

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

ANALÝZA OBSAHOVÝCH LÁTEK RODU *PSILOCYBE* II
Analysis of *Psilocybe* constituents II.
(Slovensko)

Diplomová práce

Vedúci diplomovej práce: prof. RNDr. Luděk Jahodář, CSc.

Konzultant: PharmDr. Viktor Voříšek

HRADEC KRÁLOVÉ, 2017

Bc. Andrea Gunčagová

Pod'akovanie

Moje pod'akovanie za odborné vedenie, metodickú pomoc a trpezlivosť pri spracovávaní diplomovej práce patrí predovšetkým vedúcemu práce prof. RNDr. Luďku Jahodářovi, CSc. a konzultantovi PharmDr. Viktorovi Voříškovvi. Za pomoc pri druhovom určovaní húb vd'áčim Mgr. Janovi Wiplerovi.

Diplomová práca bola vypracovaná s podporou grantu SVV 260 412.

PREHLÁSENIE

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Celá použitá literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú riadne citované. Práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové 7.3.2017

.....

podpis

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Kandidát: Bc. Andrea Gunčagová

Školitel: prof. RNDr. Luděk Jahodář, CSc.

Název diplomové práce: Analýza obsahových látek rodu *Psilocybe* II

Cieľom diplomovej práce bolo okrem analýzy obsahových látok zmapovanie výskytu 2 vybraných druhov rodu *Psilocybe* v rámci Slovenska a Moravskoslezského kraja, a stanovenie obsahu vody vo vzorkách.

Pracovali sme s 22 vzorkami pochádzajúcimi z 10 lokalít. Správnosť druhového určenia zastrešoval člen mykologickej spoločnosti. *Psilocybe serbica* var. *bohemica* bola identifikovaná na 2, zatiaľ čo *Psilocybe semilanceata* na 8 lokalitách. Priemerný obsah vody vo vzorkách bol $87,07\% \pm 10,91\%$.

Vzorky boli analyzované metódou LC-MS/MS (LIT). Kvalitatívne boli stanovované alkaloidy (psilocín a psilocybín) identifikované vo všetkých vzorkách.

Výsledky kvantitatívnej analýzy (uvedené v % na sušinu) sú v jednotlivých lokalitách obdobné, značný rozdiel badáme v rôznych druhoch *Psilocybe*. Obsah alkaloidov stanovených v *P.bohemica* bol: PSC 0,001-0,011 % a PSB 0,01 – 0,07 %. *P.semilanceata* obsahovala 0,0005 – 0,011 % PSC a 0,074 – 0,763% PSB.

Záverom môžeme prehlásiť, že zvolená analytická metóda LC-MS/MS sa pri stanovení PSC a PSB osvedčila pre veľkú špecifickosť a presnosť výsledkov. Predložená práca svojimi závermi prispela k budúcej optimalizácii a validácii použitej metódy na hubový materiál s predpokladaným rozšírením práce o ďalšie lokality zberu.

Kľúčové slová:

Psilocybe, psilocín, psilocybín, LC-MS/MS (LIT)

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of pharmaceutical botany and ecology

Candidate: Bc. Andrea Gunčagová

Supervisor: prof. RNDr. Luděk Jahodář, CSc.

Title of diploma thesis: The analysis of *Psilocybe* constituents II.

The aim of this thesis was to analyse *Psilocybe* constituents, to plot the places of occurrence of chosen *Psilocybe* brands and also to determinate their water content. The thesis deals with 22 samples that originate in 10 habitats in Slovakia and Moravian–Silesian region. Accuracy of brand specification was supervised by a member of mycological society. *Psilocybe serbica* var. *bohemica* was identified in 2, whereas *Psilocybe semilanceata* in 8 habitats. The average content of H₂O in samples was 87,07 % ± 10,91 %. All of the samples were analysed by LC-MS/MS (LIT) method. The qualitative analysis of determined substances showed the presence of psilocine (PSC) and psilocybine (PSB) in all samples. The results of quantitative analysis (expressed in percentage of dry matter) are similar in particular habitats, but there is a significant difference between two specific brands of *Psilocybe* mushrooms. The content of determined alkaloids in *P. bohemica* was: PSC 0,001-0,011 % and PSB 0,01–0,07%.

P. semilanceata contained 0,0005 – 0,011 % PSC and 0,074 – 0,763% PSB. In the end we can claim that the chosen analytical method LC-MS/MS was proved by the analysis because of the high level of accuracy and specificity. The results of thesis have supported the future optimalization and validation of the analytical method for mushroom samples with the possibility to broaden a number of samples from various habitats in Slovakia.

Keywords:

Psilocybe, psilocine, psilocybine, LC-MS/MS (LIT)

OBSAH

ÚVOD.....	8
I. TEORETICKÁ ČASŤ.....	9
1. Botanická charakteristika	9
1.1 História a objav <i>Psilocybe</i>	9
1.2 Taxonomické zaradenie druhov	10
1.3 Popis druhu.....	11
1.3.1 <i>Psilocybe serbica</i> var. <i>bohemica</i> (Šebek ex Šebek)	11
1.3.2 <i>Psilocybe semilanceata</i> (Fr.) P. Kumm.	12
1.4 Výskyt.....	13
2. Obsahové látky	14
2.1 Psilocybín.....	14
2.2 Psilocín.....	15
2.2.1 Biosyntéza PSC a PSB.....	15
2.3 Baocystín a norbaocystín	16
3. Biologická aktivita.....	16
3.1 Metabolizmus a farmakokinetika.....	16
3.2 Farmakodynamika.....	17
3.3 Časový priebeh intoxikácie.....	17
3.4 Somatický efekt.....	17
3.5 Psychotropný efekt.....	18
3.6 Úskalia užívania psilocybínových húb.....	18
4. Metódy stanovovania PSC a PSB.....	20
4.1 Extrakcia PSC a PSB	20
4.2 Kvalitatívne stanovenie PSC a PSB vo vzorkách húb	20
4.3 Kvantitatívne stanovenie PSC a PSB vo vzorkách húb	21
4.3.1 Príklady analýz PSC a PSB z posledných rokov	22
4.4 Stanovenie PSC a PSB v telových tekutinách a tkanivách	22
5. LC-ESI-MS/MS.....	23
5.1 Kvapalinová chromatografia.....	23
5.2 Hmotnostná spektrometria	24

5.2.1	Ionizácia elektrosprejom.....	25
5.2.2	Iónová pasca (Ion trap)	25
5.3	Spojenie LC-MS/MS.....	26
II.	CIEĽ PRÁCE.....	27
III.	PRAKTICKÁ ČASŤ	28
6.	Laboratórne merania.....	28
6.1	Chemikálie a prístrojová technika.....	28
6.1.1	Použité chemikálie	28
6.1.2	Použitá prístrojová technika.....	29
6.2	Rastlinný materiál	30
6.2.1	Identifikácia húb	30
6.2.2	Zbery <i>Psilocybe</i>	30
6.3	Postup stanovovania.....	34
6.3.1	Príprava vzoriek.....	34
6.3.2	Extrakcia PSC a PSB	36
6.3.3	Podmienky LC-MS/MS	38
IV.	VÝSLEDKY A DISKUSIA	41
7.	Výsledky.....	41
7.1	Obsah PSC a PSB podľa lokalít.....	41
7.2	Obsah PSC a PSB podľa druhov.....	42
8.	Diskusia	43
	ZÁVER	45
	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	46
	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK.....	51
	ZOZNAM OBRÁZKOV	52
	ZOZNAM TABULIEK	53

ÚVOD

Rod *Psilocybe* obsahuje mnohé druhy a variety, zahŕňajúc druhy halucinogénne aj druhy neobsahujúce psychoaktívne látky. Zmienky o užívaní halucinogénnych druhov *Psilocybe* pri náboženských a spirituálnych obradoch sú staré tisícky rokov. V súčasnosti je narastajúcim problémom užívanie psilocybinových húb ako rekreačných drog mládežou. Tento trend je pozorovateľný od neskorých 60-tych rokov a rozšíril sa po publikácii článkov o mexickom druhu *Psilocybe cubensis*.

Spolu s rozšírením všeobecného povedomia o halucinogénnych druhoch *Psilocybe* narástla aj potreba spoľahlivej identifikácie a kvantifikácie obsahových látok zodpovedných za halucinogénny efekt: psilocínu (PSC) a psilocybinu (PSB). Do dnešného dňa bolo uverejnených množstvo publikácií opisujúcich stanovenie psilocybinových alkaloidov. Majorita štúdií je založená na metanolovej extrakcii a následnom stanovení pomocou kvapalinovej chromatografie (LC) v kombinácii s rôznymi druhmi detekčných metód.

V našej práci využívame metanolovú extrakciu s aditívami špecifickými pre PSC a PSB u vybraných druhov *Psilocybe serbica* var. *bohemica* a *Psilocybe semilanceata*. Analytickou metódou voľby je LC-MS/MS (LIT – lineárna iónová pasca).

I. TEORETICKÁ ČASŤ

1. Botanická charakteristika

Rod *Psilocybe* z taxónu bazídiových húb obsahuje mnohé druhy a variety, vyznačujúce sa veľkou rozmanitosťou a širokým geografickým rozšírením v rôznych pásmach celého sveta. Zahŕňa druhy halucinogénne, aj druhy neobsahujúce psychoaktívne látky.

1.1 História a objav *Psilocybe*

Historicky sú psychoaktívne druhy rodu *Psilocybe* pravdepodobne najdôležitejšími hubami v etnomykológii. [1] Prvé zmienky o ich užívaní pri rituálnych náboženských a spirituálnych obradoch sú staré tisíce rokov. Tento fakt potvrdzujú objavy hubových motívov v podobe nástenných malieb pri vykopávkach ruín starobyklých chrámov. [2] Stredoamerické domorodé kmene Mayov a Aztékov patrili medzi prvé, u ktorých bolo užívanie húb potvrdené. Práve pre Aztékov mali huby z rodu *Psilocybe* tak vysokú kultúrnu hodnotu, že boli označované ako „teonacatl“ (mäso bohov). Dnes považuje tieto huby za posvätné len určitá skupina Mexických indiánov a obyvateľov Papui Novej Guinei.

V súčasnosti sú zneužívané najmä mladými ľuďmi ako rekreačné drogy. Tento trend je pozorovateľný od neskorých 60-tych rokov. [3,4]

Napriek užívaniu húb rodu *Psilocybe* od dávnych čias, bol ich výskum iniciovaný až začiatkom 20. storočia. Lekár Wasson v roku 1953 navštívil Mexiko za účelom potvrdenia užívania psychoaktívnych húb v minulosti. Z výskumu vzišiel článok popisujúci jeho vlastnú skúsenosť z požitia halucinogénnych húb, ktorý získal rodu *Psilocybe* svetovú pozornosť. V roku 1955 francúzsky mykológ Heim, prizvaný Wassonom, identifikoval v Mexiku 14 rodov, pričom okrem iných správne určil rod *Psilocybe*, *Conocybe* a *Stropharia*. Identifikácia prebiehala na základe morfológických znakov. [5]

Aktívne látky rodu *Psilocybe* izoloval v roku 1958 Švajčiarsky chemik Albert Hoffmann. Identifikoval a nazval ich psilocybín a psilocín. [5,6]

1.2 Taxonomické zaradenie druhov

Svetová autorita v oblasti *Psilocybe* Gaston Guzmán v roku 1983 vymedzil popisovaný rod a jeho jednotlivé druhy. V súčasnosti je akceptovaných 172 druhov a variet tohto rodu.[7]

Predložená práca pojednáva o druhoch *Psilocybe serbica* var. *bohemica* a *Psilocybe semilanceata*. Vychádza z taxonomického rozdelenia podľa Holca a kol. publikovaného v roku 2012 (Vid' Tabuľka 1). [8]

P. serbica var. *bohemica* (Šebek ex Šebek) bola prvýkrát popísaná z Českej republiky Šebekom v roku 1975, ako varieta druhu *Psilocybe serbica*. Druhový názov *P. bohemica* bol validovaný až v roku 1983. [5,9]

P. semilanceata (Fr.) P. Kumm. v roku 1871 identifikoval a pomenoval Kummer. [10] Od polovice 20. storočia bola popísaná z Austrálie, Thajska, Mexika, Kanady, Nórska, Československa a ďalších Európskych krajín. [7]

Tabuľka 1 Taxonomické zaradenie vybraných druhov *Psilocybe* [8]

	<i>Psilocybe bohemica</i>	<i>Psilocybe semilanceata</i>
Ríša:	Fungi	Fungi
Podríša:	Dikarya	Dikarya
Oddelenie:	Basidiomycota	Basidiomycota
Pododdelenie:	Agaricomycotina	Agaricomycotina
Trieda:	Agaricomycetes	Agaricomycetes
Rad:	Agaricales	Agaricales
Čeľaď:	Strophariaceae	Strophariaceae
Rod:	<i>Psilocybe</i>	<i>Psilocybe</i>
Druh:	<i>serbica</i>	<i>semilanceata</i>
Varieta:	<i>bohemica</i>	

1.3 Popis druhu

1.3.1 *Psilocybe serbica* var. *bohemica* (Šebek ex Šebek)

Český názov: Lysohlávka tajemná česká

Slovenský názov: Holohlavec český

Klobúk veľkosti 15-60 mm, kužeľovitý, neskôr zvonovitý až vyklenutý s tupým hrbolkom. Povrch môže byť mierne slizký, hygrofóbny a priehľadne čiarkovaný. Okraj je rozbrázdnený. Za vlhka má klobúk okrovo až čokoládovo hnedú farbu. Často olivovo až karamelovo hnedý a za sucha farby bielej kávy. V porovnaní s *P. semilanceata* mäsitejší.

