



## POLSKIEJ RZECZYPOSPOLITEJ LUDOWEJ OPIS PATENTOWY

Nr 43326

Kl. 30 h, 2/03

Sandoz A. G.\*)

Bazyleja, Szwajcaria

### Sposób otrzymywania psylocybiny i psylocyny

Patent trwa od dnia 10 stycznia 1959 r.

Pierwszeństwo: 21 lutego 1958 r. dla zastrz. 2;

30 lipca 1958 r. dla zastrz. 1, 3—11. (Szwajcaria)

Wynalazek dotyczy sposobu otrzymywania z pewnych gatunków grzybów dotychczas nieznanymi substancji o działaniu psychotropowym, psylocybiny i psylocyny. Sposób według wynalazku polega na tym, że z *Psilocybe mexicana* Heim albo ze sztucznie wyhodowanego materiału grzybowego, otrzymanego z kultur lub biologicznych wariantów albo mutantów tego grzyba przez zaszczepianie naturalnych lub sztucznych pożywek i dojrzewanie tych kultur na świetle lub w ciemności w stałej temperaturze między 18 i 27°C, ekstrahuje się według znanych metod substancje czynne a następnie oczyszcza, oddziela od siebie i ewentualnie uwalnia od chlorowca.

Prócz tego stwierdzono, że psylocybiny i psylocynę można otrzymać w stanie czystym zgodnie z wyżej przytoczonym sposobem postępowania, wychodząc z materiału grzybowego

pochodzenia naturalnego rodzajów *Psilocybe*, *Stropharia*, *Conocybe*, *Panaeolus*, *Amanita* lub *Russula* lub ze sztucznie wyhodowanego materiału grzybowego, otrzymanego z kultur poszczególnych gatunków grzybów albo ich biologicznych wariantów lub mutantów.

Jest już rzeczą znaną (R. Heim, C.r. hebdomadaire Seances Acad. Sci. 242, 965 (1956)), że szereg gatunków grzybów pochodzenia naturalnego z Meksyku, Wschodniej Syberii, Kamczatki i innych krajów Azji i Ameryki stosuje się do celów rytualnych lub jako używki albo środki oszalamiające. Wywołują one swoiste działanie na ciało, a przede wszystkim na psychikę człowieka. Przy tych, tak zwanych grzybach halucynacyjnych chodzi o następujące rodzaje: *Psilocybe*, *Stropharia*, *Panaeolus*, *Conocybe*, *Amanita*, *Russula*. Dotychczas nie udało się jednak wyizolować substancji czynnych ani z grzybów pochodzenia naturalnego ani z materiału grzybowego sztucznie wyhodowanego. Nie potrafiono również wychodzić z grzybów (o właści-

\*) Właściciel patentu oświadczył, że twórcą wynalazku jest Roger Cailleux.

wościach halucynacyjnych) pochodzenia naturalnego wyhodować w laboratorium takich gatunków, w których tworzyłyby się substancje czynne w ilości wystarczającej do otrzymania tych ciał w skali preparatywnej.

Wynalazek dotyczy sposobu, według którego można otrzymać dotychczas nieznaną substancję czynną gatunków grzybów halucynacyjnych, przede wszystkim *Psilocybe mexicana* Heim, *Psilocybe caerulescens* Murrill var. *Mazatecorum* Heim, *P. caerulescens* Murrill var. *nigripes* Heim, *P. Zapotecorum* Heim, *P. semper-viva* Heim i *Cailleux*, *P. Aztecorum* Heim, *Stropharia cubensis* Earle. Te substancje czynne można otrzymać w stanie czystym według znanych metod, albo bezpośrednio z materiału grzybowego pochodzenia naturalnego albo z materiału grzybowego wyhodowanego z kultury, wywodzących się z naturalnych lub z sztucznych substratów, przy czym hodowlę tych kultur prowadzi się według takich metod, które pozwoliłyby otrzymać substancje czynne w ilości technicznie przydatnej.

Sposób postępowania jest przeważnie następujący: dla hodowli na naturalnych substratach sporządza się kompost z przefermentowanej słomy pszenicznej, mieszanki liści i łądy kukurydzy oraz żdzbeł dzikiej trawy, który następnie przemywa się dużą ilością bieżącej wody, rozdrabnia w glinianej misie i sterylizuje w autoklawie. Kompost zaszczepia się grzybnią z pierwotnych kultur i poddaje dojrzewaniu w ciągu około dwóch tygodni w temperaturze 24–27°C, kultury zaś pokrywa się sterylnym piaskiem i pozostawia w temperaturze 18–27°C w szklanych skrzynkach na świetle dziennym, utrzymując przy tym stałą wilgotność. Po czterech do pięciu tygodniach ukazują się owocnie: zbiory następują w ciągu jednego do dwóch miesięcy od zaczęcia tworzenia się zarodników.

Ponieważ jednak otrzymanie na tej drodze większych ilości materiału wyjściowego jest kłopotliwe, opracowano inne metody hodowli. Stwierdzono przy tym nieoczekiwanie, że grzyby *in vitro* nastawione na substratach bogatych w pożywkę tworzą zamiast grzybni z owocnikami w dużej ilości prawie wyłącznie aktywną grzybnię i częściowo sklerocje, zaś na substratach ubogich w pożywkę znane owocnie. Na przykład dla pożywki na podłożu agarowym (o zawartości 1,5% agaru) optimum wytwarzania się owocni leży przy stężeniu suchej substancji ekstraktu słodowego od 0,2–0,7%, na-

tomiaś optimum wytwarzania się grzybni i sklerocji leży przy stężeniu 4–10%, zależnie od gatunku grzyba.

Podczas gdy do tworzenia się owocni niezbędne jest światło dzienne, stwierdzono w przeciwieństwie do tego, że przy dojrzewaniu kultur w ciemności zachodzi głównie obfite wytwarzanie się sklerocji lub grzybni. Najlepsze wydajności aktywnego materiału grzybowego (grzybni i sklerocji) otrzymuje się wtedy, gdy kultury powierzchniowe nastawi się na roztworze pożywki z ekstraktu słodowego (brzeczki piwnej lub handlowego preparatu ekstraktu słodowego) o zawartości 4–10% suchej substancji i gdy te kultury pozostawi się do dojrzewania w ciemności w stałej temperaturze między 22–26°C. Dla dobrego wzrostu należy dodać do roztworu pożywki 0,2% agaru. W tym prawie ciekłym ośrodku grzyb znajduje dostateczny punkt oparcia do szybkiego wytworzenia zamkniętej pokrywy grzybni. Dodatek soli  $Fe^{II}$  jest niezbędny, oprócz tego okazuje się, że bardzo korzystnie wpływają dodatki soli cynku, potasu, wapnia i magnezu, zawierające jony azotanowe, fosforanowe i siarczanowe, jak również ekstraktu drożdżowego lub namoku kukurydzianego.

Ten sposób hodowli oznacza wielki postęp techniczny, gdyż pozwala w krótszym czasie i przy mniejszym nakładzie pracy w porównaniu z hodowlą na naturalnych substratach, otrzymać ponad dziesięciokrotnie większą wydajność aktywnego materiału wyjściowego.

