

アプリケーションノート

幻覚性キノコに含まれるシロシビン、関連するトリプタミン、 β -カルボリンの分離および検出のための単一の分析法

Adam Bengtson, Paul D. Rainville, Fadi L. Alkhateeb, Stephanie Harden

Waters Corporation

要約

幻覚性キノコを疾患の治療に使用できることから、最近注目が集まっています。シロシビンを含むトリプタミンと既知の抗うつ薬のクラスに属する β -カルボリンの2つのクラスの活性化合物が、これらのキノコから見つかりました。この試験の目的は、単一のクロマトグラフィー分析法で6種のトリプタミンと4種の β -カルボリンのパネルを分離することでした。このパネルに含まれる化合物はルイス塩基として機能し、標準的なステンレススチール製HPLCシステムに含まれる金属酸化物層と相互作用することが知られています。MaxPeak High Performance Surfaces (HPS) テクノロジーにより、分析種と金属酸化物の相互作用に関する問題を解決できることがわかりました¹。これは、ピークの面積と高さがそれぞれ最大426%および最大882%増加しているクロマトグラフィー結果により実証されています。この記事では、Arc™ Premierシステムを、Empower™サンプルセットジェネレーター (SSG) および XSelect™ Premier HSS T3 カラムと組み合わせて使用して、10種のトリプタミンと β -カルボリンのパネルを分離する分析法について説明します。

アプリケーションのメリット

- MaxPeak HPS テクノロジーを使用することで、標準的なステンレススチール製 HPLC システムと比較して、クロマトグラフィー性能が大幅に向上
- より環境に優しいメタノールを強溶媒として使用して開発された、より環境に配慮した分析法
- 単一の15分の分析法で、トリプタミンと β -カルボリンのパネルのベースライン分離が可能に

- Empower サンプルセットジェネレーターを使用した装置メソッドおよびサンプルセットの迅速な作成
-

はじめに

ここ数年、幻覚性キノコに含まれる化合物の研究は再び注目を集めています。ほとんどの研究では、トリプタミンシロシビンの医薬品としての可能性、特に群発頭痛、不安、抑うつ、強迫神経症、心的外傷後ストレス障害、薬物乱用などの障害の治療における使用に焦点を当てています²。これらのキノコは、医薬品としての可能性だけでなく、一部の地域では娯楽使用の合法化が増加傾向にあります³。

生のキノコの摂取における適切な摂取量の決定は、活性化合物の存在量がさまざまな属、種、変異、生長条件によって大きく異なるため、困難になる場合があります⁴。さらに、幻覚性キノコを摂取すると、筋力低下などの有害反応が発生する事例も報告されています。この効果は、シロシビンに関連するトリプタミンの1つであるアエルギナシンに起因すると推測されています⁵。これらのキノコに含まれるβ-カルボリンは、モノアミンオキシダーゼ阻害剤（MAOI）の一種です。MAOIは一般に、抗うつ薬として処方されますが、トリプタミンの代謝に影響することもあります⁶。この化合物の混合物によってもたらされる可能性のある良い相乗効果や悪い相乗効果については、まだ十分に調査されていません。臨床研究、安全性、投与の正確さを向上させるために、これらの化合物を分離するためのシンプルで迅速な分析法が必要とされています。

本稿では、10種のトリプタミンとβ-カルボリン化合物を分離するためのHPLC分析法の開発について紹介します。これらの化合物の化学構造を図1に示します。Empower SSGを使用して、分析法開発プロセスの最適化ステップにおける装置メソッドの作成を自動化しました。重要なこととして、Waters™ MaxPeak HPSテクノロジーを利用して、分析種と金属酸化物の相互作用に関連するリスクを大幅に低減しました。

