

LC/MS 法及び LC/MS/MS 法によるマジックマッシュルーム中の サイロシン、サイロシビンの同定

葛岡 孝太***, 岡本 健*, 山田 豊****, 高原 聰美*****, 大嶽 秀之*

Identification of Psilocin and Psilocybin in Magic Mushroom by LC/MS and LC/MS/MS

Kota KUZUOKA***, Ken OKAMOTO*, Yutaka YAMADA****, Satomi TAKAHARA***** and Hideyuki OTAKE*

* Nagoya Customs Laboratory, 2-3-12, Irifune, Minato-ku, Nagoya, Aichi 455-8535 Japan

** Present address: Central Customs Laboratory, Ministry of Finance, 6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882 Japan

*** Present address: Nagoya Customs Container Inspection Center, 28, Nishihama, Tobishimamura, Ama, Aichi 490-1447

**** Present address: Nagoya Customs, 2-3-12, Irifune, Minato-ku, Nagoya, Aichi 455-8535 Japan

In this study, we developed a method to identify Psilocin and Psilocybin contained in Magic Mushroom using LC/MS and LC/MS/MS. We measured Psilocin, Psilocybin and Bufotenine and we found that these all were detected by LC/MS. In particular, it was found that Psilocin and Bufotenine which are stereoisomers of each other were able to be specifically differentiated by comparing their retention times. In addition, we studied the most appropriate analysis condition, that is, the optimum collision energy for the LC/MS/MS method for identifying Psilocin and Psilocybin. We also measured the methanol extract of Magic Mushroom by LC/MS and LC/MS/MS methods, and we found that these methods were able to detect Psilocin and Psilocybin.

1. 緒 言

いわゆるマジックマッシュルームとは、サイロシン又はサイロシビンを含有する幻覚性きのこ類の俗称であり、麻薬及び向精神薬取締法において麻薬原料植物として規制されている。

マジックマッシュルームを識別するためには、サイロシン又はサイロシビンを含有することを確認する必要があり、税関分析においては、一般にガスクロマトグラフィ/質量分析法(以下「GC/MS法」という。)によりサイロシン及びサイロシビンの同定を行っている。

GC/MS法は、薬物分析において一般的に用いられている分析法の1つであり、得られるピークの保持時間とマススペクトルから物質の同定が可能である。しかし、サイロシビンは、熱に不安定な物質であり、GC/MS法による分析の際に注入口で脱リン酸化され、サイロシンとして検出されることが知られている。¹⁾そのため GC/MS 法によるサイロシン及びサイロシビンの同定では、試料溶液の調製の際に、熱分解を防ぐための誘導体化処理を行う必要がある。また、GC/MS 法では、同定可能なマススペクトルを得

るために、GC でサイロシン及びサイロシビンと夾雜成分とを完全に分離する必要があるが、夾雜成分は、きのこの種類等により異なることが考えられる。さらに、マジックマッシュルーム中のサイロシン又はサイロシビンの含有量についても、きのこの種類や試料の形状等により異なることが報告されていることから²⁾、含有量が少ない検体では GC/MS 法による同定が困難な場合も想定される。

一方、液体クロマトグラフィ/質量分析法(以下「LC/MS 法」という。)及び液体クロマトグラフィ/タンデム質量分析法(以下「LC/MS/MS 法」という。)を用いたサイロシン及びサイロシビンの同定が Tooru Kamata らにより報告されている。³⁾同報告において LC/MS 法及び LC/MS/MS 法では、誘導体化処理することなくサイロシビンを検出することができ、GC/MS 法よりも高感度な分析が可能であることが報告されている。

また、一般に LC/MS/MS 法では、LC で目的成分と夾雜成分とを完全に分離することができない場合でも、MS/MS を用いることで目的成分のみを選択的に測定することが可能である。

しかし、同報告においては、より高感度で検出が可能な

* 名古屋税関業務部 〒455-8535 愛知県名古屋市港区入船 2-3-12
 ** 現在所属 財務省税關中央分析所 〒272-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-5
 *** 現在所属 名古屋税關コンテナ検査センター 〒490-1447 愛知県海部郡飛鳥村西浜 28
 **** 現在所属 名古屋税關業務部 〒455-8535 愛知県名古屋市港区入船 2-3-12

