

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE



Analýza obsahových látek rodu *Psilocybe* I.

Analysis of *Psilocybe* Constituents I.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vypracovala: Tereza Koblířová

Vedoucí diplomové práce: Prof. RNDr. Luděk Jahodář, CSc.

Konzultant: PharmDr. Viktor Voříšek

Hradec Králové, 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

1. 5. 2016

Podpis: _____

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu diplomové práce panu Prof. RNDr. Lud'ku Jahodářovi, CSc. a konzultantovi panu PharmDr. Viktoru Voříškovi za odborné vedení, rady a připomínky při zpracování mé diplomové práce. Panu Mgr. Janu Wiplerovi děkuji za pomoc při sběru a určování hub. Dále chci poděkovat všem, kteří mi v mé práci pomáhali a dávali cenné rady.

Práce byla vypracována za grantové podpory SVV 260 292.

OBSAH

1	ÚVOD A CÍL PRÁCE	6
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED	7
2.1	Charakteristika hub	7
2.1.1	HOUBY OBECNĚ.....	7
2.1.2	STAVBA TĚLA HUB.....	8
2.1.3	ROZMNOŽOVÁNÍ HUB.....	9
2.1.4	SCHÉMA.....	10
2.1.5	ROD: <i>Psilocybe</i> (Fr.) P. Kumm. – lysohlávka	10
2.1.6	DRUHY RODU <i>PSILOCYBE</i> A JEJICH VÝSKYT	11
2.1.7	PŘEHLED DALŠÍCH DRUHŮ RODU <i>PSILOCYBE</i>	14
2.2	Obsahové látky.....	16
2.3	Nejvýznamnější alkaloidy	17
2.4	Biologické účinky.....	19
2.4.1	VZTAH DÁVKY A ÚČINKU	19
2.4.2	TOXIKOKINETIKA	20
2.4.3	KLINICKÁ ODPOVĚĎ	22
2.5	Průkaz a léčba	24
2.5.1	KLINICKÉ STANOVENÍ OTRAVY <i>PSILOCYBINOVÝMI</i> HOUBAMI	24
2.5.2	DIAGNOSTICKÉ TESTOVÁNÍ.....	24
2.5.3	LÉČBA	25
2.6	Přehled analýz.....	25
2.7	Kapalinová chromatografie.....	29
2.8	Hmotnostní spektrometrie	29
2.8.1	IONIZACE ELEKTROSPREJEM	31
2.8.2	LINEÁRNÍ IONTOVÁ PAST (LIT)	31
2.8.3	ORBITRAP	32
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	34
3.1	Použité chemikálie a přístrojové vybavení.....	34
3.1.1	CHEMIKÁLIE.....	34
3.1.2	PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	34
3.2	Analyzovaný materiál.....	35
3.2.1	SBÍRANÉ DRUHY	35

3.2.2	POPIS LOKALIT	37
3.2.3	PŘÍPRAVA K ANALÝZE.....	39
3.2.4	ANALÝZA NA HMOTNOSTNÍM SPEKTROMETRU A PODMÍNKY MĚŘENÍ.....	40
4	VÝSLEDKY	42
4.1	Obsah PS a PSB ve vzorkách dle lokalit	42
4.2	Obsah PS a PSB ve vzorkách dle druhu	43
4.3	Graf obsahu PS a PSB ve vzorkách dle druhu.....	44
5	DISKUZE	45
6	ZÁVĚR	48
7	ABSTRAKT	49
8	ABSTRACT.....	50
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	51
10	SEZNAM TABULEK	53
11	SEZNAM OBRÁZKŮ	54
12	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	55

1 ÚVOD A CÍL PRÁCE

První zmínky o setkání člověka a psychoaktivních hub nás zavedou do dob Aztéků a oblasti Mexika. Právě v Mexiku roste druh lysohlávky *Psilocybe cubensis*, podle dosavadních výzkumů je to jeden z druhů, který obsahuje největší množství psychoaktivních alkaloidů. Aztéctí šamani tyto houby nazývali Teonanacatl (ve volném překladu „maso bohů“) a využívali jejich účinků při svých posvátných rituálech. Stav změněného vědomí po konzumaci psychoaktivních hub jim pomáhal v jejich šamanských dovednostech – věštba, léčba aj. V polovině 20. století Gordon Wasson uvedl magické houby do povědomí širší veřejnosti. Tím odstartoval velký zájem lidí o tuto drogu, černý trh a řadu vědeckých projektů.[1] Alkaloidy obsažené v houbách rodu *Psilocybe* je doposud složité kvantitativně stanovit, bylo publikováno mnoho prací, mnoho metod, z nichž většina dosahovala velmi variabilních výsledků s velkou odchylkou. V naší práci používáme metodu methanolové extrakce ve spojení s LC-MSⁿ (LIT – lineární iontová past), jejíž výhodou je spolehlivé rozlišení psilocinu a psilocybinu.

Cíle této práce:

- stanovení obsahu vody ve vzorcích hub
- zmapování jejich výskytu
- určení druhu houby mykologem (Mgr. Jan Wipler)
- popis a porovnání jednotlivých lokalit sběru
- kvalitativní a kvantitativní posouzení obsahových látek ve třech druzích r. *Psilocybe* nasbíraných v Čechách
- zjištění faktorů, které ovlivňují metodu, pro budoucí optimalizaci

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Charakteristika hub

2.1.1 HOUBY OBECNĚ

Houby jsou nejpočetnější skupina eukaryotických organismů. Jsou to primárně heterotrofní stélkaté organismy. Jejich buňky se odlišují od buněk zelených rostlin především nepřítomností chloroplastů (tudíž nejsou schopné asimilace) a složením buněčné stěny, která je tvořena především chitinem. Naopak stejně jako rostliny nejsou schopné aktivního pohybu. Přítomností lyzozomů a metabolickou produkcí glykogenu se podobají živočichům.[1]

Heterotrofní organismy jsou odkázány na autotrofní organismy, získávají živiny z organických látek. Nejsou tak přísně heterotrofní jako živočichové, neboť jsou schopny v určitém množství asimilovat oxid uhličitý, také amonné soli a dusičnany dokáží využít k zisku dusíku. Živiny získávají několika způsoby, dle toho se houby dělí na saprotrofní a symbiotické.[2, 3]

Většina hub jsou saprotrofní (hniložijné) organismy, což znamená, že se živí odumřelým dřevem a zbytky rostlin. Jako destruenti dostávají do koloběhu živin odumřelou hmotu, mění za pomoci svých enzymů lignin a celulózu na látky využitelné houbou i jinými organismy.[2, 4]

Symbiotické houby mají vztah s živým organismem, který je minimálně pro jednoho prospěšný a pro druhého neškodný, nebo i oboustranně prospěšný. Nejčastějším případem symbiózy je mykorrhiza, kdy houba vyrůstá exogenně či endogenně na postranních kořincích cévnatých rostlin. Houba umožňuje rostlině lepší příjem vody, minerálů, dusíku, biologicky aktivních a dalších látek. Rostlina poskytuje houbě cukry jako zdroj energie. Příkladem soužití s nižšími rostlinami je lichenismus (houba a řasa nebo sinice).[2, 4]

Mezi symbiotické houby řadíme i houby parazitické (příživné), které získávají organické látky z živých organismů a v různé míře poškozují hostitelský organismus. Houby jsou často specializované na svého hostitele (příkladem jsou rozvětvené hyfy – haustoria). Řadí se sem také patogenní houby, které způsobují mnohá onemocnění živočichů včetně člověka.[5]

Často dochází k přechodům mezi způsoby výživy. Například parazité, kteří nadále žijí i na mrtvém organismu, se tím stávají saprofyty.[2]

Houby se tradičně dělí do dvou skupin. Vřeckovýtrusné houby (Ascomycetes), které tvoří výtrusy endogenně uvnitř válcovitých útvarů – vřecek. Vřeckovýtrusné houby tvoří 70% všech hub. Stopkovýtrusné houby (Basidiomycetes) tvoří výtrusy exogenně na speciálních buňkách nazývaných bazidia. Obě skupiny se však z evolučního hlediska řadí do stejné vývojové větve – Dikarya. Další dělení je na mikromycety, tzn. houby, které můžeme okem pozorovat jako povlaky či skvrny, ale rozlišíme je až pomocí mikroskopu. Mikromycety tvoří většinu hub u vřeckovýtrusných hub a část jich najdeme i u stopkovýtrusných hub. Diplomová práce je orientována na rod patřící mezi makromycety, tzn. houby, které jsou viditelné a mají rozpoznatelné plodnice pouhým okem.[2, 3, 6]

2.1.2 STAVBA TĚLA HUB

Následující popis se týká většiny makromycetických hub, tedy i většiny stopkovýtrusných hub. Za vhodných podmínek se tvoří plodnice, tento proces se nazývá fruktifikace. Plodnice nese rozmnožovací orgán houby, z makroskopického hlediska se dělí na klobouk, třeně a podhoubí ukryté v substrátu nebo v hostiteli. Klobouk má na spodní straně rouško (hymenium), což je struktura, která nese hymenofory ve formě lupenů, rourek nebo ostnů. Na hymenoforech se tvoří výtrusy. Mladé plodnice zahaluje obal (velum), ze kterého u dospělé houby zůstává pochva na spodu třeně, bradavice na povrchu klobouku a prsten v horní části třeně.[2, 3, 7]

Z mikroskopického hlediska se tělo (vegetativní stélka) u převážné většiny zástupců makromycetických hub nazývá myceliální. Myceliální stélka se skládá z vláknitých hyf uspořádaných do houbového nepravého pletiva, které se nazývá plektenchym. Hyfy jsou v pletivu různě podélně propleteny. Hyfy rostou apikálním růstem, v jejich vrcholu probíhají intenzivní metabolické děje. Hyfy jsou u odvozenějších typů hub přehrádkované a uprostřed každé je malý otvor (pór), který je průchodný pro určité organely.[6]

Většina zástupců má vícevrstevnou buněčnou stěnu, dominantní složkou buněčné stěny většiny hub je chitin, chitosan, beta-polyglukany a mannan.

70 – 95 % hmoty čerstvé houby tvoří voda. Hlavními zásobními látkami jsou glykogen, cukry ve formě alkoholů (mannitol, arabitol) či disacharidu trehalózy. Dále bílkoviny a tuky.[3]

2.1.3 ROZMNOŽOVÁNÍ HUB

Houby se šíří pomocí svých pohlavních výtrusů (askospor a bazidiospor) či nepohlavních výtrusů (konidií), které aktivně nebo pasivně uvolňují plodnice či samotné podhoubí. Výtrusy se šíří do okolí vzduchem, vodou či pomocí živočichů. Dalším způsobem nepohlavního rozmnožování je přenos úlomků hyf a částí podhoubí do okolí. Za vhodných podmínek (optimální teploty, vlhkosti, přítomnosti živin apod.) výtrusy začínají klíčit v klíční hyfu. Klíční hyfy rostou a větví se za vzniku podhoubí (mycelia), které tvoří tělo houby (stélku).

U vřekovýtrusné houby jsou jednotlivé úseky hyf jednojaderné, jádra mají jednu sadu chromozomů (jsou haploidní). Těsně před vytvářením plodnic proběhne pohlavní proces a vznikají askogenní hyfy, které v konečné fázi vývoje mají dvoujaderné (dikaryotické) buňky a končí tzv. vřeckem. Vřecko (askus) je kyjovitý útvar na konci hyf. Ve vřecku se tvoří výtrusy (askospor) procesem zahrnujícím karyogamii, meiózu, mitózu a obalení buněčnou stěnou.[6]

Stopkovýtrusné houby mají kolem prostředního póru zesílenou membránu (tzv. dolipor), kterou lze otvor zúžit. Většinu života houby mají buňky mycelia dvě jádra. Dvoujaderné buňky vznikají splynutím dvou primárních geneticky kompatibilních (každé jiného pohlaví) mycelií. Za příhodných podmínek dojde ke splynutí jader a meióze v buňkách mycelií a vznikají tím bazidie, dalším redukčním dělením se vytváří bazidiospory neboli pohlavní výtrusy.[3, 6]

Stopkovýtrusné houby se mohou rozmnožovat i pučením čili tvorbou sekundárních spor (konidií).[6]

2.1.4 SCHÉMA

Moderní systém hub odráží evoluci (vývoj) hub, tzn. je fylogenetický.

Tabulka 1: zařazení rodu *Psilocybe* do systému hub

říše: Fungi
vývojová větev: Dikarya
oddělení: Basidiomycota
pododdělení: Agaricomycotina
trída: Agaricomycetes
řád: Agaricales
čeleď: Strophariaceae
rod: <i>Psilocybe</i>

[3]

2.1.5 ROD: *Psilocybe* (Fr.) P. Kumm. – lysohlávka

Zástupci jsou rozšířeni celosvětově. Jsou to především druhy rostoucí na dřevěných zbytcích a spadlých shnilých kmenech, hlavně v listnatých a smíšených lesích, méně často v jehličnatých. Často rostou podél cest či silnic, v roklicích u potoků, v podrostu koprův nebo ostružiníků, také v parcích, zahradách, některé druhy hojně na pastvinách. Všechny druhy rodu *Psilocybe* obsahují psychoaktivní látky.[8]

Druhy tohoto rodu jsou klasifikovány, mimo molekulární biologie, mikroskopickými znaky. Mezi nejdůležitější charakteristické mikroskopické znaky patří tvar pleurocystidia a jeho výskyt na povrchu lupenů, tvar cheilocystidií, velikost a tvar spor.[9]

Houby jsou malé, povětšinou hnědé s kuželovitým tvarem se štíhlou válcovitou tření. Mají přilehlé lupeny, některé druhy mají prstenec. Spory mají nejčastěji liliovou až fialovohnědou barvu, jsou hladké s pórem blízko vrcholu. Mnoho druhů obsahujících psychotropní látky modrá či modrozelená na tření i klobouku, po dotyku či se stáří.[10]

V Evropě se vyskytuje přibližně 15 druhů. V ČR jsou nejfrekventovanější, a na obsah alkaloidů nejbohatší, tři následující druhy. Lysohlávka tajemná, se svými varietami česká a obecná, a lysohlávka kopinatá.[9]

2.1.6 DRUHY RODU *PSILOCYBE* A JEJICH VÝSKYT

2.1.6.1 Vybrané druhy a jejich popis

Psilocybe semilanceata (Fr.) P. Kumm. – lysohlávka kopinatá

Plodnice tohoto druhu se vyskytují ve skupinkách, stářím a otláčením modrají.