Aktywny materiał grzybowy (owocnie, sklerocje lub grzybnie) suszy się ostrożnie w strumieniu powietrza lub w próżni w temperaturze 20–40°C, drobno miele i dokładnie ekstrahuje wodą, niższym alkoholem alifatycznym lub mieszaniną wody i rozpuszczalnika organicznego mieszającego się z wodą. Ekstrakcję przeprowadza się w temperaturze pokojowej. Ekstrakty odparowuje się w próżni w niskiej temperaturze, a pozostałość odtłuszcza się eterem naftowym i ekstrahuje acetonem lub mieszaniną chloroform-alkohol, w celu uwolnienia jej od nieaktywnych substancji towarzyszących. Pozostałe substancje balastowe oddziela się przez rozpuszczenie pozostałości w możliwie małej ilości wody i powtórne wytrącenie za pomocą bezwodnego etanolu albo acetonu. Przesącz odparowuje się w próżni w niskiej temperaturze.

Dalsze oczyszczanie odbywa się na drodze chromatograficznej w kolumnie z proszkiem

celulozowym. Eluację przeprowadza się za pomocą butanolu nasyconego wodą lub innego alkoholu nie mieszanego się z wodą. Pobrane frakcje poddaje się próbie z odczynnikiem Kellera (chlorek żelaza w kwasie octowym i stężony kwas siarkowy) na zawartość substancji czynnych. Frakcje wykazujące dodatnią reakcję barwną łączy się i w razie potrzeby poddaje ponownemu rozdzielaniu na kolumnie chromatograficznej wypełnionej proszkiem celulozowym. Z chromatogramu eluuje się strefę szybciej przesuwaną się, która daje czysto niebieskie zabarwienie w reakcji Kellera, i z której otrzymuje się substancję czynną zwaną „psilocyną”, podczas gdy z wolniej przesuwaną się strefy otrzymuje się drugą, przeważającą pod względem ilościowym substancję czynną „psilocybinę”, która daje fioletową reakcję barwną.

Otrzymane z kolumny już w dość czystej postaci substancje czynne, zawierają chlorowec i z tego względu nie krystalizują. Dopiero na drodze obróbki chemicznej można usunąć chlorowec, przez co otrzymuje się związki zdolne do krystalizacji. W tym celu roztwór wodny ciał czynnych traktuje się węglem srebrowym a przesącz uwalnia się od nadmiaru jonów srebrowych za pomocą siarkowodoru. Następnie przesącz zagęszcza się w próżni w niskiej temperaturze, przy czym ze stężonego roztworu krystalizują substancje czynne.

Do celów analitycznych psilocybinę poddaje się ponownemu przekrystalizowaniu z metanolu lub z wody. Z wody otrzymuje się drobne, śnieżnobiałe igielki, z metanolu — bezbarwne sześciokątne płytki lub pryzmy, zawierające metanol, które topią się z rozkładem w temperaturze 195—200°C. Otrzymany związek rozpuszcza się w 120 częściach objętościowych wrzącego metanolu lub w 20 częściach objętościowych wrzącej wody: w wyższych alkoholach lub w innych rozpuszczalnikach organicznych jest on bardzo trudno rozpuszczalny lub całkowicie nierozpuszczalny.

Do analizy suszy się czystą substancję w próżni w temperaturze 100°C, przy czym następuje ubytek ciężaru równy 10,4%. Wyniki analizy elementarnej odpowiadają wzorowi sumarycznemu  $C_{12}H_{17}O_4N_2P$  (ciężar cząsteczkowy 284,2). Psilocybina jest związkiem amfoterycznym, optycznie nieczynnym i rozpuszcza się łatwo z wytworzeniem soli w rozcieńczonych wodnych roztworach kwasów mineralnych i alkaliów. Roztwór psilocybiny w 80%-o-

wym roztworze wodnym etanolu reaguje słabo kwaśno (pH = 5,2). Widmo ultrafioletowe w roztworze metanolem wykazuje maksima przy 222, 267 i 290 m $\mu$ .

Do analizy psilocynę oczyszcza się przez ponowne chromatografowanie na kolumnie wypełnionej proszkiem celulozowym za pomocą nasyconego wodą butanolu lub przez traktowanie kwaśnym węglanem sodowym w roztworze wodnym i wytrząsanie z eterem lub innym rozpuszczalnikiem organicznym. Wyniki analizy elementarnej odpowiadają wzorowi sumarycznemu  $C_{12}H_{16}NO_2$ . Psilocyna krystalizuje z metanolu lub z acetonu: jest ona umiarkowanie rozpuszczalna w wodzie a łatwo rozpuszczalna w rozcieńczonym kwasie. Temperatura topnienia 173—176°C (rozkład).

Psilocyna charakteryzuje się widmem ultrafioletowym (w roztworze metanolem) o maksimach przy 222, 260, 267, 283 i 293 m $\mu$ , oraz reakcją barwną Kellera, w której w przeciwieństwie do psilocybiny daje zabarwienie czysto niebieskie.

Przy wstrzykiwaniu podskórnym lub podawaniu doustnym 2—8 mg psilocybiny wywołuje ona u ludzi objawiające się na zewnątrz pocucie błogostanu, któremu towarzyszy brak pobudliwości i apatia. Przy wyższych dawkach występują obok objawów wegetatywnych pewne dostrzegalne zmiany zewnętrzne. Omówione związki mogą być stosowane do badania chorób umysłowych i psychoz różnorodnego pochodzenia oraz mogą być stosowane jako skuteczny środek pomocniczy przy leczeniu psycho-terapeutycznym psychicznie chorych.

Przykład I. Psilocybina i psilocyna z *Psilocybe mexicana* Heim pochodzenia naturalnego.

Do hodowli na naturalnym substracie sporządza się kompost z przefermentowanej słomy pszenicznej. Kompost przemywa się dużą ilością bieżącej wody, rozdrabnia w glinianej misie, sterylizuje w autoklawie, a następnie zaszczenia grzybnią z pierwotnych kultur i poddaje dojrzewaniu w ciągu około 2 tygodni w temperaturze 24—27°C. Po tym czasie kultury przykrywa się sterylnym piaskiem i pozostawia w szklanych skrzynkach na świetle dziennym w temperaturze 21—22°C. Po 4 do 5 tygodniach pojawiają się owocnie: zbiór następuje w ciągu jednego do dwóch miesięcy od chwili kiedy zaczęły się tworzyć zarodniki.

Dojrzałe owoce *Psilocybe mexicana* Heim suszy się następnie ostrożnie w strumieniu powietrza w temperaturze 30°C. 54 g wysuszonych grzybów miele się drobno i wytrząsa jeden raz z 600 ml i trzykrotnie z 300 ml metanolu w ciągu 1/2 godziny. Ekstrakty oczyszcza się i odparowuje w próżni do suchości. Pozostałość 12 g.