Lupene mierne zbiehavé, v mladosti šedé až hnedavé, v dospelosti čokoládovo hnedé s purpurovým nádychom.

Hlúbik o veľkosti 40-120 x 2-5 mm, hrboľatý, sprehybaný. Hore belasý, smerom dole žltavý až hnedý, s bielo vláknitým povrchom. Typicky modrajúci. (Vid' Obrázok 1) Chuť a vôňa red'kovky.

Výtrusný prach tmavo hnedý. Výtrusy 10-15 x 6-7,5 μm , elipsovitého tvaru. [8]

Všeobecne je veľkosť plodníc premenlivá a výrazne závislá na kvalite substrátu. [11]



Obrázok 1 *Psilocybe serbica* var. *bohemica* (foto: autor)

1.3.2 *Psilocybe semilanceata* (Fr.) P. Kumm.

Český názov: Lysohlávka kopinatá

Slovenský názov: Holohlavec končistý

Klobúk o šírke 7-30 mm, štíhle kónický až zvonovitý s výrazným úzkym hrbolkom (tzv. „bradavkou“). Povrch klobúka je hladký, hygrofóbný. Starutím má tendenciu expandovať až k finálnej reflexovanej či rovnej podobe. Za vlhka jemne lepkavý olivovo hnedej farby. Za sucha špinavo žltookrový až svetlohnedý s tmavším centrom a rozbrázdneným povrchom. Často s olivovým, či modro-zeleným nádychom. Pri poškodení má rovnako ako *P. serbica* var. *bohemica* tendenciu k modraniu.

Lupene o šírke 1-3 mm, úzko pripojené až voľné. V mladosti svetlo hnedé, v dospelosti tmavo purpurovo šedohnedé, s belavým, rozstrapkaným ostrím.

Hlúbik 50-120 x 1-3mm, valcovitý, dole mierne rozšírený, pružný. Pri klobúku belavý, smerom dole svetlo okrový až svetlohnedý. Povrch bielo vláknitý, pri poškodení typicky modrajúci. (Vid' Obrázok 2)

Chuť a vôňa reďkovky.

Výtrusný prach červenkastý až purpurovo hnedý. Výtrusy o veľkosti 10,5-15 x 6,5-8,5µm, elipsovité, hrubostenné. [8,12]



Obrázok 2 *Psilocybe semilanceata* (foto: autor)

1.4 Výskyt

Rod *Psilocybe* je charakteristický okrem modrajúcej dužiny u psychoaktívnych druhov aj svojim výskytom. Patria tu jednak druhy endemické, tak aj druhy so širokým zastúpením v tropickom, subtropickom aj miernom pásme celého sveta. (Vid' Obrázok 3 Rozšírenie rodu *Psilocybe*).

Psilocybe serbica var. *bohemica* môžeme označiť za endemit Západnej Európy, vyskytujúci sa najmä na území Českej, Slovenskej republiky a Rakúska. Rastie na zbytkoch dreva. Nájdeme ho v opadaných listnatých a zmiešaných lesoch, v roklinách a údoliach potokov. Od nížin až do podhorí. Najmä na vlhkých a človekom vytvorených stanovištiach ako sú botanické záhrady, parky či cintoríny. Rastie v jesenných mesiacoch, často s prvým ranným mrazom. [8,13]

Naproti tomu *Psilocybe semilanceata* je druh, ktorého výskyt bol potvrdený na viacerých kontinentoch. Je rozšírený v mnohých regiónoch Európy s chladným severským aj miernym podnebím. Výskyt bol tiež zaznamenaný v Amerike, Austrálii či Ázii. Často ich nachádzame v kolóniách (spoločenstvách) v tráve a machu, na lúkach, pastvinách oviec či kráv, ďalej tiež na okrajoch ciest a lesov. Všeobecne uprednostňujú piesočné pôdy chudobnejšie na živiny. Nájdeme ich od nížin až do vysokých polôh. Výskyt je spájaný s trsmi metlice trsnatej (*Deschampsia cespitosa*). Rastie typicky medzi VII-XI mesiacom. [8,12]



Obrázok 3 Rozšírenie rodu *Psilocybe* zdroj: [3]

2. Obsahové látky

Hlavnými účinnými látkami vyššie popisovaných druhov rodu *Psilocybe* sú indolové alkaloidy psilocín (PSC) a psilocybín (PSB), ďalej ich deriváty baocystín a norbaocystín. Okrem rodu *Psilocybe* boli identifikované aj v rodoch *Inocybe*, *Conocybe*, *Panaeolus* a ďalších. Huby rodu *Psilocybe* obsahujú približne 89 ± 2 % vody. [14]

Drogy obsahuje čerstvá alebo sušená stielka. [15]

Celkový obsah alkaloidov v hubách je v rozmedzí 0,2 – 1%. Záleží na druhu, vývojovom štádiu pri zbere, podmienkach prostredia, type pôdy, skladovaní či na extrakčnej metóde. [14,16]

Obsah alkaloidov je rozdielny v rôznych častiach tela huby. Klobúk obsahuje viac psilocybínu ako hlúbik. Vo všeobecnosti je obsah PSB podstatne vyšší ako obsah PSC. [17]

V čistej forme je PSC aj PSB biely kryštalický prášok. Z fyzikálnych vlastností je pre ne typická rozpustnosť v polárnych rozpúšťadlách (metanol, etanol). PSB je rozpustný vo vode, zatiaľ čo PSC je viac rozpustný v tukoch. Vo forme roztoku sú nestabilné na svetle, naopak ich stabilita stúpa s klesajúcim dopadom svetla a znižujúcou sa teplotou. Odporúčané skladovanie je preto v tme pri nízkych teplotách. [16]

Štruktúrne sú obsahové látky príbuzné ostatným prirodzene sa vyskytujúcim derivátom tryptamínu: serotonínu, bufotenínu a melatonínu, a niektorým alkaloidom vykazujúcim psychotropný účinok: harmin, harmalin, reserpin či LSD. Podobnosť s LSD nie je len štruktúrna, ale vykazuje aj široké spektrum zhodných účinkov na organizmus. Na rozdiel od psilocybínu je LSD asi 45x účinnejšie. [4]

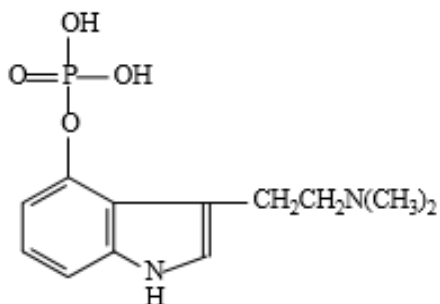
2.1 Psilocybín

Chemický názov: 4-fosforyloxy-N,N-dimetyltryptamín

Súhrnný vzorec: $C_{12}H_{17}N_2O_4P$ (Vid' obrázok 4)

M_r : 284.248 g/mol [18]

PSB predstavuje hlavný psychoaktívny alkaloid obsiahnutý v halucinogénnych hubách. Je pomerne stabilný, jeho množstvo sa významne nemení pri sušení ani pri dlhšom skladovaní. Štúdie dokázali, že PSB je obsiahnutý v plodnici, ale mycélium PSB neobsahuje. [14,15]



Obrázok 4 Psilocybin [17]

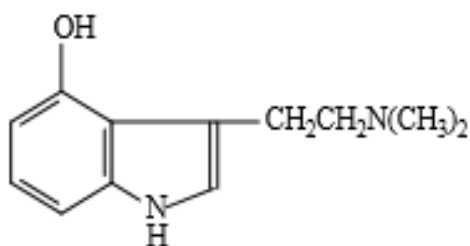
2.2 Psilocin

Chemický názov: 4-hydroxy-N,N-dimetyltryptamín

Súhrnný vzorec: $C_{12}H_{16}N_2O$ (Vid' Obrázok 5)

Mr: 204,268 g/mol [19]

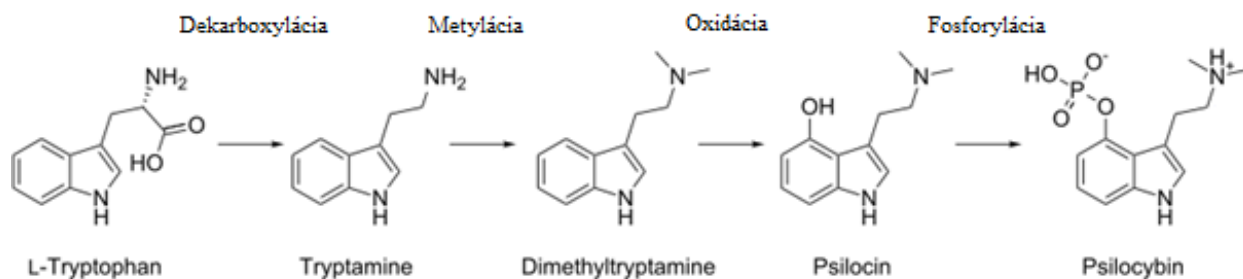
Psilocin vzniká defosforyláciou psilocybinu po požití. Za rovnakých podmienok vykazuje v porovnaní s PSB nižšiu stabilitu. [4]



Obrázok 5 Psilocin [17]

2.2.1 Biosyntéza PSC a PSB

Indolové alkaloidy PSC a PSB sú odvodené od L-tryptofánu. Jedna z možných ciest biosyntézy hovorí, že psilocin pravdepodobne vzniká dvomi metylačnými reakciami amínového dusíku a hydroxyláciou indolového skeletu. Z neho následne po fosforylácii hydroxylovej skupiny vzniká psilocybin. [20] (Vid' Obrázok 6) Intermediárne kroky tejto reakcie sú stále špekulatívne.