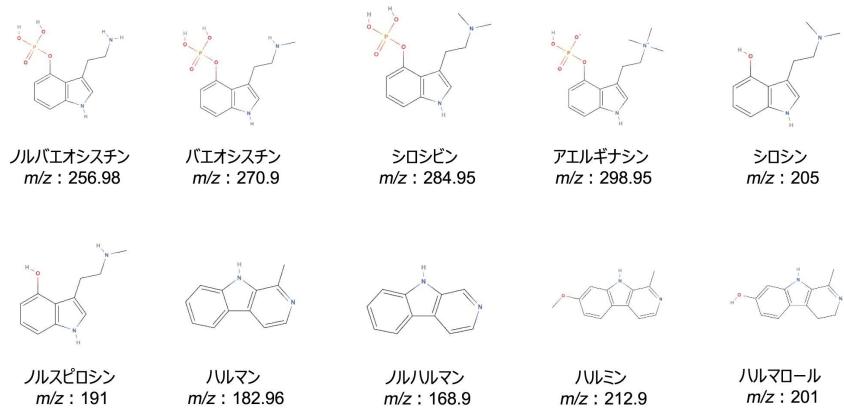


図 1. この試験で使用した 10 種の化合物すべての化学構造と対応する m/z

実験方法

サンプルの説明

1:1 アセトニトリル：水に溶解したシロシビンおよびシロシンは、Sigma Aldrich（ドイツ、ダルムシュタット）から個別に入手しました。バエオシスチン、アエルギナシン、ノルバエオシスチン、ノルブシロシン、ハルマン、ハルミン、ノルハルマン、ハルマロールは Caymen Chemicals（米国、ミシガン州）から入手しました

幻覚性キノコに含まれる活性化合物を模倣するために、トリプタミンと β-カルボリンのパネルを標準試料から調製しました。これらの化合物は全般に、メタノールで抽出されています⁷。このことを受けて、10 種すべての化合物のパネルを 5% 水、5% アセトニトリル、90% メタノール中に調製しました。シロシビン、シロシン、バエオシスチン、アエルギナシン、ノルバエオシスチン、ノルブシロシン、ハルマロールは 0.05 mg/mL になるように調製しました。ハルマン、ハルミン、ノルハルマンは 0.025 mg/mL になるように調製しました。

LC 条件

LC システム：

Arc Premier QSM-r

検出：

PDA 2998@ 254 nm

バイアル：

1 mL トータルリカバリーバイアル、製品番号

：186000385DV

カラム：
XSelect Premier HSS T3 カラム、 100 \AA 、 $2.5 \mu\text{m}$ 、
 $4.6 \times 100 \text{ mm}$ 、製品番号：186009859

カラム温度： $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$

サンプル温度： $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$

注入量： $1 \mu\text{L}$

流速： 0.75 mL/分

移動相 A： 0.1% ギ酸含有脱イオン水

移動相 B： 0.1% ギ酸メタノール溶液

グラジエントテーブル

時間 (分)	流速 (mL/分)	%A	%B	曲線
0	0.75	88	12	6
1	0.75	88	12	6
10	0.75	45	55	6
10.2	0.75	5	95	6
12	0.75	5	95	6
12.1	0.75	88	12	6
15	0.75	88	12	6

MS 条件

MS システム：
ACQUITY QDa™ 質量検出器

イオン化モード:	ポジティブ
取り込み範囲:	100 ~ 400
キャピラリー電圧:	0.8 Kv
コーン電圧:	15 v

データ管理

クロマトグラフィーソフトウェア:	Empower 3.8.0
MS ソフトウェア:	Empower 3.8.0
インフォマティクス:	Empower 3.8.0

結果および考察

分析法開発

分析法開発プロセスにおいて、選択性が異なる 4 種類のカラムケミストリーをスクリーニングしました。これらのカラムには、XBridge™ Premier BEH C₁₈、XSelect Premier CSH C₁₈、XSelect Premier CSH Phenyl-Hexyl、XSelect Premier HSS T3 が含まれます。カラムはすべて 2.5 μm、4.6 × 100 mm でした。ピーク同定には、PDA 質量検出器と QDa 質量検出器の両方を使用してスクリーニングを実行しました。XSelect Premier HSS T3 カラムが、最良のクロマトグラフィーピーク形状を示し、分析種の保持が最も良好であることがデータからわかりました。これらの優れた性能から、XSelect Premier HSS T3 カラムを選択して、さらに分析法の最適化を行いました。

分析法の最適化では、Empower SSG を使用して、グラジエント時間、強溶媒の割合、温度、流速、強溶媒の種類などのパラメーターを調査しました。このアプリケーションを使用するには、SSG にインポートできる CSV 形式のスプレッドシートを作成する必要があります。プロンプトに従うことで、アプリケーションにより、仕様に合ったサンプルセットが作成されます。これにより、装置メソッドとサンプルセットを個別に作成する際のエラーを低減し、時間を削減できます。

