

Psylocybina - ogólnodostępny psychodysleptyk

by

Karolina Dydak¹, Mariola Śliwińska-Mossoń², Halina Milnerowicz²

Otrzymano: 2015.01.29 Zaakceptowano: 2015.06.11 Opublikowano: 2015.09.07

© 2015, autorzy

original report: <https://phmd.pl/resources/html/article/details?id=141865>

¹ Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Biomedycznych Analiz Środowiskowych

² Katedra i Zakład Biomedycznych Analiz Środowiskowych, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Adres autorki: dr Mariola Śliwińska-Mossoń, Katedra i Zakład Biomedycznych Analiz Środowiskowych, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, ul. Borowska 211, 50-556 Wrocław; e-mail: mariola.sliwiska-mosson@umed.wroc.pl

Spis Treści:

Streszczenie

Wstęp

Budowa i działanie substancji aktywnych

Metody izolacji i analizy psylocybiny i psylocyny

Analiza morfologiczna

Ekstrakcja

Strefowa elektroforeza kapilarna

Metody chromatograficzne

Metoda chromatografii gazowej i spektrofotometrii masowej

Chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią masową

Wysokosprawna chromatografia cieczowa

Chromatografia cienkowarstwowa

Badania genetyczne

Podsumowanie

Piśmiennictwo

Streszczenie

Substancje pochodzenia roślinnego były wykorzystywane w celu wywołania halucynacji od bardzo dawna, zarówno przy obrzędach i rytuałach religijnych, jak i do uśmierzenia bólu. Psylocybina i psylocyna naturalnie występują w grzybach rodzaju *Psilocybe*. Ze względu na ich psychodeliczne działanie i względną nieszkodliwość tych substancji oraz to, że nie wywołują uzależnienia fizycznego, psylocybina i psylocyna coraz częściej zastępują syntetyczne psychodysleptyki, takie jak dietyloamid kwasu D-lizergowego. Oba związki jako substancje psychoaktywne są substancjami nielegalnymi, jednak psylocybina, poza działaniem psychotropowym, wykazuje także działania korzystne, które z medycznego punktu widzenia, wskazują na możliwości wykorzystania jej w terapiach. Zatrucia psylocyną i jej pochodnymi są wciąż dużym problemem klinicznym i społecznym głównie w grupie młodych osób, dlatego też bardzo ważna jest szybka i wiarygodna ich identyfikacja. Tradycyjne sposoby, takie jak analiza morfologiczna, biochemiczna czy badania palinologiczne oraz sporologiczne, są mało skuteczne i często nie dają jednoznacznych wyników. Wiarygodność, szybkość i ekonomiczność analiz DNA powoduje, że metody genetyczne coraz częściej są wykorzystywane w celu określenia przynależności gatunkowej grzybów. Tymi metodami są techniki: RAPD (random amplification of polymorphic DN), AFLP (amplified fragment length polymorphism) i HRM (high resolution melting). Ponadto zaproponowano analizę regionów ITS1 oraz nLSU jako wiarygodną metodę mającą zastosowanie w systematyce molekularnej grzybów w sądownictwie. Współczesne metody identyfikacji psylocybiny i psylocyny

w grzybach i w materiale biologicznym to: strefowa elektroforeza kapilarna, wysokosprawna chromatografia cieczowa, chromatografia gazowa i cieczowa sprzężona ze spektrometrią masową. Wymienione metody z powodzeniem służą do identyfikacji substancji psychoaktywnych zarówno w materiale z grzybów, jak również w próbkach krwi i moczu.

Słowa kluczowe: psylocybina, psylocyna, psychodysleptyki, psychodeliki, *Psilocybe*, grzyby, grzybki halucynki

