

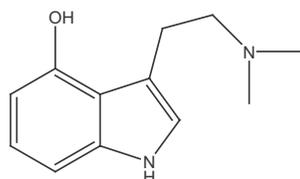
Nachweis und quantitative Bestimmung von Psilocin- und Psilocybin in halluzinogenen Pilzen

Markus Schläpfer und Michael Bovens

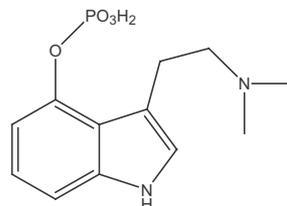
Wissenschaftlicher Dienst, Stadtpolizei Zürich, Zeughausstrasse 11, CH-8004 Zürich

1. Einleitung

Die Tryptamine Psilocybin und Psilocin sind die hauptsächlichen, psychoaktiven Komponenten, die in halluzinogenen Pilzarten der Gattungen Psilocybe, Stropharia, Conocybe und Panaeolus enthalten sein können. Die Effekte nach Einnahme (t_0 ca. 30 min) ähneln jenen eines kürzeren LSD-Trips (ca. 6 h) mit diversen Wahrnehmungs-veränderungen. Eine psychedelische Wirkung tritt ab ca. 10 mg Gesamtpsilocin (Psilocin + Psilocybin) ein. Die Wirkung von 15 mg Gesamtpsilocin wird als vergleichbar mit einem durchschnittlichen LSD Trip von 250 mg beschrieben [1].



Psilocin: $C_{12}H_{16}N_2O$
Molmasse: 204.27



Psilocybin: $C_{12}H_{17}N_2PO_4$
Molmasse: 284.25

Aus diesen Gründen wurden die Hauptwirkstoffe Psilocin und Psilocybin in die restriktivste Klasse der Betäubungsmittel (verbotene Stoffe) eingegliedert. Seit dem 31.12.2001 wurden aufgrund des massiv zunehmenden Pilzhandels (Magic Mushrooms) auch die eingangs erwähnten Pilzgattungen selbst, im Anhang der schweizerischen Betäubungsmittelverordnung spezifisch gelistet. Der Gesetzesartikel betrifft nicht nur den reifen Fruchtkörper, sondern alle Erscheinungsformen des Pilzes, also auch Myzel und Sporen [2].

2. Schwerer Fall (CH) / Nicht geringe Menge (DE) [2]

In der Schweiz wurde der "schwere Fall" gemäss einem Bundesgerichtsurteil auf die Menge der entsprechenden Substanz festgelegt, die eine naheliegende und ernstliche Gefahr für die körperliche oder seelische Gesundheit für mindestens zwanzig Personen hervorrufen kann. Im Fall von Psilocin ergeben – in Analogie zum "schweren Fall" von LSD - 200 Konsumeinheiten zu jeweils 10 mg Psilocin den vorgeschlagenen, mengenmässig "schweren Fall" von 2 g Gesamt-Psilocin.

In Deutschland wurde von der GTFCh im Juni 1999 eine nach deutschem BtmG "nicht geringe Menge" für Psilocin/Psilocybin von 1.2 g vorgeschlagen. Dies entspricht gemäss obiger Ausführung ca. 80 - 120 Konsumeinheiten.

3. Lebenszyklus von Pilzen

Pilzsporen keimen unter optimalen klimatischen Bedingungen und bilden ein Primärmyzel (Pilzfadengeflecht), das aus einkernigen (monokaryotischen) Zellen besteht. Mycelien von

verschiedenen Sporen fusionieren zum Sekundärmycel, wobei Zellen mit jeweils zwei Zellkernen (dikaryotisch) entstehen. Dieses Sekundärmycel ist komplett und somit fähig zu praktisch unbeschränktem, selbständigem Wachstum. Das Mycel produziert Enzyme, die Kohlenhydrate, Fette und Eiweiße verdauen können. Die entstehenden Produkte werden aufgenommen. Dies ist das Brutstadium, während dem Energie gespeichert wird. Die Bildung des sichtbaren Pilzfruchtkörpers beginnt mit dem "Nadelkopf"-Stadium. Kleine Knötchen markieren die Stellen, an denen die Fruchtkörper entstehen werden. Der Pilz bildet Stiel und Hut aus und entwickelt Lamellen. Auf den Lamellenflächen findet in den Basidien die Kernverschmelzung (Karyogamie) statt und durch anschließende Teilung (Meiose) entstehen vier haploide Zellkerne. Diese werden von der Basidie abgeschnürt und als Sporen freigesetzt um den Zyklus von vorn zu beginnen. [3, 4]