Pozostałość po ekstrakcji metanolem uciera się czterokrotnie z 250 ml eteru naftowego i jeszcze 3 razy ze 100 ml chloroformu z dodatkiem 10% alkoholu w celu usunięcia tłuszczów. Nierozpuszczoną jeszcze pozostałość rozpuszcza się w 10 ml wody i powoli zadaje 100 ml absolutnego alkoholu, przy czym roztwór wzbogaca się w substancję czynną. Tę operację powtarza się jeszcze 2 lub 3 razy. Zdekantowane roztwory odparowuje się w próżni do suchości, ponownie rozpuszcza w metanolu i zadaje 20 g proszku celulozowego z dodatkiem 5% wody. Metanol ponownie odparowuje się w próżni a proszek celulozowy obciążony substancją czynną wprowadza się do kolumny wypełnionej 100 g sproszkowanej celulozy z dodatkiem 5% wody (kolumnę oczyszcza się uprzednio przez przemycie butanolem nasyconym wodą). Eluację przeprowadza się za pomocą butanolu nasyconego wodą i odbiera się frakcje po 20 ml. Pozostałość po odparowaniu poszczególnych frakcji poddaje się próbie na zawartość substancji czynnych za pomocą barwnej reakcji Kellera. W tym celu 0,25 mg próbki z pozostałości po odparowaniu traktuje się 2 ml odczynnika Kellera.

Frakcje o dodatniej reakcji barwnej łączy się. Bezpostaciowy proszek rozpuszcza się w 20 ml wody i wytrząsa z 0,5 g węglanu srebrowego. Po przesączeniu usuwa się z roztworu jony srebrowe za pomocą siarkowodoru a następnie roztwór ostrożnie zagęszcza się. Ze stężonego roztworu krystalizuje psylocybina pod postacią bezbarwnych, drobnych igieł (wydajność 200 mg).

Psylocynę otrzymuje się z owocu tylko w ilościach śladowych.

Psylocybiny otrzymuje się w stanie analitycznie czystym po powtórnych przekrystalizowaniu z metanolu lub wody. Rozpuszcza się ją w 120 częściach wagowych wrzącego metanolu lub w 20 częściach wagowych wody w temperaturze wrzenia. Z metanolu otrzymuje się bezbarwne pryzmy, które topią się w temperaturze 195–220°C z równoczesnym rozkładem.

Podane wartości odpowiadają według analizy wzorowi sumarycznemu  $C_{13}H_{20}O_3N_2P_2$ . Widmo ultrafioletowe otrzymane w metanolu wykazuje następujące maxima:

222 mμ, 267 mμ i 290 mμ.

Nowa substancja czynna posiada charakter amfoteryczny. Rozpuszcza się ona zarówno w rozcieńczonych wodnych roztworach alkaliów jak również w wodnych roztworach kwasów. Roztwór psylocybiny w 80%-owym wodnym roztworze alkoholu reaguje kwaśno (pH-5,2).

Przykład II. Otrzymywanie psylocybiny i psylocyny z *Stropharia cubensis* Earle pochodzenia naturalnego.

Owoce *Stropharia cubensis* Earle zebrane w Meksyku suszy się na powietrzu, w cieniu, w temperaturze pokojowej. 24,2 g wysuszonej owocu miele się drobno i wytrząsa się w temperaturze pokojowej jeden raz z 300 ml i trzy razy z 150 ml metanolu w ciągu 1/2 godziny. Ekstrakty łączy się i odparowuje w próżni do suchości. Pozostałość (6 g) w celu odłuszczenia uciera się czterokrotnie z 125 ml eteru naftowego a następnie trzykrotnie z 50 ml chloroformu zawierającego 10% etanolu. Nierozpuszczoną jeszcze resztę w ilości około 5 g rozpuszcza się w 5 ml wody i z roztworu tego wytrąca się inne substancje towarzyszące, przez powolne traktowanie 50 ml absolutnego etanolu, przy czym roztwór wzbogaca się w substancję czynne. Oczyszczanie na tej samej drodze powtarza się jeszcze dwu- lub trzykrotnie. Zdekantowane roztwory łączy się i odparowuje w próżni do suchości. Pozostałość roztwarza się w metanolu i traktuje 10 g proszku celulozowego z dodatkiem 5% wody. Metanol odparowuje się w próżni a proszek celulozowy zawierający substancję czynną wprowadza się na kolumnę wypełnioną 50 g proszku celulozowego zawierającego 5% wody (uprzednio kolumnę przemycia się butanolem nasyconym wodą). Eluację przeprowadza się za pomocą nasyconego wodą butanolu i odbiera frakcje po 10 ml. Poszczególne frakcje odparowuje się w wysokiej próżni przy temperaturze łaźni najwyższej 50°C i przeprowadza próbę na zawartość substancji czynnych za pomocą lodowatego kwasu octowego, zawierającego chlorek żelazowy oraz stężonego kwasu siarkowego. W tym celu próbki pozostałości po 0,25 mg traktuje się 2 cm<sup>3</sup> odczynnika Kel-

lera. Frakcje czynne dają fioletowe (psylocybina) lub czysto niebieskie (psilocyna) zabarwienie w reakcji Kellera.

Frakcje dające dodatnią reakcję barwną o tym samym zabarwieniu łączy się razem. Bezpostaciowy proszek otrzymany jako pozostałość po odparowaniu powyższych frakcji rozpuszcza się w 2 ml wody i wytrząsa z 0,25 g węglału srebrowego. Po przesączeniu usuwa się nadmiar jonów srebrowych siarkowodorem. Z roztworu zagęszczonego w warunkach zachowawczych krystalizuje psylocybina pod postacią bezbarwnych drobnych igieł. Otrzymuje się 58 g krystalicznej psylocybiny, co odpowiada wydajności 0,24% w odniesieniu do wysuszonej owocni, oraz ślady psilocyny.

Przykład III. Otrzymywanie psylocybiny i psilocyny z czystych kultur *Psilocybe semiperviva* Heim et Cailleux.

#### a. Otrzymywanie szczepionki:

Czyste kultury z zarodników meksykańskich grzybów kapeluszowych *Psilocybe semiperviva* Heim et Cailleux wprowadza się na pożywkę z brzezki piwnej i agaru. W tym celu zarodniki opadające z blaszek dojrzałej owocni chwytają się na sterylną podstawkę, wprowadza na brzezke piwną z agarem i poddaje dojrzewaniu. Z tak wytworzonych kultur pierwotnych otrzymuje się w następujący sposób materiał do zaszczepienia:

Grzybnie przy sterylnym dopływie wody zeskrobuje się ostrą łopatką tak, że powstaje zawiesina zawierająca drobne kłaczki grzybni. Tą zawiesiną zaszczepia się kolbki Erlenmeyera, które zawierają pożywkę i wypełnienia porcelanowe w kształcie siodelkowatym. Najlepiej przeprowadza się doświadczenia w kolbkach Erlenmeyera o pojemności 300 ml, zawierających 50 g wypełnienia w kształcie siodelkowatym (wielkość 1 cm, ciężar około 0,9 g) i 80 ml pożywki, składającej się z brzezki piwnej o zawartości około 4% suchej substancji i 0,2% agaru.

Kultura dojrzewa w temperaturze 24°C, po upływie dwóch tygodni tworzy się na powierzchni ściska pokrywa grzybni. Całą kulturę wytrząsa się w ciągu 30 minut na wstrząsarce obrotowej, przy czym siodelkowate wypełnienie swymi ostrymi krawędziami powoduje zmieszenie grzybni. Wytwarza się przy tym drobna zawiesina kłaczek grzybni. Tak otrzymana szczepionka wystarcza do zaszczepienia 50 litrów pożywki.

