita anomala in quanto, la maggior parte delle sostanze ad azione allucinogena agiscono a livello del sistema serotoninergico ed in particolare sul recettore 5HT-2a. Per queste caratteristiche, la salvinorina A, presenta interessanti differenze rispetto a qualsiasi altra sostanza psicoattiva.

Il dosaggio "soglia", necessario per percepire effetti allucinogeni, è stabilito nell'ordine dei 200mcg. Tale attività classifica la Salvinorina A quale sostanza psicoattiva naturale più potente oggi conosciuta, psilocina e

psilocibina sono approssimativamente cinquanta volte meno attive, mentre l'LSD, che peraltro è di origine semisintetica, è tra due e quattro volte più attiva.

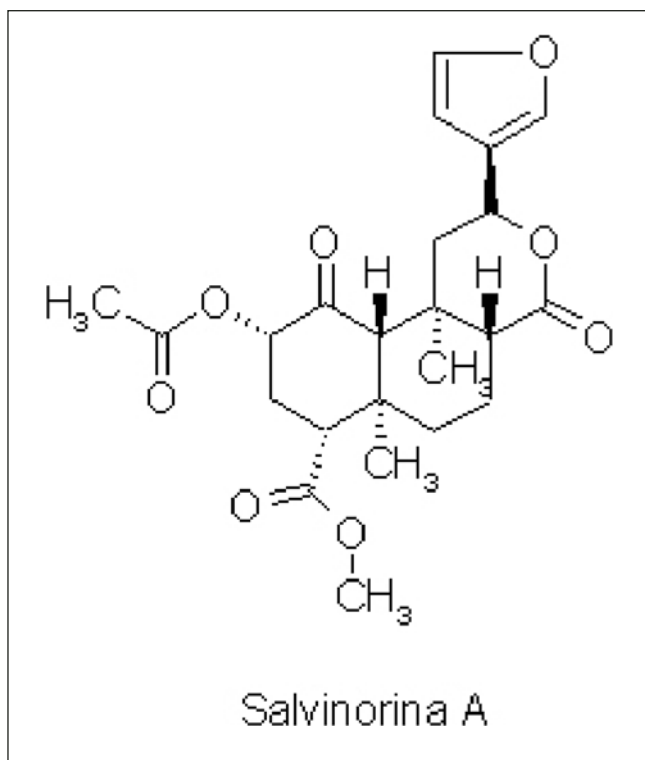
L'effetto principale solitamente descritto dopo l'assunzione di Salvinorina A è riconducibile ad una separazione totale tra corpo e coscienza. L'effetto dura meno di dieci minuti ma in alcuni casi può permanere per 30-60 minuti.

All'inizio degli anni ottanta nuove ricerche di A. Ortega e L. Valdés portarono all'isolamento di alcuni diterpeni *trans*-clerodani nella specie brasiliana della pianta e venne isolato un nuovo diterpene denominato *salvinorina A* insieme al suo derivato deacetilato inattivo, la *salvinorina B*. La struttura di entrambi gli isomeri fu chiarita nel 1990 mediante cristallografia a raggi X.

Date le caratteristiche della molecola e l'assenza di gruppi funzionali derivatizzabili, la risoluzione in GC\MS risulta inadeguata ad ottenere un risultato quantitativo attendibile: scarsa risoluzione del picco e coeluizione con altri componenti della matrice. Pertanto la gascromatografia abbinata alla spettrometria di massa può essere impiegata solamente per indagini di tipo qualitativo pur con alcune difficoltà di riconoscimento.

#### Materiale e Metodi

A partire dal 2001, indagini condotte dalla Polizia Postale di Milano hanno portato al sequestro di ingenti



quantità di materiale sospetto proveniente dall'Olanda, in attesa di essere recapitato ai singoli destinatari tramite servizio postale. Successive indagini tossicologiche effettuate su tale materiale, condotte presso la Sezione di Tossicologia Forense dell'Istituto di Medicina legale di Milano, hanno rilevato, in parte dei reperti, la presenza di salvignorina A. Si è resa pertanto necessaria la messa a punto di una metodica idonea a dosare la salvignorina in campioni di materiale vegetale.

Sono stati oggetto dello studio n. 10 campioni di salvia divinorum in forma di foglie intere essiccate.