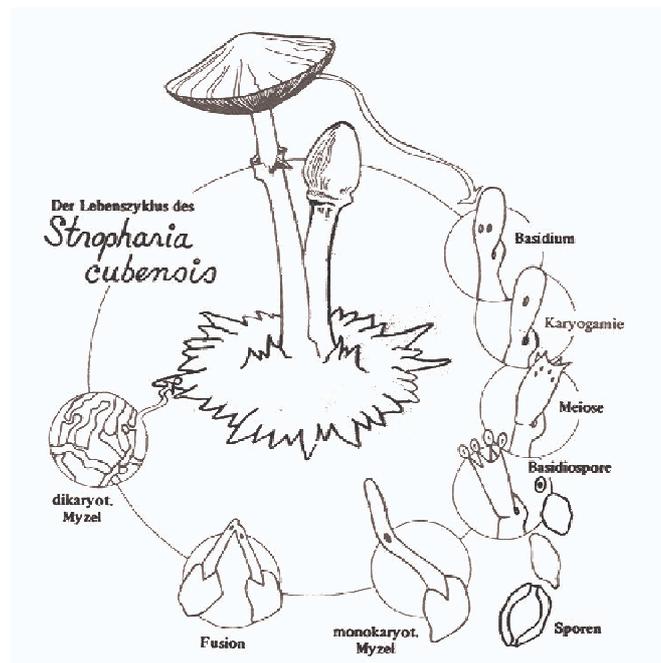


Abb. 1. Der Lebenszyklus von Pilzen

4. Color-Test (Vortest)

Eine Spatelspitze des getrockneten und fein zerhackten Pulvers wird auf eine Tüpfelplatte gegeben und mit Ehrlich's Reagenz (1 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd in 10 ml Methanol und 10 ml Phosphorsäure) versetzt.

Psilocin und Psilocybin führen nach 5-10 Minuten (Reaktion kann durch Erwärmen der Platte beschleunigt werden) zu einer rosa bis violetten Färbung.

5. Dünnschichtchromatographie (Vortest)

100 mg des getrockneten und fein zerhackten Pilzmaterials wird mit 1 ml Methanol extrahiert (90 min bei 40°C unter gelegentlichem Schütteln oder über Nacht bei RT). Die Probelösung wird durch eine 0,45 µm Membrane filtriert. Als Referenzlösungen werden je 0,5 mg Psilocin und Psilocybin in 1 ml Methanol gelöst. Die Referenzlösungen sind im Kühlschrank (+ 5°C) bis zu 4 Wochen haltbar.

Je 5 µl der Referenzlösungen bzw. 2 x 5 µl der Probelösung werden mit einer Kapillare auf eine HPTLC 10x10cm Kieselgel 60 F₂₅₄ Platte aufgetragen und trocknen gelassen.

Als Laufmittel wird eine Lösung aus 20 ml n-Butanol, 10 ml Essigsäure und 10 ml Wasser verwendet. (Dieses Laufmittel muss frisch hergestellt werden.) Die Trennung im vorkonditionierten DC-Tank mit deiner Laufstrecke von 8 cm dauert ca. 2 h. Der Nachweis der Komponenten erfolgt entweder mit UV 254 nm oder mit Sprühreagenz (Ehrlich's Reagenz s. oben).