#### b. Otrzymywanie kultury:

Świeżą jasną brzezke piwną bez dodatku chmielu rozcieńcza się wodą do zawartości 8% suchej substancji. Jeden litr tego roztworu zawiera:

|                                       |           |
|---------------------------------------|-----------|
| FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O | 0,00417 g |
| ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O | 0,00172 g |
| Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>     | 1,0 g     |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>       | 0,0624 g  |
| MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O | 0,0624 g  |
| KCl                                   | 0,0312 g  |
| Agar-Agar                             | 2,0 g     |

Tę pożywkę rozlewa się w porcjach po 1 litrze do kolb penicylinowych i sterylizuje w autoklawie w ciągu 25 minut w temperaturze 108°C. Po ochłodzeniu zaszczepia się zawartość kolb za pomocą 2 ml zawiesiny, *P. semiperviva* Heim et Cailleux. Otrzymane kultury dojrzewają w ciemności w temperaturze 24–26°C. Wytwarza się pokrywa grzybni, jak opisano pod IIIa.

#### c. Wyodrębnienie materiału grzybowego:

Po siedmiu tygodniach dojrzałą kulturę przesącza się przez gazę, materiał grzybowy wyciska i suszy w próżni w temperaturze 30°C. Z jednej szarży 100 kolb penicylinowych, zawierających 100 litrów pożywki otrzymuje się przy zbiorze po upływie 49 tygodni 2540 g suchego materiału, to jest 25,4 g na litr nastawionej pożywki. Przesącz z kultury, który zawiera także pewną ilość substancji czynnych, poddaje się obróbce w taki sam sposób jak poniżej opisany materiał grzybowy.

#### d. Otrzymywanie substancji czynnych:

306 g wysuszonego materiału grzybowego poddaje się dokładnemu sproszkowaniu i wytrząsa trzykrotnie z chloroformem w ilości po 500 ml a następnie trzykrotnie z chloroformem zawierającym 10% etanolu w ilości po 500 ml. Nieaktywne substancje towarzyszące przechodzą przy tym do roztworu w ilości 2,8 g. Wstępnie wyekstrahowany materiał grzybowy łąguje się wyczerpująco jeden raz 3 litrami i trzykrotnie po 1,5 litra metanolu. Połączone wyciągi odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem do suchości, przy czym pozostaje jasno brunatny osad w ilości 17,5 g. W celu oddzielenia od zanieczyszczeń tłuszczowych rozpuszcza się ten osad w 17,5 ml wody a zawiesinę wytrząsa jeden raz z 500 ml i dwa razy z eterem naftowym w ilości po 250 ml. Roztwór w eterze naftowym zawiera 0,75 g nieaktywnych substancji towarzyszących. Po-

zostały roztwór wodny zagęszcza się w próżni do około 25 ml i zadaje przy silnym mieszanju 250 ml absolutnego etanolu. Roztwór zawierający substancję czynną oddziela się przez dekantację od powstałego przy tym kleistego osadu. Osad ponownie rozpuszcza się w małej ilości wody i traktuje dziesięciokrotną ilością absolutnego alkoholu etylowego. To oczyszczanie osadu przez strącanie powtarza się jeszcze dwukrotnie. Roztwory łączy się i odparowuje w próżni do suchości. Otrzymuje się 11,7 g pozostałości, która zawiera całkowitą ilość substancji czynnych.

Do chromatografii w kolumnie celulozowej pozostałość rozpuszcza się w możliwie niewielkiej ilości 50%-owego metanolu a otrzymany roztwór dokładnie miesza z 40 g proszku celulozowego i suszy w próżni. Proszek celulozowy obciążony w ten sposób substancją wprowadza się na kolumnę celulozową, której wypełnienie przygotowano przez odszlamowanie 350 g-proszku celulozowego za pomocą butanolu nasyconego wodą. Chromatogram rozwija się za pomocą butanolu nasyconego wodą, przy czym oddziela się frakcje po 100 ml i odparowuje w wysokiej próżni przy temperaturze łaźni nie przekraczającej 50°C. Średnie frakcje (3,35 g), które dają dodatnią reakcję barwną z odczynnikami Kellera oczyszcza się jeszcze raz przez chromatografowanie na proszku celulozowym.

Przy rozwijaniu chromatogramu za pomocą butanolu nasyconego wodą, oddziela się frakcje po 50 ml i po odparowaniu w wysokiej próżni przy temperaturze łaźni najwyżej 50°C, poddaje próbie na barwną reakcję Kellera. Otrzymuje się przy tym następujący podział:

| Frakcja nr. | Pozostałość<br>mg | Barwna reakcja<br>Kellera |
|-------------|-------------------|---------------------------|
| 1 — 7       | 1270              | ujemna                    |
| 8 — 16      | 87                | czysto niebieska          |
| 17 — 20     | 79                | ujemna                    |
| 21 — 30     | 1053              | fioletowa                 |
| 31 — 43     | 758               | ujemna                    |

Pozostałość z frakcji 8—16 (87 mg) dostarcza po traktowaniu węglanem srebrowym 45 mg czystej psylocyny, jak opisano w przykładzie II. Frakcje 21—30 (1053 mg) dostarczają po traktowaniu węglanem srebrowym 765 mg czystej psylocybiny.

W taki sam sposób otrzymuje się substancje czynne z przesączu po kulturze. W tym celu przesącz zagęszcza się w próżni do około 1/10

objętości. Substancje towarzyszące wytrąca się za pomocą dziesięciokrotnej objętości metanolu, następnie odsąca się, a roztwór odparowuje w próżni do suchości i ekstrahuje pozostałość trzy razy dziesięciokrotną ilością metanolu. Pozostałość po odparowaniu ekstraktów metanolowych poddaje się dalszej obróbce jak powyżej. Z 12 litrów przesączu po kulturze otrzymuje się 80 mg psylocybiny i 6 mg psylocyny. Ogólna wydajność: 845 mg psylocybiny i 51 mg psylocyny, co odpowiada zawartości 0,28% lub 0,017% w odniesieniu do suchego materiału grzybowego.

**P r z y k ł a d I V.** Otrzymanie psylocybiny i psylocyny z czystych kultur *Psilocybe mexicana* Heim.

W przykładzie tym podaje się dokładny opis hodowli grzybów *Psilocybe mexicana* Heim in vitro w celu wytworzenia grzybni i sklerocji, jak również otrzymywanie czystych substancji czynnych.