Wykaz skrótów: **5-HT**- 5-hydroksytryptamina, serotonina, **AFLP** - polimorfizm długości amplifikowanych fragmentów (amplified fragment length polymorphism), **CZE** - strefowa elektroforeza kapilarna (capillary zone electrophoresis), **GC-MS** - chromatografia gazowa sprzężona ze spektrofotometrią masową (gas chromatography-mass spektrometry), **HPLC** - wysokosprawna chromatografia cieczowa (high performance liquid chromatography), **HRM** - topnienie w wysokiej rozdzielczości (high resolution melting), **ITS** - region na jądrowym **DNA** wykorzystywany do sekwencjonowania materiału genetycznego w identyfikacji gatunkowej grzybów, **LC-MS** - chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią masową (liquid chromatography-mass spektrometry), **LSD** - dietyloamid kwasu D-lizergowego (lysergic acid diethylamide), **Olsu** - region na jądrowym DNA charakteryzujący się mniejszym polimorfizmem niż ITS, **PCR** - reakcja łańcuchowa polimerazy (polymerase chain reaction), **RAPD** - metoda losowej amplifikacji polimorficznego DNA (random amplified polymorphic DNA).

Wstęp

Stosowanie substancji odurzających znane jest od zarania dziejów, niemal wszystkie pierwotne cywilizacje korzystały z substancji zmieniających świadomość. Rośliny i grzyby o właściwościach psychoaktywnych znajdowano w każdym środowisku - od syberyjskiej tajgi przez amazońską dżunglę, aż do australijskich stepów. Do dziś opisano ponad 200 roślin i około 80 odmian grzybów o właściwościach halucynogennych, a odkryto w nich kilka tysięcy związków chemicznych. Z czasem zaczęto naturalne psychodysleptyki zastępować syntetycznymi środkami psychoaktywnymi, które stały się realnym zagrożeniem dzisiejszego świata.

Najpowszechniej stosowanymi substancjami psychoaktywnymi są pochodne konopi indyjskich (łac. *Cannabis Sativa* var. *Indica*). W Polsce spożycie pochodnych konopi kształtuje się na stałym poziomie około 6,3% populacji, natomiast w Czechach sięga aż 22% populacji. Kolejnymi, pod względem częstości stosowania, używkami są amfetamina i jej pochodne oraz LSD. Odnotowuje się jednak spadek zainteresowania LSD, który rekompensuje się popytem na naturalne związki psychodysleptyczne zawarte w grzybach i roślinach. Grzybki "halucynki" zwane też "magicznymi grzybkami" są najczęściej używanym środkiem o działaniu psychodelicznym w Unii Europejskiej [14]. Za działanie grzybów są odpowiedzialne zawarte w nich substancje aktywne: psylocybina, psylocyna, baeocystyna i norbaeocystyna.

Grzyby psychoaktywne należą głównie do rodzaju *Psilocybe*, *Gymnopilus* i *Panaeolus*, rosną prawie na wszystkich kontynentach, najwięcej gatunków halucynogennych scharakteryzowano w Meksyku. W Europie rośnie kilkanaście gatunków *Psilocybe*, jednak działanie psychodelicznym wykazano tylko u kilku z nich, m.in.: *Psilocybe semilanceata*, *Psilocybe bohemica*, *Psilocybe azurescens* oraz *Psilocybe cyanescens*. Łysiczki rosną w trawie, najczęściej na otwartym terenie: ziemi, nawozie, odchodach roślinożerców lub resztkach obumarłych roślin. W Polsce głównym rejonem, w którym zbiera się "magiczne grzybki" jest Dolny Śląsk, a zwłaszcza rejon Karkonoszy [14]. Dostęp do grzybów halucynogennych jest niestety bardzo prosty. Poza zbiorami świeżych grzybków można zakupić przez Internet suszone grzyby, możliwy jest też zakup zarodników i samodzielna ich hodowla.

Grzyby psychoaktywne wykazują różną aktywność biologiczną, zależną od ilości zawartych w nich psylocyny i psylocybiny oraz innych substancji aktywnych, np. baeocystyny czy norbaeocystyny. W tabeli 1. zestawiono niektóre grzyby z rodzaju *Psilocybe*, pod względem ilości zawartych w nich substancji psychoaktywnych [14].