### Preparazione dei campioni

Il materiale è stato posto in molino a palle fino a renderlo polvere, 20mg di ciascun campione sono stati prelevati e posti in 5ml di una soluzione metanolica di etaverina 10 gamma/ml (ISTD) (fornito dalla ditta Sigma, 3050 Spruce St., St. Luis Mo, 63103 USA), vorteggiati e sottoposti ad agitazione rotante per 12 ore. Successivamente si è proceduto ad una centrifugazione dei campioni per 15 minuti a 3500 rpm. Terminata questa fase, 1ml di surnatante è stato posto in vial ed analizzato in HPLC/MS.

Sono state effettuate delle prove per verificare se il metanolo fosse in grado di estrarre dal materiale vegetale la salvignorina. A tale scopo il residuo della polvere solubilizzata in metanolo previa separazione è stato posto nuovamente in 5 ml di metanolo seguendo la procedura prima descritta, quindi separato il metanolo sul residuo è stato aggiunto nuovamente metanolo. Le analisi

hanno mostrato un potere di solubilizzazione della salvignorina al primo trattamento con metanolo pari al 98,8%, nel metanolo della seconda solubilizzazione sono state rilevate tracce inferiori al 1% e l'analisi della terza solubilizzazione è risultata negativa. Con la medesima tecnica sono state effettuate prove con differenti solventi, quali; acetone, n-esano e cloroformio ma le capacità estrattive di questi ultimi sono risultate decisamente inferiori al metanolo.

### Curva di calibrazione

È stata allestita una curva di calibrazione preparando una soluzione 100mcg/ml di salvignorina A (Lipomed AG, Fabrimatten Weg 4, CH 4144 Arlesheim, Svizzera) in metanolo, di tale soluzione sono state prelevate aliquote differenti in modo da allestire cinque punti di calibrazione corrispondenti a 6,25 - 12,5 - 25 - 50 - 100 mcg tutti contenenti 10 mcg/ml di standard interno.

L'equazione della retta ottenuta è risultata:  $y = 0,000140x + -0,000109$  ed  $R^2 = 0,999849$ .

Il coefficiente di variazione della retta è risultato pari al 5,7%.

La curva di calibrazione presenta una valida correlazione  $x/y$ , anche se a causa della bassissima risposta della salvignorina rispetto lo standard interno ne risulta che le costanti ed i coefficienti dell'equazione non sembrano derivare dalla concentrazione dell'analita ( $y$ ) e dal rapporto tra la risposta dell'analita e la risposta dello standard interno ( $x$ ).

### Analisi quantitativa HPLC/MS-MS

È stata impiegata la strumentazione fornita dalla Agilent Technologies, costituita da un sistema HPLC mod. 1100 dotato di campionatore automatico, colonna Zorbax Phenyl da 5 cm di lunghezza e di diametro interno di 2,1 mm, con particelle del diametro di 3 micron. È stata utilizzata una fase mobile al flusso di 0,4 ml/min in gradiente costituita da acqua allo 0,1 % di acido formico (A) e da acetonitrile allo 0,1% di acido formico (B). Il gradiente di concentrazione ha previsto da 0 a 1 min. il 10% di B, incrementando la percentuale di B al 100% a 8 min. e mantenendola sino a 10 min. Di ciascun campione (2,5 mg/ml) è stato iniettato 1 mcl.

Il rivelatore di massa utilizzato per l'analisi è costituito da una trappola ionica della Agilent Technologies mod. XCT Plus dotata di una sorgente ESI: Come nebulizzatore è stato impiegato azoto alla pressione di 50 psi, mentre come dry gas azoto al flusso di 10 l/min. La temperatura è stata fissata a 350°C. Il rivelatore è stato predisposto per l'acquisizione di due segmenti, nel primo dal tempo 0 min sino a 8,5 min è stato isolato lo ione con  $m/z$  pari a 396,2+ caratteristico dello standard interno che è stato riframmentato con energia di secon-

da frammentazione pari a 0,65 v. Per il dosaggio è stato selezionato lo ione con m/z pari a 368,2. Nel segmento successivo da 8,51 min a 10 min è stato isolato lo ione con m/z pari 433,2+ caratteristico della salvinorina che è stato riframezzato con energia di seconda frammentazione pari a 0,65 v. Per la quantificazione è stato selezionato lo ione con m/z pari a 373,1. La Figura 1, relativa alla salvinorina, mostra il tracciato hplc e nella parte inferiore la sua seconda frammentazione. La figura 2 è relativa allo standard interno e nella parte superiore mostra il tracciato hplc, mentre nella parte inferiore è mostrata la seconda frammentazione.