- klobouk: 5 – 35 mm široký, 6 – 22 mm vysoký, štíhle kuželovitý až zvonovitý s úzkým hrbolem uprostřed, hladký, hygrofánní, za vlhka lepkavý, olivově hnědý, za sucha okrově žlutý či špinavě žlutý
- lupeny: v mládí světle hnědé, v dospělosti tmavě purpurově šedohnědé, s bílým ostřím
- třeň: rozměry 45 – 120 × 1 – 3,5 mm, pružný válcovitý, dole někdy mírně rozšířený, nahoře bělavý, směrem dolů světle hnědý, chutná a voní po ředkvičkách
- výtrusy: velikost 10,5 – 15 × 6,5 – 8,5 μm, elipsoidní až vejcovité, tlustostěnné se širokým klíčním pórem, červenohnědé až purpurově hnědé

Typickým místem výskytu jsou boreální klimatické oblasti. Tato lysohlávka roste roztroušeně, v trávě, v trsech metlice trsnaté, na loukách, okrajích cest a lesů. Dále na místech, kde se pasou ovce nebo krávy, od nížin až po vysoké horské polohy.[6, 11]



Obrázek 1: *P. semilanceata* (foto: Mgr. Jan Wipler)

***Psilocybe serbica* M. M. Moser et E. Horak – lysohlávka tajemná**

Plodnice rostou ve skupinkách, otlacením a zasycháním zelenomodrají na klobouku i třeni. V ČR se vyskytují nejhojněji dvě variety: *Psilocybe serbica* var. *arcana* (Borovička and Hlaváček) Borovička, Oborník and Noordel – lysohlávka tajemná obecná; *Psilocybe serbica* var. *bohemica* (Šebek ex Šebek) Borovička, Oborník and Noordel – lysohlávka tajemná česká.

- klobouk: 15 – 60 mm široký, je polokulatý až kuželovitý, s růstem zvonovitý až vyklenutý s tupým hrbolem na vrcholu, mírně slizký, hygrofánní, prosvítavě čárkovaný
PA: za vlhka oranžově až čokoládově hnědý klobouk s šedoolivovým odstínem, za sucha špinavě žlutavý
PB: za vlhka karamelově hnědý a za sucha v barvě bílé kávy
- lupeny: v mládí šedobéžové až hnědavé, v dospělosti čokoládově hnědé s purpurovým nádechem
PA: široké či zaobleně připojené

PB: mírně sbíhavé

- třeň: rozměry 40 – 120 × 2,5 mm, hrbolatě zprohýbaný, nahoře bělavý, níže nažloutlý až nahnědlý a někdy pozvolna zúžený, bíle vláknitý
- výtrusy: velikost 10 – 15 × 6 – 7,5 μm, elipsoidního tvaru

Tyto dvě variety *P. serbica* jsou rozšířeny v mírném klimatu po celé Evropě, Americe a Asii, záznamy o výskytu jsou i z jižní polokoule. Rostou roztroušeně, v opadu listnatých a smíšených lesů, s oblibou na vlhčích místech, od nížin až do podhůří.[6, 11]



Obrázek 2: *P. serbica* var *bohemica* (foto: Mgr. Jan Wipler)

2.1.7 PŘEHLED DALŠÍCH DRUHŮ RODU *PSILOCYBE*

2.1.7.1 *P. liniformans* Guzmán & Bas

Období růstu: září – listopad

Charakteristika a místo výskytu: koňský trus na pastvinách ve vnitrozemí, porosty *Salix repens* při pobřeží

Lokalita: Nizozemí, Belgie a Itálie

2.1.7.2 *P. hispanica* Guzmán

Období růstu: letní měsíce

Charakteristika a místo výskytu: oblasti v nadmořské výšce nad 2300 metrů na horských pastvinách (přímo v koňském hnoji)

Lokalita: pohoří Pyreneje

2.1.7.3 *P. cubensis* (Earle) Singer

Období růstu: letní měsíce

Charakteristika a místo výskytu: kompostová půda, pastviny subtropických a tropických oblastí

Lokalita: Amerika

2.1.7.4 *P. fimetaria* (P. D. Orton) Watl.

Období růstu: září – listopad

Charakteristika a místo výskytu: samostatně či v malých skupinkách, koňské či kravské pastviny

Lokalita: celosvětové rozšíření, v Evropě a Severní Americe není běžně tento druh rozšířen

2.1.7.5 *P. puberula* Bas & Noordeloos

Období růstu: září – říjen

Charakteristika a místo výskytu: písčité a suché půdy

Lokalita: Nizozemí, Belgie

2.1.7.6 *P. strictipes* Singer & A. H. Smith

Období růstu: srpen – září

Charakteristika a místo výskytu: v malých skupinkách, podél bažin, velmi vzácně

Lokalita: Evropa a Severní Amerika

2.1.7.7 *P. serbica* Mos. & E. Horak

Mimo var. *arcana* (Borovička & Hlaváček) Borovička, Oborník & Noordel a var. *bohemica* (Šebek ex Šebek) Borovička, Oborník & Noordel sbíraných pro analýzu v rámci této diplomové práce má druh *P. serbica* několik dalších variet uvedených níže.

P. serbica* var. *serbica

Období růstu: září – říjen

Charakteristika a místo výskytu: tlející dřevo, především v podhorských oblastech

Lokalita: méně známá houba, naleziště v Srbsku, Chorvatsku, ČR A Rakousku

***P. serbica* var. *moravica* (Borovička) Borovička, Oborník & Noordel**

Období růstu: září – listopad

Charakteristika a místo výskytu: ve velkých skupinách, často v půdách bohatých na dusík

Lokalita: Morava, Rakousko, Itálie, Slovensko

***P. serbica* var. *sternberkiana* (Borovička) Borovička, Oborník & Noordel**

Podobná var. *moravica*. Známa pouze z ČR a Německa.

2.1.7.8 *P. stunzii* Guzmán & J. Ott

Období růstu: léto

Charakteristika a místo výskytu: na dřevěných hoblinách

Lokalita: západ USA, Kanada

2.1.7.9 *P. cyanescens* Wakef.

Období růstu: květen – listopad

Charakteristika a místo výskytu: ve velkých skupinách

Lokalita: boreální, mírný a subtropický pás v Evropě a Severní Americe

2.1.7.10 *P. azurescens* Stamets & Gartz

Období růstu: srpen – říjen

Charakteristika a místo výskytu: saprotrofickou činností způsobují bílou hnilobu, samostatně či ve velkých skupinách, v dřevěných hoblinách listnatých stromů či na písčinných půdách

Lokalita: západ USA, v Evropě jen v důsledku rekreačního pěstování

2.1.7.11 *Psilocybe gallaeciae* Guzmán & M. L. Castro

Období růstu: říjen – listopad

Charakteristika a místo výskytu: ve skupinách na pastvinách a v zahradách

Lokalita: Španělsko

2.1.7.12 *P. medullosa* (Bres.) Borovička

Období růstu: červenec – listopad

Charakteristika a místo výskytu: na hničícím dřevě, nejčastěji smrkovém

Lokalita: vzácně, v severní a střední Evropě

2.1.7.13 *P. atrobrunnea* (Lasch) Gillet

Období růstu: červen – listopad

Charakteristika a místo výskytu: v malých skupinách, v přítomnosti mechů (*Sphagnum* a *Polytrichum*) či v rašeliništích

Lokalita: vzácně téměř v celé Evropě, speciálně v boreálním podnebí[11]

2.2 Obsahové látky

Hlavní aktivní obsahovou látkou v halucinogenních houbách je fosfátový ester psilocybin, po požití je defosforylován na farmakologicky aktivní látku psilocin. Psilocin je v houbách také přítomný, avšak v řádově nižším množství. Aktivní látky v psilocybinových houbách se řadí do skupiny indolových sloučenin, které mají v pozici 4-hydroxy nebo fosfátovou skupinu a jsou odvozené od tryptaminu.

Obě látky jsou strukturně podobné bufoteninu, harminu, LSD a neurotransmiteru serotoninu (5-hydroxytryptamin). Dále byly v některých druzích hub nalezeny další tryptaminy, méně aktivní než předchozí, baeocystin a norbaeocystin.[12]

Obsah aktivních látek v halucinogenních houbách závisí na druhu, období, životním prostředí, půdních podmínkách (hlavně na obsahu fosforu a dusíku), skladování a extrakční metodě použité před analýzou. Psilocybin se vyskytuje především v plodnici, ve vegetativní části se nevyskytuje.[13]

2.3 Nejvýznamnější alkaloidy

2.3.1.1 Psilocybin

Psilocybin je fosfátový ester psilocinu, který v psilocin přechází defosforylací v organismu.

Psilocybin je rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v methanolu, ethanolu, zředěné kyselině sírové a hydroxidu sodném. Díky své velké ionizaci není rozpustný ve většině organických rozpouštědel.[10, 12]

Chemický název: 4-fosforyloxy-N,N-dimethyltryptamin

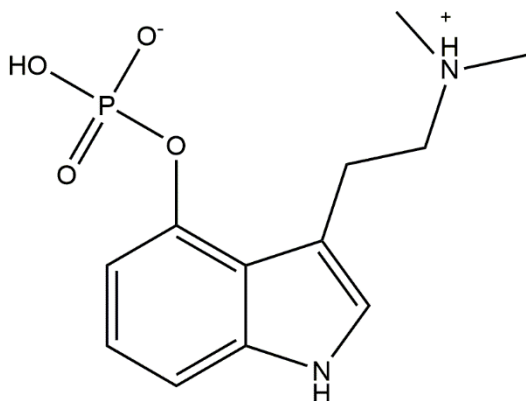
Systematický název: [3-(2-dimethylaminoethyl)-1H-indol-4-yl]dihydrogen phosphate

Souhrnný vzorec: C₁₂H₁₇N₂O₄P

Mr: 284,25 g/mol

Teplota tání: 224 °C

Log P (oktanol-voda): 1,000



Obrázek 3: psilocybin

2.3.1.2 Psilocin

Psilocin je izomer bufoteninu, lišící se pouze pozicí hydroxyskupiny. Je relativně nestálý v roztocích. V alkalických podmínkách v přítomnosti kyslíku okamžitě vytváří modré

a černé produkty degradace. Je rozpustný v methanolu, ethanolu, zředěné kyselině sírové, hydroxidu sodném. Není rozpustný ve vodě a na rozdíl od psilocybinu se rozpouští v organických rozpouštědlech (butylchlorid a další halogenované uhlovodíky).[10, 12]

Chemický název: 4-hydroxy-N,N-dimethyltryptamin

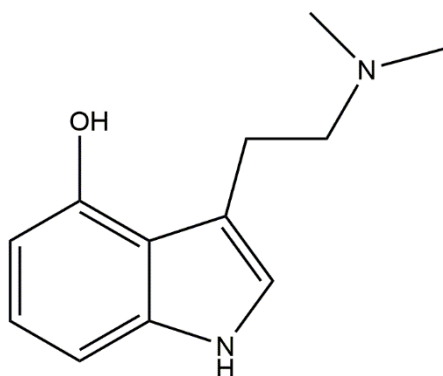
Systematický název: 3-(2-dimethylaminoethyl)-1H-indol-4-ol

Souhrnný vzorec: $C_{12}H_{16}N_2O$

Mr: 204,27 g/mol

Teplota tání: 174,5 °C

Log P (oktanol-voda): 1,460



Obrázek 4: psilocin

2.3.1.3 Baeocystin

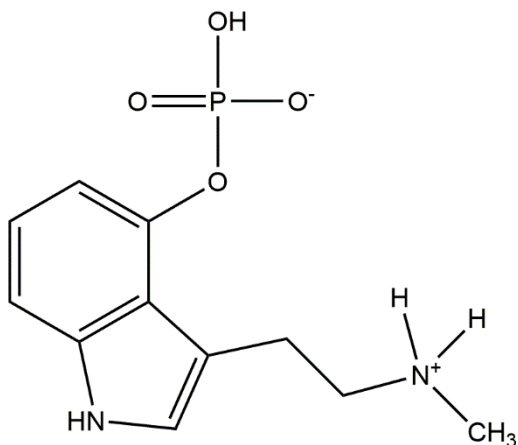
Baeocystin je monometylovaný analog psilocybinu.

Systematický název: [3-[2-(methylamino)ethyl]-1H-indol-4-yl]dihydrogen phosphate

Souhrnný vzorec: $C_{11}H_{15}N_2O_4P$

Mr: 270,22 g/mol

Log P (oktanol-voda): -0,26



Obrázek 5: baeocystin

2.3.1.4 Norbaeocystin

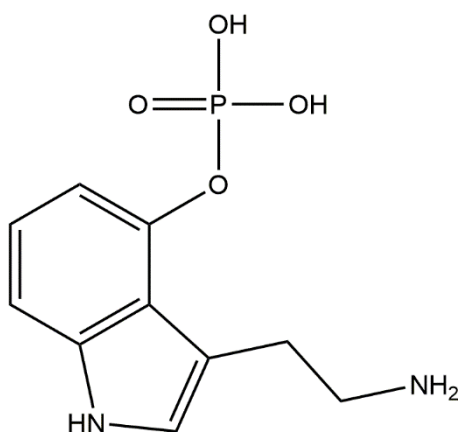
Norbaeocystin je demetylovaný analog baeocystinu.