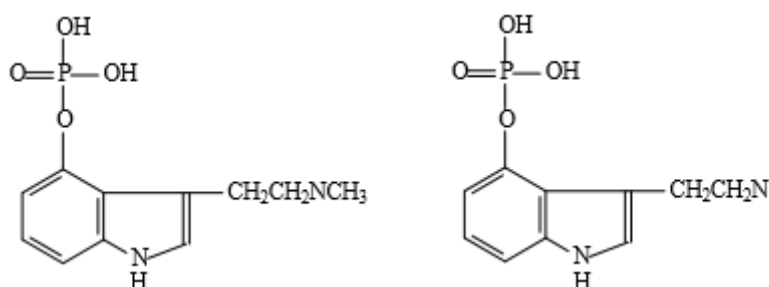
Obrázok 6 Biosyntéza psilocybínu [21]

2.3 Baocystín a norbaocystín

Súhrnný vzorec: $C_{11}H_{15}N_2O_4P$ / $C_{10}H_{13}N_2O_4P$

M_r : 270.222 g/mol / 256.195 g/mol [22,23]

Látky líšiace sa od psilocybínu len stratou jednej (baocystín) alebo dvoch (norbaocystín) metylových skupín na terminálnej amino skupine. Potenciálny halucinogénny účinok stále nebol preukázaný. (Vid' Obrázok 7)



Obrázok 7 Baocystín (vľavo) a norbaocystín (vpravo) [18]

3. Biologická aktivita

3.1 Metabolizmus a farmakokinetika

Po požití je psilocybin rapídne defosforylovaný na psilocin alkalicou fosfatázou v čreve. Psilocin môžeme označiť ako hlavný aktívny metabolit. Následne prebieha glukuronidácia endoplazmatickým enzýmom UGT-glukuronosyltransferázou na

psilocin-O-glukuronid. V tejto forme je psilocín z 80% vylúčený z organizmu. Takmer uniformne je distribuovaný do všetkých tkanív organizmu, vrátane mozgového. Majoritné množstvo je močom exkretované do 8, zbytok do 24 hodín. [6,16]

V ľudskej plazme je psilocybín detekovateľný po 20-40 minútach od orálneho požitia. Psilocín po 30 minútach. Maximálna hladina je vykazovaná po 80-105 minútach. Preukázateľná je do 6 hodín. [6]

3.2 Farmakodynamika

Psilocybín a najmä psilocín predominantne pôsobia ako agonisti serotonergných receptorov. Psilocín tvorí vysokoafinitné väzby s receptormi 5-HT_{2A} a 5-HT_{1A}. Tento vzťah je označovaný ako nevyhnutný pre prejav halucinogénneho efektu. V menšej miere bola preukázaná jeho afinita k dopamínovým receptorm D₁ a D₃. [6,16]

Štúdie dokazujú, že 5-HT_{2A} je spojený s mnohými signálnymi cestami, avšak konkrétne signálne dráhy zodpovedné za charakteristické účinky opisovaných psychoaktívnych látok neboli doposiaľ identifikované. [24]

3.3 Časový priebeh intoxikácie

Začiatok psychostimulačného efektu pozorujeme po orálnom užití zvyčajne do 40 minút s maximom okolo 60-90 minút (efekt sa objavuje pri dávke nad 15 mg psilocybinu prijatého orálne). Doba intoxikácie je stanovená na 4-6 hodín. Väčšina príznakov vymizne medzi 6-8 hodinami, ostatné do 24 hodín. Po i.v. podaní sa efekt objavuje do 1-2 minút s maximom okolo 5 minút a trvaním do 20 minút. [16]

3.4 Somatický efekt

Psilocybín vykazuje charakteristické prejavy stimulácie sympatiku – mydriáza, zvýšenie tlaku a srdečnej aktivity (závislé na dávke). Z ďalších prejavov je to nauzea, tremor, slabosť, zvracanie, spavosť, neostré videnie a parestézia. Nebol zaznamenaný žiadny efekt na teplotu tela. Psilocybín neovplyvňuje iónovú rovnováhu organizmu, hladinu glukózy ani cholesterolu. Zvyšuje hladinu prolaktínu a vo vysokých dávkach hladinu kortikotropných hormónov. [16,25]

3.5 Psychotropný efekt

Už od dávnych čias je rod *Psilocybe* spájaný s mystickými a spirituálnymi zážitkami. Veľmi malé dávky ovplyvňujú psychický stav v podobe ospalosti či zvýraznenia súčasnej nálady. Vyššie dávky evokujú silné psychedelické zážitky. Povznesená nálada, poruchy vnímania, pocity snenia, halucinácie (vizuálne, sluchové). Časté sú zmeny vnímania vlastného tela ako parestézie vo forme chvenia až trpnutia končatín, pocit zväčšenia či zmenšenia objemu tela. Zmeny vizuálneho vnímania jasu a teploty farieb. Depersonalizácia a derealizácia, skreslené vnímanie času a priestoru, porucha pozornosti a neschopnosť koncentrácie patria medzi sprievodné javy. Typický je somatický pocit otupenia. Niekedy dochádza k rapídny zmenám nálady v priebehu intoxikácie – euforický stav sa mení na pocity strachu, nervozity až depresie. [16,26]

3.6 Úskalia užívania psilocybínových húb

Rod *Psilocybe* a jeho obsahové látky nevyvolávajú kompulzívne správanie spojené s vyhľadávaním drogy. Nebola preukázaná fyzická ani psychická závislosť spojená s psilocybínovými hubami.

Napriek tomu sú niekedy užívané takým spôsobom, ktorý ohrozuje bezpečnosť jednotlivca aj iných osôb (napríklad pri riadení auta po požití *Psilocybe*). Aj keď psilocybínové halucinogény vykazujú relatívne nízku fyziologickú toxicitu, existujú psychologické riziká. Najpravdepodobnejšie je riziko známe ako tzv. „bad trip“, charakteristické pocitmi úzkosti, strachu, paniky alebo paranoje. Vnemy môžu byť rôzne: zmyslové (napr. desivé ilúzie), somatické (rušivé vnímanie fyziologických procesov), alebo psychologické (strach o život). Vzhľadom k tomu, že psilocybín často umocňuje existujúcu náladu, ktorýkoľvek zo spomínaných účinkov môže potenciálne vyústiť v nebezpečné správanie. Vzácnne končí „bad trip“ smrťou ako napríklad skočením z budovy a podobne.

Ďalším potenciálnym rizikom je dlhodobá psychóza trvajúca dni až mesiace. Zo štúdií vyplýva, že jedinci, u ktorých boli psychotické stavy zaznamenané, mali predispozíciu k duševnej chorobe už pred požitím psilocybínových halucinogénov. Nie je však známe, či by sa psychóza nevyhnutne objavila aj pri absencii psilocybínu. Perzistujúca porucha vnímania je tiež považovaná za potenciálne riziko, avšak jej spojitosť s psilocybínovými halucinogénmi nebola potvrdená. Často je zamieňaná

s pojmom „flashback“, ktorý popisuje krátky vnem pripomínajúci akútny účinok halucinogénov. Tento vnem popisuje malé percento užívateľov. Nebýva nimi však považovaný za znepokojujúci či klinicky významný. [26]

Tabuľka 2 Zhrnutie biologických účinkov psilocybínových húb [27]

Intoxikácia	PSB
Časový priebeh	Doba nástupu účinku: min – 1h Trvanie psychózy: 4-6h Vrchol intoxikácie: 2-3h
Somatické znaky	↑ srdečnej frekvencie a tlaku, mydriáza, nauzea, potenie, triaška, excitácia, možné sklony k agresívnemu správaniu
Poruchy vnímania	Ilúzie, halucinácie, ornamentalizácia objektov, tendencia k pareidolií
Emocionálne poruchy	Eufória, smiech až excitované stavy-dysfória-úzkosť, plačlivosť-silnejšia depresia-panická úzkosť
Poruchy myslenia	Paranoidné bludy, podráždenosť, perzekučné mánie, nesúvislé myslenie
Poruchy pamäte	Zmätenosť, stavy delýria
Poruchy úsudku	Značné poruchy vnímania a určovania času a priestoru
Poruchy pozornosti	Poruchy koncentrácie
Osobnostné poruchy	Depersonalizácia a derealizácia
Poruchy vedomia	Somnolencia, vo vyšších dávkach sopor až kóma
Špecifické znaky	Poruchy základných inštinktov: sebadeštruktívne znaky, samovražedné sklony

4. Metódy stanovovania PSC a PSB

Zneužívanie húb rodu *Psilocybe* ako zdroja „spirituálnych zážitkov“ je dôvodom prehlásenia psilocybínu za drogu. Dnes patrí medzi kontrolované zložky. Stúpla preto potreba spoľahlivej identifikácie a kvantifikácie psilocybínových alkaloidov nie len vo vzorkách húb, ale aj v telových tekutinách a tkanivách. [28]

4.1 Extrakcia PSC a PSB

Ako už bolo uvedené, psilocín a psilocybín sú látky rozpustné v polárnych rozpúšťadlách (metanol, etanol,..). Najviac využívaným extrakčným činidlom je preto metanol. Konkrétne je to extrakcia miešaním sušených a homogenizovaných vzoriek húb s metanolom, vytrepávanie do metanolu či ultrasonikácia. [17] Kysilka a Wurst v roku 1990 uverejnili nové extrakčné metódy pre psilocín a psilocybín vo vzorkách *P.bohemica*. Zistili, že PSC a PSB sú najlepšie extrahovateľné samostatne. Konkrétne psilocybín v 75% metanole saturovanom dusičnanom draselným a psilocín 75% etanolom. Autori neštudovali, či samotná extrakcia psilocínu má vplyv na obsah psilocybínu v rovnakej vzorke. Je otázne, či vysoký obsah psilocínu stanoveného vo vzorkách nie je artefakt hydrolytického štiepenia psilocybínu na psilocín fosfatázami. [29]

Čas extrakcie sa v štúdiách líši od 2 minút do 24 hodín. Pre mnohé odlišnosti je nutné vyzdvihnúť potrebu podrobnejšieho skúmania nielen zloženia extrakčných činidiel a času extrakcie, ale aj preanalytických podmienok vplývajúcich na celý proces stanovovania. [17]

4.2 Kvalitatívne stanovenie PSC a PSB vo vzorkách húb

V prvých rokoch po objavení PSC a PSB bola screeningovou metódou papierová chromatografia (PC). V súčasnosti je preferovanou metódou pre detekciu PSC a PSB tenkovrstevná chromatografia (TLC), ktorá ponúka možnosť využitia špecifických detekčných činidiel.

Spoločné detekčné činidlo indolových alkaloidov pre PC aj TLC je 4-dimetylaminobenzaldehyd (DMAB), zvyčajne v kombinácii s kyselinou

chlorovodíkovou. Ďalšie detekčné činidlá sú diazotovaná kyselina sulfanilová či alkalický roztok Fast Blue B.

Z non-chromatografických metód patrí do tejto kategórie hmotnostná spektrometria (MS), tandemová hmotnostná spektrometria (MS/MS), ultrafialová (UV) a infračervená spektroskopia (IR) a kvapalinová chromatografia (LC) v kombinácii s MS/MS, ktorá vykazuje výrazne vyššiu špecifitu a presnosť. [17]

4.3 Kvantitatívne stanovenie PSC a PSB vo vzorkách húb

Pre kvantifikáciu PSC a PSB sú v doterajších výskumoch opisované najmä chromatografické metódy. Najpoužívanejšou metódou je vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC) na normálnej aj reverznej fáze. Pre možnú kontamináciu ko-extrahovanými polárnymi látkami a nižšiu reprodukovateľnosť si normálna fáza nezískala v oblasti kvantifikácie PSB popularitu. Viac opisovaná bola reverzná fáza (napr. C18). Nevýhodou v tomto prípade je hydrofóbná povaha reverznej fázy. Psilocybín je tu málo zadržovaný a má tendenciu interferovať s inými, vo vode rozpustnými nečistotami. Simultánna analýza PSC a PSB je obtiažna, z dôvodu ich rozdielnej polarizácie. Problém môže byť odstránený pomocou gradientovej elúcie alebo dvoch rôznych roztokov MF.

Plynová chromatografia (GC) je pre kvantitatívne stanovenie PSC a PSB používaná menej. PSC a PSB sú termolabilné, preto vzorky vyžadujú derivatizáciu. Napr. silylácia alebo derivatizácia činidlom N-Methyl-N-trimethylsilylfluoroacetamidom (MSTFA), ako opísal pri kvantifikácii PSB vo vzorkách *P.subcubensis* Guzmán v roku 1998. [30] Pedersen-Bjergaard v roku 1997 aplikoval pre stanovenie obsahu PSB v *P.semilanceata* kapilárnu zónovú elektroforézu (CZE). Aj keď sa zdá, že metóda môže byť alternatívou k HPLC, nevýhodou je nemožnosť súčasného stanovenia PSC a PSB. [28] PSC aj PSB dobre absorbujú v oblasti UV. Pre monitorovanie látok separovaných na kolóne je bežne používaná ultrafialová spektrofotometria. Z moderných metód je to MS. [17]

4.3.1 Príklady analýz PSC a PSB z posledných rokov

V roku 2000 Mushoff a kol. uverejnili štúdiu o obsahu PSC a PSB z materiálu skonfiškovaného na nemeckom trhu. Stanovenie psilocybínových alkaloidov pozostávalo z extrakcie metanolom v ultrazvukovej lázni a analýzy metódou HPLC s využitím UV detekcie (Vid' Tabuľka 3).