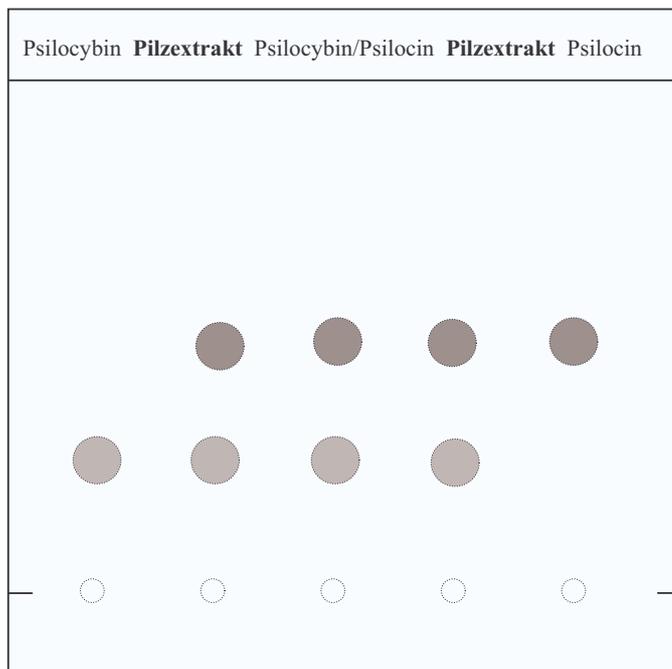


Abb. 2: DC-Vortests auf Psilocybin/Psilocin. Die R_f-Werte betragen für Psilocin 0.46 (violette Färbung) und Psilocybin 0.23 (rosa Färbung):

6. Ionen Mobilitäts Spektrometrie (IMS)

IMS wird häufig mit TOF-MS verglichen, man kann sich darunter aber auch eine Elektrophorese in der Gasphase vorstellen. Eine Probe wird ionisiert und die Ionen werden unter Normaldruck in eine Driftröhre gelenkt. In dieser Driftröhre bewegen sich die Ionen im elektrischen Feld in Richtung Detektor. Die Ionen bewegen sich mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch einen Gegenstrom eines Driftgases (trockene Luft). Die Geschwindigkeit hängt von ihrer Masse, der Größe und der Ladung ab. Kleine Ionen haben eine hohe Mobilität und erreichen den Detektor vor größeren Ionen mit geringerer Mobilität. [9]

6.1 Qualitative Analyse von Psilocin mit IMS

Für die qualitative Analyse von Psilocin kann getrocknetes und fein zerkleinertes Pilzmaterial direkt verwendet werden. Spuren des getrockneten Pilzmaterials werden auf eine Teflonmembrane gebracht und ohne Aufarbeitung ins Spektrometer gebracht. Psilocybin wird im Spektrometer umgesetzt und ebenfalls als Psilocin erfasst.