Systematický název: {[2-(2-aminoethyl)-1H-indol-4-yl]oxy}phosphonic acid

Souhrnný vzorec: C₁₀H₁₃N₂O₄P

Mr: 256,2 g/mol

Log P (oktanol–voda): -0,79



Obrázek 6: norbaeocystin

2.4 Biologické účinky

Indolové alkaloidy (deriváty tryptaminu) neboli halucinogenní tryptaminy, psilocin a psilocybin, působí v organismu jako psychotomimetika. Účinky jsou vysoce nepředvídatelné a variabilní. Stejně jako u ostatních psychedelik (halucinogenů) charakter psychologické odpovědi závisí na dávce, stavu, náladě, osobnosti a předchozích zkušenostech. Velký vliv má očekávání určitého zážitku, očekávání příjemného zážitku většinou vede k příjemné odpovědi. Subjektivní účinky se liší u jednotlivých osob a i u různých intoxikací jedné osoby. V 25 % byly zaznamenány nepříznivé reakce (psychóza, panické záchvaty, agrese, zmatenost).[10, 14, 15]

2.4.1 VZTAH DÁVKY A ÚČINKU

Při požití psilocybinu jsou klinické odpovědi velmi variabilní při požití stejné dávky jiným subjektem. U jednoho pacienta byly zaznamenány halucinace a podrážděnost po požití 10 houbiček, zatímco u jiného po požití 200 houbiček došlo jen k bolesti břicha.[16]

Klasická dávka při rekreačním užití, která vyvolá žádoucí účinky, je 5 – 15 mg. Prahová dávka závisí na jednotlivci, množství 3 – 5 mg (přibližně 0,04 mg PSB/kg) bylo detekovatelné sympatomimetickými příznaky, ale bez halucinací. V dávce 12 – 20 mg p. o. psilocybin již obvykle mění stav vědomí. Ve studiích dobrovolníci popisují po požití dávky 0,25 mg PSB/kg pocity euforie, velkoleposti, vizuální iluze, obtížné myšlení, pocity depersonalizace a derealizace.[14, 17, 18]

Vyšší dávky se blíží až k 50 mg (3,5 – 5 g suché váhy nebo 35 – 50 g čerstvých hub), což závisí na druhu houby a obsahu psilocybinu. Obvyklá dávka rekreačních uživatelů je 20 – 30 čerstvých hub, výjimečně 50 a ojediněle 100.[10]

Akutní toxicita psilocybinu je poměrně nízká, střední letální dávka (orální LD 50) u krysu je 280 mg/kg, tedy asi poloviční než u kofeinu. Pro člověka je v rámci gramů na kg, udává se 1,5 - 1,7 kg sušených hub, což znamená 15 kg čerstvých.

Při intravenózním podání králíkům je LD 50 asi 12,5 mg/kg.[10, 14]

Nebyl objeven výskyt tolerance po opakovaných dávkách.[14]

Houby jsou konzumovány perorálně s různou přípravou (mléčný koktejl, polévka, dušené houby, čaj, sušené houby v medu, směs s čokoládou, omeleta) nebo přímo syrové plodnice. Při důkladném rozmělnění v ústech je nástup účinku rychlejší a celkově je účinek silnější než při rychlém spolknutí. Nástup klinického efektu je při požití vodných extraktů z hub (polévka, čaj) výrazně rychlejší, projevy se objevují již po 10 minutách. Pokud je droga zkonsumována ve formě roztoku, nástup může být výrazně urychlen.

Při intravenózním užití se objevují jiné, závažnější příznaky.[10]

2.4.2 TOXIKOKINETIKA

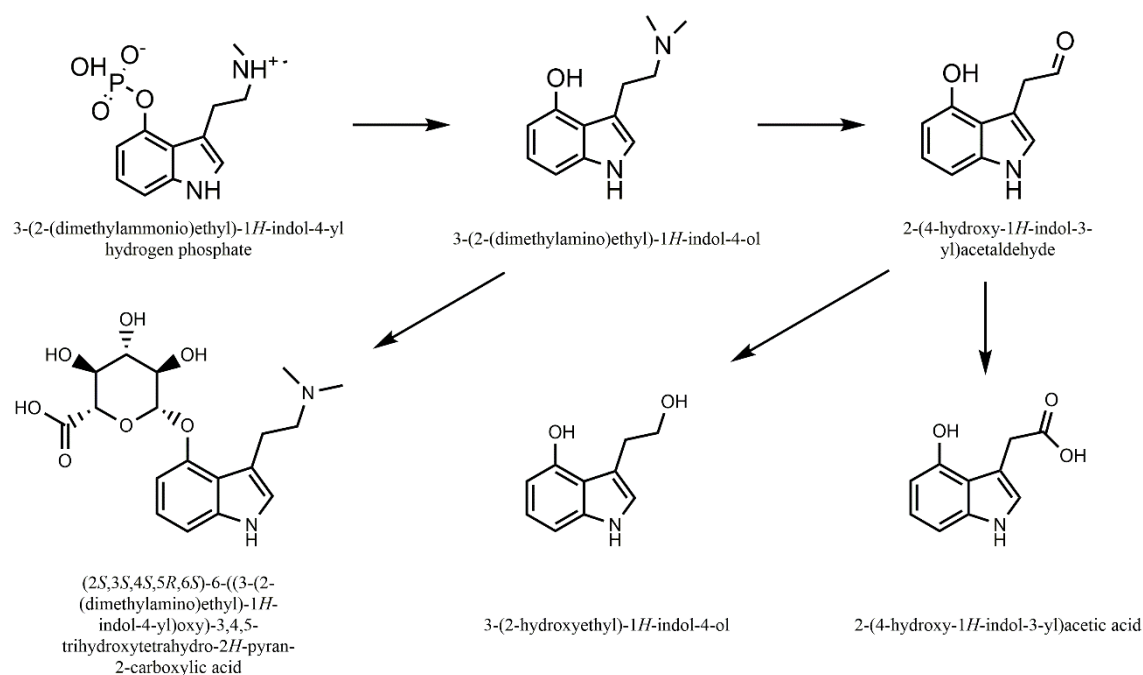
Ve studii, kdy tři dobrovolníci nalačno pozřeli 0,224 mg PSB/kg své váhy (tj. okolo 10 – 20 mg), biologická dostupnost byla $52,7 \pm 20 \%$. [19]

Psilocin je lipofilnější než psilocybin a velmi dobře prostupuje stěnou cév a koncentruje se v mozku, nejvyšší koncentrace byly zaznamenány v mozkové kůře, hipokampu, extrapyramidovém motorickém centru a v retikulární formaci. Po 20 – 40 minutách při p. o. podání je psilocybin detekovatelný v plasmě. Psilocin se objevuje v plasmě po 30 minutách. Před vstupem do systémového oběhu je nejspíše majoritní část

psilocybinu převedena na psilocin, psilocybin může hrát roli jakéhosi proléčiva. Aktivní látkou působící biologickou odpověď je právě psilocin.[10, 14]

Psilocybin podléhá v organismu rychlé defosforylaci na psilocin a následné konjugaci s glukuronidem, kdy je konjugát renální exkrecí eliminován. Na glukuronidaci se podílí UGT1A10 v tenkém střevě a UGT1A9 v játrech. Alternativní metabolickou cestou je inaktivace psilocinu monoaminoxidázou na 4–hydroxy–tryptofol a 4–hydroxyindol octovou kyselinu. Shrnutí v Tabulka 7. Několik málo procent psilocinu bylo během 24 hodin vyloučeno močí nezměněno. Vrchol plasmatické koncentrace byl dosažen v průměru po 105 ± 37 minutách po ingesci. Biologický poločas psilocinu po orálním užití dosahoval přibližně $2,5 \pm 1$ hodin.[20, 21]

Při podání i. v. je biologický poločas psilocybinu dvakrát kratší, doba působení se zkracuje na 15 – 30 minut.[14]



Obrázek 7: schéma metabolismu psilocybinu

2.4.3 KLINICKÁ ODPOVĚĎ

Strukturně se psilocin a psilocybin velmi podobají tryptaminům. Oba mají velkou afinitu k serotoninovým receptorům, psilocin váže primárně 5-HT_{2A} receptor (K_i = 6nM) a méně i 5-HT_{1A} receptory (K_i = 190nM).[22]

Ingesce halucinogenních hub obsahujících psilocybin má podobné klinické příznaky jako LSD a mezkalin. Dávka psilocybinu však musí být mnohokrát vyšší, aby vyvolala podobné příznaky.[23]

Na rozdíl od jiného indolaminového derivátu (LSD), psilocin nestimuluje přímo D₂ dopaminové receptory.

V porovnání s LSD, psilocin způsobuje méně intenzivní depersonalizaci, mírnější somatické symptomy, ale mnohem intenzivnější prostorové iluze.

Požadované příznaky jsou záchvaty smíchu, euforie a změněné vnímání.[24]

2.4.3.1 Účinky neurovegetativní (sympatomimetické)

Po určité době latence (30 – 60 minut) nastupují somatické symptomy způsobené sympatomimetickou aktivitou narušeného neurovegetativního systému, nazývané také jako excitační syndrom, a poruchy percepce. Patří sem bolest hlavy, slabost, zčervenání obličeje, pocení, horečka, nauzea až zvracení, rozmazané vidění, mydriáza, třes, citlivost na světlo, úzkost a zmatenost. Celkové zvýšení reflexů a zvýšení metabolického obratu. Tachykardie a hypertenze či hypotenze jsou obvykle mírné. Většina těchto příznaků se objevuje brzy po požití a postupně vymizí.[10]

2.4.3.2 Neuropsychické účinky

Po dalším čase se objeví neuropsychické účinky, které jsou realizovány stimulací serotoninových receptorů. Psilocin stimuluje serotoninové receptory v oblasti nuclei raphe, což jsou jádra retikulární formace v mozku. Stimulace těchto jader je spojována s halucinogenním účinkem. Inhibice neuronů v nucleus raphe vede nejspíše k aktivaci noradrenergických neuronů z okolí locus coeruleus, což je centrum pro integraci smyslových vjemů. To může vysvětlit některé formy změn vnímání jako je například synestezie. Negativním efektem stimulace těchto receptorů je pokles smyslové filtrace v thalamu a tím pádem je více informací pouštěno do vyšších mozkových center, odpovědných za představy a emoce.[10, 14]

Běžně se vyskytující neuropsychické symptomy jsou zrakové změny, zkreslení tvarů a barev – popis světla, jasných teplých barev, hodně zelené a červené, synestezie – vnímání jednoho smyslu druhým („vidí zvuky, slyší barvy“), zrakové obrazce při zavřených očích (kaleidoskopický fenomén), iluze geometrických tvarů až spatřování duchů. Zvýšené vnímání zvuku, pocit zvýšení hlasu, odlupování pokožky, lehkosti (ztráty váhy), chladu, mírný třes, nutkavé zívání a pocity zpomalení času. Časová deprese – zvyšuje se objem dat v rámci časové jednotky a mění se chronologie událostí v čase. Popisovány jsou pocity zvětšování prostoru v okolí. Po vyšších dávkách psilocybinu má uživatel sklony k introspekci, mohou se dostavit pocity depersonalizace (duchovní a mystické prožitky, pocity spojení s celým lidstvem či s celým vesmírem), ve spojení s halucinacemi uživatel necítí nějakou celé tělo nebo nějakou jeho část. V menších dávkách nenastávají halucinace, ale jen smyslové zkreslení. Častým příznakem je parestézie, ataxie, svalová slabost, kompulzivní pohyby a otupělost.[10, 14, 25-29]

Řidčeji se ale může dostavit agresivní chování i velmi nepříjemné až děsivé pocity silné dezorientace, neschopnost rozlišit mezi halucinací a realitou, panika a paranoia, delirium označované slangově jako „špatný trip“ („bad trip“).

Po další době je charakteristická malátnost, apatie, velké vyčerpání, někdy i hluboká deprese spojovaná se špatnou náladou a úzkostí před požitím drogy.[14]

Většina symptomů do 4 – 6 hodin sama vymizí, některé spánkové potíže mohou trvat kolem 24 hodin. Vzácně perzistuje dysforie déle než 12 hodin.[30]

2.4.3.3 Trvalé a fatální narušení zdraví

Nepříznivé psychiatrické symptomy běžně nesetrvávají, avšak jsou známy případy, kdy se během 4 měsíců objevovaly akutní panické záchvaty a flashbacks. Úmrtí po intoxikaci je spíše spojováno s kombinací s jinými drogami nebo traumatem v důsledku pozměněného vnímání a psychického stavu. Traumatické komplikace zahrnují především zranění v důsledku halucinací, pády ze střeš, ztráty vědomí.[10, 16, 31, 32]

Při zkoumání působení psilocybinu na zdravých jedincích a na jedincích trpících schizofrenií byl zjištěn hlavní rozdíl ve stupni depersonalizace. Schizofrenik prožívá neobvyklé zážitky sám za sebe, zatímco intoxikovaný člověk má tzv. ego–alien

symptom, prožívá zážitky jako jiná osoba. Po požití má intoxikovaný pocitu podivnosti, to se u schizofreniků nevyskytuje.