Tabuľka 3 Výsledný obsah alkaloidov (v percentách na sušinu)

	Obsah PSC (%)	Obsah PSB (%)
<i>Psilocybe cubensis</i>	0,01 – 0,23	0,00 – 1,07
<i>Psilocybe semilanceata</i>	0,01 – 0,90	0,01 – 0,91

[31]

V roku 2003 českí vedci Stříbrný, Borovička a Sokol uviedli štúdiu o vybraných druhoch *Psilocybe* a ich obsahových látkach. Bola využitá metanolová extrakcia a analytickou metódou voľby bola GC-MS (Vid' Tabuľka 4).

Tabuľka 4 Výsledný obsah alkaloidov (v percentách na sušinu):

	Obsah PSC (%)	Obsah PSB (%)
<i>Psilocybe bohemica</i>	0,742	0,464
<i>Psilocybe semilanceata</i>	0,158	0,311
<i>Psilocybe arcana</i>	0,340	0,457

[32]

V diele *Medical toxicology of drug abuse* z roku 2012 autori uvádzajú experimentálne stanovený obsah PSB *P.semilanceata* 0,98% a *P.bohemica* 0,85% sušiny. Obsah PSC *P.bohemica* bol 0,02 % a v *P.semilanceata* nebol PSC zaznamenaný. [14]

4.4 Stanovenie PSC a PSB v telových tekutinách a tkanivách

Psilocybínové drogy sú stanovované v sére, plnej krvi a v moči rôznymi analytickými metódami. Pre kvantifikáciu internej dávky halucinogénov je potrebné najskôr enzymaticky rozštiepiť psilocínové konjugáty, následne extrahovať aktívne

látky, a podľa použitej analytickej metódy previesť derivatizáciu. Ideálnu metódu pre stanovenie psilocybinu a psilocínu v rôznych biologických tekutinách predstavuje LC, často v kombinácii s MS. Detekcia pomocou GC-MS je rovnako ako v prípade kvantifikácie obsahových látok hubových vzoriek obtiažna. [17]

V moči je možné stanovenie PSC vďaka hlavnému exkrečnému metabolitu – psilocín glukuronidu. Po hydrolýze metabolitu stanovujeme PSC pomocou LC-MS metódy. V roku 2003 Kamata zverejnil metódu hydrolýzy psilocín glukuronidu (PCG) za pomoci *E.coli* β -glukuronidázy, ktorá dosiahla kompletnú hydrolýzu PCG po 2 hodinách za stanovených podmienok. Týmto spôsobom bolo stanovených 3,55 μ g PSC/ml moču, pričom bez hydrolýzy nebol psilocín zaznamenaný vôbec. [33]

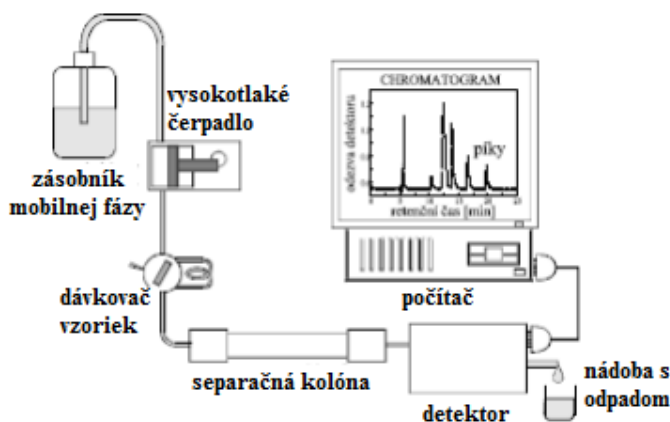
5. LC-ESI-MS/MS

5.1 Kvapalinová chromatografia

Kvapalinová chromatografia (LC) je separačná metóda, pri ktorej sa látky rozdeľujú medzi 2 navzájom nemiesiteľné fázy: pohyblivú (mobilnú, MF) fázu a nepohyblivú (stacionárnu, SF) fázu na základe fyzikálne-chemických interakcií. Najpoužívanejšou a najrozšírenejšou chromatografickou metódou vôbec je vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC). Umožňuje analýzu až 80 % všetkých známych látok, ktoré sa podstatne líšia vlastnosťami ako napr. polarita, prchavosť, teplotná stabilita a iné. Mobilnou fázou je v tomto prípade kvapalina a stacionárnou fázou sú častice sorbentu prichytené na pevný podklad. Medzi uvedenými fázami dochádza v priebehu separácie k opakovanému vytváraniu rovnovážnych stavov delených látok, pričom látky unášané MF sú selektívne zadržované v SF a tým dochádza k rozdeleniu zložiek zmesi. Kvalitatívnym údajom o analyte je retenčný čas – čas, po ktorý je analyt zadržovaný v SF. [34]

Vysoká účinnosť je dosiahnutá použitím SF s malými časticami (rádovo v μ m) pravidelného tvaru a veľkosti, ktoré homogénne vypĺňajú chromatografickú kolónu. (Vid' Obrázok 8) Prietok mobilnej fázy je zaistený vysokým tlakom (desiatky MPa). Metóda vyžaduje malé množstvo vzorky (μ l). Separáciu látok môžeme ovplyvňovať zložením mobilnej fázy, ktorá interaguje s analyzovanými látkami a tým sa významne podieľa na separácii.

Výhodou HPLC je jej široké uplatnenie, rýchlosť analýzy, minimálne množstvo vzorky, automatizácia. [34,35] V našej práci využívame chromatografickú separáciu na reverznej fáze (mobilná fáza je polárnejšia ako stacionárna) s gradientovou elúciou.

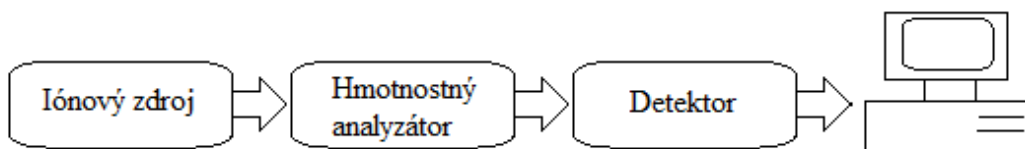


Obrázok 8 Schéma kvapalinového chromatografu [zdroj: *Výukový materiál Ostravskej univerzity, Instrumentální metody v biochemii. Úpravy: autor*]

5.2 Hmotnostná spektrometria

Hmotnostná spektrometria (MS) je fyzikálne-chemická metóda slúžiaca na určovanie hmotnosti atómov, molekúl a ich častí po ich prevedení na kladné a záporné ióny. Stanovuje relatívnu početnosť iónov v závislosti na pomere hmotnosti a náboja (m/z). Poskytuje informácie o kvalitatívnom a kvantitatívnom zložení organických a anorganických látok, štruktúre a zložení povrchov, či zastúpení izotopov. [35,36]

Hmotnostný spektrometer pozostáva z troch hlavných častí. (Vid' Obrázok 9) Prvou je iónový zdroj, ktorý prevádza neutrálne molekuly analytu na nabité častice. Podľa množstva energie dodanej iónovým zdrojom delíme ionizačné techniky na mäkké, pri ktorých je dodaná energia dostatočujúca na ionizáciu, ale molekuly nefragmentuje (napr. ionizácia elektrosprejom, chemická ionizácia, a iné) a tvrdé, kedy vysoká dodaná energia vedie k rozsiahlej fragmentácii molekuly (elektrónová ionizácia). Hmotnostný analyzátor slúži ako disperzný prvok a umožňuje rozdeliť zmes iónov produkovaných iónovým zdrojom o rôznych pomeroch m/z v priestore alebo čase. Detektor poskytuje analógový signál priamo úmerný počtu dopadajúcich iónov z hmotnostného analyzátoru. Signál je následne prevedený do počítača a vhodným programovým vybavením je spracovaný do formy hmotnostných spektier. [35] V našej práci je použitá ionizácia elektrosprejom, kedy sú separované analyty z kolóny vedené priamo do kovovej kapiláry ESI. Hmotnostný analyzátor voľby je LIT.



Obrázok 9 Schéma hmotnostného spektrometra (zdroj: autor)

5.2.1 Ionizácia elektrosprejom

Ionizácia elektrosprejom (ESI) patrí medzi mäkké techniky ionizácie. V súčasnosti je najpoužívanejším iónovým zdrojom pre kombináciu s LC. Analyt rozpustený vo vhodnom eluente je privedený do iónového zdroja tenkou kovovou kapilárkou, na ktorú je vložené napätie 3-5 kV. Na výstupe z kapiláry vplyvom elektrického poľa medzi kapilárkou a uzemnenou protielektródou vznikajú drobné kvapôčky kvapalnej fázy s vysokou hustotou povrchového náboja. Tie sú vysušené protiprúdom inertného plynu, najčastejšie dusíkom o teplote asi 200 °C. Mechanizmom iónového vyparovania prechádzajú disociované látky do plynnej fázy a vzniknuté ióny sú vedené štrbinou do hmotnostného analyzátoru. V procese vznikajú kladne a záporne nabité ióny v závislosti na polarite napätia vloženého na protielektródu. [35]

5.2.2 Iónová pasca (Ion trap)

Iónová pasca je hmotnostný analyzátor, ktorý pomocou striedavého elektrického poľa umožňuje uzatvoriť ióny v ohraničenom priestore. Pozostáva zo vstupnej a výstupnej elektródy s hyperbolickým prierezom a z prstencovej stredovej elektródy. Krajné elektródy sú uzemnené a na stredovú elektródu je privádzané vysokofrekvenčné napätie s premennou amplitúdou. Pri vstupe analyzovaných iónov je na stredovú elektródu privádzané striedavé napätie o malej amplitúde, ktoré umožňuje udržanie iónov o širokom rozsahu hmotností na stabilných dráhach a ich akumuláciu v priestore iónovej pasce. Následne je zvyšovaná amplitúda striedavého napätia. S rastúcou hodnotou amplitúdy sú ióny s rastúcim m/z postupne vypudzované z pasce cez otvor výstupnej elektródy do detektoru. Dnes je iónová pasca využívaná najmä v spojení LC-MS, a to aj pre analýzy vysokomolekulárnych látok. [35]

5.3 Spojenie LC-MS/MS

Základným predpokladom úspešného spojenia tandemovej hmotnostnej spektrometrie s kvapalinovou chromatografiou je účinné odstránenie zložiek mobilnej fázy pred vlastnou ionizáciou. Sprejové ionizačné techniky typu elektrospreja sú uspokojené pre prácu s kvapalnou fázou, preto sú pri kombinácii LC/MS metódami prvej voľby.