L'acetonitrile, l'acqua per Hplc, l'acido formico ed il metanolo sono stati forniti dalla ditta J.T.Baker (222 Red School Lane, Phillisburg NY 08865 USA).

**Risultati**

Le analisi condotte con il metodo dello standard interno ed eseguite in triplo, sia per i punti di calibrazione, sia per i campioni in esame hanno fornito ottimi risultati; la retta di calibrazione ha mostrato un coefficiente di variazione pari al 5,7%, con deviazione standard del 0,000007714 e fattore medio 0,0001344.

Nella tabella n. 1 seguente sono riportati i risultati quantitativi relativi a dieci campioni reali.

L'analisi quantitativa, che presenta buoni risultati in termini di accuratezza e precisione analitica, ha permesso il dosaggio del principio attivo in tutti i campioni sottoposti ad indagine. Inoltre, il coefficiente di varia-

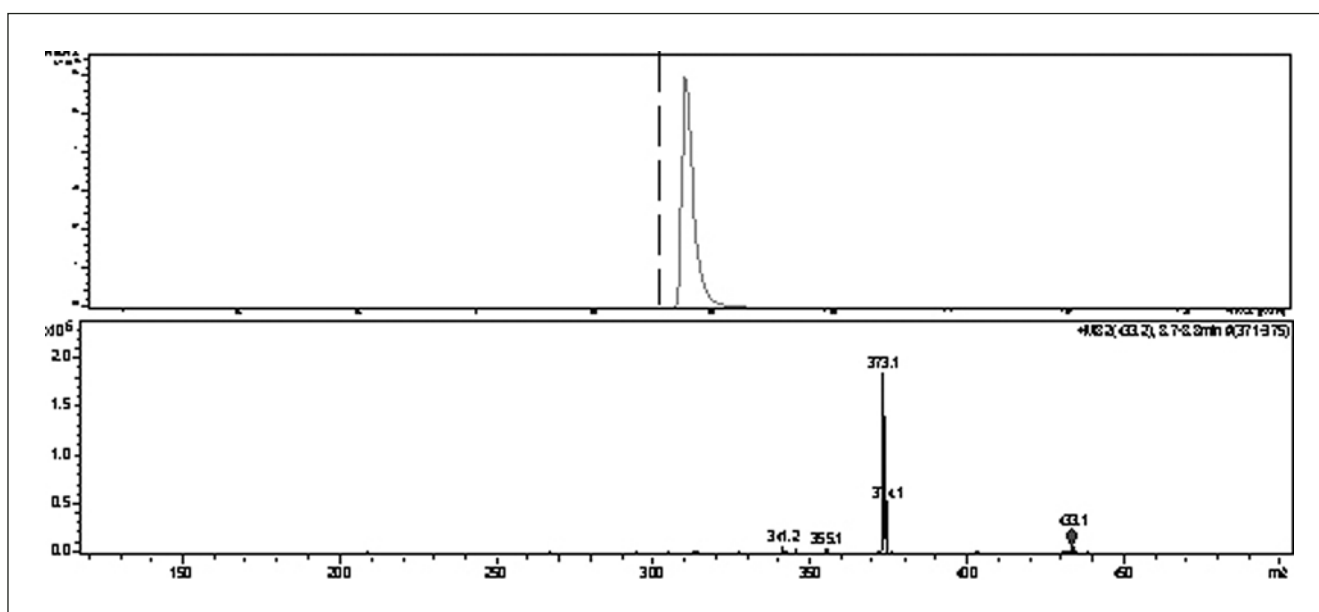


Fig. 1 - Tracciato HPLC/MS salvinorina A.