LC/MS/MS 法の条件検討はされているものの、より多くのフラグメント情報を得ることができる条件については検討されていない。また、一部のきのこ類に含有することが知られているサイロシンの構造異性体であるブホテニン⁴⁾とサイロシンとの識別についても検討されていない。

そこで、標準試料のサイロシン、サイロシビン及びブホテニンを用いて、これらの検出及び識別が LC/MS 法で可能であるか否かについて検討を行い、併せてサイロシンとサイロシビンについて LC/MS/MS 法でより多くのフラグメント情報を得ることができる分析条件を検討したので報告する。また、上記分析条件により標準試料のマジックマッシュルーム中のサイロシン及びサイロシビンが検出可能であるか否かについても確認したので報告する。

2. 実験

2.1 試料及び試薬

2.1.1 試料

マジックマッシュルーム*

サイロシン*

サイロシビン*

ブホテニン塩酸塩 (Cayman chemical)

*国立医薬品食品衛生研究所から譲り受けたもの

2.1.2 試薬

アセトニトリル (関東化学、LC/MS 用)

メタノール (関東化学、特級)

ギ酸アンモニウム (和光純薬、特級)

2.2 装置及び測定条件

2.2.1 LC/MS 法

装置 : Agilent 6500 Q-TOF LC/MS (アジレントテクノロジー社)

カラム : ZORBAX Eclipse Plus C18 Rapid Resolution HD

(2.1 mm × 100 mm) (アジレントテクノロジー社)

カラム温度 : 40 °C

流速 : 0.300 mL/min

溶離液 : (A) 10 mM ギ酸アンモニウム (B) アセトニトリル

グラジェント条件 : A:B=95:5 (15 min hold) → 10:90 (25 min, 10 min hold)

イオン化法 : エレクトロスプレーイオン化法 (ESI 法)

イオン化条件 : ポジティブモード

乾燥ガス温度 : 300 °C

キャピラリー電圧 : 4000 V

フラグメンター電圧 : 150 V

検出器 : 飛行時間型質量分析計

2.2.2 LC/MS/MS 法

コリジョンガス : 窒素

コリジョンエネルギー : 10~30 eV

プリカーサーイオン : m/z 205 (サイロシン), 285 (サイロシビン)

検出器 : 四重極飛行時間型タンデム質量分析計

*その他分析条件は、2.2.1 の条件を使用

2.2 実験方法

2.3.1 試料の調製

サイロシン、サイロシビン及びブホテニンをそれぞれメタノールで溶解させ、水で 10 倍希釈したものを標準検液とした。

マジックマッシュルーム約 15 mg を細かく碎き、1 mL のメタノールで抽出し、孔径 0.22 μm メンブレンフィルターでろ過後、水で 10 倍希釈したものを検液とした。

2.3.2 サイロシン、サイロシビン及びブホテニンの LC/MS 法による測定

サイロシン、サイロシビン及びブホテニンの標準検液について、2.2.1 の測定条件を用いて測定した。

2.3.3 サイロシン及びサイロシビンの LC/MS/MS 法による測定

サイロシン及びサイロシビンの標準検液について、2.2.2 の測定条件を用いて測定を行い、最適なコリジョンエネルギーを検討した。

2.3.4 マジックマッシュルームの LC/MS 法及び LC/MS/MS 法による測定

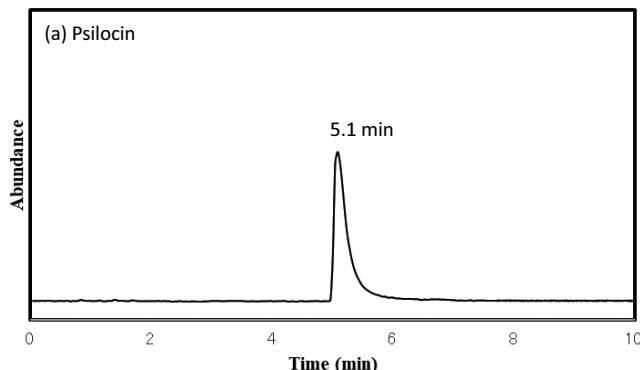
マジックマッシュルームの検液について、2.2.1 の測定条件、2.2.2 の測定条件及び 2.3.3 で決定したコリジョンエネルギーを用いて測定を行った。