Tandemová hmotnostná spektrometria (MS/MS) združuje dvojicu hmotnostných analyzátorov spojených kolíznou celou. V prvom je voľbou intenzity magnetického poľa vybraný ión o určitej m/z (materský ión), ktorý je následne fragmentovaný v kolíznej cele. Vzniknuté fragmenty (dcérske ióny) sú podľa pomeru m/z rozdelené v druhom hmotnostnom analyzátore a následne detekované. V súčasnosti je použitie LC-MS/MS pri podrobnejších štruktúrnych štúdiách nutnosťou. [35]

II. CIEĽ PRÁCE

- Zmapovanie výskytu vybraných druhov húb rodu *Psilocybe* na území Slovenskej republiky a Moravskoslezského kraja
- Určenie druhu *Psilocybe*
- Stanovenie obsahu vody vo vzorkách *Psilocybe*
- Popis a porovnanie lokalít zberu
- Porovnanie obsahu PSC a PSB v rámci území SR a Moravskoslezska
- Porovnanie obsahu PSC a PSB v rôznych druhoch *Psilocybe*

III. PRAKTICKÁ ČASŤ

6. Laboratórne merania

6.1 Chemikálie a prístrojová technika

6.1.1 Použité chemikálie

Extrakcia PSC

- Dichlormethane PESTANAL ® (FLUKA)
- Ethyl acetate LC-MS CHROMASOLV ® (FLUKA)
- Sodium hydroxide p.a. (MERCK MILLIPORE)
- Destilovaná voda (prístroj MILLI-Q-POD ® (MERCK MILLIPORE)

Extrakcia PSB

- Ethyl acetate LC-MS CHROMASOLV® (FLUKA)
- Methanol LC-MS CHROMASOLV® (FLUKA)
- Ammonium hydroxide 25-29% (PENTA)
- Dihydrogenfosforečnan draselný p.a. EMSURE® (MERCK MILLIPORE)
- Destilovaná voda (prístroj MILLI-Q-POD ® (MERCK MILLIPORE)

LC-MS

- (DIPT) 4-Acetoxy–N,N-diisopropyltryptamine hydrochloride LGCFOR 1275,28 (LGC GmbH) – interný štandard (IS)
- Methanol LC-MS CHROMASOLV® (FLUKA) – rozpustenie IS
- (MFA) Formic acid LC-MS puriss p.a. for mass spectroscopy (FLUKA)
- (MFB) Acetonitrile LC-MS CHROMASOLV®(FLUKA)
- Destilovaná voda prístrojom MILLI-Q-POD ® (MERCK MILLIPORE)

6.1.2 Použitá prístrojová technika

Sušenie húb

- Jemný štetec
- Laboratórne kliešte
- Laboratórne váhy KERN 440-49N (predvážka)
- Analytické váhy HR-120 (HELAGO)
- Termostat MEMMERT model 400 (MEMMERT)
- Horúcovzdušný sterilizátor HS 31A

Analýza obsahových látok

- Kónické extrakčné skúmavky
- Analytické váhy BC100 (BOECO Germany)
- Odparka Digital dry bath, Model: NDK 200-2 (LABICOM s.r.o.)
- Centrifúga Hettich® Universal 320/320R
- Pipety Thermo Scientific™ Finnpiptette™ F1
 - objemy: 10-100 µl
 - 0,5-5 ml
 - 100-1000 µl
- Otáčavá trepačka Heto MasterMix, Type MMV 14
- Ultracentrifúga Hemrle, program 03
- LC
 - Kolóna Hypersil GOLD , katalógové číslo 25005 – 152130 (Thermo Scientific)
 - Pumpa: Rheos 2200 (FLUX Instrument)
 - Autosampler: HTS PAL (CTC ANALYTICS AG)
 - Termostat sampleru CTC ANALYTICS AG (Schwitzerland)
- MS: LTQ XL (Thermo Fisher Corporation)

6.2 Rastlinný materiál

Analyzovaný materiál tvorili vzorky *Psilocybe serbica* var. *bohemica* a *Psilocybe semilanceata* zozbierané z rôznych lokalít (Vid' Obrázok 12).

6.2.1 Identifikácia húb

Identifikácia a diferenciacia druhov *Psilocybe* prebiehala za pomoci člena mykologickej spoločnosti Mgr. Jána Wiplera, pracujúceho na Oddelení klinickej mikrobiológie Fakultnej nemocnice v Hradci Králové.

6.2.2 Zbery *Psilocybe*

Zbery prebiehali v jesenných mesiacoch roku 2014 a 2015 na území Slovenskej republiky a Moravskoslezského kraja. Celkovo bolo nazbieraných a identifikovaných 22 vzoriek z 10 rôznych lokalít. (Vid' Obrázok 10 a 11) V jednej lokalite bolo odobraných viacero vzoriek z rôznych nálezísk, pričom minimálna vzdialenosť nálezísk v rámci 1 lokality bola 15-20 m. (Vid' Tabuľka 5)

Množstvo a kvalitu odobraných vzoriek ovplyvnilo rôznorodé počasie pri zbere. (Vid' 6.3.1 Príprava vzoriek)



Obrázok 10 Zber *Psilocybe semilanceata*, Čertovica (foto:autor)



Obrázok 11 Zber *Psilocybe bohemica*, Ostrava (foto: autor)

Priebeh zberu

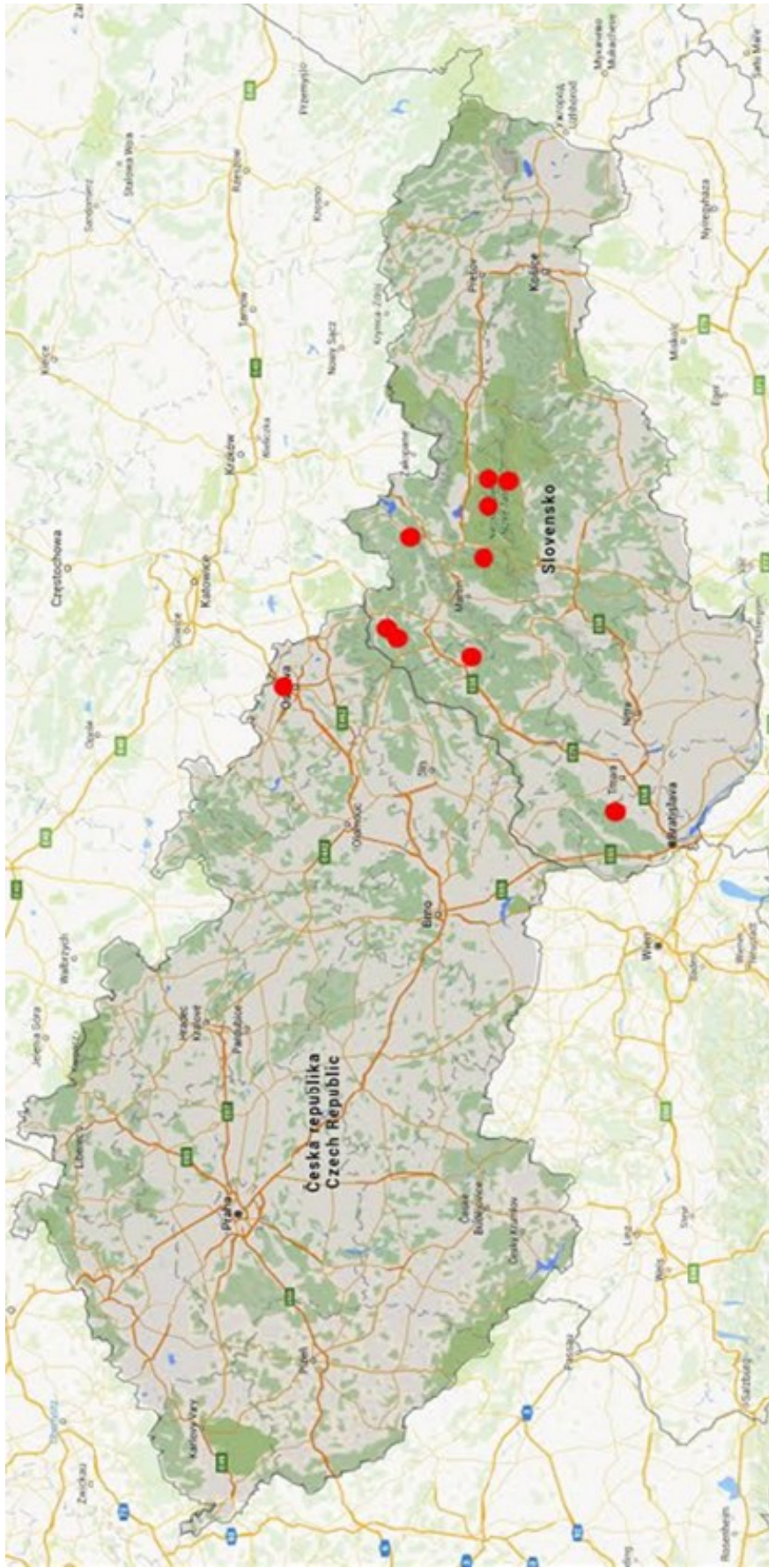
Každé nálezisko bolo zaznamenané prostredníctvom GPS súradníc, spolu so zápisom počasia a nadmorskej výšky danej lokality. (Vid' Tabuľka 5 a 7) Ihneď po zbere boli vzorky zvážené na prenosných váhach KERN 440-49N. Následne boli jednotlivé vzorky uložené do termosky a transportované. V prípade, že nebolo možné vzorky do 3 hodín (v závislosti na vzdialenosti náleziska) transportovať na Katedru farmaceutickej botaniky a ekológie UK v Hradci Králové na ďalšie spracovanie, boli vzorky uchovávané v termoske pri chladničkovj teplote (2-8°C).

Tabuľka 5 Náleziská rodu *Psilocybe*

	Dátum	Miesto	Druh
1	23.11.2014	Moravskoslezské beskydy, Ostrava	PB
2	23.11.2014	Moravskoslezské beskydy, Ostrava	PB
3	23.11.2014	Moravskoslezské beskydy, Ostrava	PB
4	5.12.2014	Moravskoslezské beskydy, Ostrava	PB
5	5.12.2014	Moravskoslezské beskydy, Ostrava	PB
6	26.9.2015	Malá Fatra, Martinské hole	PS
7	26.9.2015	Malá Fatra, Martinské hole	PS
8	3.10.2015	Nízke Tatry, Jasná	PS
9	3.10.2015	Nízke Tatry, Jasná	PS
10	4.10.2015	Veľká Fatra, Smrekovica	PS
11	4.10.2015	Veľká Fatra, Smrekovica	PS
12	2.10.2015	Oravská Magura, Hruštín	PS
13	17.10.2015	Javorníky, Dlhá n. Kysucou	PS
14	17.10.2015	Javorníky, Dlhá n. Kysucou	PS
15	17.10.2015	Javorníky, Dlhá n. Kysucou	PS
16	17.10.2015	Javorníky, Podvysoká	PS
17	17.10.2015	Javorníky, Podvysoká	PS
18	31.10.2015	Nízke Tatry, Čertovica	PS
19	31.10.2015	Nízke Tatry, Čertovica	PS
20	31.10.2015	Nízke Tatry, Nižná Boca	PS
21	17.11.2015	Malé Karpaty, Červený Kameň, Častá	PB
22	17.11.2015	Malé Karpaty, Červený Kameň, Častá	PB

Legenda :

PB	<i>Psilocybe bohemica</i>
PS	<i>Psilocybe semilanceata</i>



Obrázok 12 Mapa nálezísk *Psilocybe*

6.3 Postup stanovovania

Zozbieraný a správne uchovaný materiál prešiel procesom prípravy vzoriek: analýzou obsahu H_2O vo vzorkách, sušením a rozotrením v trecej miske. Následne prebehla extrakcia a stanovenie účinných látok pomocou LC-MS/MS (LIT).

6.3.1 Príprava vzoriek

Sušenie

Po transporte vzoriek na katedru bola každá vzorka očistená jemným štetcom od drobných nečistôt a rozdelená na 2 časti:

1. Časť určená na analýzu obsahových látok: vzorky sušené v termostate nastavenom na max. teplotu $35^{\circ}C$ do úplného vysušenia. Následne boli vzorky rozotrené v trecej miske na prášok, zvážené a premiestnené do fľaštičiek z tmavého skla. Chitínová kostra húb nám však nie vždy dovolila vytvoriť homogénny prášok. V konečnom výsledku vzorky obsahovali aj celistvé časti húb o rozmeroch približne 0,1-0,3 cm. Takto pripravené vzorky boli transportované do laboratória FN na analýzu PSC a PSB metódou LC-MS/MS (LIT).

2. Časť určená na stanovenie množstva H_2O : Podľa zásad určených Českým liekopisom z roku 2009 sme zisťovali stratu vody v každej vzorke. Pri teplote $105^{\circ}C$ sme sušili vzorky v sušiarňi HS 31A vo vopred odvážených váženkách do nemeiteľného úbytku hmotnosti ($<0,0009g$). [37] Základom bol čas sušenia 2hod/ $105^{\circ}C$, preváženie a následne 1hod/ $105^{\circ}C$. Porovnanie hmotností po 2 a 3 hodinách. V prípade potreby doplnenie o ďalšiu 1hod/ $105^{\circ}C$ (Vid' Tabuľka 6).

