

RICONOSCIMENTO E DOSAMENTO DELLA PSILOCIBINA

by

NEVIO FIUSSELLO

Istituto Botanico dell'Università di Torino*

ABSTRACT

It is possible to detect and dose Psilocibine, a psychoneurotropic substance occurring in *Psilocybe*, *Stropharia*, *Panaeolus* etc., with a reaction already used to detect Tryptophane and indole-auxins (6) (7) (8) (9).

This method is more sensitive than U.V. measurement and Keller's reaction (4) (see fig. 3).

Optical density is proportional to concentration from 0,005 to 0,050 μ moles per ml when measured in a 1 cm cell in the Beckman spectrophotometer.

Tryptophane, indole-auxins and 2-deoxy-sugars could interfere (6) (7) (8) (9) (10).

procedure: In a test tube are pipetted:

- | | |
|---|----------|
| a) 1 % solution of fructose in H ₂ O | : ml 0.1 |
| b) 5 % solution of cysteine hydrochloride | : ml 0.2 |
| c) methanolic solution to be tested | : ml 1.0 |
| d) conc. H ₂ SO ₄ /water 70/30 (v.v.) | : ml 3.0 |

the mixture is allowed to cool off at room temperature, a pink color develops and reaches its maximum of intensity in about 90 minutes.

The absorption spectrum of the chromophore exhibits a maximum at 512 m μ (see fig. 2).

The ratio E₅₁₂ in the reaction mixture/E₂₆₇ in U.V. is about 1,9 and differs from other indole-derivatives. (see. Tab. 11).

The reaction can also be employed to detect and dose Psilocibine-spots in paper and thin-layer chromatography spraying with the following mixture prepared just before use:

- | | |
|------------------------------------|--------|
| fructose | g 1.0 |
| cysteine hydrochloride | g 1.0 |
| 3 N H ₂ SO ₄ | ml 100 |

Paper - chromatograms are dried in an oven (70° C) for 5 minutes, chromatoplates for 10-15 minutes.

Psilocibine appears as a pink spot.

La psilocibina, sostanza ad azione psicotropa, estratta per la prima volta da *Psilocybe mexicana* HEIM ed in seguito da *Psilocybe caerulescens* MURR., var. *Mazatecorum* HEIM, *Psilocybe semperviva*

* Lavoro n. 110 della Sezione I del Centro di Studio per la Micologia del Terreno del C.N.R., diretta dal prof. ARTURO CERUTI, presso l'Istituto Botanico dell'Università di Torino.

Accepted for publication: II.IV.1969.

HEIM & CAILLEUX, *Psilocybe Zapotecorum* HEIM, *Psilocybe Aztecorum* HEIM, *Stropharia cubensis* EARLE, *Panaeolus sphinctrinus* FR., etc. (1) (2) (3) (5) é un composto fosforilato con nucleo indolico e precisamente la 0-fosforil-4-idrossi-N-N-dimetil-triptamina. (4)

La separazione viene di solito effettuata per via cromatografica ed il composto isolato può essere identificato dallo spettro in U.V. oppure dalle reazioni colorate di Keller o di Ehrlich (3) (4).

Anche la determinazione quantitativa può essere eseguita sia in U.V. sia con la reazione di Keller (0,5 ml. della soluzione da dosare, 1 ml.

