

ing ¹³C-NMR spectra, Mrs. N. Pitoiset (Faculté de Médecine, Dijon) for GLC-MS analysis and Dr. F. Tillequin (Faculté de Pharmacie, Paris V) for the ¹H-NMR spectra.

References

- (1) Watt, S. M., Breyer-Brandwijk, M. G. (1962) The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa, p 116, E. and S. Livingstone Ltd., Edinburgh and London.
- (2) Dadoun, H., Cave, A. (1972) Plant. Med. Phytother. 6, 223.
- (3) Chazan, J. B. (1971) Phytochemistry 10, 2111.
- (4) Domon, B., Hostettmann, K. (1983) Helv. Chim. Acta 66, 422.
- (5) Becchi, M., Bruneteau, M., Trouilloud, M., Combier, H., Sartre, J., Michel, G. (1979) Eur. J. Biochem. 102, 11.
- (6) Becchi, M., Bruneteau, M., Trouilloud, M., Combier, H., Pontanier, H., Michel, G. (1980) Eur. J. Biochem. 108, 271.
- (7) Wagner, H., Nickl, H., Aynehchi, Y. (1984) Phytochemistry 23, 2505.
- (8) Jansson, P. E., Kenne, L., Liedgren, H., Lindberg, B., Lönngren, J. (1976) Chem. Comm. (Stockholm Univ.) 8, 1.

- (9) Amagaya, S., Takeda, T., Ogihara, Y., Yamasaki, K. (1979) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 2044.
- (10) Mizukani, K., Ohtani, K., Wei, J. X., Kasai, R., Tanaka, O. (1984) Planta Med. 327.
- (11) Kasai, R., Okihara, M., Asakawa, J., Mizutani, K., Tanaka, O. (1979) Tetrahedron, 35, 1427.
- (12) Hiller, K., Voigt, G. (1977) Pharmazie 32, 365.
- (13) Hiller, K., Adler, C. (1982) Pharmazie 37, 619.
- (14) Hostettmann, K. (1980) Helv. Chim. Acta 63, 606.
- (15) Domon, B., Hostettmann, K. (1984) Helv. Chim. Acta 67, 1310.
- (16) Dekanosidze, G. E., Pkheidze, T. A., Kemertelidze, E. F. (1970) Khim. Prirod. Soedin. 6, 491.
- (17) Wagner, H., Jurcic, K., Schaette, R. (1980) Plant Med. 38, 358.
- (18) Wagner, H., Ott, S., Jurcic, K., Morton, J., Neszmelyi, A. (1983) Planta Med. 48, 136.
- (19) Watanabe, J., Saito, H., Tagaki, K. (1973) Japan J. Pharmacol. 23, 563.
- (20) Hostettmann, K., Kizu, H., Tomimori, T. (1982) Planta Med. 44, 34.
- (21) Harris, P. J., Henry, R. J., Blakeney, A. B., Stone, B. A. (1984) Carbohydr. Res. 127, 59.

Psilocybin in Fruchtkörpern von *Inocybe aeruginascens*

Psilocybin in fruiting-bodies of *Inocybe aeruginascens*

M. Semerdžieva^{1,3}, M. Wurst¹, T. Koza¹ und J. Gartz²

Received: July 29, 1985

Abstract: Psilocybin was quantitatively determined in methanolic extracts of dried fruiting-bodies of the basidiomycete *Inocybe aeruginascens* and its content was compared with that in *Psilocybe bohemica* and *P. semilanceata*. By means of HPLC it was found that the content of psilocybin in *Inocybe aeruginascens* is lower than in *Psilocybe* species. Similarly to *Psilocybe*, the content of psilocybin in *Inocybe* decreased during storage of dried fruiting-bodies. The psilocybin content also depends on the origin of the fruiting-bodies.

Einleitung

Psilocybin (1) und ihm ähnliche psychotrope Stoffe, wie Psilocin, Baeocystin, Norbaeocystin, wurden in einer Reihe von Vertretern der Gattung *Psilocybe* aus Amerika (2, 3), Australien (4) und Europa festgestellt. Von den *Psilocybe*-Arten in Europa waren es *P. semilanceata* (Fr. ex Secr.) Kumm., der spitzkegliche Kahlkopf (5, 6, 7, 8, 9, 10) und *P. cyanescens* Wakefield emend. Krieglsteiner, der blauende Kahlkopf (6, 10, 11, 12, 13). Psilocybin und ihm ähnliche Indol-Derivate wurden auch bei einigen Arten anderer Gattungen beschrieben

und zwar bei *Conocybe* (14, 19), *Gymnopilus* (15), *Panaeolus* (16, 17), *Pluteus* (18, 19) und *Psathyrella* (17). In *Panaeolus foeniciculus* fanden Stijve und Mitarbeiter Serotonin, das aber keine psychotropen Wirkungen hat (20).