Tabuľka 6 Časová schéma stanovovania množstva H_2O vo vzorkách:

Čas T0	T2	T2+1	T2+1+1
Hmotnosť čerstvého materiálu + hm. váženky	Hmotnosť váženky + vzorky po 2hod/ $105^{\circ}C$	Hmotnosť váženky + vzorky po 3hod/ $105^{\circ}C$	Hmotnosť váženky + vzorky po 4hod/ $105^{\circ}C$

Medzi jednotlivými úsekmi sušenia boli vzorky prevážané na analytických váhach HR-120. Váženky boli zo sušiarne vyberané vopred opálenými laboratórnymi kliešťami (zabránenie prenosu vlhkosti z kliešťov na váženku a tým zvýšeniu hmotnosti). V čase mimo sušiarne boli váženky uchovávané a prenášané v exikátore nad silikagélom, taktiež kvôli zabráneniu priberania vlhkosti z prostredia. Po ochladení váženiek na laboratórnu teplotu boli zvažované. Ak bol rozdiel hmotností v časoch T2 a T2+1 $\geq 0,001$ g, bola doplnená ďalšia hodina sušenia a následného prevážania vzoriek.

Tabuľka 7 Špecifikácia nálezísk a stanovený obsah vody

	Miesto	Nadmorská výška (m.n.m)	Počasi pri zbere	Obsah vody (%)
1	Moravskoslezské beskydy, Ostrava	230	Oblačno, bez dažďa	91,15
2	Moravskoslezské beskydy, Ostrava			91,36
3	Moravskoslezské beskydy, Ostrava			92,87
4	Moravskoslezské beskydy, Ostrava			89,44
5	Moravskoslezské beskydy, Ostrava			87,34
6	Malá Fatra, Martinské hole	1290	Dážď	94,53
7	Malá Fatra, Martinské hole			91,02
8	Nízke Tatry, Jasná	1150	Sucho, slnečno	92,51
9	Nízke Tatry, Jasná			91,44
10	Veľká Fatra, Smrekovica	1428	Sucho, Slnečno	81,79
11	Veľká Fatra, Smrekovica			89,06
12	Oravská Magura, Hruštín	697	Sucho, slnečno	63,14
13	Javorníky, Dlhá n. Kysucou	537	Dážď	94,85
14	Javorníky, Dlhá n. Kysucou			94,04
15	Javorníky, Dlhá n. Kysucou			93,56
16	Javorníky, Podvysoká	460	Po daždi	94,05
17	Javorníky, Podvysoká			93,69
18	Nízke Tatry, Čertovica	1378	Mráz, Sucho	61,23
19	Nízke Tatry, Čertovica			70,15
20	Nízke Tatry, Nižná Boca	851	Mráz, sucho	80,22
21	Malé Karpaty, Červený Kameň, Častá	339	Po daždi	86,91
22	Malé Karpaty, Červený Kameň, Častá			91,11

6.3.2 Extrakcia PSC a PSB

Z pripravených vzoriek *Psilocybe* boli extrahované účinné látky psilocín a psilocybín extrakčnými postupmi vytvorenými PharmDr. Viktorom Voříškom. Extrakcia prebiehala v laboratóriu na Úseku klinickej a forenžnej toxikológie ÚKBD FN v Hradci Králové.

Extrakcia psilocínu:

1. Navážka 30-50 mg sušeného materiálu do skúmaviek TOXI-TUBE a ich uzatvorenie vrchnákom s bielym tesnením.
2. Príprava extrakčnej zmesi pridaním 1ml 0,5M NaOH a 4ml EtOac/CH₂Cl₂ k navážke.
3. Extrakcia po dobu 20 minút na otáčavej trepačke.
4. Centrifugácia 3500 otáčok / 5 minút.
5. Prenesenie 1,5 ml supernatantu do kónickej extrakčnej skúmavky a následné odparenie organickej časti jemným prúdom dusíka (dusík a termostat nastavený podľa návodu). Organická fáza odobraná s ohľadom na prichytené častice materiálu na stenách skúmavky – čo najmenší kontakt pipety so stenami skúmavky TOXI-TUBE.
6. Rekonštitúcia odparku 0,4 ml MeOH/H₂O (50/50) + 0,1 ml IS (DIPT, 2000 ng/ml).
7. Podrobenie rekonštituovaného vzorku ultracentrifugácii pri 30 000 ot/min po dobu 10 minút. Odstredená vzorka následne prenesená do vzorkovej skúmavky priamou dekantáciou.
8. LC-MS/MS analýza.

Extrakcia psilocybínu:

1. Navážka 30-50 mg sušeného materiálu do skúmaviek TOXI-TUBE a ich uzatvorenie vrchnákom s bielym tesnením.
2. Príprava extrakčnej zmesi pridaním 1 ml fosfátového pufru pH 6, premiešanie a následné pridanie 5 ml MeOH + EtOac (4+1) so 4% NH₄OH
3. Extrakcia po dobu 20 minút na otáčavej trepačke.

4. Centrifugácia 3500 otáčok / 5 minút.
5. Prenesenie 1,5 ml supernatantu do kónickej extrakčnej skúmavky a následné odparenie organickej časti jemným prúdom dusíka (dusík a termostat nastavený podľa návodu). Organická fáza odobraná s ohľadom na prichytené častice materiálu na stenách skúmavky – čo najmenší kontakt pipety so stenami skúmavky TOXI-TUBE.
6. Rekonštitúcia odparku 0,7 ml MeOH/H₂O (50/50) + 0,1 ml IS (DIPT, 2000 ng/ml).
7. Podrobenie rekonštituovaného vzorku ultracentrifugácii pri 30 000 ot/min po dobu 10 minút. Odstredená vzorka následne prenesená do vzorkovej skúmavky priamou dekantáciou.
8. LC-MS/MS analýza.

Výťažnosť extrakcie

Z dôvodu nedostupnosti značeného i neznačeného štandardného materiálu nebola stanovená výťažnosť (recovery) extrakcie.

Extrakčné metódy sme overovali z hľadiska extrakčného času. Prebehla extrakcia PSC a PSB podľa návodu vypracovaného PharmDr. Viktorom Voříškom na otáčavej trepačke v dĺžke 15, 20, 60 a 90 minút. Vrchol extrakcie obsahových látok bol stanovený na 20 minút, pričom s predĺžením extrakčného času nebol zaznamenaný štatisticky významný vzostup extrahovaných látok.

6.3.3 Podmienky LC-MS/MS

Kvantifikácia a detekcia psilocínu a psilocybinu vo vyššie uvedených vzorkách bola prevedená s využitím HPLC-MS/MS (LIT).

Bola použitá separačná kolóna Hypersil GOLD, 25005 – 152130 (Thermo Scientific) s rozmermi 150 x 2,1 mm a zrnitosťou 5 µm. Vzorky boli na kolónu dávkované autosamplerom HTS PAL (CTC ANALYTICS AG) s termostatom od firmy CTC ANALYTICS AG. Systém bol doplnený HPLC pumpou Rheos 2200 (FLUX Instrument). Mobilná fáza bola zložená z kyseliny mravčej (MFA) a acetonitrilu (MFB). Separácia prebehla gradientovou elúciou s prietokom 300 µl/min. (Vid' Tabuľka 8 Profil gradientu MF v priebehu separácie). Celkový čas separácie bol 20 min.

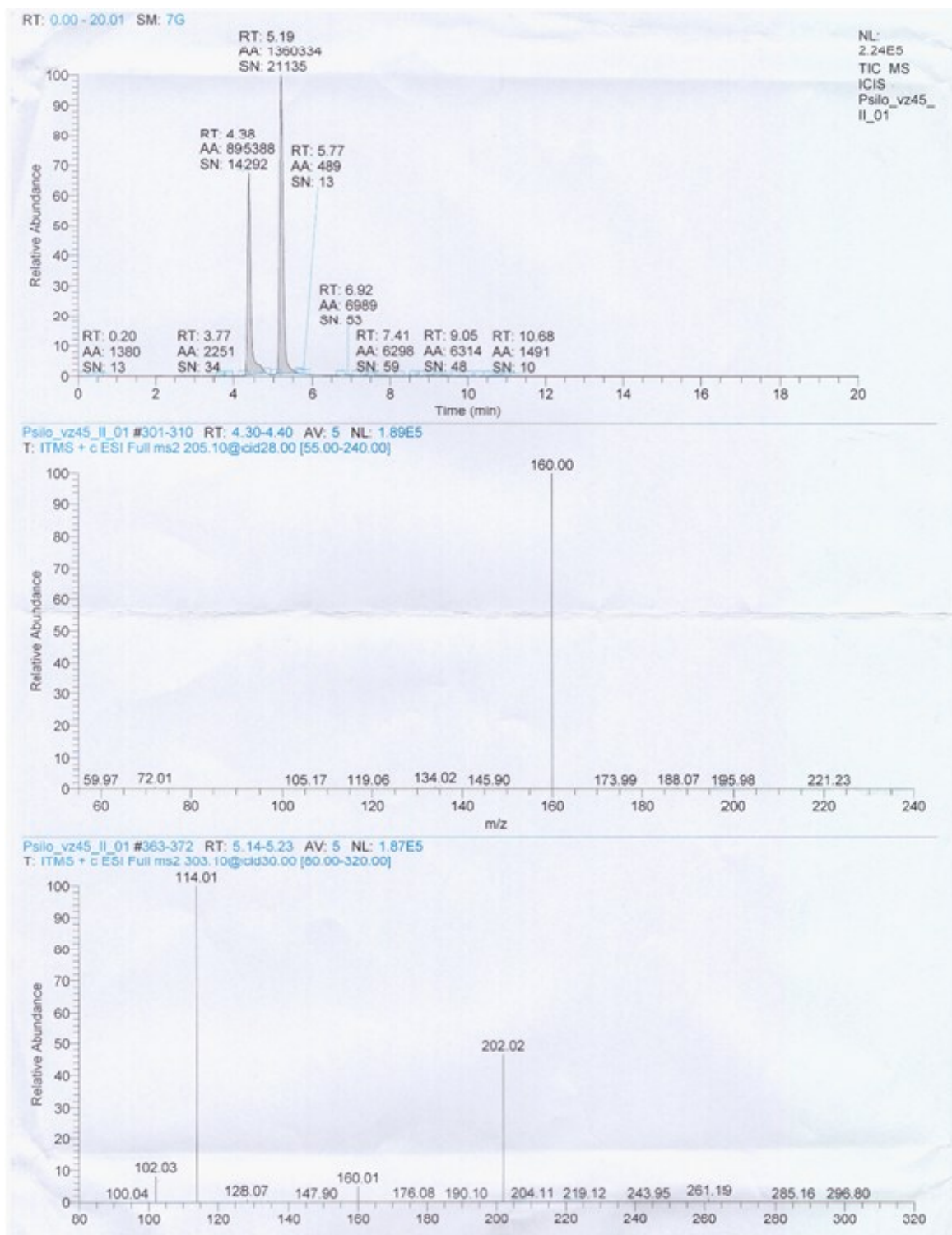
Po separácii vzoriek HPLC systémom boli detekované hmotnostným spektrometrom LTQ XL (Thermo Fisher Corporation) s ionizáciou elektrosprejom. Zdrojom sušiacoho plynu bol kvapalný dusík. Detektor (iónová pasca) skenuje simultánne analyt a IS. Konkrétne skenuje m/z $[M+H]^+$: 205,2 (PSC); 303,1 (IS); 284,9 (PSB) a range skenu bol nastavený na 55-240 (PSC), 80-320 (IS), 75-300 (PSB). Normalizovaná kolízna energia mala hodnoty PSC 28%, IS 30% a PSB 30%. Skenovací čas bol 20 mS.