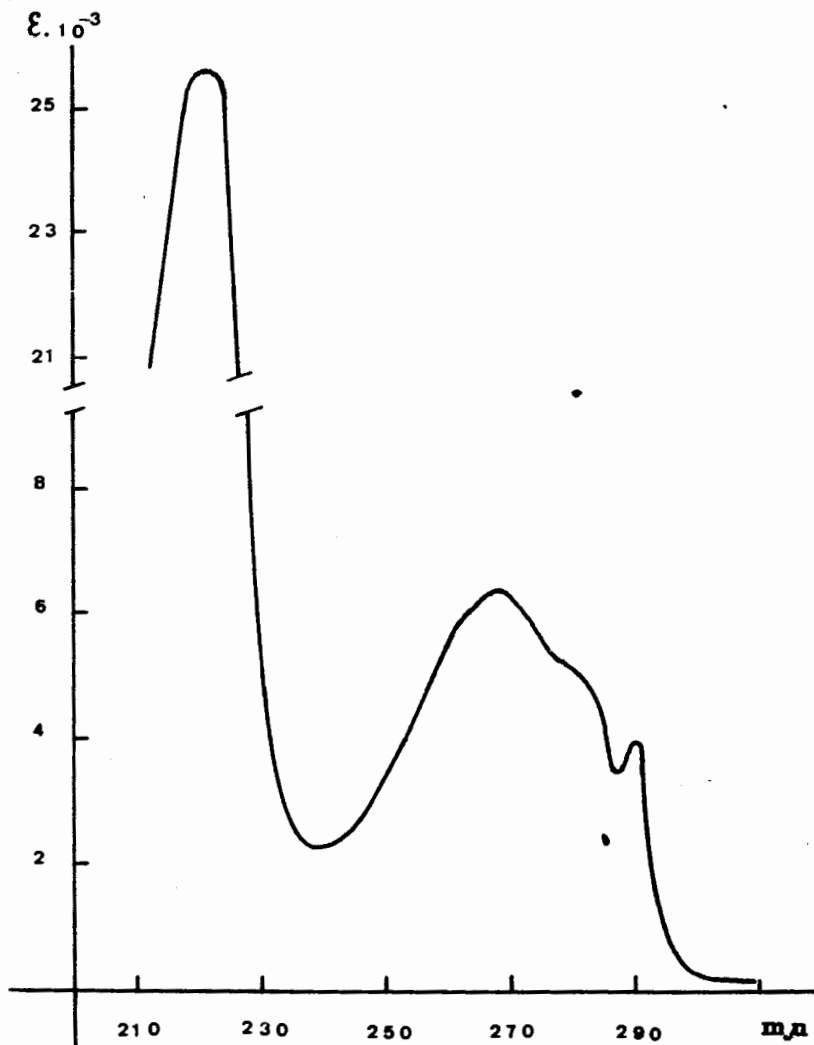


Fig. 1. Spettro di estinzione del campione di Psilocibina in metanolo.

di acido acetico contenente 0,01 % di FeCl_3 , 1 ml. di H_2SO_4 concentrato (4). Per la determinazione quantitativa in U.V. la lettura viene effettuata a $267 \text{ m}\mu$ ed è necessaria una purificazione molto spinta, perchè negli estratti sono presenti molte sostanze che estinguono in tale banda e possono quindi interferire notevolmente.

Ho pensato di applicare una reazione con cisteina, fruttosio ed acido solforico già impiegata per il dosamento del triptofano (6) (7) e delle auxine indoliche (8) (9).

Si ottiene una colorazione rosa con un massimo di estinzione a $\lambda = 512 \text{ m}\mu$.

MATERIALE E METODO

Le prove di confronto tra il metodo proposto e quelli già descritti sono state eseguite su un campione di Psilocibina gentilmente fornito dal Prof. A. HOFMANN.

Il coefficiente di estinzione molare a $\lambda = 267 \text{ m}\mu$ è stato assunto uguale a 6300 (4).

Metodo:

In un tubo da saggio si pipettano nell'ordine:

- | | |
|---|-----------|
| 1) soluzione di fruttosio al 1 % | = ml. 0,1 |
| 2) soluz. di cisteina clorid. al 5 % | = ml. 0,2 |
| 3) soluz. metanolica di Psilocibina | = ml. 1,0 |
| 4) H_2SO_4 conc./ H_2O 70/30 (v.v.) | = ml. 3,0 |

Si agita bene e si lascia a temperatura ambiente.

Si sviluppa una colorazione rosa che raggiunge il massimo di intensità dopo 90' circa e si mantiene costante per almeno 30'. La lettura viene eseguita a $\lambda = 512 \text{ m}\mu$ contro un "bianco" che al punto 3) contiene ml. 1,0 di metanolo. Le misure sono state effettuate con spettrofotometro Beckman D.U.

Cromatografia

In cromatografia, sia su carta che su strato sottile, si può usare la stessa reazione per mettere in evidenza le macchie di Psilocibina spruzzando la seguente miscela preparata di volta in volta al momento dell'uso:

cisteina cloridrato	gr.	1,0
fruttosio	gr.	1,0
H_2SO_4 3N	ml.	100

Il cromatogramma si pone in stufa a 70° circa e dopo 5' si ottiene una colorazione rosa; per cromatografia su strato sottile il tempo necessario è normalmente più lungo e dipende dallo spessore dello strato. E' opportuno segnare subito la posizione della macchia per-