Tabela 1. Przykładowe gatunki grzybów halucynogennych oraz zawartość psylocyny, psylocybiny oraz baeocystyny w przeliczeniu na suchą masę grzyba [14]

Gatunek	% psylocybiny	% psylocyny	% baeocystyny
<i>P. azurens</i>	1,78	0,38	0,035
<i>P. bohemica</i>	1,34	0,11	0,020
<i>P. semilanceata</i>	0,98	0,02	0,360
<i>P. baeocystis</i>	0,85	0,59	0,100
<i>P. cyanescens</i>	0,85	0,36	0,030
<i>P. cubensis</i>	0,63	0,60	0,250
<i>P. weilii</i>	0,61	0,27	0,050
<i>P. stuntzii</i>	0,36	0,12	0,020

Do gatunków o najwyższej zawartości psylocybiny należą:

Psilocybe semilanceata - łyśniczka lancetowata. Jest to gatunek należący do grzybów pierścieniakowatych. Ze względu na wygląd i właściwości psychodeliczne nazywany jest również czapeczką wolności. Owocniki łyśniczki lancetowatej są małe i delikatne. Kapelusz ma średnicę 0,5-2,5 cm, jest najczęściej stożkowy, gładki, jego wysokość jest prawie dwa razy większa od średnicy. Kolor od kasztanobrazowego do płowóżłtego. Blaszki są szeroko przyrośnięte do trzonu, mają kolor brązowy z odcieniami oliwki, fioletu, czerwieni lub czerni. Trzon grzyba jest smukły, gładki, białawy przy kapeluszu i brązowiejący w stronę podstawy, jego wysokość waha się 30-100 mm, a średnica 0,5-2 mm. Zarodniki są gładkie, ciemne, purpurowobrazowe o elipsoidalnym kształcie, o wielkości 10-16 µm na 6-8 µm. Podczas zbierania owocniki brudzą skórę dłoni na kolor niebieski [22].

Psilocybe bohemica - łyśniczka czeska. Należy do grzybów pierścieniakowatych, niezwykle rzadko występuje w Polsce. Kapelusz grzyba jest higrofaniczny, gładki, nie lepi się, wilgotny - rdzawobrazowy, suchy - jasnobrazowy. Z wiekiem i w miejscach uszkodzonych ulega przebarwieniu na kolor ciemno sino-zielonkawy. Blaszki grzyba są początkowo jasnobrazowe, z czasem przyjmują kolor kremowy. Zarodniki brązowe z purpurowym odcieniem, elipsoidalne, nieco spłaszczone, grubościennie. Trzon strzelisty, giętki, cylindryczny, do 12 cm długości wysoki. Rośnie w ogrodach, parkach, na poboczach dróg, na spróchniałym drewnie, gałązkach, kompoście, resztkach roślinnych. Owocniki grzyba wyrastają z osobna lub w grupach [14].

Psilocybe azurens. Jest gatunkiem najbardziej bogatym w psychoaktywne alkaloidy. Jest to grzyb saprofityczny, rosnący naturalnie tylko w Ameryce Północnej, wzdłuż wybrzeża Oceanu Spokojnego. Kapelusz grzyba ma rozmiary 30-100 mm średnicy, kształt stożkowy do wypukłego, higrofaniczny, barwy brązowej lub karmelowej, jaśniejszej na obwodzie. Powierzchnia kapelusza jest gładka, wilgotna lepka. Białawy lub brudnobrazowy trzon o 3-6 mm średnicy i długości 90-200 mm. Zarodniki mają kolor czarny, brązowy lub ciemnofioletowy [29].