Ladenie (tuning) metódy zahŕňalo nastavenie napätia na tryske ESI (5kV), el. prúdu kapiláry (0,3-0,4 μ A), sušiacoho plynu (45 jednotiek), pomocného plynu (15 jednotiek), napätia na kapiláre (49 V) a teploty na kapiláre (295°C).

Vyššie popisovaná použitá analytická metóda je validovaná pre stanovenie psilocínu v sére a odtiaľ aplikovaná na hubový materiál. Je kontrolovaná externou kontrolou kvality podľa GTFCH (Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie, ref. Anhang B, seite 1 von 24).

Tabuľka 8 Profil gradientu MF v priebehu separácie

Čas (min.)	MFA (%)	MFB (%)
0.00	95.0	5.0
0.02	95.0	5.0
0.10	95.0	5.0
3.00	55.0	45.0
5.00	30.0	70.0
7.00	5.0	95.0
10.00	5.0	95.0
15.00	95.0	5.0
20.00	95.0	5.0



Obrázok 13 Chromatografický záznam psilocínu a interného štandardu (hore), hmotnostné spektrum psilocínu u vzorky č. 12

IV. VÝSLEDKY A DISKUSIA

7. Výsledky

7.1 Obsah PSC a PSB podľa lokalít

Vzorky boli zozbierané z 10 lokalít. V jednej lokalite boli zbierané huby vždy 1 druhu. Tabuľka uvádza jednotlivé lokality s počtom nálezísk. Obsah vody je uvedený ako priemerná hodnota z jednotlivých nálezísk. Stanovený obsah PSC a PSB je uvedený ako rozsah hodnôt stanovený z jednotlivých nálezísk v rámci jednej lokality. Je uvedený v percentách na sušinu. Každá vzorka bola zmeraná trikrát. (Vid' Tabuľka 9)

Tabuľka 9 Obsah PSC a PSB podľa lokalít

Č.	Lokalita	Druh	Počet nálezísk	Obsah vody (%)	Obsah PSC (%)	Obsah PSB (%)
1	Moravskoslezské beskydy, Ostrava	PB	5	90,43	0,001 - 0,01	0,015 - 0,075
2	Malá Fatra, Martinské hole	PS	2	92,76	0,002 - 0,011	0,140 - 0,292
3	Nízke Tatry, Jasná	PS	2	91,96	0,0006 - 0,004	0,106 - 0,326
4	Veľká Fatra, Smrekovica	PS	2	85,43	0,0005 - 0,003	0,101 - 0,175
5	Oravská Magura, Hruštín	PS	1	63,14	0,002 - 0,007	0,163 - 0,213
6	Javorníky, Dlhá n. Kysucou	PS	3	94,15	0,001 - 0,004	0,156 - 0,509
7	Javorníky, Podvysoká	PS	2	93,87	0,001 - 0,005	0,205 - 0,763
8	Nízke Tatry, Čertovica	PS	2	65,69	0,0008 - 0,005	0,107 - 0,208
9	Nízke Tatry, Nižná Boca	PS	1	80,22	0,005 - 0,007	0,125 - 0,186
10	Malé Karpaty, Červený Kameň, Častá	PB	2	89	0,004 - 0,006	0,077 - 0,092

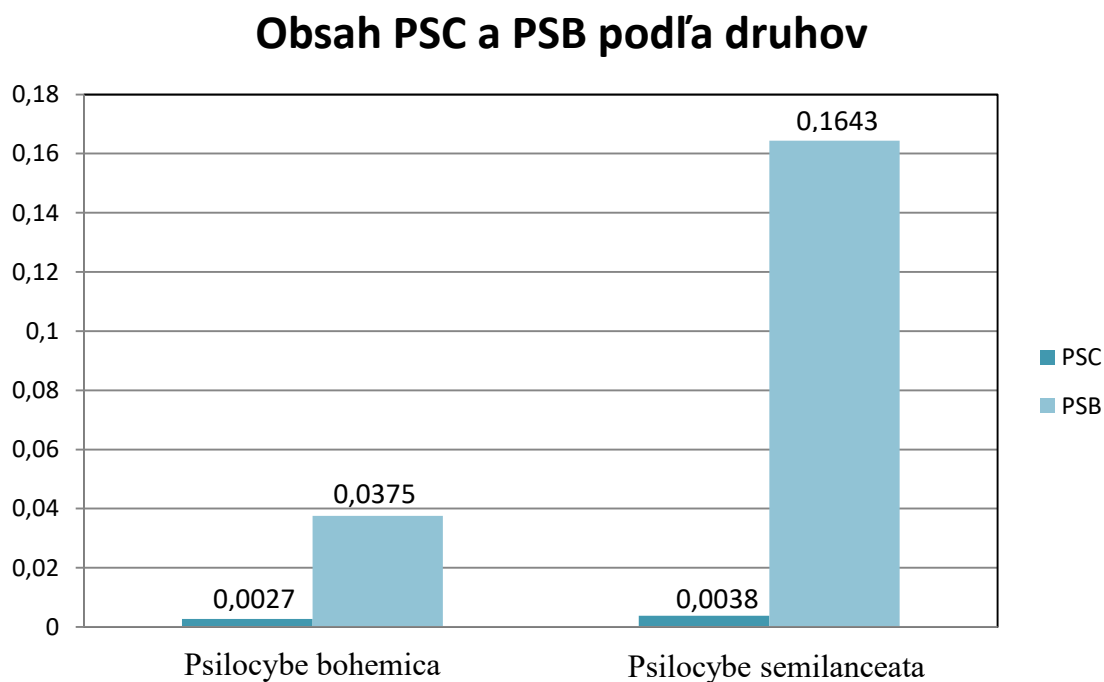
7.2 Obsah PSC a PSB podľa druhov

Práca pojednáva o druhoch *Psilocybe seminlanceata* a *Psilocybe serbica* var. *bohemica*. V tabuľke vidíme výsledný obsah alkaloidov psilocínu a psilocybinu podľa druhu v percentách na sušinu. (Vid' Tabuľka 10)

Tabuľka 10 Obsah PSC a PSB podľa druhov

Druh	Počet nálezísk	Obsah PSC (%)	Obsah PSB (%)
<i>Psilocybe bohemica</i>	7	0,001 - 0,011	0,01 - 0,07
<i>Psilocybe semilanceata</i>	15	0,0005 - 0,011	0,074 - 0,763

Graf obsahových látok podľa druhov



8. Diskusia

Diplomová práca pojednáva o druhoch *Psilocybe serbica* var. *bohemica* a *Psilocybe semilanceata*.

V prvej časti výskumu prebehli samotné zbery *Psilocybe* na území Slovenskej republiky a Moravskoslezského kraja. Správne druhové určenie zastrešil člen mykologickej spoločnosti Mgr. Jan Wipler. Náleziská húb zodpovedali miestam výskytu popisovaným v literatúre. [8,12,13]

Psilocybe serbica var. *bohemica* bola zozbieraná v opadaných listnatých až zmiešaných lesoch (Ostrava, Častá) po prvých prízemných mrazoch. Naproti tomu *Psilocybe semilanceata* sme nachádzali najmä na lúkach a pastvinách, často bol jej výskyt spájaný s rastom metlice trsnatej - *Deschampsia cespitosa* (Martinské hole, Čertovica, Jasná Nízke Tatry,...).

Celkovo boli vzorky zozbierané z 10 lokalít, pričom častejším nálezom bola *Psilocybe semilanceata*. *Psilocybe serbica* var. *bohemica* sme zaznamenali na 2 lokalitách. Nadmorská výška nálezísk sa pohybovala v rozmedzí 230 m.n.m. (Ostrava) – 1378 m.n.m.(Čertovica).

Ďalšou časťou stanovovania bolo zistenie množstva vody vo vzorkách. Nami stanovený priemerný obsah vody je $87,07 \% \pm 10,91 \%$. Tento nález odpovedá hodnotám uvedeným v literatúre. [14] Obsah vody sa líšil v závislosti na počasí. V mrazivé a suché dni bol zaznamenaný obsah vody 61 – 80 %, pričom za daždivých či slnečných dní s dostatkom vlhkosti bol obsah vody vo väčšine prípadov nad 90 %.

Do dnešného dňa bolo publikovaných množstvo štúdií opisujúcich metódy stanovovania obsahových látok psilocínu a psilocybínu. Dôležitým faktorom pri publikácii výsledkov je ich štatistická významnosť, ktorá je v mnohých prípadoch pre malý počet vzoriek nedostačujúca. [14,31,32] Naša práca pracuje s 22 vzorkami z 10 lokalít, čo je na hranici prijateľnosti.

Metóda stanovovania a extrakčné postupy boli navrhnuté PharmDr. Viktorom Voříškom podľa štandardných operačných postupov ÚKBD FN v Hradci Králové. Rovnako ako majorita uverejnených výskumov sme vychádzali z metanolovej extrakcie PSC a PSB. [31,32] Extrakčné postupy zahŕňali aditíva špecifické pre PSC a PSB. U psilocínu to bola kombinácia etylacetátu a dichlormetánu s prídavkom hydroxidu

sodného. Psilocybín bol extrahovaný metanolom a etylacetátom s prídavkom hydroxidu amónneho a fosfátového pufu.

Ako interný štandard bol použitý DIPT (diisopropyltryptamín) z dôvodu nedostupnosti značeného i neznačeného štandardu psilocínu a psilocybínu. Z rovnakého dôvodu nebola stanovená výťažnosť extrakcie a zvolené extrakčné postupy sme porovnávali len z časového hľadiska. V tomto prípade sa ukázala ako najvýhodnejšia extrakcia na otáčavej trepačke v čase 20 minút, pričom so zvyšujúcim sa časom extrakcie sme nezaznamenali štatisticky významný vzostup PSC a PSB.

Pre ďalšie pokračovanie výskumu navrhujem zabezpečiť príslušné certifikované štandardy a uskutočniť vnútornú kalibráciu metódy a celkovú výťažnosť extrakcie. Analytickou metódou voľby bola LC-MS/MS (LIT) z dôvodu vysokej špecificity a presnosti výsledkov. Metóda je schopná bezpečne odlíšiť psilocín a psilocybín. V ďalšom výskume je nevyhnutné zabezpečiť štandardy psilocínu a psilocybínu, čím by sme zabezpečili zvýšenie presnosti výsledkov a tiež sa venovať skráteniu doby analýzy. Pre nedostupnosť opisovaných materiálov môžeme nami použitú metódu označiť len za semikvantitatívnu. Metóda nebola v rámci výskumu validovaná na hubový materiál. Validácia sa preto stáva nutnosťou pri ďalšom výskume.

Obsah PSC a PSB bol porovnávaný z hľadiska druhov a lokalít výskytu. Kvalitatívne boli obsahové látky identifikované vo všetkých vzorkách. Kvantitatívne bol obsah PSC a PSB v každej vzorke stanovený trikrát. V prípade jednej vzorky prebehli 2 merania z dôvodu nedostatku materiálu. Výsledky sú, rovnako ako v publikovaných štúdiách, uvedené v rozmedzí hodnôt stanovenom z jednotlivých nálezísk v rámci jednej lokality a sú porovnateľné s vyššie uvedenými štúdiami. [31,32] Obsah alkaloidov stanovených v *P.bohemica* bol: PSC 0,001-0,011 % a PSB 0,01 – 0,07%. *P.semilanceata* obsahovala 0,0005 – 0,011 % PSC a 0,074 – 0,763 % PSB. Z uvedených hodnôt vidíme určitý rozptyl výsledkov. Ten je s najväčšou pravdepodobnosťou spôsobený rôznymi náleziskami vybraných druhov rodu *Psilocybe* (rôzne fyto geografické podmienky ovplyvnili konečné množstvo obsahových látok), no taktiež môže byť ovplyvnený nehomogenitou materiálu pri spracovaní vzoriek a nerovnomerným rozložením psilocybínových alkaloidov v hube. V ďalších výskumoch je pre lepšie spracovanie materiálu nutné použitie homogenizátoru. [17]

ZÁVER

Cieľom diplomovej práce bolo zmapovanie výskytu vybraných druhov rodu *Psilocybe*, ďalej zistenie obsahu vody vo vzorkách *Psilocybe* a zistenie množstva obsahových látok psilocínu a psilocybínu.