Im Jahre 1983 berichtete Drewitz über halluzinogene Wirkungen von *Inocybe aeruginascens* Babos, dem grünlichverfärbenden Rißpilz (21). Diese seltene Pilzart wurde erstmals 1967 in Ungarn gefunden. Den Erstfund für die DDR machte Kaspar bei Berlin-Köpenick (22). Gartz verglich diese Pilzart mittels Dünnschichtchromatographie (TLC) mit *Psilocybe semilanceata* und *P. callosa* (23).

In vorliegender Mitteilung wurde in methanolischen Extrakten aus getrockneten Fruchtkörpern des grünlichverfärbenden Rißpilzes der Anteil des Psilocybins mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) und TLC analysiert und mit zwei Psilocybinenthaltenden mitteleuropäischen Kahlkopfformen verglichen.

Material und Methode

HPLC-Analyse

Gerät: Varian LC 8500, Säule: Lichrosorb RP-18, 5 µ, 250 × 20 mm. Mobile Phase: A, Wasser-Ethanol-Essigsäure (79.2 : 20.0 : 0.8, 20 ml/h (10); B, Zitrat-Phosphat-Puffer - Ethanol (9 : 1, 60 ml/h) (24). Detektion: Variscan LC UV-Spektrophotometer (267 nm), Varian Fluorichrom Detektor (Ex. 280, Em. 360 nm), elektrochemischer Detektor Stupac (1,0 V, Ag/AgCl).

¹ Mikrobiologisches Institut der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4 Krč, ČSSR

² Institut für Biotechnologie, Akademie der Wissenschaften der DDR, Permoserstraße 15, 7050 Leipzig, DDR

³ Korrespondenzadresse

Tabelle I. Psilocybin-Anteil (% bezogen auf Fruchtkörpertrockengewicht) in *Inocybe aeruginascens* und zwei *Psilocybe*-Arten.

Pilzart	Herkunft	Jahr des Fundes	Jahr der Analyse	Psilo- cybin %	Psilo- ^x cin %
<i>Inocybe aeruginascens</i>	Potsdam, DDR	1984	1984	0,38	—
<i>Inocybe aeruginascens</i>	Potsdam, DDR	1983	1984	0,34	—
<i>Inocybe aeruginascens</i>	Potsdam, DDR	1982	1984	0,33	—
<i>Inocybe aeruginascens</i>	Müggelberge, DDR	1975	1985	0,11	—
<i>Inocybe aeruginascens</i>	Csévharaszt, Ungarn	1967	1985	0,22	—
<i>Psilocybe bohemica</i>	Sázava, Mittelböhmen	1982	1982	1,14	0,02
<i>Psilocybe bohemica</i>	Sázava, Mittelböhmen	1983	1984	0,84	—
<i>Psilocybe bohemica</i>	Sázava, Mittelböhmen	1983	1985	0,72	—
<i>Psilocybe bohemica</i>	Sázava, Mittelböhmen	1977	1982	0,63	0,06
<i>Psilocybe bohemica</i>	Sázava, Mittelböhmen	1974	1982	0,50	0,07
<i>Psilocybe bohemica</i>	Sázava, Mittelböhmen	1971	1982	0,25	0,04
<i>Psilocybe bohemica</i>	Frenštát, Nordmähren	1981	1982	0,46	0,07
<i>Psilocybe semilanceata</i>	Dübener Heide, DDR	1984	1984	0,96	—
<i>Psilocybe semilanceata</i>	Prag, Mittelböhmen	1980	1982	1,05	0,12
<i>Psilocybe semilanceata</i>	Krásná Lípa, Nordböhmen	1970	1982	0,91	0,09

^x Psilocin konnte in den *Inocybe*-Proben quantitativ nicht bestimmt werden, da keine Standard-Substanz mehr zur Verfügung stand.

Dosierung: 1–5 µl methanol. Extrakt.

Identifizierung: Retentionsdaten, Vergleich mit Referenzstoffen, MS-Spektren.

Quantitative Bestimmung: Integrator Varian CDS 111.

TLC-Analyse

Kieselgelfolie Silufol[®] UV 254.

Mobile Phase: *n*-Butanol-Essigsäure-Wasser (24 : 10 : 10).

Detektion: Ehrlich-Reagenz (23).

Ergebnisse und Diskussion

Der elektrochemische Detektor war insgesamt empfindlicher für Indol-Derivate (Einheiten ng) als der UV-Detektor (Zehnerinheiten ng). Der Fluoreszenz-Detektor hatte ungefähr die gleiche limitierende Grenzempfindlichkeit wie der elektrochemische (24).