3. 結果及び考察

3.1 サイロシン、サイロシビン及びブホテニンの測定結果

3.1.1 LC/MS 法による測定結果

サイロシン、サイロシビン及びブホテニンを LC/MS 法により測定したトータルイオンクロマトグラムを Fig.1 に示す。Fig.1 に示すとおり、サイロシン、サイロシビン及びブホテニンは、いずれも異なる保持時間にピークを検出することができた。特に構造異性体の関係にあるサイロシンとブホテニンの保持時間は、それぞれ 5.1 分と 2.8 分と明らかに異なっており、2.2.1 に示した一般的な ODS カラムでの識別が可能であることが分かった。



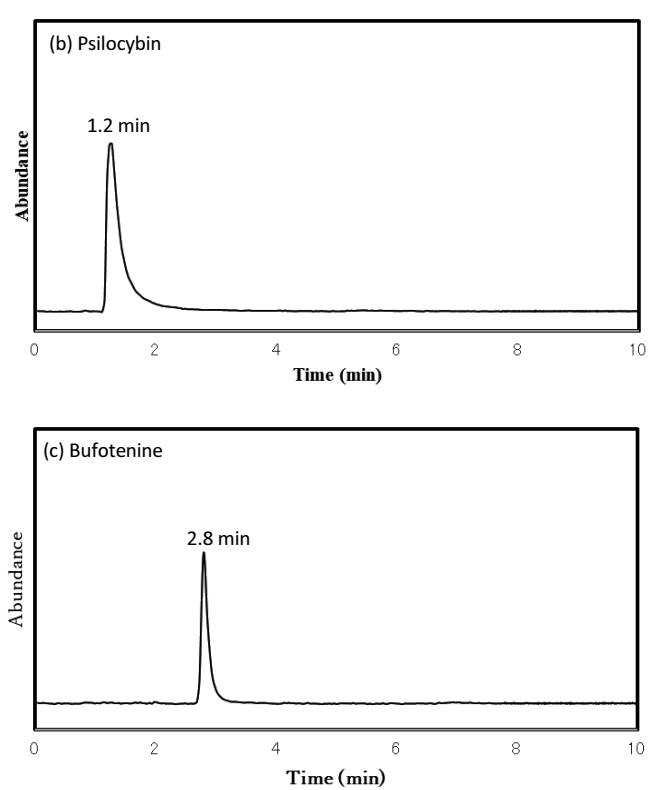


Fig.1 Total ion chromatograms of (a) Psilocin, (b) Psilocybin and (c) Bufotenine under the LC/MS condition described in 2.2.1.

3.1.2 LC/MS/MS 法による測定結果

より確度の高い物質の同定を行うためには、より詳細な化学構造についての情報を得る必要があり、LC/MS/MS 法においては、プリカーサーイオンに加えて、化学構造に由来するフラグメントイオンがより多く得られるようにコリジョンエネルギーを決定する必要がある。そこで、サイロシン及びサイロシビンについて最適なコリジョンエネルギーの検討を行った。

サイロシンについて異なるコリジョンエネルギー（10 から 30 eV）で LC/MS/MS 法により測定した MS/MS スペクトルをそれぞれ Fig.2 に示す。Fig.2 に示すとおり、コリジョンエネルギーが 20 eV 以上で、プリカーサーイオン（205）が消失し、明確に確認できるフラグメントイオンの数はコリジョンエネルギーによらず、Tooru Kamata らにより報告されていた 160 のフラグメントイオンに加えて新たに 58, 115, 及び 132 のフラグメントイオンが明確に確認できることが分かった。そのため、サイロシンにおいてプリカーサーイオンを消失させず、各フラグメントイオンが確認可能な最適なコリジョンエネルギーは 10~15 eV であるといえる。