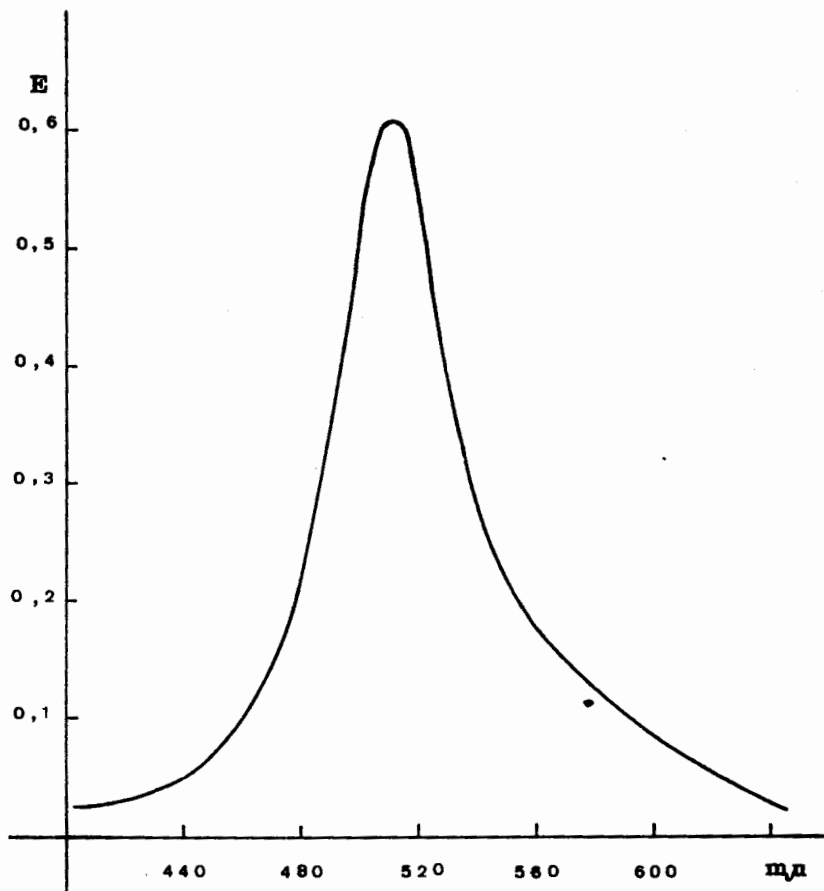


Fig. 2. Spettro di estinzione del composto formatosi in seguito alla reazione proposta.

chè il cromatogramma quando è estratto dalla stufa assorbe umidità dall'ambiente e si decolora.

Per la determinazione quantitativa è opportuno eseguire una prova in doppio; in corrispondenza della posizione della Psilocibina si ritaglia la carta e si pone in un tubo da saggio con 1,0 ml. di metanolo indi si esegue la reazione come precedentemente indicato. Dopo un'ora circa si centrifuga per eliminare i residui di carta a 3000 giri/minuto per 15'.

Sul surnatante si esegue la lettura allo spettro-fotometro contro un "bianco" preparato con la stessa quantità di carta. Si potrebbe eluire le macchie con metanolo ed eseguire la reazione sull'estratto però è noto che in tal modo non si riesce mai ad estrarre completamente la sostanza dalla carta.

DISCUSSIONE

La reazione proposta permette di dosare la Psilocibina da 0,005 a 0,050 $\mu\text{moli/ml.}$, per concentrazioni superiori la proporzionalità tra estinzione e concentrazione non é più lineare.

La sensibilità della reazione, nelle condizioni indicate, è circa due volte quella ottenibile con misure in U.V. a $\lambda = 267$ e circa tre volte quella data dalla reazione di Keller (vedi fig. 3). La velocità di reaz-