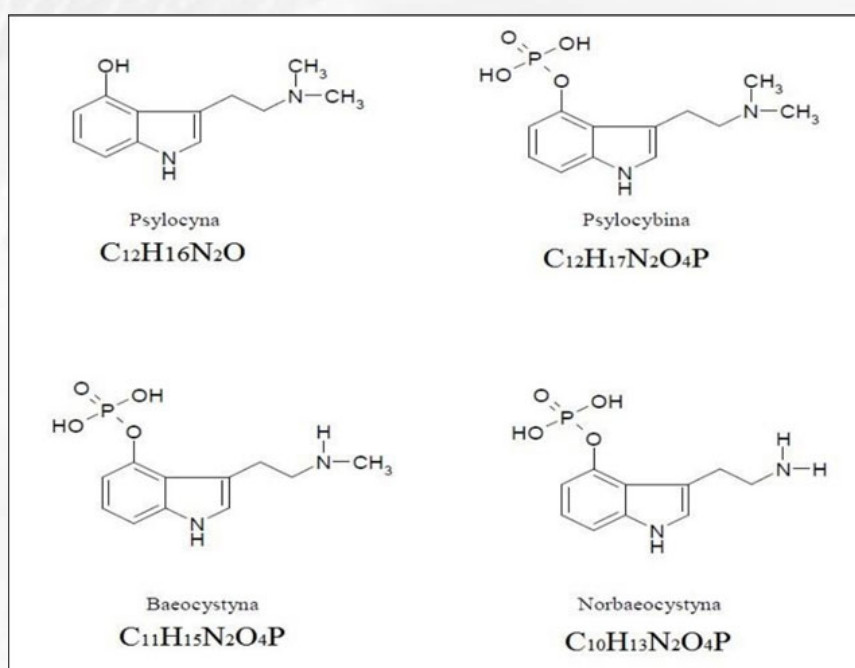
Psilocybe cyanescens. Nazwa gatunku pochodzi od niebieskiego koloru jaki pojawia się w miejscu uszkodzenia grzyba. Kapelusz ma średnicę ~5 cm, brzeg falisty, kształt stożkowy, wypukły, ale zadziera się do góry z wiekiem. Powierzchnia jest gładka, lepka gdy wilgotna dzięki obecności galaretowatej "skórki". Trzon osiąga długość do 10 cm i grubość 2-5 mm, rozszerza się ku podstawie. Powierzchnię ma gładką, włóknistą, określaną jako jedwabista, koloru białawego. Zarodniki są elipsoidalne, koloru ciemnofioletowo-brązowego. Występuje w Ameryce, skąd został sprowadzony do Europy, rośnie na terenach drzewiastych i w wysokich trawach [4,28].

Podobnie jak w przypadku grzybów jadalnych, podczas zbiorów grzybków psychoaktywnych nietrudno o pomyłkę. Niektóre gatunki grzybów trujących w wyglądzie przypominają łyśniczki, często rosną w ich towarzystwie. Wymienić tu należy rodzaj *Galerina* i *Conocybe* czyli hełmówki i stożkogłówki. W Europie występuje ponad 50 gatunków hełmówek, w tym także *Galerina autumnalis* i *Galerina marginata*, które zawierają związki silnie toksyczne podobne do tych, które występują w trującym muchomorze sromotnikowym - *Amanita phalloides*. Wśród *Conocybe* należy zwrócić uwagę na trujące gatunki *blattaria* i *filaris*, które mogą być omyłkowo zebrane ze względu na występowanie w towarzystwie *Psilocybe*. Od łyśniczek odróżnia je trochę ciemniejsza barwa i delikatny pierścień na trzonie [13].

Budowa i działanie substancji aktywnych

Psylocybina (4-fosforyloksy-*N,N*-dimetylotryptamina) jest głównym aktywnym składnikiem zawartym w grzybach blaszkowatych z rodziny *Grophiaceae*, z których większość należy do rodzaju *Psilocybe*. Należy do grupy psychodysleptyków nazywanych potocznie halucygenami. Psychodysleptyki są substancjami psychoaktywnymi, które silnie wpływają na percepcję, nastrój i procesy poznawcze człowieka. Halucynogeny są uważane za fizjologicznie bezpieczne, niepowodujące uzależnienia. Ich używanie wiąże się jednak z ryzykiem pojawienia się zaburzeń mentalnych, które mogą prowadzić do nieprzewidywalnych działań [27]. Mimo iż psylocybinę potocznie nazywa się substancją halucynogenną, nie powoduje halucynacji, a jedynie zmianę postrzegania rzeczywistości. Halucynacją nazywa się wrażenie widzenia obrazów lub słyszenia dźwięków, których nie ma, ale są oparte na rzeczywistości (słynna fatamorgana na pustyni), natomiast psylocybina powoduje tzw. modyfikacje percepcji nieudające rzeczywistości, czyli sprawia, że obiekty i dźwięki już istniejące, które w danej chwili widzi się czy słyszy, są odbierane w zupełnie inny sposób niż wyglądają w rzeczywistości (martwe przedmioty się poruszają, szept jest odbierany niczym głośne krzyki, patyk staje się mieczem) lub jawią się obrazy tak odrealnione, że zdajemy sobie sprawę z tego, że jest to iluzja (barwne plamy, wzory, fraktale) [18]. Jednak określenie "grzybki halucynki" jest już tak zakorzenione w społeczeństwie, że nie sposób go zmienić, a nawet nie ma ku temu powodów, zwłaszcza że nie istnieje krótkie i treściwe określenie na "modyfikację percepcji nieudającą rzeczywistości".