Świeżą, pozbawioną chmielu brzeczkę piwną rozcieńcza się wodą do zawartości 4,0—4,5% suchej substancji. Na każdy litr tego roztworu dodaje się:

|                                      |           |
|--------------------------------------|-----------|
| FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 0,00417 g |
| ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 0,00172 g |
| agar-agar                            | 2,0 g     |

Pożywkę tę rozlewa się porcjami po 500 ml do kolb Fernbacha o pojemności 1,6 litra i sterylizuje w autoklawie w ciągu 25 minut w temperaturze 108°C. Po ochłodzeniu zaszczepia się zawartość kolb 2 ml zawiesiny grzyba *Psilocybe mexicana* Heim. Szczepionkę otrzymuje się przez umieszczenie zarodników czystych kultur wymienionych grzybów kapeluszkowych na brzeczce piwnej i agarze. Zarodniki opadające z blaszek dojrzałej owocni, wprowadza się na pożywkę z brzeczki piwnej i agaru i poddaje dojrzewaniu. Z wytworzonych w ten sposób kultur pierwotnych można otrzymać szczepionkę w sposób następujący: grzybnie przy sterylnym dopływie wody zeskrobuje się ostrą łopatką tak, że wytwarza się zawiesina drobnych kłaczek grzybni. Tą szczepionką zaszczepia się umieszczoną w kolbkach Erlenmeyera pożywkę (w której umieszczone są siodełkowate porcelanowe kształtki wypełniające). Najlepiej przeprowadza się doświadczenia z kolbami Erlenmeyera zawierającymi 50 g siodełkowatych kształtek wypełniających (wielkość — 1 cm, ciężar około 0,9 g) i 80 ml pożywki, składającej się z brzeczki piwnej o zawartości około 4% suchej substancji i 0,2%

agaru. W czasie dojrzewania w temperaturze 24°C, po upływie 2 tygodni tworzy się na powierzchni szczelna pokrywa grzybni. Całą hodowlę wiruje się w ciągu 30 minut na wstrząsance, przy czym kształtki siodełkowe rozdrabniają grzybnę, tak że powstaje drobna zawiesina kłaczek grzybni. Tak otrzymana szczepionka wystarcza do zaszczepienia 25 litrów pożywki.

Zaszczepione kultury dojrzewają w ciemności w temperaturze 24–26°C. Tworzy się przy tym już opisana pokrywa grzybni, zacierająca bardzo liczne sklerocje, które ogólnie biorąc osiągają wielkość około 1 cm (w poszczególnych przypadkach mogą być znacznie większe). W celu oddzielenia grzybni i sklerocji przesącza się czyste kultury przez gazę, sprasowuje się i suszy w suszarce w temperaturze 35–40°C. Z jednej szarzy 135 kolb Fernbacha, zawierających 67 litrów pożywki, otrzymuje się przy zbiorze po upływie 62 dni 1149 g suchego materiału (sklerocji i grzybni), co odpowiada 17,14 g na liter nastawionej pożywki.

W celu otrzymania substancji czynnych, sproszkowuje się dokładnie na przykład 612 g wysuszonego materiału, składającego się z sklerocji i grzybni i ekstrahuje 3 razy chloroformem w ilości po 1 litrze i jeszcze 3 razy chloroformem z dodatkiem 10% etanolu w ilości po 1 litrze. Do ekstraktu przechodzi przy tym 5,6 g nieaktywnych ciał towarzyszących. Wstępnie wyekstrahowany materiał grzybowy luguje się następnie dokładnie metanolem (jeden raz w ilości 6 litrów i 3 razy w ilości 3 litrów). Połączone wyciągi metanole odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem do suchości i otrzymuje się przy tym 35 g jasno brunatnej pozostałości. Tę pozostałość w celu usunięcia zanieczyszczeń tłuszczowych zalewa się 35 ml wody i wytrząsa się jeden raz z 1 litrem i dwa razy po 0,5 litra eteru naftowego. Eter naftowy zawiera teraz 1,5 g nieaktywnych substancji towarzyszących. Pozostały roztwór wodny zagęszcza się uprzednio w próżni do około 50 ml i następnie silnie mieszając zadaje 500 ml bezwodnego etanolu. Roztwór zawierający substancje czynne oddziela się przez dekantację od powstałego kleistego osadu. Osad rozpuszcza się jeszcze raz w małej ilości wody i ponownie traktuje dziesięciokrotną ilością bezwodnego alkoholu. Tę operację strącania powtarza się jeszcze 2 razy. Roztwory łączy się i odparowuje w próżni do suchości. Otrzymuje się stałą pozostałość w ilości 23,4 g, która zawiera całkowitą ilość substancji czynnych.

Do chromatografowania na kolumnie celulozowej rozpuszcza się osad w możliwie małej ilości 50%-owego metanolu, a roztwór miesza się dokładnie z 80 g proszku celulozowego, po czym tak otrzymany materiał suszy się w próżni. Proszek celulozowy obciążony w ten sposób substancją wprowadza się na kolumnę celulozową, której wypełnienie przygotowano przez odszlamowanie 700 g proszku celulozowego za pomocą butanolu nasyconego wodą. Chromatogram rozwija się butanolem nasyconym wodą, przy czym wydziela się frakcje po 200 ml, które odparowuje się w wysokiej próżni w temperaturze łaźni nie przekraczającej 50°C. Otrzymuje się przy tym następujący podział:

Tabela 1

| Frakcja nr | Pozostałość<br>g | Reakcja barwna<br>Kellera |
|------------|------------------|---------------------------|
| 1–14       | 2,170            | ujemna                    |
| 15–34      | 6,660            | dodatnia                  |
| 35–40      | 3,540            | ujemna                    |
|            | 12,370           |                           |

Reszta w ilości około 11 g zostaje zatrzymana na kolumnie.

Frakcje 15–34, które dostarczają łącznie 6,660 g pozostałości, zawierają pewną ilość substancji czynnych. W celu dalszego oczyszczenia poddaje się je ponownie chromatografowaniu w sposób poniżej opisany. 6,6 g pozostałości rozpuszcza się w możliwie małej ilości metanolu, otrzymanym roztworem nasycy się 20 g proszku celulozowego, suszy i następnie wprowadza na kolumnę wypełnioną 600 g proszku celulozowego poddanego obróbce jak wyżej. Przy rozwijaniu chromatogramu za pomocą butanolu nasyconego wodą wydziela się frakcje po 100 ml, które po odparowaniu w wysokiej próżni poddaje się próbie na reakcję barwną. Otrzymuje się przy tym następujący podział:

Tabela 2

| Frakcja nr | Pozostałość<br>mg | Reakcja barwna<br>Kellera |
|------------|-------------------|---------------------------|
| 1–8        | 2,950             | ujemna                    |
| 9–17       | 180               | czysto niebieska          |
| 18–21      | 155               | ujemna                    |
| 22–31      | 912               | fioletowa                 |
| 32–45      | 1,510             | ujemna                    |

Pozostałość frakcji 9–17 (180 mg) dostarcza po obróbce węglanem srebrowym, jak opisano w przykładzie I, 90 mg czystej psylocyny.

Frakcje 22–31 (tabela 2) dostarczają po obróbie za pomocą węglanu srebrowego, opisanej w przykładzie I, 619 mg czystej psylocybiny o właściwościach opisanych w przykładzie I. Z przesączu po kulturach otrzymuje się substancje czynne w taki sam sposób jak powyżej opisano dla sklerocij. W tym celu przesącz po kulturach zagęszcza się w próżni do około 1/10 jego objętości, zadaje dziesięciokrotną objętością metanolu, przesącza, a pozostałość ekstrahuje 3 razy dziesięciokrotną ilością metanolu. Pozostałość po odparowaniu ekstraktów metanolowych przerabia się dalej, jak opisano wyżej. Z 10 litrów przesącza po kulturach otrzymuje się na przykład 220 mg psylocybiny i 12 mg psylocyny.