U intravenózního užití nastávají příznaky odlišné než při orálním užití – nauzea, břišní bolesti, průjmy, zvracení, třes, bolesti hlavy, kloubů a svalů, objevují se puchýře na kůži. Postižený má abnormální jaterní a ledvinové testy, leukocytózu s posunem doleva, methemoglobinemii a vysoké horečky.[10]

2.5 Průkaz a léčba

2.5.1 KLINICKÉ STANOVENÍ OTRAVY PSILOCYBINOVÝMI HOUBAMI

Klinické příznaky je někdy složité určit, na ulicích jsou nabízeny často jiné houby namočené v LSD nebo fencyklidinovém roztoku. Pak se objevují k typickým halucinacím další symptomy. Typickými příznaky pro fencyklidin je analgezie s pocením a rigidita. Pro LSD je typická panická reakce, pro amfetaminy loupání kůže, skřípání zuby, hypománie. Anticholinergní účinky vyvolané přirozenými parasymptolytiky (muskarin), při požití muskarinových hub, jsou rozmazané vidění, zadržování moči, znehybnění ilea, delirium a další.[10]

2.5.2 DIAGNOSTICKÉ TESTOVÁNÍ

Metody pro detekci psilocybinu a méně stabilního metabolitu psilocinu zahrnují infračervenou spektroskopii, UV spektrofotometrii, TLC, kapilární elektroforézu, GC–MS, LC–MS a HPLC. Psilocin jako aktivní metabolit je v moči možné naleznout ještě 24 hodin po požití střední dávky drogy. Ve vzorku moči se stanovuje psilocin enzymatickou hydrolýzou glukuronidových konjugátů. Následně je derivován s N–methyl–N–trimethylsilyl–trifluoroacetamidem, což snižuje limit kvantifikace na 10 ng/ml, při měření metodou GC–MS po extrakci na pevné fázi. Test na psilocin v drogovém screeningu vzorku moči není přítomen, nicméně často je po požití psilocybinových hub pozitivní amfetaminový test. Je nutné dodělat test přímo na psilocin, protože pozitivní amfetaminový test může způsobit kromě amfetaminů také konzumace určitých potravin či endogenní zdroj fenylethylaminu.[21, 33-36]

Při intoxikaci halucinogenními houbami mírně stoupá v séru hladina laktátdehydrogenázy a aspartátaminotransferázy. Jaterní funkce jsou v pořádku.[37]

2.5.3 LÉČBA

Detoxikační postupy jsou omezeny na případy, kdy je užito několik drog v kombinaci během 1 – 2 hodin. V tom případě se podává aktivní uhlí. Při halucinacích a změněném vnímání je pacient umístěn do tmavé komory, kde ho okolí nestimuluje, často pomáhá přítomnost blízké osoby. Při perzistující dysforii jsou podávány benzodiazepiny a při velkých halucinacích antipsychotika (haloperidol).[8]

2.6 Přehled analýz

V jednotlivých tabulkách je uveden výčet vybraných analýz, co byly doposud publikovány, se zaměřením především na druhy sbírané pro účely naší experimentální práce. Tabulky obsahují následující informace o analýze: rok, kdy byla práce publikována; zemi, ze které vzorky pochází; použitý typ extrakce a analýzy; informace o sběru či jiném zisku vzorku; obsahy psilocybinu (PSB) a psilocinu (PS) u jednotlivých druhů a sběrů.

Tabulka 2[38]

Rok	Oblast	Extrakce	Analýza
2005	Japonsko	neuveveno	LC-MS ⁿ
Původ vzorků	Druh houby	Obsah PS	Obsah PSB
sběr	<i>P. cubensis</i>	0,060 % – 0,140 %	0,018 % – 0,380 %

Tabulka 3[39]

Rok	Oblast	Extrakce	Analýza
2003	ČR	methanol	GC-MS
Původ vzorků	Druh houby	Obsah PS	Obsah PSB
sběr	<i>P. semilanceata</i>	0,158 %	0,311 %
	<i>P. bohemica</i>	0,742 %	0,464 %
	<i>P. arcana</i>	0,340 %	0,457 %

Tabulka 4[40]

Rok	Oblast	Extrakce	Analýza
2003	Japonsko	methanol	HPLC-UV
Původ vzorků	Druh houby	Obsah PS	Obsah PSB
černý trh	<i>P. cubensis</i>	0,140 % – 0,420 %	0,370 % – 1,300 %
	<i>P. copelandia</i>		

Tabulka 5[41]

Rok	Oblast	Extrakce	Analýza
2000	Německo	methanol v ultrazvukové lázni	HPLC–UV
Původ vzorků	Druh houby	Obsah PS	Obsah PSB
internetový černý trh	<i>P. cubensis</i>	0,094 %	0,353 %
	<i>P. semilanceata</i>	0,255 %	0,394 %

Tabulka 6[42]

Rok	Oblast	Extrakce	Analýza
1999	Salzburg	chloroform v ultrazvukové lázni	GC–MS
Původ vzorků	Druh houby	Obsah PS	Obsah PSB
sběr	<i>P. subcubensis</i> Guzmán	0,025 %	0,830 %

Tabulka 7[43]

Rok	Oblast	Extrakce	Analýza
1993	ČR	methanol	HPLC
Původ vzorků	Druh houby	Obsah PS	Obsah PSB
agar	<i>P. subcubensis</i> (Earle) Singer	0,180 %	1,070 %
sběr, Sázava	<i>P. bohémica</i> Šebek	0,020 %	0,850 %
kultivace	<i>P. cubensis</i> (Earle) Singer	0,110 %	0,630 %
kultivace	<i>P. semilanceata</i> (Fr.)	nedetekováno	0,980 %

Tabulka 8[44]

Rok	Oblast	Extrakce	Analýza
1992	ČSR	methanol s KNO ₃	HPLC–UV
Původ vzorků	Druh houby	Obsah PS	Obsah PSB
kultivace ze spor	<i>P. bohemica</i> Šebek		
Frenštát, 1981		0,020 %	0,460 %
Sázava, 1982		0,070 %	1,140 %
Sázava, 1983		0,480 %	0,640 %
sběr	<i>P. semilanceata</i>		
Praha, 1980		0,120 %	1,050 %
Krásná Lípa, 1982		0,090 %	0,910 %
Spišská Nová Ves, 1986		0,090 %	0,760 %

Tabulka 9[45]

Rok	Oblast	Extrakce	Analýza
1990	Čechy	methanol	HPLC–UV/ED
Původ vzorků	Druh houby	Obsah PS	Obsah PSB
sběr	<i>P. bohemica</i> Šebek	0,010 %	0,930 %

Tabulka 10[46]

Rok	Oblast	Extrakce	Analýza
1987	Švýcarsko	methanol	HPLC–UV
Původ vzorků	Druh houby	Obsah PS	Obsah PSB
sběr či ilegální obchod	<i>P. semilanceata</i> (Fr.) Quéł	0,230 %	1,760 %

Tabulka 11[47]

Rok	Oblast	Extrakce	Analýza
1985	Čechy	neuvedeno	HPLC–UV
Původ vzorků	Druh houby	Obsah PS	Obsah PSB
sběr	<i>P. bohemica</i> Šebek	0,058 ± 3,02 %	0,58 ± 10,10 %

Tabulka 12[48]

Rok	Oblast	Extrakce	Analýza
1983	Norsko	methanol s NH ₄ NO ₃	HPLC–UV/ED/FD
Původ vzorků	Druh houby	Obsah PS	Obsah PSB
sběr	<i>P. semilanceata</i>	0,002 %	1,510 %

Tabulka 13[49]

Rok	Oblast	Extrakce	Analýza
1981	Peru, amazonské povodí	neuvedeno	HPLC
Původ vzorků	Druh houby	Obsah PS	Obsah PSB
kultivace ze spor	<i>P. cubensis</i> (Earle) Singer	0,157 %	0,631 %

Tabulka 14[50]

Rok	Oblast	Extrakce	Analýza
1981	Norsko	methanol s NH ₄ NO ₃	HPLC s fotometrickou detekcí
Původ vzorků	Druh houby	Obsah PS	Obsah PSB
sběr	<i>P. semilanceata</i> (Fr. Ex Secr.)	nedetekováno	0,730 %

Tabulka 15[51]

Rok	Oblast	Extrakce	Analýza
1980	Pacific Northwest	neuvedeno	HPLC
Původ vzorků	Druh houby	Obsah PS	Obsah PSB
sběr	<i>P. semilanceata</i> (Fries) Kummer	0,000 %	0,614 %

2.7 Kapalinová chromatografie

Chromatografické techniky jsou separační techniky, které rozdělují směsi látek pomocí fyzikálně-chemických mechanismů. V kapalinové chromatografii se látky dělí mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze (mobilní a stacionární) v závislosti na jejich afinitě k jednotlivým fázím. Stacionární fáze může být kapalina zakotvená na nosiči (v případě rozdělovací chromatografie) nebo pevná látka (u adsorpční, gelové, afinitní či iontoměničové chromatografie). Po nástřiku je vzorek unášen proudem mobilní fáze optimální rychlostí přes kolonu k detektoru. Analyty se zadržují různě dlouhou dobu v koloně na stacionární fázi. Čas, po který analyt setrvává v systému, je nazýván retenční čas a udává kvalitativní informaci o dané látce. Na výstupu z kolony je umístěn detektor. V instrumentaci použité při této diplomové práci je kapalinová chromatografie spojena s hmotnostním spektrometrem a eluované analyty jsou po výstupu z kolony vedeny do kapiláry s vloženým napětím, jež se účastní ionizačního procesu.

V kapalinové chromatografii je rozlišována separace na normálních (stacionární fáze je polárnější než mobilní) a reverzních (stacionární fáze je méně polární než mobilní) fázích. V naší analýze byla využita reverzní fáze. Systémy reverzních fází využívají nejčastěji stacionární fáze tvořené silikagelem.

Složení MF může být konstantní (izokratická eluce) nebo se během separace měnit a tím tvořit gradient (gradientová eluce).[52, 53]

2.8 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je stále více a více využívaná analytická metoda. Tato destruktivní metoda slouží pro kvalitativní, kvantitativní i isotopovou analýzu zkoumaných látek. Principem hmotnostní spektrometrie je převedení molekul vzorku na ionty a jejich rozdělení podle poměru hmotnosti a náboje (m/z). Výsledkem této analýzy je hmotnostní spektrum.

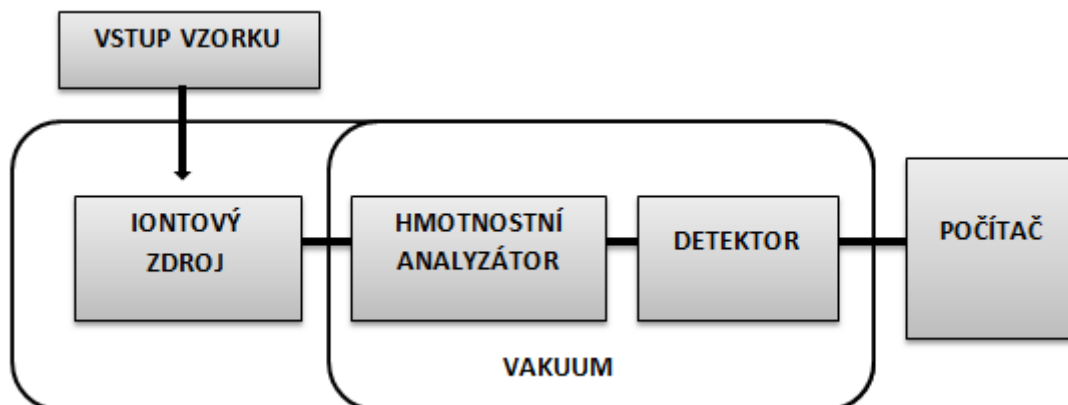
Po nástřiku vzorku dochází k ionizaci v iontovém zdroji. Podle charakteru látky (skupenství, fyzikálně-chemických vlastností aj.) můžeme využít různé způsoby ionizací. Ionizační techniky dělíme na tvrdé a měkké. Typickým zástupcem tvrdých ionizačních technik, kdy získává molekula velký přebytek vnitřní energie a dochází k velké fragmentaci, je ionizace elektrony s vysokou energií (EI). Tvrdé ionizační

techniky zejména ve spojení se separačními technikami v plynné fázi typu GC, jsou vhodné pro ionizaci látek s nízkou molekulovou hmotností. Mezi měkké ionizační techniky řadíme nejvíce využívanou ionizaci elektrosprejem (ESI), chemickou ionizaci za atmosférického tlaku (APCI) a ionizaci laserem za přítomnosti matrice (MALDI). Měkké ionizační techniky využívají nižší energie a molekula je ionizována na menší množství nabitých částic-fragmentů ve srovnání s elektronovou ionizací. Výsledné hmotnostní spektrum je v zásadě chudší, vykazuje menší kvalitativní výčet iontů. Tento problém řeší iontová a zejména pak lineární iontová past, která byla užita v naší práci.[54-58]

Ionty jsou dále separovány v hmotnostním analyzátoru. Analyzátoři využívají k separaci magnetické nebo elektrické pole, či jejich kombinaci. Ionty jsou rozděleny na základě podílu m/z . Mezi nejběžnější analyzátoři patří měřiče doby průletu iontů (TOF), iontové pasti (IT), kvadrupólové analyzátoři (Q) a jejich kombinace, využívané v tandemových hmotnostních spektrometrech.

Rozdělené ionty dopadají v určitém pořadí na detektor, který zaznamenává elektrický proud vznikající dopadem stanovovaných iontů. Nejčastěji se používají násobičové elektrody nebo Faradayova klec. U některých analyzátorů detektor přítomen není, neboť detekce probíhá přímo v analyzátoru (např. Orbitrap).