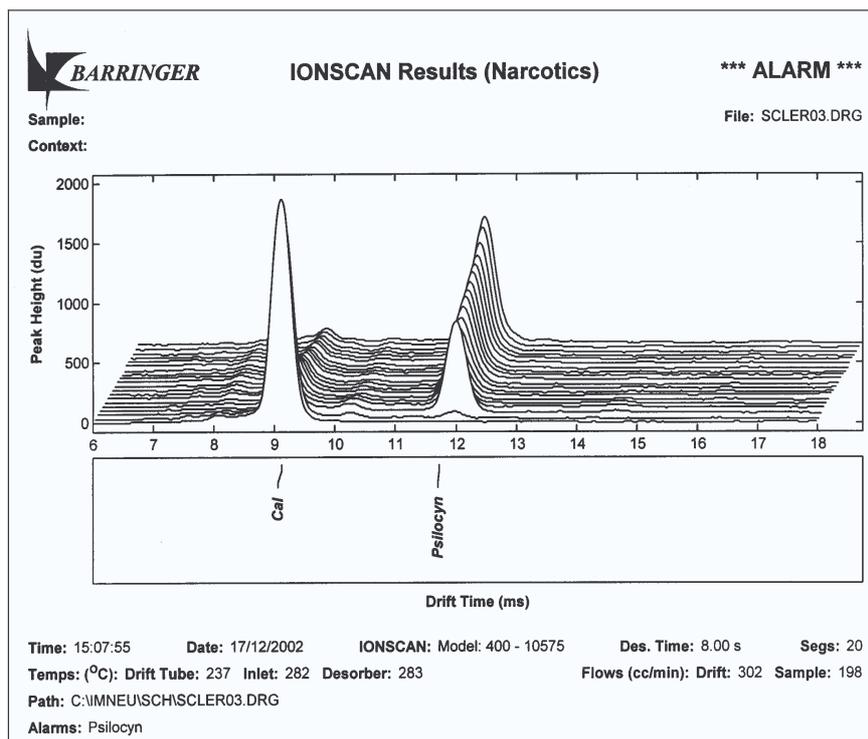


Abb. 3. Analyse von Psilocin mit IMS. Gerät: Barringer Ionscan 400. Filter: Teflon-Disks. Drift time: Cal: 9.00 ms, Psilocin: 11.59 ms. Reduzierte Ionen Mobilität: K_0 Psilocin: 1.4463, Limit of detection (LOD): 20 ng für Psilocybin, 1 ng für Psilocin

7. Grundlagen der Micellaren elektrokinetischen Kapillarchromatographie

Micellare elektrokinetische Kapillarchromatographie (MEKC) ist ein Modus der elektrokinetischen Chromatographie in welcher dem Puffer grenzflächenaktive Stoffe in Konzentrationen zugesetzt werden, welche Micellen bilden.

MEKC ist eine besondere Form der Kapillarelektrophorese, weil mit ihr sowohl neutrale, als auch geladene Analyten untersucht werden können. Micellen haben eine dreidimensionale Struktur mit dem hydrophoben Teil des grenzflächenaktiven Stoffes im Innern und dem geladenen Teil auf der Aussenseite. Die Trennung von Neutralteilen beruht auf der hydrophoben Interaktion des Analyten mit den Micellen. Je stärker die Interaktion, desto länger migriert der Analyt mit der Micelle. Die Selektivität der MEKC kann durch die Art der grenzflächenaktiven Substanz und durch Zugabe von Modifiern in den Puffer kontrolliert werden.

Das Trennprinzip der MEKC beruht auf einer unterschiedlichen Verteilung der Analyten zwischen den Micellen und dem Laufmittel. [5]

7.1 Quantitative MEKC-Analytik von Psilocin und Psilocybin

Psilocybin wird im Körper rasch zu Psilocin dephosphoryliert. So wird die psychotrope halluzinogene Wirkung eigentlich dem Psilocin zugeschrieben. Rechtlich relevant soll aus diesem Grund der Gesamtpsilocingehalt – Summe aus Psilocin und Psilocybin – sein (analog zum Gesamt THC-Gehalt von Δ^9 -THC-Carbonsäure und freier Base).

Die im folgenden vorgestellte Analysenmethode erfasst Psilocin und Psilocybin getrennt.

7.2 Geräte und Chemikalien

CE-Gerät:	Beckmann MDQ mit Säule: fused silica 45 cm, unbelegt
Spritzenfilter:	0.2 µm PET
ISTD-Lösung:	1 mg Coffein / ml Methanol
Puffer:	9 mmol NaHPO ₄ 4.5 mmol Na ₂ B ₄ O ₇ x 10 H ₂ O 40 mmol SDS Methanol 7% Acetonitril 3.5%, mit NaOH auf pH 8.5 einstellen
Referenzmaterial:	Hausstandards

7.3 Extraktion des Pilzmaterials

Feuchtes Pilzmaterial wird bei 40°C getrocknet. Das trockene Pilzmaterial wird pulverisiert. 60 mg Pilzpulver wird in ein 2 ml Schraubdeckelvlial eingewogen und mit 1 ml ISTD-Lösung versetzt. Diese Proben werden während 90 min. bei 40°C unter gelegentlichem Schütteln extrahiert. 100 µl dieses Extrakts werden mit 100 µl Puffer und 800 µl Wasser versetzt. Diese Lösung wird durch eine 0.2 µl Membrane filtriert und so für die Analyse verwendet.

7.4 Methodenparameter für die MEKC-Analyse

Die Fused silica Kapillare wird mit NaOH (0.1N), H₂O und Puffer konditioniert. Vor jeder Analyse wird die Kapillare gut mit Puffer gespült.