**Przykład V.** Otrzymywanie psylocybiny i psylocyny z czystych kultur *Stropharia cubensis* Earle.

Pożywkę przyrządza się następująco: świeża, jasną brzczkę piwną bez dodatku chmielu rozcieńcza się wodą bieżącą do 6% zawartości suchej substancji. Do każdego litra tego roztworu dodaje się:

|                                      |          |
|--------------------------------------|----------|
| FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 0,0021 g |
| ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 0,0009 g |
| Ca/NO <sub>3</sub> /2                | 1,0 g    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 0,0624 g |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 0,0624 g |
| KCl                                  | 0,0312 g |
| Agar-agar                            | 2,0 g    |

Pożywkę tę sterylizuje się jak w przykładzie III i zaszczepia 2 ml zawiesiny grzyba *Stropharia cubensis* Earle na litr pożywki. Otrzymywanie tej szczepionki w zawieszynie odbywa się tak, jak podano w przykładzie III. Po 52 dniach dojrzewania w ciemności w temperaturze 24°C otrzymuje się z ładunku 20 litrów 452 g suchego materiału grzybowego, to jest 22,6 g na litr pożywki. Otrzymanie substancji czynnych z materiału grzybowego przeprowadza się w sposób opisany w przykładzie III. Wydajność: 1083 mg czystej krystalicznej psylocybiny i 45 mg psylocyny, co odpowiada wydajności 0,24% lub 0,010% w odniesieniu do suchego materiału grzybowego.

**Przykład VI.** Otrzymywanie psylocybiny i psylocyny z *Psilocybe semperviva* Heim et Cailleux pochodzenia naturalnego.

Dojrzałe owocnie grzyba *Psilocybe semperviva* Heim et Cailleux otrzymane na drodze sztucznej hodowli na naturalnej pożywce (kompost) suszy się ostrożnie w strumieniu powietrza w temperaturze 30°C. 32 g wysuszonej owocni miele się drobno i wytrząsa w temperaturze pokojowej po 1/2 godziny raz z 300 ml metanolu i trzy-

krotnie z metanolem w ilości po 150 ml. Połączone ekstrakty odparowuje się w próżni do suchości. Pozostałość (8,3 g) w celu odtłuszczenia uciera się czterokrotnie z eterem naftowym w ilości po 125 ml i trzykrotnie z chloroformem, który zawiera 10% etanolu w ilości po 50 ml. Otrzymuje się 6,5 g pozostałości, którą rozpuszcza się w 6 ml wody. Roztwór ten traktuje się powoli 60 ml bezwodnego etanolu w celu wytrącenia pozostałych substancji towarzyszących, przy czym roztwór wzbogaca się w substancje czynne. Oczyszczanie na tej drodze powtarza się jeszcze dwa razy. Roztwory dekantuje się, łączy się razem i odparowuje w próżni do suchości. Pozostałość rozpuszcza się w metanolu i chromatografuje na proszku celulozowym, jak to opisano w przykładzie II. Tak otrzymane ciała czynne uwalnia się od chlorowca przez obróbkę węglanem srebrowym. Po przekrystalizowaniu otrzymuje się 160 mg krystalicznej psylocybiny i 32 mg psylocyny, co odpowiada zawartości 0,5% lub 0,1% w odniesieniu do wysuszonego materiału grzybowego.

**Przykład VII.** Otrzymywanie psylocybiny z *Psilocibe caerulescens* Murrill var. *Mazatecorum* Heim pochodzenia naturalnego.

Dojrzałe owocnie grzyba *Psilocibe caerulescens* Murrill var. *Mazatecorum* Heim otrzymane drogą sztucznej hodowli na naturalnej pożywce (kompost), suszy się ostrożnie, po czym wysuszony materiał grzybowy (7,3 g) miele się drobno i ekstrahuje dokładnie metanolem, jak opisano w przykładzie II. Ekstrakty łączy się i odparowuje w próżni do suchości. Otrzymaną jak w przykładzie II pozostałość poddaje się dalszej przeróbce w celu otrzymania substancji czynnych. Otrzymuje się 14,6 mg psylocybiny (w odniesieniu do materiału grzybowego wysuszonego). Z przerobionej próbki grzyba nie otrzymuje się psylocyny.

**Przykład VIII.** Otrzymywanie psylocybiny z czystych kultur *Psilocibe caerulescens* Murrill var. *Mazatecorum* Heim.

\* Środowisko hodowlane przygotowuje się przez rozcieńczenie wodą bieżącą świeżej brzcзки piwnej bez dodatku chmielu do zawartości 4,0% suchej substancji. Na każdy litr tego roztworu dodaje się:

|                                      |           |
|--------------------------------------|-----------|
| namoku kukurydzianego                | 10,0 g    |
| FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 0,00834 g |
| Ca/OH/2                              | 0,20 g    |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>      | 0,20 g    |
| NH <sub>4</sub> OH                   | 0,25 g    |
| Agar-agar                            | 2,0 g     |
| pH roztworu: 5,4                     |           |

Pożywkę tę sterylizuje się jak podano w przykładzie III, zaszczepia zawiesiną grzybni czystej hodowli *Psilocibe caerulescens* Murrill var. *Mazatecorum* Heim z Meksyku, a wytworzone kultury poddaje dojrzewaniu w ciemności w temperaturze 26°C. Po 48 dniach zbiera się 20,4 g suchego materiału grzybowego na litr roztworu. Wyodrębnienie i oczyszczenie substancji czynnych z tego materiału odbywa się tak, jak podano w przykładzie III. Wydajność z jednego ładunku: z 10 litrów pożywki wynosi: 449 mg psylocybiny, co odpowiada zawartości 0,22% w odniesieniu do wysuszonego materiału grzybowego. W ładunku tym nie znaleziono psylocyny.

**Przykład IX.** Otrzymywanie psylocybiny z *Psilocibe Zapotecorum* Heim pochodzenia naturalnego.

Dojrzałe owoce *Psilocibe Zapotecorum* Heim zebrane i przebrane w Meksyku w okolicach zwanych „pays chatino” ostrożnie suszy się (pozostałość 42,4 g) drobno miele i wytrząsa się z metanolem jak podano w przykładzie II. Połączone ekstrakty metanoleowe odparowuje się w próżni do suchości. Pozostałość przerabia się dalej jak podano w przykładzie II. Otrzymuje się 212 mg czystej psylocybiny, co odpowiada zawartości 0,5%. Z przerobionego materiału grzybowego nie otrzymuje się psylocyny.

**Przykład X.** Otrzymywanie psylocybiny z czystych kultur *Psilocibe Zapotecorum* Heim.

Świeżą, jasną brzczkę piwną bez dodatku chmielu rozcieńcza się wodą bieżącą do zawartości 4,5% suchej substancji. Na każdy litr tego roztworu dodaje się:

|                                 |           |
|---------------------------------|-----------|
| FeSO <sub>4</sub>               | 0,00834 g |
| namoku kukurydzianego           | 10,0 g    |
| NH <sub>4</sub> OH              | 0,30 g    |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 0,30 g    |
| Agar-agar                       | 2,0 g     |

pH roztworu: 5,5.