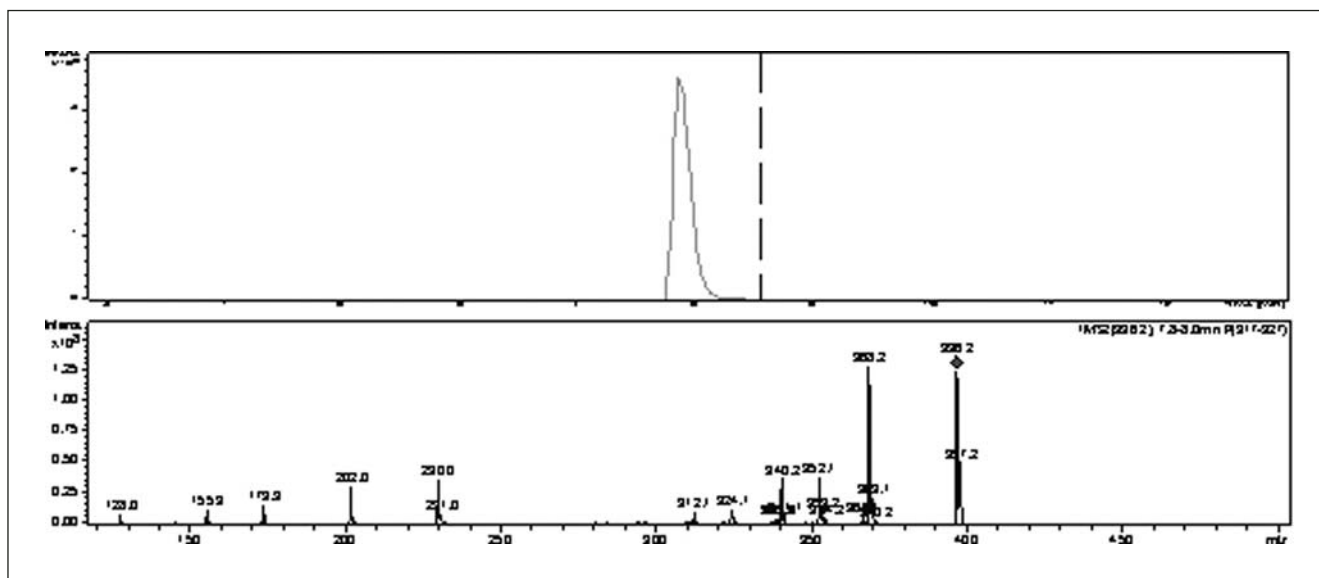


Fig. 2 - Tracciato HPLC/MS etaverina (ISTD).

Tabella 1

CAMPIONE	salvinorina A mcg in 20 mg	salvinorina A mcg/mg
1	46,62	2,33
2	51,80	2,59
3	54,10	2,70
4	47,90	2,39
5	49,00	2,45
6	44,22	2,21
7	50,10	2,50
8	48,10	2,40
9	48,62	2,43
10	60,98	3,05

zione della retta è inferiore al 10% come mostrato nella figura relativa alla retta di taratura.

## Conclusioni

La salvinorina A è una molecola che analiticamente può essere considerata difficile. Infatti, la sua scarsa risoluzione gascromatografica e l'interferenza della matrice rendono inattuabile il suo dosaggio, permettendo, in GC/MS, unicamente una difficoltosa analisi di tipo qualitativo.

In considerazione dello scarso assorbimento UV della molecola, è difficilmente rilevabile anche con sistemi hplc tradizionali che impiegano rivelatori UV a causa della scarsa sensibilità dello strumento stesso.

Il sistema da noi utilizzato è risultato idoneo a determinare la salvinorina A in matrici vegetali nonostante il composto in questione abbia poca attitudine ad ionizzarsi nella fase mobile, infatti a parità di concentrazione risponde pochissimo rispetto allo standard interno utilizzato. Sono state eseguite alcune prove variando la concentrazione dell'acido formico nella fase mobile senza ottenere migliori. Scarsi risultati si sono ottenuti utilizzando una fase mobile costituita da acqua contenente ammonio formiato 20mmolare ed acetonitrile ed analizzando il composto in ioni negativi; anche in questo caso si è registrata una scarsa ionizzazione.

In conclusione è possibile affermare che, nonostante la scarsa ionizzazione del composto, la metodica HPLC/MS-MS approntata è risultata la più idonea al rilievo e dosaggio della salvinorina A in campioni di matrice vegetale. La metodica dello standard interno è sicuramente quella che offre maggiori garanzie per quanto riguarda accuratezza e precisione con un valore del coefficiente di variazione pari al 5,7%.