Die typische violette Verfärbung des Psilocybins bei TLC, die später violettblau wird (Rf 0,38) unterstützte seine Identität. Ein weiterer für die *Inocybe*-Proben charakteristischer rosa, später schwach violetter Fleck (Rf 0,28), der bei den *Psilocybe*-Proben fehlte, wurde nicht identifiziert.

Der Nachweis des Psilocybins und Psilocins wurde mittels Massen-Spektren bestätigt, in denen typische Bruchstückionen *m/z* 58 (C₃H₈N) und Molekülionen M⁺, gegebenenfalls für die Eliminierung des Ion (M-H₂PO₃)⁺ bei *m/z* 204 gefunden wurden.

Insgesamt wurden 15 Proben von drei Pilzarten verglichen (Tab. I). Bei den einzelnen Proben sind Jahr des Fundes und Jahr der Analyse angeführt.

Im grünlichverfärbenden Reißpilz ist der Psilocybin-Gehalt wesentlich geringer als in beiden mitteleuropäischen Kahlköpfen. Bei Proben, die in ein und demselben Jahr gesammelt und geprüft wurden, betrug er etwa ein Drittel des Gehaltes in Kahlköpfen (*Inocybe aeruginascens* 1984 0,38 %, *Psilocybe bohemica* 1982 1,14 %, *P. semilanceata* 1984 0,96 %).

Der Psilocybin-Gehalt in den Fruchtkörpern sinkt allmählich bei Raumtemperatur in Abhängigkeit von der Aufbewahrungszeit. Bei *I. aeruginascens* nahm er nach dem ersten Jahr um 10,5 % ab, nach zwei Jahren insgesamt um 13,2 % (von 0,38

auf 0,33 %). Ein auffallendes Abnehmen des Psilocybin-Anteils war auch beim böhmischen Kahlkopf beobachtet worden, im Laufe von 11 Jahren von 1,14 auf 0,25 %.

In Fruchtkörpern ein und derselben Art kann sich der Psilocybin-Gehalt je nach Fundort unterscheiden. Grünlichverfärbende Reißpilze ungarischer Herkunft enthielten mehr Psilocybin als Pilze aus der DDR. Auch bei Kahlköpfen wurden auffallende Unterschiede vermerkt, z. B. kleine Mengen im böhmischen Kahlkopf aus Nordmähren (0,46 % nach einem Jahr Aufbewahrung), hohe Anteile im spitzkegeligen Kahlkopf aus Nordböhmen (0,91 % nach zwölf Jahren).

Somit läßt sich eine weitere Pilzgattung – *Inocybe* – mit der Art *Inocybe aeruginascens* Babos zu kleinen Lamellenpilzen, die Indol-haltige psychotrope Stoffe enthalten, anschließen.

Danksagung

Die Autoren danken den Mitarbeitern der Firma Sandoz, Basel, für das freundliche Zusenden der Referenzstoffe.

Literatur

- (1) Hoffmann, A., Heim, R., Brack, A., Kobel, H. (1958) *Experientia* 14, 107.
- (2) Repke, D. B., Leslie, D. T. (1977) *J. Pharm. Sci.* 66, 113.
- (3) Beug, M. W., Bigwood, J. (1981) *J. Chromatogr.* 207, 379.
- (4) Perkal, M., Blackman, G. L., Ottrey, A. L., Turner, L. K. (1980) *J. Chromatogr.* 196, 180.
- (5) Hoffmann, A., Heim, R., Tschertter, H. (1963) *C. R. Seances Acad. Sci., Paris*.
- (6) Semerdzieva, M., Nerud, F. (1973) *Česká Mykol.* 27, 42.
- (7) Michaelis, H. (1977) *Z. Pilzk.* 43, 305.
- (8) Christiansen, A. L., Rasmussen, K. E. (1982) *J. Chromatogr.* 244, 357.
- (9) Jokiranta, J., Mustola, S., Ohenoja, E., Airaksinen, M. M. (1984) *Planta Med.* 45, 277.
- (10) Wurst, M., Semerdzieva, M., Vokoun, J. (1984) *J. Chromatogr.* 286, 229.
- (11) Moser, M., Horak, E. (1969) *Z. Pilzk.* 34, 137.
- (12) Šebek, S. (1983) *Česká Mykol.* 37, 177.
- (13) Krieglsteiner, G. J. (1984) Beiträge zur Kenntnis der Pilze Mitteleuropas I., Schwäb. Gmünd 61.