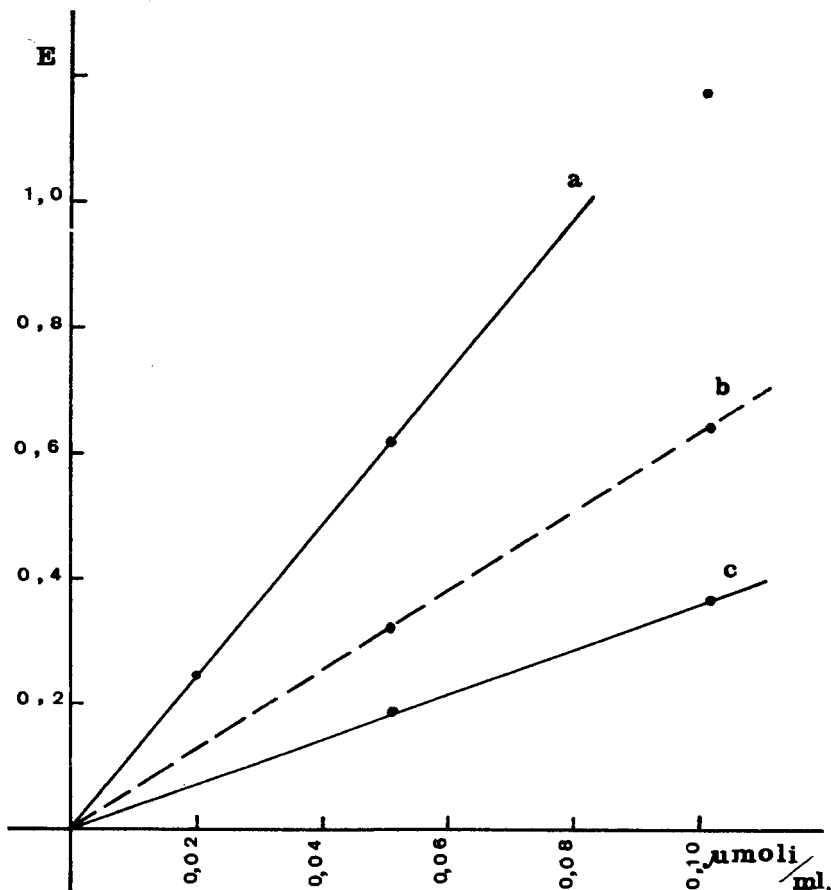


Fig. 3. Proporzionalità tra estinzione e concentrazione a) metodo proposto, b) misura a $\lambda = 267$, c) reazione di Keller.

ione dipende dalla temperatura; a 20—25° si ottiene il massimo di estinzione dopo 90' circa e tale valore si mantiene costante per almeno 30' (vedi tabella I).

TABELLA I. Variazione dell'estinzione a $\lambda = 512$ in tempi successivi per un campione di $0,051 \mu\text{moli/ml}$.

Minuti dall'inizio della reaz.	35'	55'	65'	75'	90'	115'	120'	135'
E_{512}	0,510	0,580	0,590	0,600	0,608	0,610	0,610	0,608

INTERFERENZE

Interferiscono sicuramente il triptofano (6) (7) le auxine indoliche (8) (9), ed in genere i derivati indolici oltre ai derivati dei 2-desossizuccheri (10); quindi non è possibile una determinazione diretta della Psilocibina sull'omogeneizzato del fungo o sul liquido di cultura ma è necessario allontanare prima le sostanze che possono interferire.

Ciò si ottiene normalmente con cromatografia su colonna, su carta o su strato sottile.

Rispetto alla determinazione quantitativa con lettura in U.V. si ha il vantaggio di dover eliminare un numero di possibili sostanze interferenti che è notevolmente più ristretto ed inoltre si ha maggiore sensibilità. E' possibile verificare la purezza della sostanza facendo il rapporto tra l'estinzione del composto colorato ottenuto in seguito alla reazione proposta a $\lambda = 512$ e l'estinzione a $\lambda = 267$ della soluzione prima della reazione

$$R = E_{512}/E_{267} = \frac{11800}{6300} = 1,9 \sim$$

quando sono presenti impurezze si ha variazione nel valore di R. Per altri composti che danno la stessa reazione il valore di R. è diverso (vedi tabella II).

TABELLA II. Valori del rapporto tra estinzione a $\lambda = 512$ del cromoforo formatosi in seguito alla reazione proposta ed estinzione a $\lambda = 267$.

Composto	λ max.	E_{512}/E_{267}
<i>Psilocibina</i>	512	1,9
<i>Triptamina</i>	512	3,6
<i>Triptofano</i>	516	3,3
<i>Ac. indol-acetico</i>	512	2,8
<i>Indolo</i>	482	0,8

Bibliografia

- 1. HEIM, R., BRACK, A., KOBEL, H., HOFMANN, A. & CAILLEUX, R. (1958) *Acad. Sci.* 246: 1346.

Si ringrazia vivamente il Prof. A. HOFMANN che ha provveduto il campione di Psilocibina pura.

- 2. HEIM, R. & HOFMANN, A. (1958) *C. r. Acad. Sci.* 247: 557.
- 3. HEIM, R. & HOFMANN, A. (1958) Les champignons hallucinogènes du Mexique Paris pag. 258.
- 4. HOFMANN, A., HEIM, R., BRACK, A. & KOBEL, H. (1958) *Experientia* 14: 107.
- 5. HEIM, R. (1963) Les champignons toxiques et hallucinogènes Boubee - Paris.
- 6. BELLANDO, M. & FIUSSELLO, N. (1966—1967) Su un nuovo metodo colorimetrico per il dosamento del triptofano; *Atti Acad. Sci. di Torino* 101.
- 7. FIUSSELLO, N. & BELLANDO, M. (1967—1968) Il riconoscimento e dosamento del DNP-triptofano. *Atti Acad. Sci. di Torino* 101: 175.
8. BELLANDO, M. & FIUSSELLO, N. (1968) Eine neue colorimetrische Methode zur Bestimmung von Indoloxinen. *Z. Naturf.* 23b: 3.
- 9. BELLANDO, M. & FIUSSELLO, N. (1967—1968) Sul riconoscimento e dosamento di auxine indoliche e loro derivati. *Atti Acad. Sci. di Torino*. 102: 895.
- 10. FIUSSELLO, N. (1966—1967) Nuovo metodo colorimetrico per il dosamento del 2-desossi-ribosio, dei desossi-nucleosidi, desossi-nucleotidi e DNA. *Atti Acad. Sci. di Torino*. 101: 469.