サイロシビンについて異なるコリジョンエネルギー（10 から 30 eV）で LC/MS/MS 法により測定した MS/MS スペクトルをそれぞれ Fig.3 に示す。Fig.3 に示すとおり、コリジョンエネルギーが 25 eV 以上ではプリカーサーイオン（285）が消失し、コリジョンエネルギーが 20 eV 以上で Tooru Kamata らにより報告されていた 205 及び 240 のフラグメントイオンに加えて新たに 58, 115,

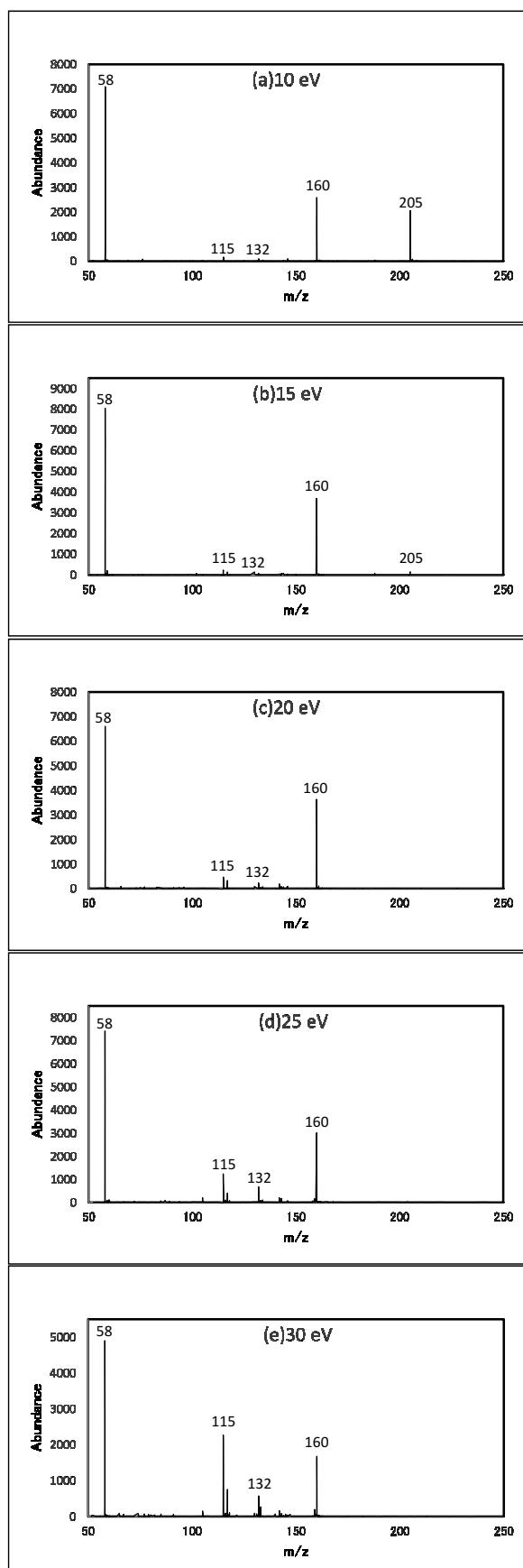


Fig.2 Mass spectra of Psilocin from the LC/MS/MS analysis at a collision energy of (a) 10 eV, (b) 15 eV, (c) 20 eV, (d) 25 eV, (e) 30 eV.