Práca pojednáva o 22 vzorkách zozbieraných z 10 lokalít. *Psilocybe serbica* var. *bohemica* bola identifikovaná na 2 a *Psilocybe semilanceata* na 8 lokalitách v rámci Slovenskej republiky a Moravskoslezského kraja. Nadmorská výška nálezísk sa pohybovala v rozmedzí 230 m.n.m. – 1378 m.n.m. Správnosť druhového určenia bola konzultovaná s Mgr. Jánom Wiplerom, členom mykologickej spoločnosti. Priemerný obsah vody vo vzorkách bol $87,07 \% \pm 10,91\%$. Z výsledkov vyplýva, že obsah vody je závislý na podmienkach počasia.

Kvalitatívne boli alkaloidy zistené vo všetkých vzorkách.

Výsledky sú v jednotlivých lokalitách obdobné, značný rozdiel badáme v rôznych druhoch *Psilocybe*. Obsah alkaloidov stanovených v *P.bohemica* bol: PSC 0,001-0,011 % a PSB 0,01 – 0,07 %. *P.semilanceata* obsahovala 0,0005 – 0,011 % PSC a 0,074 – 0,763 % PSB. Výsledky sú uvedené v % na sušinu.

Zvolená analytická metóda LC-MS/MS sa pri stanovení PSC a PSB osvedčila pre veľkú špecificitu a presnosť výsledkov. Pre určité nedostatky vyžadujúce optimalizáciu metódy môžeme nami použitú metódu využiť len k semikvantitatívnemu hodnoteniu. Najmä rozptyl výsledkov spôsobený s najväčšou pravdepodobnosťou rôznymi fyto geografickými podmienkami nálezísk vybraných druhov *Psilocybe*, ktorý taktiež môže byť ovplyvnený nedokonalou homogenizáciou vzoriek vyžaduje v ďalších štúdiách využitie prístrojovej homogenizácie. Pre absolútnu kvantifikáciu je potrebné zabezpečiť štandardy psilocínu a psilocybínu nutné pre prevedenie vnútornej kalibrácie a následnej validácie použitej analytickej metódy pre hubový materiál.

ZOZNAM POUŽITÉJ LITERATURY

1. LETCHER, Andy. *Magické houbičky: kulturní historie kouzelných hub*. 1. vyd. Praha: Volvox Globator, 2008. Muchomůrky bílé. ISBN 978-80-7207-691-8.
2. STAMETS, Paul. *Halucinogenní houby světa*. 1. vyd.. Praha: Volvox Globator, 2000. ISBN 80-7207-394-X.
3. MISRA, Jayant K. a Sunil K. DESHMUKH. *Fungi from different environments*. Enfield, NH: Science Publishers, 2009. Progress in mycological research. ISBN 1578085780.
4. VALÍČEK, Pavel. *Rostlinné omamné drogy*. 1. vyd. Benešov: Start, 2000. ISBN 80-86231-09-7.
5. MATSUSHIMA, Yoshihiro a kol. *Historical overview of psychoactive mushrooms* [online]. Gunma, Japan, 2009 [cit. 2015-12-07]. Dostupné z: http://jsir.gr.jp/journal/past_journal/2901/0047-0058.pdf
6. PASSIE, Torsten, Juergen SEIFERT, Udo SCHNEIDER a Hinderk M. EMRICH.
The pharmacology of psilocybin. *European Neuropsychopharmacology*. 2014. [cit. 2015-12-07]. DOI: 10.1080/1355621021000005937.
7. GUZMÁN, Gastón. *Supplement to the monograph of the genus Psilocybe* [online]. Berlin-Stuttgart, 1995 [cit. 2015-12-07]. Dostupné z: <https://www.dmt-nexus.me/doc/Psilocybe.pdf>
8. HOLEC, Jan, Antonín BIELICH a Miroslav BERAN. *Přehled hub střední Evropy*. 1. vyd. Praha: Academia, 2012. ISBN 978-80-200-2077-2.
9. BOROVIČKA, Jan. *Nová varieta lysohlávky Psilocybe moravica a poznámky k lysohlávce Psilocybe bohemica*. – Czech Mycol. 2006. 58(1–2): 75–80.

10. GARTZ, Jochen. *Magic mushrooms around the world: a scientific journey across cultures and time : the case for challenging research and value systems*. Los Angeles, CA: LIS Publications, 1996. ISBN 0965339904.
11. OBORNÍK, Miroslav. *Tajemné houby*. 1. vyd. České Budějovice: Velarium, 1997. Kolonie.
12. NOORDELOOS, Machiel E. *Strophariaceae s.l.* Taliansko: Candusso, 2011. ISBN 9788890531002.
13. ANTONÍN, Vladimír, Jan HOLEC a Miroslav BERAN. *Červený seznam hub (makromycetů) České republiky*. Praha: Agentura ochrany přírody a krajiny České republiky, 2006. ISBN 8087051025.
14. BARCELOUX, Donald. *Medical toxicology of drug abuse: synthesized chemicals and psychoactive plants*. Hoboken: Wiley, 2012. ISBN 978-0-471-72760-6.
15. ALBERTS, Andreas a Peter MULLEN. *Psychoaktivní rostliny, houby a živočichové*. 1. vyd. Praha: Nakladatelství Svojtka & Co, 2002. ISBN 8072375180.
16. TYLŠ, Filip, Tomáš PÁLENÍČEK a Jiří HORÁČEK. Psilocybin – Summary of knowledge and new perspectives. *European Neuropsychopharmacology*.2014. [cit. 2015-12-07]. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2013.12.006.
17. ANDERSSON, Christer, Jakob KRISTINSSON. *Occurrence and use of hallucinogenic mushrooms containing psilocybin alkaloids*. 1. vyd. Nordisk Ministerråd, 2009. ISBN 9789289318365.

18. Psilocybine. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Pubchem [online]. [cit. 2016-03-10]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=10624&loc=ec_rcs
19. Psilocin. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Pubchem [online]. [cit. 2016-03-10]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=4980&loc=ec_rcs#x395
20. NAGY, Milan, Daniel GRANČAI, Pavel MUČAJI. Farmakogózia. Biogenéza prírodných látok. 1. vyd. Marin: Osveta 2011 ISBN 978-80-8063-368-4.
21. Úpravy: autor. Cesta bioysntézy vytvorená podľa: Wurst M, Kysilka R, Flieger M. (2002). "Psychoactive tryptamines from Basidiomycetes". *Folia Microbiologica* 47 (1): 3–27.
22. Baeocystin. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Pubchem [online]. [cit. 2016-03-10]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/161359>
23. Norbaeocystin. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Pubchem [online]. [cit. 2016-03-10]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9795063>
24. HALBERSTADT, Adam, Juergen SEIFERT, Udo SCHNEIDER a Hinderk M. EMRICH. Recent advances in the neuropsychopharmacology of serotonergic hallucinogens. *Behavioural Brain Research* [online]. 2015, [cit. 2015-12-07]. DOI: 10.1016/j.bbr.2014.07.016.
25. SPOERKE, David G a Barry H RUMACK. *Handbook of mushroom poisoning: diagnosis and treatment*. Boca Raton: CRC Press, 1994. ISBN 0849301947.

26. JOHNSON, Matthew W., William A. RICHARDS a Roland R. GRIFFITHS. Human hallucinogen research: guidelines for safety. *Journal of Psychopharmacology*[online]. 2008. [cit. 2016-03-10]. DOI: 10.1177/0269881108093587. Dostupné z: <http://jop.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/0269881108093587>.
27. WURST, Milan, Roman KYSILKA a Miroslav FLIEGER. *Psychoactive tryptamines from basidiomycetes* [online]. [cit. 2015-12-07]. DOI: 10.1007/BF02818560. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02818560>
28. PEDERSEN-BJERGAARD, Stig a kol. Determination of psilocybin in *Psilocybe semilanceata* by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography B* [online]. 1997. [cit. 2016-03-10]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378434797001278>
29. KYSILKA, Roman a Milan WURST. A Novel Extraction Procedure for Psilocybin and Psilocin Determination in Mushroom Samples. *Planta Medica* [online]. 1990. [cit. 2016-02-07]. DOI: 10.1055/s-2006-960970. Dostupné z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2006-960970>
30. KELLER, Thomas, Andrea SCHNEIDER, a kol. Analysis of psilocybin and psilocin in *Psilocybe subcubensis* GUZMÁN by ion mobility spectrometry and gas chromatography–mass spectrometry. *Forensic Science International* [online]. 1999. [cit. 2016-03-16]. DOI: 10.1016/S0379-0738(98)00168-6. ISSN 03790738. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379073898001686>
31. Hallucinogenic mushrooms on the German market — simple instructions for examination and identification. In: *Science direct* [online]. 2000 [cit. 2016-10-07]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0379073800002115?np=y>

32. Stříbrný J., ²Borovička J., ¹Sokol M. Obsah psilocybinu a psilocinu v některých druzích hub. *Soud Lék.*, , 2003, No. 3, p. 45-49
33. Optimized glucuronide hydrolysis for the detection of psilocin in human urine samples. In: *Science direct*[online]. 2003 [cit. 2016-10-07]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023203006688>
34. PACÁKOVÁ, Věra a Karel ŠTULÍK. *Vysokoučinná kapalinová chromatografie*. 1. vyd. Praha: SPN, 1986.
35. ŠTULÍK, Karel. *Analytické separační metody*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0852-9.
36. VŘEŠŤÁL, Jan. *Hmotnostní spektrometrie*. 2. dopl. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2000. ISBN 80-210-2283-3.
37. Český lékopis 2009, doplněk 2015, str. 10201-10202 (8.5:20232) Nakladat. Grada, Praha,2015.

ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

CZE	kapilárna zónová elektroforéza
DIPT	diisopropyltryptamín
DMAB	4-dimetylamino-benzaldehyd
ESI	ionizácia elektrosprejom
GC	plynová chromatografia
HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
IR	infračervená (spektroskopia)
IS	interný štandard
LC	kvapalinová chromatografia
LSD	dietylamid kyseliny lysergovej
MF	mobilná fáza
MS	hmotnostná spektrometria
MS/MS	tandemová hmotnostná spektrometria
MSTFA	N-Methyl-N-trimethylsilylfluoroacetamid
PC	papierová chromatografia
PCG	psilocín glukuronid
PSB	psilocybín
PSC	psilocín
SF	stacionárna fáza
TLC	tenkovrstevná chromatografia
UV	ultrafialová (spektroskopia)

ZOZNAM OBRÁZKOV

Obrázok 1 *Psilocybe bohemica*

Obrázok 2 *Psilocybe semilanceata*

Obrázok 3 Rozšírenie rodu *Psilocybe*

Obrázok 4 Psilocybín

Obrázok 5 Psilocín

Obrázok 6 Biosyntéza psilocybínu

Obrázok 7 Baocystín (vľavo) a norbaocystín (vpravo)

Obrázok 8 Schéma kvapalinového chromatografu

Obrázok 9 Schéma hmotnostného spektrometra

Obrázok 10 Zber *Psilocybe Semilanceata* Čertovica

Obrázok 11 Zber *Psilocybe bohemica* Ostrava

Obrázok 12 Mapa nálezísk *Psilocybe*

Obrázok 13 Chromatografický záznam psilocínu a interného štandardu (hore)
a hmotnostné spektrum psilocínu (v strede) a DIPT (dole)

ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka 1 Taxonomické zaradenie vybraných druhov Psilocybe [8]

Tabuľka 2 Zhrnutie biologických účinkov psilocybínových húb [27]

Tabuľka 3 Výsledný obsah alkaloidov (v percentách na sušinu)

Tabuľka 4 Výsledný obsah alkaloidov (v percentách na sušinu):

Tabuľka 5 Náleziská rodu Psilocybe

Tabuľka 6 Časová schéma stanovovania množstva H₂O vo vzorkách:

Tabuľka 7 Špecifikácia nálezísk a stanovený obsah vody

Tabuľka 8 Profil gradientu MF v priebehu separácie

Tabuľka 9 Obsah PSC a PSB podľa lokalít

Tabuľka 10 Obsah PSC a PSB podľa druhov