To środowisko hodowlane sterylizuje się jak opisano w przykładzie III i zaszczepia zawiesiną grzybni czystej kultury, którą otrzymano z zarodników dojrzałego owocu *Psilocibe Zapotecorum* Heim z „pays chatino” w Meksyku. Po 57 dniach dojrzewania w ciemności w temperaturze 24°C otrzymuje się z ładunku 25 litrów, 430 g wysuszonego materiału grzybowego, to jest 17,2 g na litr pożywki. Otrzymywanie substancji czynnych z tego materiału odbywa się według sposobu podanego w przykładzie III. Wydajność: 903 mg czystej psylocybiny, co odpowiada zawartości 0,21% w odniesieniu do suchego materiału grzybowego. Psylocyny nie otrzymuje się.

**Przykład XI.** Otrzymywanie psylocybiny i psylocyny z *Psilocibe Aztecorum* Heim pochodzenia naturalnego.

Dojrzałe owoce *Psilocibe Aztecorum* Heim zebrane w Meksyku w kraju Azteków (Na Popocatepetl na wysokości 3300—3500 m nad poziomem morza) suszy się ostrożnie, miele drobno i dokładnie ekstrahuje metanolem jak opisano w przykładzie II. Ekstrakty łączy się i odparowuje w próżni do suchości. Pozostałość przerabia się w celu wyizolowania substancji czynnych jak podano w przykładzie II. Otrzymuje się 570 mg czystej psylocybiny i 47 mg psylocyny, co odpowiada zawartości 0,2% lub 0,017% w odniesieniu do suchego materiału grzybowego (285 g).

**Przykład XII.** Otrzymywanie psylocybiny i psylocyny z czystych kultur *Psilocibe Aztecorum* Heim.

W skład pożywki wchodzi:

|                                      |         |   |
|--------------------------------------|---------|---|
| ekstrakt słodowy                     | 100     | g |
| FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 0,00417 | g |
| ZnOS <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 0,00172 | g |
| Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>    | 1,0     | g |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 0,25    | g |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 0,25    | g |
| KCl                                  | 0,125   | g |
| Agar-agar                            | 2,0     | g |
| woda bieżąca do 1000 ml              |         |   |

Pożywkę sterylizuje się w autoklawie w ciągu 25 minut w temperaturze 108°C. 1 litr zaszczepia się 2 ml zawiesiny grzyba *Psilocibe Aztecorum* Heim. Otrzymywanie tej szczepionki zawiesinowej przeprowadza się jak podano w przykładzie IIIa. Kultury dojrzewają w ciemności przez 45 dni w temperaturze 24°C a zbiór przeprowadza się jak opisano w przykładzie IIIc. Wydajność z 10 litrów pożywki wynosi 86,5 g suchej grzybni. Drobno zmieloną grzybnię wytrząsa się w temperaturze pokojowej przez 1/2 godziny z 1 litrem 80%-owego etanolu. Pozostałość po odsączeniu ekstrahuje się jeszcze trzykrotnie w ten sam sposób. Pozostałość otrzymaną przez odparowanie połączonych ekstraktów (8,9 g), w celu oddzielenia od tłuszczowych substancji towarzyszących i nieaktywnych substancji balastowych, ługuje się kolejno dwukrotnie 100 ml eteru naftowego, dwukrotnie 30 ml chloroformu i dwukrotnie 50 ml acetonu. Otrzymuje się 5,6 g proszku rozpuszczalnego w wodzie, który rozpuszcza się w 6 ml wody. Roztwór mieszając traktuje się powoli 60 ml acetonu, oddziela wytrącony osad, który rozpuszcza się następnie w małej ilości wody i wytrąca jeszcze raz dziesięciokrotną ilość acetonu.

To oczyszczanie przez strącanie osadu powtarza się jeszcze dwa razy, przy czym pewna ilość substancji czynnych przechodzi do ekstraktu wodno-acetonowego. Ekstrakty odparowuje się w próżni, a pozostałość (2,8 g) oczyszcza się i rozdziela przez chromatografowanie na kolumnie z proszkiem celulozowym.

Po dwukrotnym chromatografowaniu otrzymuje się 225 mg krystalicznej psylocybiny i 15 mg psylocyny, co odpowiada wydajności 0,26% lub 0,017% w odniesieniu do suchego materiału grzybowego.

#### Przykład XIII. Otrzymywanie kultury.

Pożywkę otrzymuje się następująco:

Świeżą brzeczkę piwną (jasną bez chmielu) rozcieńcza się bieżącą wodą do zawartości suchej substancji od 4,0 do 4,5%. Do jednego litra tego roztworu dodaje się:

|                                      |           |
|--------------------------------------|-----------|
| FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 0,00209 g |
| ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 0,00086 g |
| Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>    | 0,25 g    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 0,0625 g  |
| MgSO <sub>4</sub>                    | 0,0625 g  |
| KCl                                  | 0,031 g   |
| Agar-agar                            | 2,0 g     |

Pożywkę tę sterylizuje się i zaszczepia jak w przykładzie IV. Po 48-dniowym dojrzewaniu w temperaturze 24°C, osiąga się na niej z jednego ładunku 55 litrów, wydajność 924 g sklerocji i grzybni (suchej substancji), co stanowi 16,6 g na litr pożywki. Otrzymanie z tego materiału ciał czynnych przeprowadza się jak opisano w przykładzie IV. Wydajność: 0,018% psylocyny i 0,12% psylocybiny w odniesieniu do suchego materiału grzybowego.

#### Przykład XIV. Otrzymywanie kultury.

Pożywkę otrzymuje się następująco:

Świeżą brzeczkę piwną (jasną, bez chmielu) rozcieńcza się wodą bieżącą do zawartości suchej substancji 4,0–4,5%. Na każdy litr tego roztworu dodaje się:

|                                      |           |
|--------------------------------------|-----------|
| FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 0,00209 g |
| ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 0,00086 g |
| Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>    | 1,0 g     |
| Agar-agar                            | 2,0 g     |

Pożywkę sterylizuje się, zaszczepia i poddaje dojrzewaniu jak w przykładzie IV. Po 48 dniach zbiera się 20,5 g suchej grzybni i sklerocji na litr pożywki, z których wydziela się substancje czynne jak w przykładzie IV. Wydajność: 0,011% psylocyny i 0,14% psylocybiny w stosunku do wysuszonego materiału grzybowego.

#### Przykład XV. Otrzymywanie kultury.

Pożywkę otrzymuje się następująco:

Świeżą brzeczkę piwną (jasną, bez chmielu) rozcieńcza się wodą bieżącą do zawartości suchej substancji 4,0–4,5%. Do każdego litra tego roztworu dodaje się:

|                                      |           |
|--------------------------------------|-----------|
| FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 0,00209 g |
| ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 0,00086 g |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 0,25 g    |
| Agar-agar                            | 2,0 g     |

Dalszą obróbkę przeprowadza się jak opisano w przykładzie IV. Wydajność wysuszonych sklerocji i grzybni wynosi po 48 dniach 15,9 g na litr pożywki. Wydzielenie substancji czynnych przeprowadza się jak opisano w przykładzie IV. Wydajność: 0,02% psylocyny i 0,11% psylocybiny w stosunku do wysuszonego materiału grzybowego.