Oprócz psylocybiny, substancjami aktywnymi w grzybach rodzaju *Psilocybe* są: psylocyna (4-hydroksy-*N,N*-dimetylotryptamina), baeocystyna (4-fosfonyloksy-*N*-metylotryptamina) i norbaeocystyna (4-fosforyloksytryptamina) (ryc. 1) [38].



Ryc. 1. Wzory strukturalne psylocyny, psylocybiny, baeocystyny i norbaeocystyny [opracowanie własne]

Psylocyna i psylocybina zostały wyizolowane i zidentyfikowane w latach 1955-1958 przez Hoffmana w laboratorium firmy Sandoz w Szwajcarii. Do analizy posłużyły grzyby *Psilocybe cubensis* i *Psilocibe mexicana*. Hoffman ustalił budowę obu związków wykorzystując analizę spektralną i ilościową oraz potwierdził opracowaną przez siebie syntezą w 1958 r. [12]. W 1973 r. ustalono, że niektóre substancje odurzające (psylocybina, psylocyna, LSD, bufotenina, ibogaina) oraz serotoniny (5-hydroksytryptamina, 5-HT) mają bardzo podobną budowę oraz podobne odległości między atomami azotu i tlenu (trójkąt N-N-O). Dzięki takiej budowie istnieje prawdopodobieństwo, że związki te mogą zajmować miejsce serotoniny w odpowiednich receptorach (ryc. 2). Wykazano, że za działanie psychoaktywne substancji będących analogami strukturalnymi indoloaminy (psylocyna, psylocybina) jest odpowiedzialne ich powinowactwo do receptorów serotoninowych typu 5-HT₂, a zwłaszcza 5-HT_{2A} i 5HT_{2C}. Związki te zwiększają ilość serotoniny w mózgu oraz powodują wzrost czynności sensomotorycznych i percepcyjnych. Stwierdzono, że serotonina jest odpowiedzialna za zachowania i nastroje.

Dowiedziano, że przemoc, impulsywność, czy aspołeczne zachowania są wynikiem obniżenia jej stężenia, natomiast wzrost stężenia serotoniny powoduje wzmożenie czujności. Serotonina pełni ważną rolę w regulacji takich procesów jak: słyszenie, widzenie, mówienie, wyobrażanie sobie znaczenia słów oraz bierze udział w regulacji w kontroli motorycznej [3].



Ryc. 2. Porównanie budowy psylocyny i psylocybiny do serotoniny [opracowanie własne]

Psylocybina jest naturalnym związkiem, zawierającym w strukturze atom fosforu, który dobrze się wchłania w jamie ustnej i następnie ulega w organizmie defosforylacji. W wyniku defosforylacji psylocybiny powstaje jej metabolit - psylocyna, która wykazuje właściwości psychodeliczne [14]. Dystrybucja psylocyny w organizmie jest na ogół równomierna, chociaż w wątrobie i nadnerczach kumuluje się jej większe ilości. Ponadto stwierdzono, iż psylocyna kumuluje się w określonych obszarach mózgu: nowej korze - biorącej udział w procesach uczenia się i zapamiętywania oraz odpowiedzialnej m.in. za interpretację zdarzeń; hipokampie - części układu limbicznego pełniącego rolę centrum kontroli emocjonalnej, uczestniczącego w procesach uczenia się i zapamiętywania oraz we wzgórzu, które odpowiada za wstępną obróbkę bodźców zmysłowych [3].