Trennungsspannung:	22 kV
Trennzeit:	10 min
Detektion:	217 nm
Injektion:	3 s mit 0.5 psi; gefolgt von 1 s mit 0.1 psi Wasser

7.5 Nachweis- und Quantifizierungsgrenze

	Psilocin	Psilocybin
Range	0.1 – 2 %	0.03 – 2 %
LOQ	0.10 %	0.03 %
LOD	0.03 %	0.01 %
Recovery	> 90 %	> 90 %

Ein typisches Kapillarchromatogramm ist in Abb. 4 dargestellt.

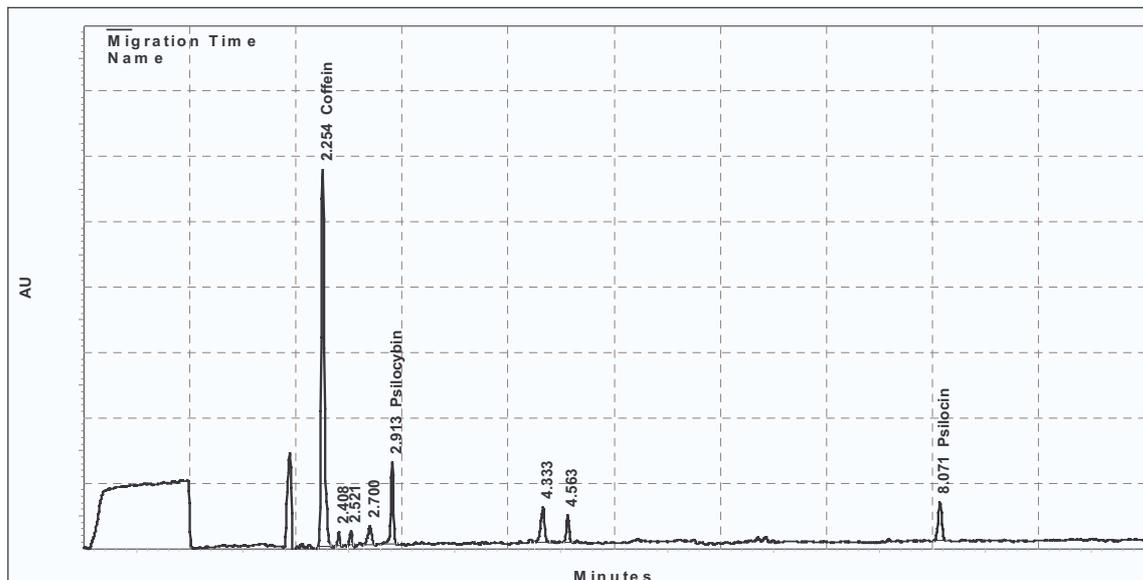


Abb. 4. Bestimmung von Psilocin und Psilocybin mit micellarer elektrokinetischer Kapillarchromatographie

8. Literatur

- [1] Turner, D.M. "Der Psychedelische Reiseführer", Nachtschattenverlag 1997
- [2] Bovens, Michael; Hansjakob, Thomas. Rechtliche Neuregelung von halluzinogenen Pilzen, Kriminalistik, 7/2002, 471-477
- [3] Homepage of the Biology Department, Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, Canada; <http://biotype.biology.dal.ca/~museum/wildMush/mushroom.html>
- [4] <http://www.zauberpilz.com>
- [5] Homepage of National Center for Biomedical Engineering Science, National University of Ireland, Galway; http://www.nuigalway.ie/ncbes/capillary_electrophoresis.htm
- [6] Stamets, Paul. 1999 "Psilocybinpilze der Welt". AT Verlag
- [7] Gartz, Jochen. 1999 "Narrenschwämme". Nachtschatten Verlag
- [8] Schläpfer, Markus; Bovens, Michael. Tagungsband GTFCH-Workshop 2003, 60-65
- [9] Cottingham, Katie. Analytical Chemistry 75/19. October 1, 2003. 435A-439A
- [10] Trachsel, Daniel; Richard, Nicolas. 2000 "Psychedelische Chemie". Nachtschatten Verlag