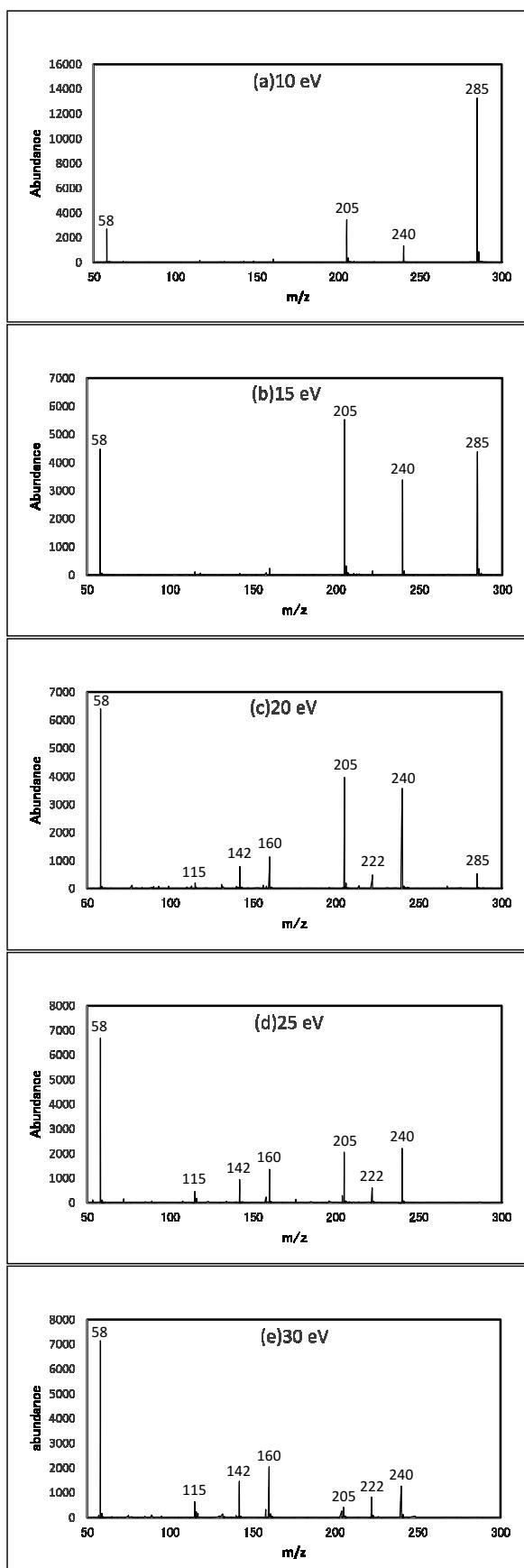


Fig.3 Mass spectra of Psilocybin from the LC/MS/MS analysis at a collision energy of (a) 10 eV, (b) 15 eV, (c) 20 eV, (d) 25 eV, (e) 30 eV.

142, 160 及び 222 のフラグメントイオンが明確に確認できることが分かった。以上より、サイロシビンにおいて、プリカーサーイオンを消失させず、各フラグメントイオンが確認可能な最適なコリジョンエネルギーは 20 eV であるといえる。

3.2 マジックマッシュルームの測定結果

マジックマッシュルームを LC/MS 法により測定したトータルイオンクロマトグラムを Fig.4 に示す。Fig.4 に示すとおり、保持時間 1.2 分と 5.1 分にピークが検出され、これらのピークの保持時間は、それぞれサイロシビン及びサイロシンの保持時間 (Fig.1(a) 及び Fig.1(b)) と一致した。

また、マジックマッシュルームを 3.1.2 で得られた最適なコリジョンエネルギーを使用して LC/MS/MS 法により測定した結果について、保持時間 1.2 分と 5.1 分のピークの MS/MS スペクトルをそれぞれ Fig.5 及び Fig.6 に示す。Fig.5 に示すとおり保持時間 1.2 分のピークの MS/MS スペクトルは、サイロシビンの MS/MS スペクトル (Fig.3(c)) と一致した。Fig.6 に示すとおり保持時間 5.1 分のピークの MS/MS スペクトルは、標準サイロシンの MS/MS スペクトル (Fig.2(b)) と一致した。

以上の結果から、マジックマッシュルーム中のサイロシン及びサイロシビンは、LC/MS 法及び LC/MS/MS 法により検出可能であり、それらの保持時間及び MS/MS スペクトルを標準物質と比較することにより、これらの同定が可能であると考えられる。