Signál z detektoru je pomocí počítače převeden na hmotnostní spektrum. V hmotnostním spektru je na ose X efektivní hmotnost iontů a na ose Y relativní zastoupení ve směsi, udané počtem dopadů jednotlivých iontů na detektor.[58, 59]



Obrázek 8: obecné schéma hmotnostního spektrometru

2.8.1 IONIZACE ELEKTROSPREJEM

Ionizace elektrosprejem je ionizace měkká, ionizovaná molekula získává menší množství energie než u tvrdých technik a fragmentace nastává v minimálním rozsahu. Tato ionizace probíhá za atmosférického tlaku, je šetrná a proto je výhodná pro spojení s kapalinovou chromatografií, kdy je mobilní fáze nesoucí analyt přímo nebulizována a nabíjena prostřednictvím trysky, na níž je přiváděno vysoké napětí. Vlastní mechanismus ionizace lze stručně popsat takto: Vzorek v roztoku je přiveden kovovou kapilárou a vstříkován do iontového zdroje. Na kapiláru je přiváděno vysoké napětí (3 – 6 kV). Mezi kapilárou a vstupní elektrodou analyzátoru vzniká intenzivní elektrostatické pole. V tomto poli vzniká za pomoci zmlžovacího plynu aerosol. Kapičky mají na povrchu velké množství nábojů a odpařováním rozpouštědla je dosaženo tzv. coulombické exploze, kdy se kapičky rozpadnou ještě na menší kapičky s rozdělením původních nábojů. Tento proces se opakuje do doby, než se začnou uvolňovat kvazimolekulární ionty, které jsou transportovány z atmosférické oblasti do vakua a hmotnostního analyzátoru.[55, 60-62]

2.8.2 LINEÁRNÍ IONTOVÁ PAST (LIT)

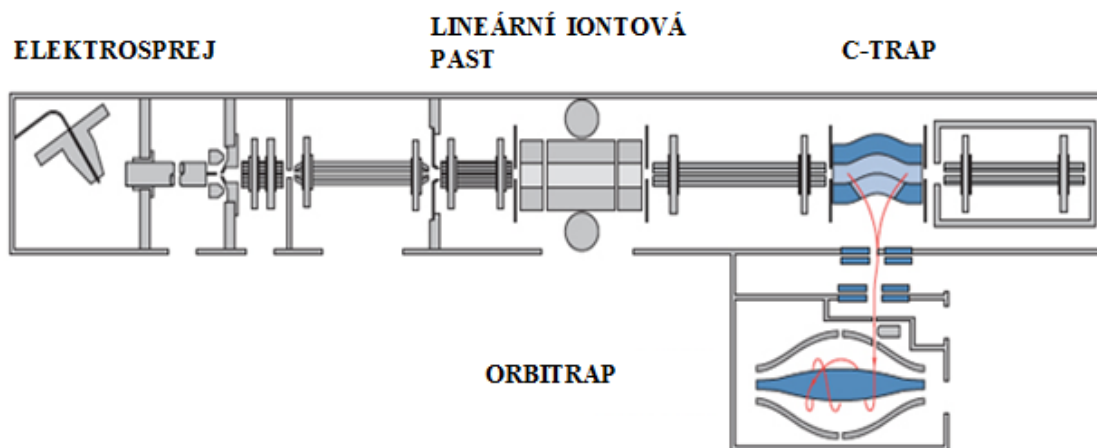
Lineární iontová past je v podstatě specificky konstruovaný kvadrupól, který má schopnost ionty uchovávat podobně jako klasická 3D-past. Principem je oscilace iontů v elektrickém poli mezi opačně nabitými elektrodami. Lineární iontová past z praktického hlediska či využití umožňuje sken mnohastupňové rozvojové fragmentace

dceřiných iontů, čímž je výsledné hmotové spektrum doplňováno v ucelenější fragmentační mapu (angl. spectral tree diagram) blížící se svou kvalitativní hodnotou EI spektru. Tuto práci sice též umožňuje 3D-past, avšak LIT má oproti trojrozměrné klasické pasti výhodu v elipsoidně tvarovaném iontovém svazku, což v konečném důsledku znamená vyšší rozlišovací schopnost, nižší diskriminaci iontů a širší dynamický rozsah v případě kvantitativního stanovení. Významné je také značné zvýšení citlivosti ve srovnání s 3D-pastí. Použitý systém také představuje vstupní vhodnou část pro spojení s Orbitrapem, jehož hlavní předností je bezkonkurenční stanovení přesné hmoty.[63]

2.8.3 ORBITRAP

Orbitrap je hmotnostní analyzátor, který lze výhodně použít zejména jako hmotnostní spektrometr s vysokým rozlišením, v nižších hmotách lepším, než jakým disponuje většina komerčně vyráběných analyzátorů doby letu (TOF). Hybridní systém vznikající spojením Orbitrapu s LIT našeho typu má vysokou citlivost i rychlost a je možné ho použít pro mnohonásobné fragmentace (MS^n). LTQ Orbitrap se skládá ze tří částí, LIT, C-trapu a Orbitrapu (viz Obrázek 9: schéma Orbitrapu). Na pracovišti bude instalován vyšší typ této konfigurace, Q-Exactive Plus, který bude výhodně využit i pro další stanovení psilocinových alkaloidů, viz dále.

Ionty jsou vypuzovány do C-trapu. C-trap akumuluje ionty před vstupem do Orbitrapu. Orbitrap je elektrostatický hmotnostní analyzátor, zde slouží přímo i jako detektor. Ionty jsou přivedeny mezi dvě elektrody (vnitřní a vnější). V závislosti na jejich m/z a kinetické energii jsou zachyceny a pohybují se v drahách kolem vnitřní elektrody. Ionty oscilují v určité frekvenci, která je nepřímo úměrná odmocnině z m/z . Ionty indukují proud, který je měřen na vnějších elektrodách a Fourierovou transformací je získáno hmotnostní spektrum.[59]



Obrázek 9: schéma Orbitrapu

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie a přístrojové vybavení

3.1.1 CHEMIKÁLIE

4–Acetoxy–N,N–diisopropyltryptamin hydrochlorid, LGC FOR 1275.28 (LGC GmbH)

Acetonitril – MS CHROMASOLV ® (FLUKA)

Destilovaná voda pomocí přístroje MILLI-Q-POD ®, MILLIPAK ® (MILLIPORE)

Dihydrogenfosforečnan draselný, puriss p.a. EMSURE ®(MERCK)

Dichlormethan PESTANAL ® (FLUKA)

Ethyl acetát LC-MS CHROMASOLV ® (FLUKA)

Hydroxid amonný 25 – 29% (PENTA)

Hydroxid sodný (NaOH), puriss p.a. (MERCK)

Kapalný dusík

Kyselina mravenčí LC–MS puriss p.a. for mass spectroscopy (FLUKA)

Methanol LC–MS CHROMASOLV ® (FLUKA)

3.1.2 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

Analytické váhy BC–100 (BOECO Germany)

Analytické váhy HR–120 (HELAGO)

Autosampler HTS PAL (CTC Analytics)

Centrifuga UNIVERSAL 320 R (Hettich ZENTRIFUGEN)

Exsikátor

Hmotnostní spektrometr LTQ XL (Thermo Fisher Corporation)

Horkovzdušný sterilizátor HS 31A

HPLC binární pumpa Rheos 2200 (Flux Instruments)

Chromatografická kolona Hypersilgold (Thermo Scientific), analogové číslo

25005-152130, rozměry 150 × 2,1 mm, velikost částic 5 µm

Jemný štětec

Kleště

Konické extrakční zkumavky

Laboratorní váhy KERN 440–49N

Odparka NDK 200-2 Digital Dey Bath (LABICOM, s. r. o.)

Pipety FINNPIPETTE F1 (Thermo SCIENTIFIC), 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl,

0,5 – 5 ml

Rotační třepačka Master Mix MMV14 (Heto MASTERMIX)

Skalpel

Skleněné váženky

Termostat (CTC Analytics AG, Schwitterland)

Termostat MEMMERT model 400 (MEMMERT)

Třecí miska

Třepačka VXR Basic (IKA © VIBRAX)

Vialky

Vysokorychlostní centrifuga (HEMRLE)

Zkumavky TOXI-TUBES, víčka s bílým těsněním

3.2 Analyzovaný materiál

Pro analýzu obsahových látek bylo posbíráno celkem 35 vzorků v rámci osmnácti lokalit.

3.2.1 SBÍRANÉ DRUHY

Psilocybe serbica var. *bohemica* (Šebek ex Šebek) Borovička, Oborník and Noordel – lysohlávka tajemná česká.



Obrázek 10: vzorky *P. bohemica* (foto: autor)

Psilocybe serbica var. *arcana* (Borovička and Hlaváček) Borovička, Oborník and Noordel – lysohlávka tajemná obecná.

Psilocybe semilanceata (Fr.) P. Kumm. – lysohlávka kopinatá.

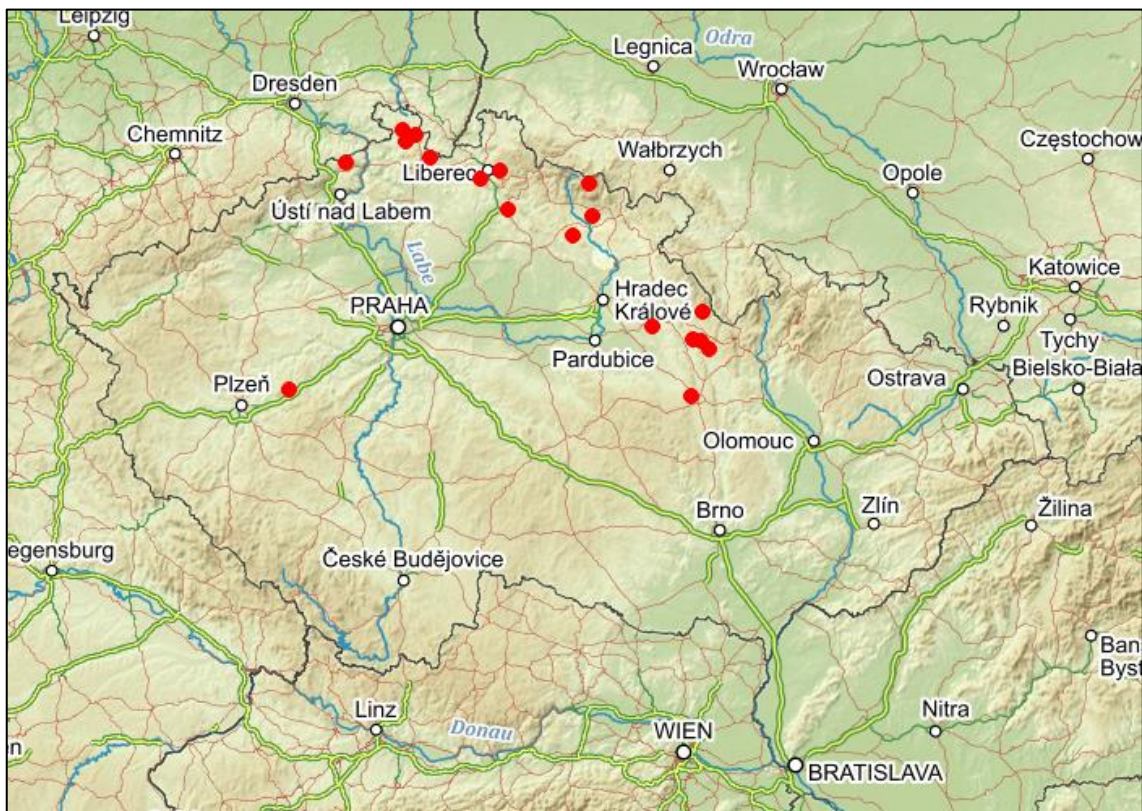


Obrázek 11: vzorky *P. semilanceata* (foto: autor)

3.2.2 POPIS LOKALIT

Všechny lokality se nacházejí v Čechách. Lokality byly vyhledány po konzultaci s mykologem nebo byly náhodně nalezeny. V následujícím obrázku (Obrázek 13: tabulka lokalit) jsou uvedeny lokality, kde byly houby pro naši analýzu nasbírány. Tabulka na obrázku obsahuje číslo lokality, počet nalezišť v dané lokalitě, souřadnice, nadmořskou výšku (v m n. m.), datum sběru, druh houby, informace o počasí při sběru, fytogeografický popis lokality, charakteristiku místa a typ půdy. Ve sloupci „Lokalita“ je uvedena zkratka pro fytogeografický obvod, číslo a název fytogeografického okresu, fytogeografický podokres a bližší určení místa sběru. Ve sloupci „Půdní typ“ je uvedena zkratka pro typ půdy, který se v této lokalitě vyskytuje. Některé z lokalit obsahují více stanovišť. Stanoviště jsou jednotlivá místa v lokalitě, vzdálená jedno od druhého minimálně 20 m.[64]

Celkem bylo nasbíráno 35 vzorků hub (35 různých nalezišť) v osmnácti lokalitách. Sběr probíhal od října do prosince v letech 2014 – 2015 v nadmořské výšce od 250 do 855 m n. m. Obrázek (Obrázek 12: mapa lokalit) zobrazuje orientačně lokality na mapě ČR.