- (14) Benedict, R. G., Tyler, V. E., Watling, R. (1967) *Lloydia* 30, 150.
- (15) Hatfield, G. M., Valdes, L. J., Smith, A. H. (1978) *Lloydia* 41, 140.
- (16) Olatunji, G. M. (1969) *Rev. Mycol. Mem. Paris, sér. 10 Mus. Natl. Hist. Nat.*
- (17) Ott, J., Guzmán, G. (1976) *Lloydia* 39, 258.
- (18) Saupe, S. G. (1981) *Mycologia* 73, 781.
- (19) Christiansen, A. L., Rasmussen, K. E., Høiland, K. (1984) *Planta Med.* 45, 341.
- (20) Stijve, T., Hischenhuber, C., Ashley, D. (1984) *Z. Mykol.* 50, 361.
- (21) Drewitz, G. (1983) *Mykol. Mitteilungsbl.* 23, 11.
- (22) Kaspar, R. (1977) *Mykol. Mitteilungsbl.* 21, 99.
- (23) Gartz, J. (1985) *Pharmazie* 40/2, 134.
- (24) Kysilka, R., Wurst, M., Pacáková, V., Štulík, K., Haškovec, L. (1985) *J. Chromatogr.* 320, 414.

Tropane Alkaloids from *Atropa belladonna*; Part I. Capillary Gas Chromatographic Analysis

Markku Ylinen¹, Toivo Naaranlahti¹, Seppo Lapinjoki¹, Aarre Huhtikangas^{1,4}, Maija-Liisa Salonen², Liisa Kaarina Simola^{2,4} and Mauri Lounasmaa^{3,4,5}

Received: October 8, 1985

Abstract: Atropine and scopolamine were assayed in leaf samples and cultured cells of *Atropa belladonna* L. by capillary gas chromatography. The samples were extracted and purified before the gas chromatographic analysis by passage through disposable extraction columns of reversed phase type. Deviation among the analyses was 4.0 % for atropine and 2.9 % for scopolamine at 50 mg/l. The limit of detection was 5 mg/l for both alkaloids.

Introduction

Of the numerous plant species producing tropane alkaloids, solanaceous genera *Atropa*, *Datura* and *Scopolia* are the most important. Considerable effort is presently being invested in the development of industrial fermentation methods for the production of atropine (*dl*-hyoscyamine) and scopolamine, the two most useful tropane alkaloids from the medicinal point of view (1, 2). One may reasonably predict that in the foreseeable future industrial production of these alkaloids, as well as of many other biochemicals, will be based on cell cultures (2, 3 and references therein). Many reports have been published on the chromatographic screening of plants and cultured cell lines possessing good biosynthetic capabilities for tropane alkaloid production. The methods in question mostly make use of complicated solvent extractions, with the ensuing chromatographic separations generally being performed with packed columns and thus with rather low resolution of the compounds of interest (2, 4, 5, 6).

The present investigation, which is part of a large research project, deals with improvement in the overall efficiency of the gas chromatographic analysis of the tropane alkaloids from biological samples. Rapid disintegration and extraction of cultured cells of leaf samples of *Atropa belladonna* L. is followed by capillary gas chromatographic analysis.

Material and Methods

Plant material

Atropa belladonna L. plants were cultivated from seed (obtained from Budapest, Hungary) in peat soil – sand mixture in a greenhouse (22–28° C day, 16–18° C night, photoperiod 18 h, 320–600 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, with Airam Fora Lux and De Luxe lamps, 80 W, as a supplement to daylight; cf. Ref. 7). Mature healthy leaves were collected from the whole shoot and were freeze-dried.

Suspension cultures

Suspension cultures of *Atropa belladonna* L. were derived from stem callus strains initiated in our group. Suspensions in their 2nd to 4th passages were used to establish the cultures to be analyzed. The suspension cultures were grown in a modified medium of White (8) and Wood and Braun (9) (cf. Ref. 10) containing 15 mM nitrogen. Cultures were incubated at 25° C, in the dark, on a horizontal rotary shaker operating at ca. 100 rpm. The tissues were harvested by vacuum filtration and were freeze-dried.

Alkaloid extraction

Freeze-dried material (10–50 mg) consisting of leaf or culture cells of *A. belladonna* was macerated in 0.5 ml of methanol overnight at room temperature. After the addition of 1.2 ml of buffer solution of pH 10 (0.025/0.025 M $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$, E. Merck) the extraction was completed in a sonication bath (30 min) at room temperature. The sample was centrifuged and the supernatant was aspirated through a disposable extraction column (Baker-10 SPETM, volume 1 ml, J. T. Baker Chemical Co., Phillipsburg). The alkaloids retained by the column were eluted with 1 ml of methanol. After solvent evaporation with a stream of nitrogen the residue was taken up in 1 ml of methylene

¹ Department of Pharmaceutical Chemistry, University of Kuopio, POB 6, SF-70211 Kuopio, Finland

² Department of Botany, University of Helsinki, Unioninkatu 44, SF-00170 Helsinki, Finland

³ Department of Chemistry, Technical University of Helsinki, SF-02150 Espoo, Finland

⁴ Addresses for correspondence

⁵ Editorial correspondence: Department of Chemistry, Technical University of Helsinki, SF-02150 Espoo, Finland