最適化データを分析したところ、アエルギナシンとバエオシスチンに対応する 2 番目と 3 番目のクロマトグラフィーピー

ークが、クリティカルペアとして同定されました。最終的な分析法においては、図 2 からわかるように、これらの 2 化合物が USP 分離度 1.95 まで完全にベースライン分離されました。この結果は、25 °C という比較的低いカラム温度、流速 0.75 mL/分、9 分間で 12 ~ 55% メタノールという速めのグラジエント時間を用いることで得られました。メタノールを使用したことで、アセトニトリルの場合と比較して、より良好な保持およびクロマトグラフィー性能が認められました。そのため、「より環境に配慮した」溶媒であるという追加のメリットも考慮して、最終的な分析法にメタノールを選択しました。

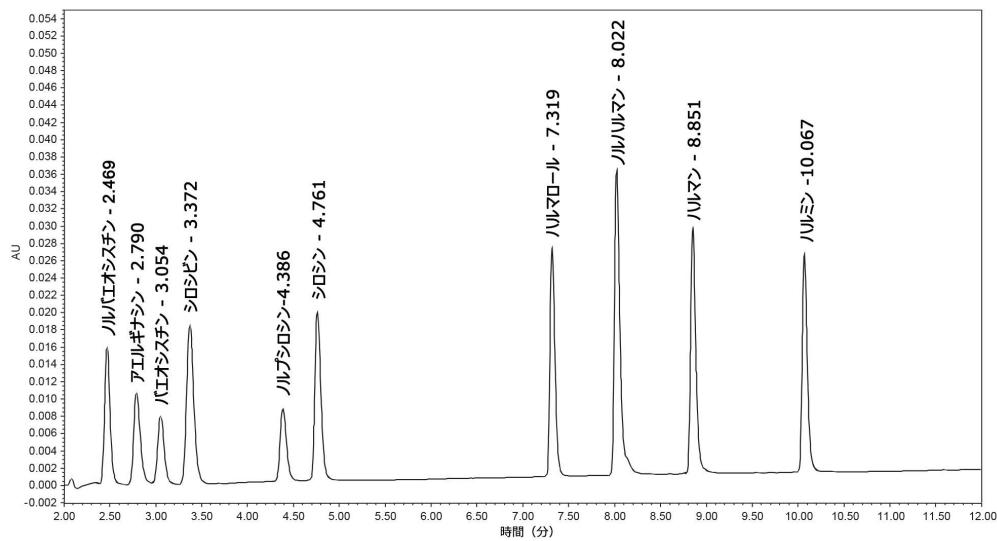


図 2. MaxPeak HPS テクノロジーを採用した Arc Premier システムおよびカラムで最終的な分析法を実行して得られた代表的なクロマトグラム

ベースラインで測定したクロマトグラフィーの USP 分離度は、すべての既知化合物について 2 に近い値になりました。ピークテーリングは、すべてのピークについて適切であることがわかりました。ノルハルマンは、テーリング係数が 1.5 を超える唯一の化合物でした。MaxPeak HPS テクノロジーを採用した Arc Premier システムおよびカラムで分析した各化合物の分離度およびテーリングを表 1 に示します。

クロマトグラフィーピークの特性		
成分	分離度	テーリング
アエルギナシン	2.56	1.43
バエオシスチン	1.95	1.17
ハルマロール	23	1.34
ハルマン	7.8	1.39
ハルミン	11.84	1.36
ノルバエオシスチン	NA	1.24
ノルハルマン	6.77	1.62
ノルプシロシン	7.38	1.23
シロシン	3.02	1.32
シロシビン	2.27	1.2

表 1. *Arc Premier* システムで最終的な分析法を実行して得られたクロマトグラフィーピークの分離度およびテーリング。

MaxPeak HPS と標準的な表面テクノロジーの比較

MaxPeak HPS テクノロジーの影響を評価するために、標準的なカラムを搭載した標準的なステンレススチール製 ACQUITY Arc システムで同じ分析を実行しました。得られたクロマトグラムを図 3 に示します。この分析における化合物では、標準のステンレススチールの場合と比較して、MaxPeak HPS テクノロジーを使用した場合、クロマトグラフィーピークの高さと面積が増加していました。MaxPeak HPS テクノロジーを使用すると、ノルハルマンのピークの高さと面積が大幅に増加し、テーリングが 2.3 から 1.6 に減少したことが注目されます。