Obrázek 12: mapa lokalit

Číslo	Počet nalezišť	Nadm. výška.	Datum	Druh	Počasí	Lokalita	Specifikace	Půdní typ
1	1	270	27.10.2014	PA	polojasno, sucho	ČM, 61c: Dolní Poorličí - Chvojenská plošina, Dolní Jelení	okraj silnice	RG
2	1	380	9.11.2014	PSE	polojasno	ČM, 48b: Lužická kotlina - Liberecká kotlina, Růžodol I	louka	PG
3	9	540	13.11.2014	PB	polojasno	ČM, 56c: Podkrkonoší - Trutnovské Podkrkonoší, Trutnov	lesopark	RG
4	1	354	13.11.2014	PB	jasno, po dešti	ČM, 63a: Českomoravské mezihoří - Žambersko, Dolní Dobrouč	les	KAm
5	3	457	13.11.2014	PB	jasno, po dešti	ČM, 63a: Českomoravské mezihoří - Žambersko, Kunčice u Letohradu	les	KAm
6	1	353	13.11.2014	PSE	jasno, po dešti	ČM, 63a: Českomoravské mezihoří - Žambersko, Dolní Dobrouč	zahrada	KAm
7	1	680	13.11.2014	PB	zataženo, po dešti	ČO, 95a: Orlické hory - Český hřeben, Panské pole	les	KAd
8	1	398	22.11.2014	PB	slunečno	ČM, 48b: Lužická kotlina - Liberecká Kotlina, Vratislavice n. Nisou	lesopark	KAd
9	3	443	23.11.2014	PB	polojasno, sucho	ČM, 63g: Českomoravské mezihoří - Opatovské rozvodí, Moravský Lačnov	lesopark	PG
10	2	393	2.12.2014	PB	zataženo, po dešti	ČM, 56c: Podkrkonoší - Trutnovské Podkrkonoší, Hostinné	louka	KAA
11	1	855	26.10.2015	PSE	zataženo, deštivo	ČO, 93a: Krkonoše - Krkonoše lesní, Horní Malá Úpa	louka	PZ
12	4	368	6.11.2015; 20.11.2015	PB	slunečno; deštivo	ČM, 50: Lužické hory, Horní Chříbská	les	PG
13	1	498	7.11.2015	PB	slunečno	ČM, 47: Šluknovská pahorkatina, Jiřetín pod Jedlovou	lesopark	KAd
14	1	579	9.11.2015	PSE	deštivo	ČM, 46a: Labské pískovce - Děčínský Sněžník, Sněžník	louka	GL
15	1	473	8.11.2015	PSE	polojasno	ČM, 35a: Podbrdsko - Holoubkovské Podbrdsko, Holoubkov	louka	PG
16	1	250	19.11.2015	PB	jasno	ČM, 55a: Český ráj - Maloskalsko, Turnov	lesopark	AN
17	1	379	19.11.2015	PB	polojasno	ČM, 53b: Podještědí - Ploučnické Podještědí, Cvikov	lesopark	KAd
18	2	489	20.11.2015	PB	deštivo	ČM, 47: Šluknovská pahorkatina, Krásná Lípa	les	KAA

Obrázek 13: tabulka lokalit

3.2.3 PŘÍPRAVA K ANALÝZE

Farmaceutická fakulta v HK, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Na katedře farmaceutické botaniky a ekologie byly provedeny následující úkony.

Vzorky hub byly do 3, výjimečně do 5 hodin od sběru zváženy. Vzorky byly očištěny jemným štětečkem. Několik plodnic bylo použito ke stanovení ztráty vody sušením pro zjištění obsahu vody v konkrétních vzorcích.

3.2.3.1 *Sušení*

Zbylé plodnice, klobouky i třeně, byly rozkrájeny skalpelem na tenké plátky a vloženy do sušičky. Sušení probíhalo při teplotě 35° C do doby, kdy byly plátky plně vysušeny do rozpadajícího se stavu. Tato teplota nemohla být překročena, neboť by mohlo dojít k degradaci stanovovaných alkaloidů.

3.2.3.2 *Homogenizace*

Po vysušení byly části vzorků rozetřeny v třecí misce až na téměř homogenní prášek. Tento prášek byl dále upravován pro analýzu.

3.2.3.3 *Stanovení ztráty vody sušením*

Stanovení ztráty vody sušením probíhalo dle lékopisu. Vzorky hub byly sušeny při teplotě 105 °C do konstantní hmotnosti navážky.[64]

Fakultní nemocnice v Hradci Králové, Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Úsek klinické a forenzní toxikologie

V laboratoři na úseku klinické a forenzní toxikologie ÚKBD FN Hradec Králové byla provedena extrakce, příprava ke stanovení a vlastní stanovení obsahu alkaloidů ve vzorcích.

3.2.3.4 *Extrakce a příprava vzorku k analýze*

Na analytických vahách bylo naváženo 30 – 50 mg lyofilizátu do TOXI-TUBE zkumavek. K navážce vzorku pro stanovení psilocinu byl přidán 1 ml 0,5M NaOH a 4 ml EtOAc/CH₂Cl₂. K navážce vzorku pro stanovení psilocybinu byl přidán 1 ml fosfátového pufru o pH 6 a 5 ml MeOH/EtOAc (4:1) se 4 % NH₄OH. Suspenze byla vložena na 20 min na otáčivou třepačku. Poté byla centrifugována při 3500 ot/min po dobu 5 minut. Supernatant byl přenesen do konické extrakční zkumavky. K odpaření organické fáze byl vložen pod proud plynného dusíku s termostatem nastaveným

na 40 °C. Rekonstituci odparku při přípravě vzorku na stanovení psilocinu byla provedena 0,4 ml roztoku methanol/voda (50:50) a 0,1 ml IS (DIPT = 4-acetoxy-N,N-diisopropyltryptamin) o koncentraci 2000 ng/ml. K rekonstituci odparku při přípravě vzorku na stanovení psilocybinu bylo použito množství 0,7 ml roztoku methanol/voda (50:50) a 0,1 ml IS (DIPT) o koncentraci 2000 ng/ml. Rekonstituovaný odparek (pokud bylo potřeba) byl podroben ultracentrifugaci při 30 000 ot/min. po dobu 10 minut. Odstředěný vzorek byl přenesen přímou dekantací do vialky.

3.2.3.5 Účinnost extrakce

Výtěžnost extrakce nebylo možné stanovit z důvodu aktuální nedostupnosti certifikovaného značeného psilocinu a psilocybinu. Výtěžnost extrakce byla ověřena pouze z časového hlediska. Nejlepší výsledky se ukázaly při extrakci trvající 20 minut.

3.2.4 ANALÝZA NA HMOTNOSTNÍM SPEKTROMETRU A PODMÍNKY MĚŘENÍ

Byla použita metoda LC-ESI-MS (LIT).

Separace proběhla gradientovou elucí s mobilními fázemi: (A) 0,05M kyselina mravenčí, (B) acetonitril (parametry gradientu viz Tabulka 16: parametry gradientu). Jako zdroj sušícího plynu byl použit tekutý dusík.

Látky separované na koloně byly ionizovány pomocí elektrospreje.

Parametry iontového zdroje byly následující: napětí na kapiláře 5 kV, proud 0,3 – 0,4 μ A, sušící plyn (dusík): 45 jednotek, pomocný plyn (dusík): 15 jednotek, napětí přívodné kapiláry 49 V, teplota na této kapiláře 295 °C. Detektor byl nastaven na simultánní sken skenující ionty o m/z 205,1 pro PS; 284,9 pro PSB a 303,1 pro vnitřní standard.

Parametry MS analýzy: normalizovaná kolizní energie 28 % pro PS, 30 % pro PSB a 30 % pro IS, izolační okno skenu 2,0 m/z, range skenu pro PS 55 – 240 m/z, pro PSB 75 – 300 m/z a pro IS 80 – 320 m/z, skenovací čas 30 ms.

Tabulka 16: parametry gradientu

Čas (s)	A %	B %	μl/min
0	95 %	5 %	300
0,02	95 %	5 %	300
0,1	95 %	50 %	300
3	55 %	45 %	300
5	30 %	70 %	300
7	50 %	95 %	300
10	50 %	95 %	300
15	95 %	5 %	300
20	95 %	5 %	300

4 VÝSLEDKY

4.1 Obsah PS a PSB ve vzorkách dle lokalit

V tabulce (Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.) jsou uvedeny jednotlivé lokality s počtem alezišť. Průměrný obsah vody je obsah vody v houbách, který byl stanoven postupem uvedeným v kapitole 4.2.3.3. Z obsahu vody vzorků z jednotlivých nalezišť v lokalitě je vypočten průměr. Obsah psilocinu (PS) a psilocybinu (PSB) je uveden jako rozsah hodnot stanovený z jednotlivých stanovišť v rámci dané lokality, v procentech na suchou hmotu. Rozsah je vypočten z hodnot ze tří měření pro každý vzorek. Houby patřící do jedné lokality jsou vždy stejného druhu.

Č.	Druh	Lokalita (počet nalezišť)	Průměrný obsah vody	Obsah PS v %	Obsah PSB v %
1	PA	Dolní Poorličí - Chvojenská plošina, Dolní Jelení (1)	69,33%	0,003 – 0,022	0,018 – 0,031
2	PS	Lužická kotlina - Liberecká kotlina, Růžodol I (1)	88,04%	0,001 – 0,004	0,138 – 0,206
3	PB	Podkrkonoší - Trutnovské Podkrkonoší, Trutnov (9)	90,00%	0,000 – 0,048	0,018 – 0,101
4	PB	Českomoravské mezihoří - Žambersko, Dolní Dobrouč (1)	89,95%	0,000 – 0,010	0,012 – 0,035
5	PB	Českomoravské mezihoří - Žambersko, Kunčice u Letohradu (3)	90,56%	0,000 – 0,024	0,018 – 0,050
6	PS	Českomoravské mezihoří - Žambersko, Dolní Dobrouč (1)	89,65%	0,000 – 0,005	0,123 – 0,337
7	PB	Orlické hory - Český hřeben, Panské pole (1)	92,65%	0,012 – 0,025	0,051 – 0,060
8	PB	Lužická kotlina - Liberecká Kotlina, Vratislavice n. Nisou (1)	90,56%	0,005 – 0,023	0,036 – 0,063
9	PB	Českomoravské mezihoří - Opatovské rozvodí, Moravský Lačnov (3)	90,94%	0,002 – 0,016	0,017 – 0,042
10	PB	Podkrkonoší - Trutnovské Podkrkonoší, Hostinné (2)	89,67%	0,005 – 0,020	0,005 – 0,031

Č.	Druh	Lokalita (počet nalezišť)	Průměrný obsah vody	Obsah PS v %	Obsah PSB v %
11	PS	Krkonoše - Krkonoše lesní, Horní Malá Úpa (1)	86,29%	0,002 – 0,004	0,301 – 0,319
12	PB	Lužické hory, Horní Chřibská (4)	93,94%	0,002 - 0,024	0,022 - 0,094
13	PB	Šluknovská pahorkatina, Jířetín pod Jedlovou (1)	90,98%	0,012 – 0,02	0,051 – 0,152
14	PS	Labské pískovce - Děčínský Sněžník, Sněžník (1)	91,27%	0,003 – 0,004	0,087 – 0,165
15	PS	Podbrdsko - Holoubkovské Podbrdsko, Holoubkov (1)	90,62%	0,004 – 0,005	0,174 – 0,196
16	PB	Český ráj - Maloskalsko, Turnov (1)	93,48%	0,011 – 0,025	0,024 – 0,033
17	PB	Podještědí - Ploučnické Podještědí, Cvikov (1)	94,38%	0,003 – 0,008	0,014 – 0,070
18	PB	Šluknovská pahorkatina, Krásná Lípa (2)	95,53%	0,005 - 0,024	0,022 - 0,064

4.2 Obsah PS a PSB ve vzorkách dle druhu

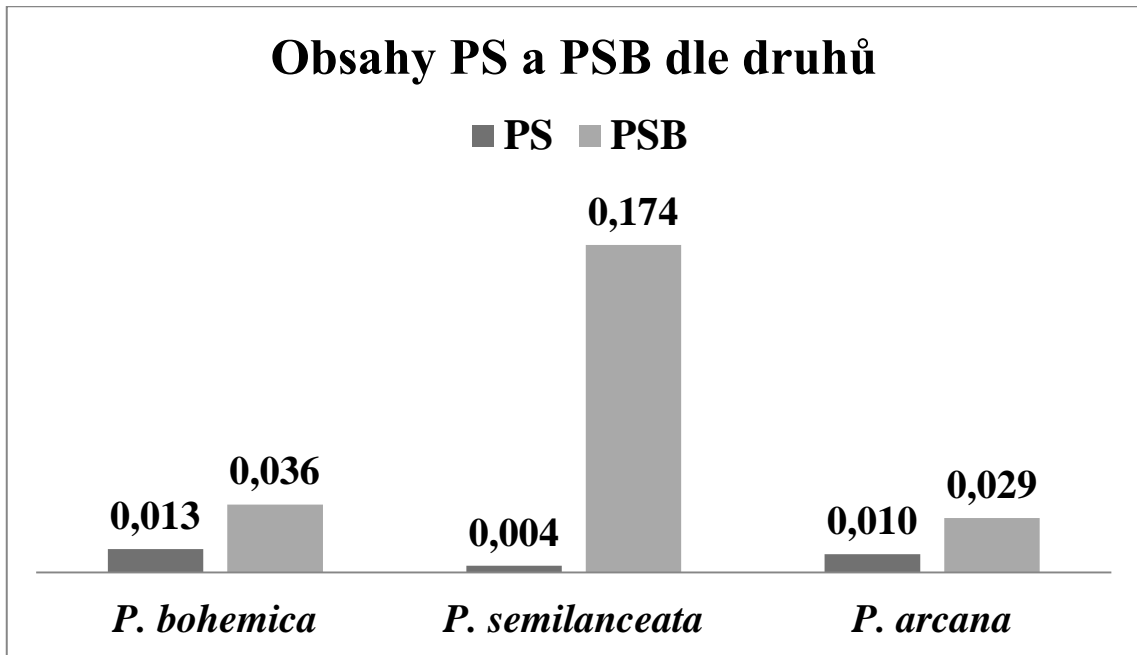
V tabulce (Tabulka 17: obsah PS a PSB ve vzorkách dle druhu) jsou uvedeny rozsahy hodnot obsahů psilocinu a psilocybinu u jednotlivých druhů. Obsah alkaloidů je vyjádřen v procentech na suchou hmotu houby.