## Bibliografia

- Dekorne J. (1993): A word in the wise. The Entheogen Review, 2(4):15.
- Dekorne J. (1994): Psychedelic Shamanism. The Cultivation, Preparation and Shamanic Use of Psychotropic Plants, Port Townsend, WA, Loompanics.
- Diaz J.L. (1979): Ethnopharmacology and taxonomy of Mexican psychodysleptic plants, J. Psyched. Drugs, 11(1-2):71-101.
- Di Candia D., Gigli F., Tirelli P. (2004) La Salvia Divinorum ed i suoi derivati: effetti psicoattivi e opportunità di restrizione e controllo. Bollettino per le farmacodipendenza e l'alcolismo, XXVII - N. 3-4/2004
- Diaz J.L. (1979): Ethnopharmacology and taxonomy of Mexican psychodysleptic plants, J. Psyched. Drugs, 11(1-2):71-101.
- Duke J.A. (1985): Handbook of Medicinal Herbs, CRC, Boca Ratón, FL.
- Emboden W. (1979): Narcotic Plants, Revised and enlarged second edition, The Macmillan, New York, NY.
- Fischer G.M. (1963): Some comments concerning dosage levels of psychedelic compounds for psychotherapeutic experiences, Psyched.Rev., 1(2):208-218.
- Foster S. (1984): Herbal Bounty The Gentle Art of Herb Culture, Gibbs M. Smith, Salt Lake City, UT. Revised edition, 1993, Herbal Renaissance-Growing, Using & Understanding Herbs in the Modern World.
- Giroud C., Felber F., Augsburg M., Horisberger B., Rivier L., Mangin P.: Salvia divinorum: an hallucinogenic mint which might become a new recreational drug in Switzerland, Forensic Science International 112 (2-3) (2000) pp. 143-150.
- Grubber H. (1973): Growing the Hallucinogens, High Times / Level Press, San Francisco, CA.
- Heffern R. (1974): Secrets of the Mind Altering Plants of Mexico, Pyramids Books, New York, NY.
- Hofmann A. (1990): Ride through the Sierra Mazateca in search of the magic plant "Ska María Pastora", in: T.J. Riedlinger (Ed.), op. cit., 115-127.
- Koreeda M. et al. (1990): The absolute stereochemistry of salvinorins, Chem.Lett., 2015-2018.
- Ledwith DM. Jones v. Gerhardstein: the involuntarily committed mental patient's right to refuse treatment with psychotropic drugs. [Journal Article] Wisconsin Law Review. 1990(5):1367-98, 1990.
- Metzner R. (1971): Mushrooms and the mind, in: B. Aaronson & H. Osmond (Eds.), Psychedelics: The Use and Implications of Hallucinogenic Drugs, The Hogarth Press, London, 90-107.
- Ortega A. et al. (1982): Salvinorin, a new trans-neoclorodane diterpene from Salvia divinorum (Labiatae), J. Chem. Soc. Perkins Trans. I,:2505-2508.
- Ott J. (1995), Ethnopharmacognosy and human pharmacology of Salvia divinorum and salvinorin A, Curare, 18(1):103-129.
- Savona G. et al. (1979): Splendidin, a new trans-clerodane from Salvia splendens, J. Chem. Soc. Perkins Trans. I, 533-534.
- Schultes R.E. (1967): The place of ethnobotany in the ethnopharmacologic search for psychotomimetic drugs, in: D.H. Efron et al., (Eds.), Ethnopharmacologic Search for Psychoactive Drugs, Public Health Service Publ. No. 1645, U.S. Government, Washington, D.C., 33-57.

- 21) Schultes R.E. (1969): Hallucinogens of plant origin, *Science*, 163:245-254.
- 22) Schultes R.E. (1970): The botanical and chemical distribution of hallucinogens, *Ann.Rev.Plant Physiol.*, 21:571-598.
- 23) Valdes III L.J. (1986): Loliolide from *Salvia divinorum*, *J. Nat. Prod.*, 49(1):171.
- 24) Valdes III J.L. (1994): Feedback on salvinorin A and Datura, *The Entheogen Review*, 3(3):16.
- 25) Valdes III J.L. (1994): *Salvia divinorum* and the unique di-terpene hallucinogen, salvinorin (divinorin) A, *J. Psychoact. Drugs*, 26(3):277-283.
- 26) Valdes III J.L. et al. (1983): Ethnopharmacology of Ska María Pastora (*Salvia divinorum* Epling & Játiva-M.), *J. Ethnopharm.*, 7(3):287-312.
- 27) Valdes III J.L. et al. (1984): Divinorin A, a psychotropic terpenoid, and divinorin B from the hallucinogenic Mexican mint *Salvia divinorum*, *J. Org. Chem.*, 49(24):4716-4720.
- 28) Wasson R.G. (1966): Ololiuhqui and the other hallucinogens of Mexico, in: W. Jiménez Moreno et al. (Eds.), *Summa Antropológica en Homenaje a Roberto J. Weitlaner*, INAH, México D.F., 329-348.