#### Przykład XVI. Otrzymywanie kultury.

Pożywkę otrzymuje się następująco:

Świeżą brzeczkę piwną (jasną, bez chmielu) rozcieńcza się wodą bieżącą do zawartości suchej substancji 4,0–4,5%. Do każdego litra tego roztworu dodaje się:

|                                      |           |
|--------------------------------------|-----------|
| FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 0,00209 g |
| ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 0,00086 g |
| namoku kukurydzianego                | 20,0 g    |
| Agar-agar                            | 2,0 g     |

Dalszą obróbkę przeprowadza się jak opisano w przykładzie IV. Wydajność wysuszonych sklerocji i grzybni po 48 dniach wynosi 29,3 g na litr pożywki. Wydzielenie ciał czynnych przeprowadza się tak jak opisano w przykładzie IV. Wydajność: 0,012% psylocyny i 0,22% psylocybiny w stosunku do suchego materiału grzybowego.

#### Przykład XVII. Otrzymywanie kultury.

Jako pożywkę stosuje się:

|                                      |           |
|--------------------------------------|-----------|
| ekstrakt słodowy                     | 45 g      |
| FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 0,00417 g |
| ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 0,00172 g |
| wodę bieżącą                         | 1000 ml   |

Pożywkę sterylizuje się w autoklawie w temperaturze 108°C w ciągu 25 minut. 1 litr pożywki zaszczepia się 10 ml zawiesiny grzyba *Psilocibe mexicana*, przy czym otrzymywanie szczepionki w zawieszynie odbywa się tak jak opisano w przykładzie IV. Po zaszczepieniu grzyb rozmnaża się na tej pożywce w temperaturze 24°C. Tworzą się przy tym kuleczki grzybni podobne do sago, co jest rzeczą znaną przy rozmnażaniu się niższych grzybów. Po 30 dniach grzybnie oddziela się przez odsączenie. Otrzymuje się 7,0 g suchej grzybni na litr pożywki.

480 g wysuszonej, drobno zmielonej grzybni wytrząsa się w temperaturze pokojowej przez 1½ godziny z 4,5 litra 80%-owego etanolu. Po

odsączeniu pozostałości ekstrahuje się w ten sam sposób jeszcze trzy razy. Pozostałość po odparowaniu połączonych ekstraktów (41 g) ługuje się kolejno dwukrotnie 500 ml eteru naftowego, dwukrotnie 400 ml chloroformu i dwukrotnie 200 ml acetonu w celu oddzielenia substancji balastowych. Pozostaje 25 g rozpuszczalnego w wodzie proszku, który rozpuszcza się w 25 ml wody. Do roztworu dodaje się powoli, dobrze mieszając, 250 ml acetonu, a wytrącony osad po oddzieleniu od cieczy rozpuszcza jeszcze raz w małej ilości wody i ponownie wytrąca za pomocą dziesięciokrotnej ilości acetonu. Tę operację z osadem nierozpuszczalnym w acetonie, powtarza się jeszcze dwukrotnie, przy czym wszystkie substancje czynne przechodzą do wyciągów wodno-acetonowych. Wyciągi te odparowuje się dobrze mieszając, a pozostałość (9,8 g) rozdziela dalej przez chromatografię na kolumnie celulozowej jak opisano w przykładzie IV. Po dwukrotnym chromatografowaniu otrzymuje się 32 mg krystalicznej psylocyny i 225 mg psylocybiny, co odpowiada wydajności 0,007 lub 0,05% w odniesieniu do suchej grzybni.

#### Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania psylocybiny i psylocyny w stanie czystym z pewnych gatunków grzybów, znamieny tym, że z materiału grzybowego pochodzenia naturalnego rodzajów *Psilocibe*, *Stropharia*, *Panaeolus*, *Conocybe*, *Amanita* lub *Russula*, albo ze sztucznie rozmnożonego materiału grzybowego, otrzymanego z kultur tych grzybów lub ich biologicznych wariantów i mutantów przez zaszczerpienie sztucznej pożywki i dojrzewanie tych kultur na świetle dziennym albo w ciemności w stałej temperaturze między 18–27°C, ekstrahuje się znanymi metodami substancje czynne, psylocybinę i psylocynę, oczyszcza, rozdziela się jedną substancję od drugiej i uwalnia od chlorowca.
2. Sposób według zastrz. 1, znamieny tym, że jako grzyb w rodzaju *Psilocibe* stosuje się *Psilocibe mexicana* Heim.
3. Sposób według zastrz. 1, znamieny tym, że jako grzyb z rodzaju *Psilocibe* stosuje się grzyb kapeluszowy *Psilocibe semperviva* Heim et Cailleux.
4. Sposób według zastrz. 1, znamieny tym, że jako grzyb z rodzaju *Psilocibe* stosuje się

grzyb kapeluszowy *Psilocibe caerulea* Murrill var. *Mazatecorum* Heim.

5. Sposób według zastrz. 1, znamieny tym, że jako grzyb z rodzaju *Psilocibe* stosuje się grzyb kapeluszowy *Psilocibe Zapotecorum* Heim.
6. Sposób według zastrz. 1, znamieny tym, że jako grzyb z rodzaju *Psilocibe* stosuje się grzyb kapeluszowy *Psilocibe Aztecorum* Heim.
7. Sposób według zastrz. 1, znamieny tym, że jako grzyb z rodzaju *Stropharia* stosuje się grzyb kapeluszowy *Stropharia cubensis* Earle.
8. Sposób według zastrz. 1–7, znamieny tym, że grzyby rozmnaża się na naturalnym substracie, a kultury pozostawia się do dojrzewania na świetle dziennym w stałej temperaturze między 18–27°C.
9. Sposób według zastrz. 1–7, znamieny tym, że jako materiał wyjściowy stosuje się grzybnie i sklerocje, a grzyby hoduje się w szkle na sztucznych pożywkach z ekstraktu słodowego o stężeniu suchej substancji od 4–10% w zależności od rodzaju grzyba, przy czym pożywkę dodaje się 0,0004–0,0010 g/l jonu żelazawego i 2 g/l agaru, a kultury pozostawia się do dojrzewania w ciemności w stałej temperaturze od 22 do 26°C.
10. Sposób według zastrz. 1–7, znamieny tym, że odtłuszczony materiał grzybowy ekstrahuje się za pomocą wody lub organicznego rozpuszczalnika mieszającego się z wodą, po czym wydziela się z roztworu wodnego nieczynne substancje towarzyszące za pomocą frakcjonowanego wytrącenia rozpuszczalnikiem organicznym mieszającym się z wodą, a zawarte w przesączu substancje czynne rozdziela się przez absorpcję na proszku celulozowym i eluuje butanolem nasyconym wodą.
11. Sposób według zastrz. 1–7, znamieny tym, że psylocybinę i psylocynę przed lub po oddzieleniu ich od siebie uwalnia się od chlorowca w znany sposób za pomocą węgla srebrowego.

SANDOZ A. G.

Zastępca: dr Andrzej Au,  
rzecznik patentowy