Tabulka 17: obsah PS a PSB ve vzorkách dle druhu

Druh	Počet nalezišť	PS v %	PSB v %
PB	29	0,000 – 0,048	0,005 – 0,152
PSE	5	0,000 – 0,005	0,087 – 0,337
PA	1	0,003 – 0,022	0,018 – 0,031

4.3 Graf obsahu PS a PSB ve vzorkách dle druhu

Graf (Obrázek 14: obsahy PS a PSB dle druhů) znázorňuje obsah alkaloidů ve třech druzích r. *Psilocybe*. Uvedené číselné hodnoty jsou hodnoty mediánu vypočteného ze všech měření v rámci druhu.



Obrázek 14: obsahy PS a PSB dle druhů

5 DISKUZE

V teoretické části uvádíme obsah vody v čerstvých houbách 70 – 95 %. Tato informace byla potvrzena experimentálně, průměrný zjištěný obsah vody u našich hub je 89,88 %. Hodnoty kolísaly víceméně v závislosti na počasí.

Sběr našich vzorků probíhal po celých Čechách. Většina vzorků byla získána z lokalit severních a severovýchodních Čech. Nejvíce vzorků bylo nasbíráno v oblasti Královéhradeckého kraje, z důvodu přesných informací poskytnutých odborníkem (Mgr. Wipler kontroloval také správnost při určování druhů nalezených hub). Všechny nalezené houby spadaly mezi tři druhy sbírané pro tuto práci. Naleziště jednotlivých druhů odpovídala literatuře. *P. serbica* var. *bohemica* byla nejčastěji nalezena na okrajích lesů a v lesoparcích. *P. semilanceata* na pastvinách a na loukách. *P. serbica* var. *arcana* podél cest na okrajích lesa. Naleziště se vyskytovala v oblasti Českomoravského mezofytika a Českého oreofytika z hlediska fyto geografického, v nadmořské výšce průměrně 450 m n. m. Nejvíce nalézaným druhem byla *P. serbica* var. *bohemica*, po ní *P. semilanceata* a varieta *P. serbica* var. *arcana* byla objevena pouze na jednom nalezišti. Tato práce představuje do jisté míry pouze pilotní studii, neboť z hlediska vyšší statistické významnosti bude třeba získat více vzorků z více lokalit. Přesto, pokud jde o publikované studie, které zkoumaly obsahy alkaloidů v houbách rodu *Psilocybe*, jednalo se většinou o nižší počty vzorků ve srovnání s naší studií (viz. kap. 2.6 Přehled analýz).

Vzorky byly po vysušení za objektivní teploty třeny v třecí misce manuálně na co nejmenší částičky, což se zdaleka nepodařilo ideálním způsobem. V době naší práce nebyl k dispozici homogenzátor. Domnívám se tedy, že velký rozptyl výsledků (viz. kap. 4 Výsledky) byl způsoben pravděpodobně nedokonalou homogenizací materiálu. Tomu napovídá i fakt, že výtěžnost extrakce byla nejlepší u *P. semilanceata*, kterou se podařilo výše uvedeným způsobem nejlépe zpracovat a materiál se svou formou blížil analyticky optimální prachové směsi. Tento nedostatek v příští práci chceme odstranit pořízením vhodného přístrojového vybavení. Pokud bude houbový prášek dostatečně homogenní, bude s ním možné pracovat téměř jako s roztokem, což je pro tento typ extrakce žádoucí. Homogenizace by také měla být zahájena ihned po vysušení za horka, aby se zabránilo pohlcování vody houbami ze vzduchu.

U všech vzorků byla provedena tři měření (a tři extrakce), ve dvou případech *P. semilanceata* pouze dvě z důvodu nedostatku materiálu.

Extrakce a analýza byla navržena a provedena dle interního standardního operačního postupu laboratoře úseku klinické a forenzní toxikologie ÚKBD FN Hradec Králové.

K extrakci byl stejně jako u předchozích studií použit methanol v kombinaci s dalšími sloučeninami. U psilocinu byl použit dichloromethanol s ethylacetátem a hydroxid sodný. U psilocybinu methanol s ethylacetátem, hydroxid amonný a fosfátový pufr.

Jako vnitřní standard byl použit DIPT (4-acetoxy-N,N-diisopropyltryptamin), z důvodu aktuální nedostupnosti značeného i nezačeného psilocinu a psilocybinu. Ze stejného důvodu nemohla být provedena kompletní výtěžnost extrakce. Byla tedy provedena jen z časového hlediska, kdy se ukázala nejúčinnější při 20 minutách na otáčivé třepce. Pro zlepšení informací o výtěžnosti extrakce by bylo vhodné sehnat příslušné standardy a provést vnitřní kalibraci metodou isotopové diluce.

K analýze byla zvolena metoda LC-MSⁿ s LIT pro výše uvedené důvody (podrobnější strukturní informace a spolehlivé rozlišení báze i jejího esteru). V minulosti byly často publikovány práce s použitím GC-MS a HPLC-UV. Jedním z důvodů proč čísla u těchto studií (především u *P. bohemica* a *P. arcana*) jsou vyšší než v naší studii, je použití těchto méně přesných metod a jejich neschopnost rozlišit mezi psilocinem a psilocybinem.[39]

LC-MSⁿ je (zejména pro prvotní kvalitativní analýzu sebraného materiálu) přesnější, specifitější a bezpečně rozlišuje mezi psilocinem a psilocybinem. V další práci, pro vlastní kvantitativní stanovení očekávaného většího kvanta hodláme užít LC-MSⁿ s principem stanovení přesné hmoty na bázi Orbitrap. Tím bude možno podstatně zkrátit dobu analýzy jednotlivých vzorků. Dosavadní časový profil analýz byl v důsledku užití technologie LIT značně expenzivní a časová odezva výsledků byla na hranici únosnosti. Vedle toho očekáváme větší dynamický rozsah měření, což povede ke zvýšení přesnosti výsledků. Tento analytický parametr ovšem vyžaduje získání standardů psilocinu a psilocybinu. Metodu v této práci tedy hodnotíme jako semikvantitativní. Na základě našich poznatků popsaných v této diskuzi, jak metodu vylepšit, aby mohla být považována za kvantitativní. S využitím technologie Orbitrap

v další práci chceme také vedle hlavních látek stanovit i další alkaloidy vyskytující se v minoritních množstvích.[12, 65]

Kvalitativně byly alkaloidy prokázány ve všech nalezených vzorcích.

Hodnoty výsledků našich měření mají velký rozptyl, jsou proto uváděny stejně jako téměř ve všech studiích před námi, rozsahy hodnot ze tří měření. I v ostatních studiích jsou výsledky udávány ve velmi širokém rozmezí, což je dáno nehomogenitou materiálu a nerovnoměrným rozložením alkaloidů v plodnici.[51]

Výsledky ve všech lokalitách jsou podobné a závislé spíše na druhu houby. Obsahy alkaloidů u našich druhů jsou následující (v přepočtu na suchou hmotu): *P. bohémica* 0,005 – 0,152 % PSB, 0,000 – 0,048 % PS; u *P. semilanceata* 0,087 – 0,337 % PSB, 0,000 – 0,005 % PS; u *P. arcana* 0,018 – 0,031 % PSB, 0,003 – 0,022 % PS.

6 ZÁVĚR

Obsah vody v našich vzorcích hub je průměrně 89,88 %. Čísla kolísají víceméně v závislosti na počasí.

Většina vzorků byla nasbírána na severu a severovýchodě Čech. Všechny nalezené vzorky odpovídaly sbíraným druhům. Nejhojněji nalézaným druhem byla *P. bohemica*.

Lokality, ve kterých byly houby nasbírány, se nacházejí v průměrné nadmořské výšce 450 m n. m. Z fyto geografického hlediska se jedná o oblasti Českomoravského mezofytika a Českého oreofytika.

Z hlediska kvalitativního byly alkaloidy potvrzeny ve všech nasbíraných vzorcích.

Metoda LC-MSⁿ (LIT) používaná v naší práci je velice přesná a specifická. Dokáže rozlišit psilocin a psilocybin, čímž se liší od doposud používaných metod. Prozatím je naše metoda ve fázi semikvantitativního stanovení. Výsledky této studie jsou podkladem pro optimalizaci metody. Hlavním faktorem velice rozptýlených výsledků je nedostatečná homogenizace vzorku. Pro zlepšení je v dalších pracích žádoucí použít na vysušené vzorky metodu instrumentální homogenizace. Další nutný postup k optimalizaci metody je sehnání standardů psilocinu a psilocybinu. Tyto standardy musí být zajištěny pro provedení vnitřní kalibrace. Taktéž s nimi bude možné v rámci validace zjistit dynamický rozsah kvantitativní analýzy. Možný nedostatečný dynamický rozsah může být jedním z důvodů nižších čísel v porovnání s ostatními studii.

Výsledky ve všech lokalitách jsou podobné a závislé spíše na druhu houby. Naše výsledky jsou vztaženy na suchou hmotu. U jednotlivých druhů byla zjištěna tato čísla: *P. bohemica* 0,005 – 0,152 % PSB, 0,000 – 0,048 % PS; u *P. semilanceata* 0,087 – 0,337 % PSB, 0,000 – 0,005 % PS; u *P. arcana* 0,018 – 0,031 % PSB, 0,003 – 0,022 % PS.

7 ABSTRAKT

Cílem této diplomové práce bylo stanovit obsahy dvou hlavních alkaloidů druhů r. *Psilocybe* vyskytujících se na území České republiky. Správnost určování druhů byla kontrolována odborníkem-mykologem. Kvalitativní a kvantitativní stanovení obsahových látek ve třech sbíraných druzích rodu *Psilocybe* bylo provedeno metodou LC-MSⁿ (LIT).

Vzorky hub byly nasbírány převážně na severu a severovýchodě Čech. Byly nalezeny tři druhy r. *Psilocybe*. Nejvíce nalézaným druhem byla *P. serbica* var. *bohemica*, dále *P. semilanceata* a *P. serbica* var. *arcana* byla objevena pouze na jednom nalezišti. Vzorky pocházejí z celkem 35 nalezišť v rámci 18 lokalit. Z kvalitativního hlediska byly oba hlavní alkaloidy potvrzeny ve všech vzorcích. Kvantitativní výsledky pro obsah psilocinu a psilocybinu (v tomto pořadí) jsou následující: *P. bohemica* 0,005 – 0,152 %, 0,000 – 0,048 %; *P. semilanceata* 0,087 – 0,337 %, 0,000 – 0,005 %; *P. arcana* 0,018 – 0,031 %, 0,003 – 0,022 %. Výsledky ve všech lokalitách jsou podobné a závislé spíše na druhu houby. Naše výsledky jsou vztaženy na suchou hmotu. Práce přinesla zásadní poznatky k budoucí optimalizaci analytické metody a předpoklady pro rozšíření projektu o další lokality a stanovení vedle hlavních obsahových látek i látek minoritních.

8 ABSTRACT

The goal of this work was to determine the contents of two main alkaloid types of *Psilocybe* species occurring in the Czech Republic. Correct identification of species was checked by mycology specialist. Qualitative and quantitative determination of substances contained in three collected species of the genus *Psilocybe* was carried out by LC–MSⁿ (LIT).