Przyjęcie inhibitorów monoaminoooksygenazy przed zażyciem psylocybiny wzmacnia jej działanie. Farmakologicznie działanie psylocybiny jest typowe dla związków halucynogennych i przypomina skutki po zażyciu LSD, jednak około 100 razy słabsze. Wykazano, że psylocybina i psylocyna nie wywołują uzależnienia fizycznego, jednak mogą powodować uzależnienia psychiczne. Działanie doustnie przyjętej psylocybiny określono na 4-6 godzin. Jej działanie zaobserwowano po 15-40 min od zażycia. Oznaczono we krwi stężenie psylocybiny w 20-40 min po podaniu doustnym dawki: 0,2 mg/ kg masy ciała [14]. Psylocybina przyjmowana do organizmu jest najczęściej w postaci suszu grzybowego lub surowych grzybów, rzadziej dożylnie, w postaci pochodnych powstałych po samodzielnej syntezie lub zakupie gotowego produktu. W 1 gramie suszu grzybów (około 20 sztuk grzybów *Psilocybe*), znajduje się 10-12 mg psylocybiny, która wywołuje działanie psychodeliczne. Ustalono doświadczalnie wielkość dawki progowej (0,25 g suszonych grzybów) potrzebnej do wywołania pierwszych objawów. Stwierdzono również, że niezbędna ilość psylocybiny do wywołania intensywnych zaburzeń percepcji to 10-18 mg [11]. Maksymalne działanie w dawce 40 µg/kg masy ciała występuje po 2 godzinach i stopniowo zmniejsza się w ciągu następnych 3-4 godzin [27]. Są to jednak ilości szacunkowe, gdyż na skutki działania psylocybiny składa się wiele czynników: polimorfizm genetyczny związany z metabolizmem, masa ciała, pokarm przyjęty przed spożyciem grzybów, usposobienie i nastawienie do świata oraz aktualny nastrój osoby zażywającej [14].

Psylocybina, jako bezpieczna i naturalna alternatywa dla LSD, zyskała dużą popularność na całym świecie, szczególnie wśród młodych ludzi. Jej psychodeliczne właściwości zapewniły grzybkom *Psilocybe* sławę, co doprowadziło do rozpowszechnienia handlu tymi grzybami, a także powstawaniu stron internetowych z tematyką w całości poświęconą "magicznym grzybkom".

Osoby zażywające psylocybiny często opisują swoje doświadczenia oraz uczucia jakie im towarzyszą po zażyciu tej substancji, na różnych forach tematycznych i blogach. We wpisach uwzględniają ilość zażytej substancji oraz sposób jej przyjęcia, a także to, czy była pochodzenia naturalnego czy syntetyzowana w domowych warunkach. Opisywane są bardzo różne doznania, zarówno te pozytywne, jak i negatywne ("bad trip"). Skutki spowodowane przez spożycie psylocybiny można podzielić na 3 grupy (tabela 2).

Psylocybina jest określana mianem substancji o znikomej lub bardzo małej toksyczności. Wykazano, że dawka śmiertelna (lethal dose, LD) psylocybiny dla szczura i królika wynosi odpowiednio LD50: 280 mg/kg masy ciała i 12,5 mg/kg masy ciała. Należy jednak pamiętać, że króliki wyjątkowo nie tolerują substancji psychoaktywnych. Wyliczono, że dawka letalna dla człowieka to 6 g psylocybiny, przy czym najczęściej w celach niemedycznych przyjmuje się dawki w granicach 8-20 mg. Stwierdzono, że LD50 aspiryny wynosi 200 mg/kg masy ciała u szczurów, jest więc odpowiednio niższa niż LD50 psylocybiny, co wskazuje, że przeciętnie przyjmowana jednorazowo dawka psylocybiny jest mniej szkodliwa dla organizmu niż średnia dawka aspiryny [35].