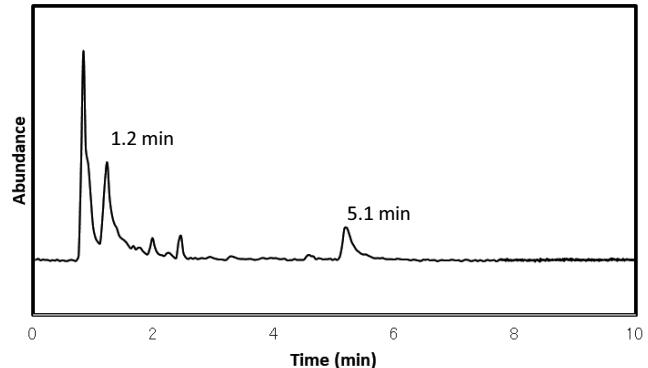


Fig.4 Total ion chromatogram of magic mushroom under the LC/MS condition described in 2.2.1.

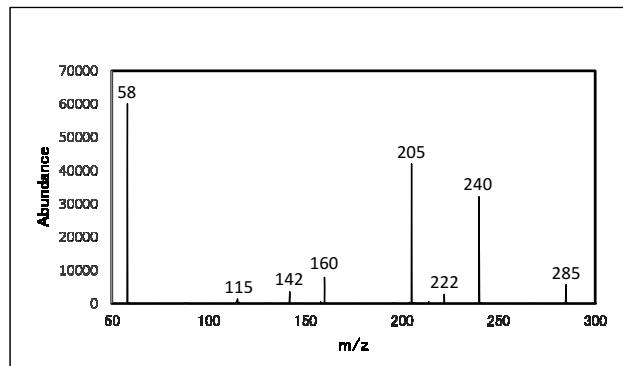


Fig.5 Mass spectra of the detected peaks at 1.2 min in Fig.4 from the LC/MS/MS analysis at a collision energy of 20 eV. Precursor ion selected for the LC/MS/MS analysis was m/z 285.

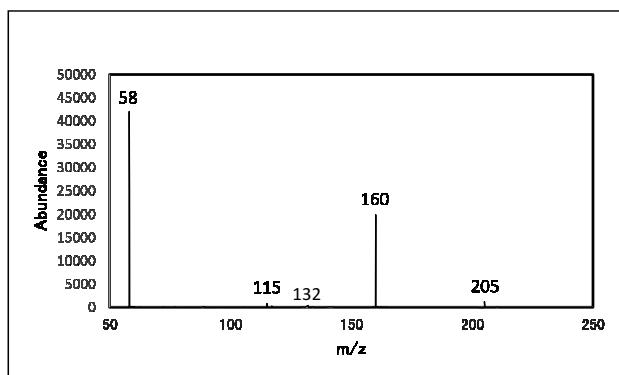


Fig.6 Mass spectra of the detected peaks at 5.1 min in Fig.4 from the LC/MS/MS analysis at a collision energy of 15 eV. Precursor ion selected for the LC/MS/MS analysis was m/z 205.

4. 要 約

当研究では、マジックマッシュルーム中のサイロシン及びサイロシビンの同定方法について、LC/MS 法及び LC/MS/MS 法を用いた方法を検討した。サイロシン、サイロシビン及びブホテニンについて測定した結果、いずれも LC/MS 法で検出可能であることが分かった。特に構造異性体の関係にあるサイロシンとブホテニンについても保持時間を比較することで明確に識別できることが分かった。また、サイロシン及びサイロシビンの最適な LC/MS/MS 法の分析条件を検討した。さらに、マジックマッシュルームのメタノール抽出物について LC/MS 法及び LC/MS/MS 法で測定することで、サイロシン及びサイロシビンの検出及び同定が可能であることを確認した。

文 献

- 1) 薬毒物試験法と注解 2006
- 2) 「幻覚性きのこの現状について」沖縄医報 Vol.46 No.11 2010
- 3) Tooru Kamata, Mayumi Nishikawa, Munehiro Katagi, Hitoshi Tsuchihashi: *J Forensic Sci*, **50**, 336(2005)
- 4) 長沢栄史：“日本の毒きのこ”，P66(2003)，(学習研究社)