Samples were mainly collected in the north and northeast Bohemia. Three species of *Psilocybe* were found. The most found species were *P. serbica* var. *bohemica* then *P. semilanceata* and only one deposit of *P. serbica* var. *arcana*. Total of 35 deposits within eighteen locations. From qualitative point of view, the two main alkaloids were confirmed in all samples. Quantitative results for content of psilocin and psilocybin (in this order) are: *P. bohemica* 0,005 – 0,152 %, 0,000 – 0,048 %; *P. semilanceata* 0,087 – 0,337 %, 0,000 – 0,005 %; *P. arcana* 0,018 – 0,031 %, 0,003 – 0,022 %. Results in all locations are similar and rather dependent on the fungi type. Our results are based on dry mass. This work brought fundamental knowledge for future optimisation of analytical methods and assumptions for the project extension of other locations and determination of content of minority substances alongside the content of majority substances.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

5HT1A	podtyp serotoninového receptoru
5-HT2A	podtyp serotoninového receptoru
AN	antrozem
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
ČM	Českomoravské mezofytikum
ČO	České oreofytikum
ČR	Česká republika
DIPT	4-acetoxy-N,N-diisopropyltryptamin
EI	elektronová ionizace
ESI	ionizace elektrosprejem
FN	Fakultní nemocnice
GC	plynová chromatografie
GL	glej
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
i.v.	intravenózní
IS	vnitřní standard
IT	iontová past
KAa	kambizem acidní
KAd	kambizem dystrická
KAm	kambizem modální
kap.	kapitola
Ki	disociační konstanta komplexu enzym-inhibitor
LC	kapalinová chromatografie
LIT	lineární iontová past
log P	rozdělovací koeficient
LSD	diethylamid kyseliny lysergové
m n. m.	metr nad mořem
MALDI	ionizace laserem za účasti matrice
MF	mobilní fáze
MS	hmotnostní spektrometrie
MS ⁿ	tandemová hmotnostní spektrometrie
ot/min	otáčky za minutu
P.	<i>Psilocybe</i>
p.o.	perorální
PA	<i>Psilocybe serbica</i> var. <i>arcana</i>
PB	<i>Psilocybe serbica</i> var. <i>bohemica</i>
PG	pseudoglej
PS	psilocin
PSB	psilocybin
PSE	<i>Psilocybe semilanceata</i>
PZ	kryptopodzol, podzol
Q	kvadrupól
r.	rod
RG	regozem arenická
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TOF	doba letu

UGT1A10	podtyp UDP–glukuronyltransferázy
UGT1A9	podtyp UDP–glukuronyltransferázy
ÚKBD	Ústav klinické biochemie a diagnostiky
UV	oblast ultrafialového záření
var.	varietà

10 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: zařazení rodu <i>Psilocybe</i> do systému hub	10
Tabulka 2[38]	25
Tabulka 3[39]	25
Tabulka 4[40]	25
Tabulka 5[41]	26
Tabulka 6[42]	26
Tabulka 7[43]	26
Tabulka 8[44]	27
Tabulka 9[45]	27
Tabulka 10[46]	27
Tabulka 11[47]	27
Tabulka 12[48]	28
Tabulka 13[49]	28
Tabulka 14[50]	28
Tabulka 15[51]	28
Tabulka 16: parametry gradientu	41
Tabulka 18: obsah PS a PSB ve vzorkách dle druhu	43

11 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: <i>P. semilanceata</i> (foto: Mgr. Jan Wipler).....	12
Obrázek 2: <i>P. serbica</i> var <i>bohemica</i> (foto: Mgr. Jan Wipler).....	13
Obrázek 3: psilocybin	17
Obrázek 4: psilocin	18
Obrázek 5: baeocystin.....	18
Obrázek 6: norbaeocystin	19
Obrázek 7: schéma metabolismu psilocybinu.....	21
Obrázek 8: obecné schéma hmotnostního spektrometru	31
Obrázek 9: schéma Orbitrapu	33
Obrázek 10: vzorky <i>P. bohemica</i> (foto: autor).....	35
Obrázek 11: vzorky <i>P. semilanceata</i> (foto: autor)	36
Obrázek 12: mapa lokalit.....	37
Obrázek 13: tabulka lokalit	38
Obrázek 14: obsahy PS a PSB dle druhů.....	44

12 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Furst, P.T., *Flesh of the Gods: the ritual use of hallucinogens*. 1972: Praeger New York.
2. Kalina, T. and V. Jiří, *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii*. 2005: Karolinum.
3. Rozsypal, S., *Nový přehled biologie*. 2003: Sientia, spol. s.r.o.
4. Keizer, J.F., *Houby*. 2005: Artedit. s.r.o.
5. Jelínek, J., *Biologie prokaryot, nižších a vyšších rostlin, hub*. 1995: Nakladatelství a vydavatelství FIN.
6. Holec, J., A. Bielich, and M. Beran, *Přehled hub střední Evropy*. 2012: Academia.
7. Smotlacha, M., *Kapesní atlas hub*. 2002: Ottovo nakladatelství.
8. Barceloux, D.G., *Psilocybin and hallucinogenic mushrooms*. *Medical Toxicology of Drug Abuse: Synthesized Chemicals and Psychoactive Plants*, 2012: p. 950-960.
9. Borovička, J., *The wood-rotting bluing *Psilocybe* species in Central Europe—an identification key*. *Czech Mycology*, 2008. **60**(2): p. 173-192.
10. Smolinske, S.C., *Psilocybin-containing mushrooms*. *Handbook of Mushroom Poisoning. Diagnosis and Treatment*. DG Spoerke and BH Rumack (Eds.), CRC Press, Boca Raton, 1994: p. 309-324.
11. Noordeloos, M., E., *Genus *Psilocybe*. Strophariaceae*. 2011: Candusso.
12. EMCDDA. *Hallucinogenic mushrooms drug profile*. [online] 2015.

13. Gross, S.T., *Detecting psychoactive drugs in the developmental stages of mushrooms*. Journal of Forensic Science, 2000. **45**(3): p. 527-537.
14. Passie, T., et al., *The pharmacology of psilocybin*. Addiction biology, 2002. **7**(4): p. 357-364.
15. Lüllmann, H., K. Mohr, and L. Hein, *Barevný atlas farmakologie*. 2007: Grada Publishing as.
16. Francis, J. and V. Murray, *Review of enquiries made to the NPIS concerning Psilocybe mushroom ingestion, 1978-1981*. Human & Experimental Toxicology, 1983. **2**(2): p. 349-352.
17. Vollenweider, F.X., et al., *5-HT modulation of dopamine release in basal ganglia in psilocybin-induced psychosis in man—a PET study with [11C] raclopride*. Neuropsychopharmacology, 1999. **20**(5): p. 424-433.
18. Wittmann, M., *Time perception and temporal processing levels of the brain*. Chronobiology international, 1999. **16**(1): p. 17-32.
19. Hasler, F., et al., *Determination of psilocin and 4-hydroxyindole-3-acetic acid in plasma by HPLC-ECD and pharmacokinetic profiles of oral and intravenous psilocybin in man*. Pharmaceutica Acta Helvetiae, 1997. **72**(3): p. 175-184.
20. Manevski, N., et al., *Glucuronidation of psilocin and 4-hydroxyindole by the human UDP-glucuronosyltransferases*. Drug metabolism and disposition, 2010. **38**(3): p. 386-395.
21. Hasler, F., et al., *Renal excretion profiles of psilocin following oral administration of psilocybin: a controlled study in man*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2002. **30**(2): p. 331-339.

22. Deliganis, A.V., P.A. Pierce, and S.J. Peroutka, *Differential interactions of dimethyltryptamine (DMT) with 5-HT1A and 5-HT2 receptors*. *Biochemical pharmacology*, 1991. **41**(11): p. 1739-1744.
23. Hollister, L.E. and A.M. Hartman, *Mescaline, lysergic acid diethylamide and psilocybin: comparison of clinical syndromes, effects on color perception and biochemical measures*. *Comprehensive Psychiatry*, 1962. **3**(4): p. 235-241.
24. Peden, N.R., S.D. Pringle, and J. Crooks, *The problem of psilocybin mushroom abuse*. *Human & Experimental Toxicology*, 1982. **1**(4): p. 417-424.
25. Jahodář, L., *Houbové jedy a toxiny*, in *Přírodní toxiny a jedy*. 2004, Galén.
26. Fischer, R., et al., *Psilocybin reactivity and time contraction as measured by psychomotor performance*. *Arzneimittel-Forschung*, 1966. **16**(2): p. 180-185.
27. Wittmann, M., et al., *Effects of psilocybin on time perception and temporal control of behaviour in humans*. *Journal of Psychopharmacology*, 2007. **21**(1): p. 50-64.
28. Malitz, S., et al., *Some observations on psilocybin, a new hallucinogen, in volunteer subjects*. *Comprehensive psychiatry*, 1960. **1**(1): p. 8-17.
29. Musha, M., et al., *Poisoning by hallucinogenic mushroom Hikageshibiretake (Psilocybe argentipes K. Yokoyama) indigenous to Japan*. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 1986. **148**(1): p. 73-78.
30. Satora, L., H. Goszcz, and K. Ciszowski, *Poisonings resulting from the ingestion of magic mushrooms in Krakow*. *Przegląd lekarski*, 2004. **62**(6): p. 394-396.
31. Benjamin, C., *Persistent psychiatric symptoms after eating psilocybin mushrooms*. *British medical journal*, 1979. **1**(6174): p. 1319.

32. Halpern, J.H., *Hallucinogens and dissociative agents naturally growing in the United States*. Pharmacology & therapeutics, 2004. **102**(2): p. 131-138.
33. Lee, R.E., *A technique for the rapid isolation and identification of psilocin from psilocin/psilocybin-containing mushrooms*. Journal of Forensic Science, 1985. **30**(3): p. 931-941.
34. Beug, M.W. and J. Bigwood, *Quantitative analysis of psilocybin and psilocin and psilocybe baecystis (singer and smith) by high-performance liquid chromatography and by thin-layer chromatography*. Journal of Chromatography A, 1981. **207**(3): p. 379-385.
35. Beck, O., et al., *Presence of phenylethylamine in hallucinogenic Psilocybe mushroom: possible role in adverse reactions*. Journal of analytical toxicology, 1998. **22**(1): p. 45-49.
36. Kamata, T., et al., *Optimized glucuronide hydrolysis for the detection of psilocin in human urine samples*. Journal of Chromatography B, 2003. **796**(2): p. 421-427.
37. Sivyer, G. and L. Dorrington, *Intravenous injection of mushrooms*. Medical journal of Australia, 1984. **140**(3): p. 182-182.
38. Kamata, T., et al., *Liquid chromatography-mass spectrometric and liquid chromatography-tandem mass spectrometric determination of hallucinogenic indoles psilocin and psilocybin in "magic mushroom" samples*. Journal of forensic sciences, 2005. **50**: p. 336.
39. Stříbrný, J., J. Borovička, and M. Sokol, *Obsah psilocybinu a psilocinu v některých druzích hub*. Česko-slovenská patologie a Soudní lékařství, 2003. **39/48**: p. 45.
40. Tsujikawa, K., et al., *Morphological and chemical analysis of magic mushrooms in Japan*. Forensic science international, 2003. **138**(1): p. 85-90.

41. Musshoff, F., B. Madea, and J. Beike, *Hallucinogenic mushrooms on the German market—simple instructions for examination and identification*. Forensic science international, 2000. **113**(1): p. 389-395.
42. Keller, T., et al., *Analysis of psilocybin and psilocin in *Psilocybe subcubensis* GUZMÁN by ion mobility spectrometry and gas chromatography–mass spectrometry*. Forensic science international, 1999. **99**(2): p. 93-105.
43. Gartz, J., *Extraction and analysis of indole derivatives from fungal biomass*. Journal of basic microbiology, 1994. **34**(1): p. 17-22.
44. Wurst, M., R. Kysilka, and T. Koza, *Analysis and isolation of indole alkaloids of fungi by high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 1992. **593**(1-2): p. 201-208.
45. Kysilka, R. and M. Wurst, *A novel extraction procedure for psilocybin and psilocin determination in mushroom samples*. Planta medica, 1990. **56**(3): p. 327-328.
46. Borner, S. and R. Brenneisen, *Determination of tryptamine derivatives in hallucinogenic mushrooms using high-performance liquid chromatography with photodiode array detection*. Journal of Chromatography A, 1987. **408**: p. 402-408.
47. Kysilka, R., et al., *High-performance liquid chromatographic determination of hallucinogenic indoleamines with simultaneous UV photometric and voltammetric detection*. Journal of Chromatography A, 1985. **320**(2): p. 414-420.
48. Christiansen, A. and K. Rasmussen, *Screening of hallucinogenic mushrooms with high-performance liquid chromatography and multiple detection*. Journal of Chromatography A, 1983. **270**: p. 293-299.

49. Bigwood, J. and M.W. Beug, *Variation of psilocybin and psilocin levels with repeated flushes (harvests) of mature sporocarps of Psilocybe cubensis (Earle) Singer*. Journal of ethnopharmacology, 1982. **5**(3): p. 287-291.
50. Christiansen, A., K. Rasmussen, and F. Tønnesen, *Determination of psilocybin in Psilocybe semilanceata using high-performance liquid chromatography on a silica column*. Journal of Chromatography A, 1981. **210**(1): p. 163-167.
51. Beug, M.W. and J. Bigwood, *Psilocybin and psilocin levels in twenty species from seven genera of wild mushrooms in the Pacific Northwest, USA*. Journal of ethnopharmacology, 1982. **5**(3): p. 271-285.
52. Taylor, L., R.B. Papp, and B.D. Pollard, *Instrumental methods for determining elements*. 1994: VCH.
53. Neue, U.D., *HPLC columns: theory, technology, and practice*. 1997.
54. Gaskell, S.J., *Electrospray: principles and practice*. Journal of mass spectrometry, 1997. **32**(7): p. 677-688.
55. Paizs, B. and S. Suhai, *Fragmentation pathways of protonated peptides*. Mass spectrometry reviews, 2005. **24**(4): p. 508-548.
56. Friedecký, D. and K. Lemr, *Úvod do hmotnostní spektrometrie*. Klinická Biochemie a Metabolismus, 2012. **20**(41): p. 152-157.
57. Cañas, B., et al., *Mass spectrometry technologies for proteomics*. Briefings in functional genomics & proteomics, 2006. **4**(4): p. 295-320.
58. Stulík, J. and a. kol., *Vybrané kapitoly z molekulární patologie: skripta pro studenty DSP Molekulární patologie*. 2008, Hradec Králové: Univerzita obrany.
59. Bier, M.E., *Coupling ESI and MALDI sources to the quadrupole mass filter, quadrupole ion trap, linear quadrupole ion trap, and Orbitrap mass analyzers*.

Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications, Second Edition, 2010: p. 263-344.

60. Fenn, J.B., et al., *Electrospray ionization—principles and practice*. Mass Spectrometry Reviews, 1990. **9**(1): p. 37-70.
61. Ho, C., et al., *Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications*. Clinical Biochemist Reviews, 2003. **24**(1): p. 3-12.
62. Mora, J.F.d.l., et al., *Electrochemical processes in electrospray ionization mass spectrometry*. Journal of Mass Spectrometry, 2000. **35**(8): p. 939-952.
63. Watson, D., et al., *Mass Spectrometry Clarke's Analytical Forensic Toxicology*, 2013.
64. ČR, M.z., *Doplněk 2015. Český lékopis*. 2009: Grada.
65. Moffat, A., et al., *Quality Assurance and Control in the Toxicology Laboratory Clarke's Analytical Forensic Toxicology*, 2013.