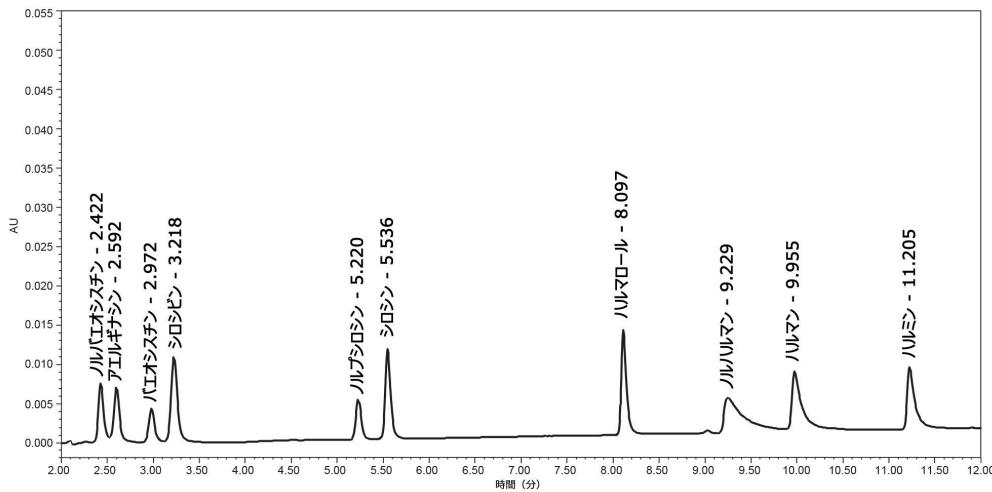


図 3. 標準的なステンレススチール製ハードウェアおよびカラムを含む ACQUITY Arc システムで、最終的な分析法を使用して得られた代表的なクロマトグラム

この分析法の 10 回の繰り返し注入を、両方の HPLC 構成で同時に実行しました。この実験の結果を表 2 および表 3 に示します。計算から、このテクノロジーにより、クロマトグラフィーピークの面積と高さの相対標準偏差が小さくなり、より再現性の高い分析法につながることがわかります。

クロマトグラフィーピークの面積における MaxPeak HPS とステンレススチール HPLC 構成の比較						
	面積レスポンスの平均（10 回の注入）			面積 % RSD の平均（10 回の注入）		
成分	HPS	ステンレススチール (SS)	HPS での面積/SS での面積	HPS	ステンレススチール (SS)	HPS/SS
アエルギナシン	56966	30311	188%	0.8	1.4	57%
バエオシスチン	41167	19294	213%	0.6	1.8	33%
ハルマロール	99810	52215	191%	0.4	1.8	22%
ハルマン	112157	49021	229%	0.6	2.3	26%
ハルミン	95821	44069	217%	0.6	1.9	32%
ノルバエオシスチン	72071	31817	227%	1.1	1.5	73%
ノルハルマン	148642	34896	426%	0.6	7.1	8%
ノルブロロジン	40189	21097	190%	0.6	2	30%
シロジン	88751	46678	190%	0.4	1.8	22%
シロジビン	101713	52794	193%	0.4	1.8	22%

表 2. 標準的なステンレススチール表面と MaxPeak HPS 表面で得られたクロマトグラフィーピーク面積の比較

クロマトグラフィーピークの高さにおける MaxPeak HPS とステンレススチール HPLC 構成の比較						
成分	高さレスポンスの平均 (10 回の注入)			高さ % RSD の平均 (10 回の注入)		
	HPS	ステンレススチール (SS)	HPS での高さ / SS での高さ	HPS	ステンレススチール (SS)	HPS/SS
アエルギナシン	10882	7130	153%	0.5	1.4	36%
バエオシスチン	8176	4330	189%	0.4	1.4	29%
ハリマロール	26570	13461	197%	0.5	1.8	28%
ハルマン	28455	7396	385%	0.7	2.4	29%
ハルミン	25370	7895	321%	0.6	2.1	29%
ノルバエオシスチン	16316	7778	210%	0.4	1.4	29%
ノルハルマン	35524	4026	882%	0.7	2.6	27%
ノルブロシン	8388	5198	161%	0.4	1.8	22%
シロシン	19638	11499	171%	0.4	1.8	22%
シロシビン	18580	11023	169%	0.4	1.5	27%

表 3. 標準的なステンレススチール表面と *MaxPeak HPS* 表面で得られたクロマトグラフィーピーク高さの比較

結論

幻覚性キノコに存在する 10 種の化合物を分離するために、ベースライン分離が可能で 15 分という迅速な分析法を作成しました。これらの化合物は医薬品としての可能性が研究されてきており、シロシビン、関連するトリプタミン、β-カルボリンなどが含まれます。この分析法は、XSelect Premier HSS T3 カラムを搭載した Arc Premier HPLC システムで、強溶媒としてメタノールを使用して正常に実行されました。アセトニトリルの代わりにメタノールを使用することにより、はるかに環境に優しい HPLC 分析法になっています。*MaxPeak HPS* テクノロジーを使用すると、標準的なステンレススチール製 HPLC 構成と比較して、クロマトグラフィー特性全般に大幅な改善が見られました。*MaxPeak HPS* を使用することにより、クロマトグラフィーピークの面積が最大 426%、高さが最大 882% 増加しました。

参考文献

- M. Lauber, T. H. Walter, M. Gilar, M. DeLano, C. Boissel, K. Smith, R. Birdsall, P. Rainville, J. Belanger, K. Wyndham.Low Adsorption HPLC Columns Based on MaxPeak High Performance Surfaces (HPS).Waters White Paper.2023, 720006930 <<https://www.waters.com/waters/library.htm?lid=135074404>> .
- R. Irizarry, A. Winczura, O. Dimassi, A. Minhas, J. Larice.Psilocybin as a Treatment for Psychiatric Illness: A

Meta-Analysis. *Cureus*.2022, 14(11): e31796.

3. W. R. Smith, P. S. Appelbaum.Two Models of Legalization of Psychedelic Substances.*JAMA*.2021, 326(8): 697–698.
4. M. W. Beug, J. Bigwood.Psilocybin and Psilocin Levels in Twenty Species From Seven Genera of Wild Mushrooms in the Pacific Northwest, U.S.A. *Journal of Ethnopharmacology*.1982, 5(3): 271–285.
5. A. Sherwood, A. Halberstadt, A. Klein, J. McCorry, K. Kaylo, R. Kargbo, P. Meisenheimer.Synthetic and Biological Evaluation of Tryptamines Found in Hallucinogenic Mushroom: Norbaeocystin, Baeocystin, and Aeruginascin.*J Nat Prod* 2020, 83: 461–467.
6. F. Blei, S. Dorner, J. Fricke, F. Bladeweg, F. Trottmann, A. Komor, F. Meyer, C. Hertweck, D. Hoffmeister.Simultaneous Production of Psilocybin and a Cocktail of B-Carboline Monoamine Oxidase Inhibitor in “Magic” Mushrooms.*Chem Eur J*.2020, 26: 729–734.
7. C. Lenz, J. Wick, D. Hoffmeister.Identification of ω -N-Methyl-4-hydroxytryptamine (Norpsilocin) as a Psilocybe Natural Product.*J Nat Prod*.2017, 80: 2835–2838.

ソリューション提供製品

ACQUITY Arc システム <<https://www.waters.com/nextgen/global/products/chromatography/chromatography-systems/acquity-arc-system.html>>

Arc Premier システム <<https://www.waters.com/nextgen/global/products/chromatography/chromatography-systems/arc-premier-system.html>>

ACQUITY QDa II 質量検出器 <<https://www.waters.com/nextgen/global/products/mass-spectrometry/mass-spectrometry-systems/acquity-qda-ii-mass-detector.html>>

2998 フォトダイオードアレイ（PDA）検出器 <
<https://www.waters.com/nextgen/global/products/chromatography/chromatography-detectors/2998-photodiode-array-pda-detector.html>>

Empower クロマトグラフィーデータシステム（CDS） <
<https://www.waters.com/nextgen/global/products/informatics-and-software/chromatography-software/empower-software-solutions/empower-cds.html>>

720008442JA、2024 年 7 月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#) [プライバシーポリシー](#) [商標](#) [キャリア](#) [法的通知およびプライバシー通知](#) [Cookies](#)

[Cookie 環境設定](#)