Działanie na organizm		
Pozytywne	Neutralne	Negatywne
poprawa nastroju, euforia	halucynacje przy zamkniętych (CEV) i otwartych oczach (OEV)	niepokój, paranoja
duchowe doświadczenia zmieniające poglądy na życie	zwiększona wrażliwość na światło	zawroty głowy, omdlenia
uczucie "wglądu w siebie"	wzrost wykrywania ruchu w peryferyjnym polu widzenia	nudności, wzdęcia, dyskomfort żołądkowo-jelitowy
nudne zadania lub rozrywki mogą stać się bardziej interesujące i śmieszne	rozszerzenie źrenic	zakłócenia pracy pamięci
mogą ograniczać częstotliwość występowania bólów głowy u osób cierpiących na klasterowe bóle głowy	czas zdaje się płynąć wolniej	mogą wywoływać lub nasilać ukryte lub istniejące zaburzenia
chichotliwość i śmiech	tęczowe/neonowe wzory wokół źródeł światła	silne, długotrwałe bóle głowy
paradoksalne poczucie normalności i głębokiej zmiany psychiki	zwiększona wrażliwość emocjonalna	dezorientacja
intensywne uczucia zachwyty uczucie jedności z otaczającym wszechświatem	ogólna zmiana świadomości	swoiste uczucie "szumu w głowie"
	wzrost energii	zaburzenia psychomotoryczne
	ożywienie wspomnień	zaburzenia ruchów sakkadowych gałek ocznych

Zarówno psylocybina, jak i psylocyna zostały sklasyfikowane jako substancje o dużym potencjale nadużywania. Znajdują się w wykazie środków odurzających w grupie I-P stanowiącym załącznik do ustawy *O przeciwdziałaniu narkomanii* [36]. Substancje psychotropowe grupy I-P, to substancje o braku zastosowań medycznych i o dużym potencjale nadużywania, które są wyłączone z obrotu farmaceutycznego i mogą być używane jedynie do badań naukowych [14].

Do 2004 r. zarejestrowano tylko jeden przypadek zgonu po spożyciu psylocybiny, jednak po opublikowaniu wyników analiz pojawiło się wiele wątpliwości co do ich wiarygodności. Przypadek zdarzył się we Francji w 1993 r. i dotyczył młodego chłopaka, który zmarł po spożyciu wywaru z grzybów *Psilocybe*. W badaniu chemiczno-toksykologicznym treści żołądkowej denata wykazano obecność grzybów z gatunku *Psilocybe semilanceata*, a jako przyczynę zgonu uznano przedawkowanie psylocybiną [10].

Z tymi wynikami analiz nie zgadzają się inni badacze. Przedstawione w publikacjach dane statystyczne, zebrane z kilku krajów zachodniej i północnej Europy, Ameryki i Australii, wykazują, że psylocybina jest powszechnie stosowaną substancją psychoaktywną, niemniej jednak odsetek interwencji medycznych potrzebnych po jej zażyciu jest wyjątkowo mały, a jeszcze rzadziej zachodzi potrzeba hospitalizacji intoksykowanych. W żadnym z krajów nie odnotowano również przypadku zgonu z jej przedawkowania [9]. W badaniach pośmiertnych w ogóle nie wzięto pod uwagę zatrucia inną toksyną niż psylocybiną, co mogło zaważyć na jakości analiz. Prawdopodobną przyczyną zgonu mężczyzny mogło być właśnie zatrucie muskaryną (która znajduje się w grzybach *Inocybe*, złudnie podobnych do *Psilocybe*, przez co mogły zostać przypadkowo zebrane i spożyte przez ofiarę), a ponieważ spożył w tym samym czasie *Psilocybe*, zgon przypisano psylocybinie [9].

Zastanawiającym jest także to, że artykuł ukazał się dopiero kilka lat po śmierci młodego Francuza, akurat w czasie, kiedy we Francji wprowadzono odpowiedzialność karną za spożywanie i hodowlę "Liberty Caps".

Psylocybina jest mało toksyczną substancją, niepowodującą fizycznych uzależnień i względnie bezpieczną dla zdrowia. Hospitalizacja po spożyciu grzybów *Psilocybe* wymagana jest rzadko, a śmiertelność wynosi 0%. Należy przy tym pamiętać, że jej spożycie nie jest obojętne dla organizmu i zależy od cech osobniczych, a więc jest trudne do przewidzenia.

Jednak prowadzone są badania nad zastosowaniem psylocybiny w medycynie, jako potencjalnej substancji w leczeniu chorych z przewlekłą depresją. Wykazano, że psylocybina zmniejsza aktywność centrów mózgowych, które są nadmiernie pobudzone u pacjentów, którzy skupiają się na negatywnych stronach własnej osobowości i środowiska, czego skutkiem jest stan chorobowy określany mianem depresji. Biorąc pod uwagę to, że leczenie psychiatryczne jest skuteczne zaledwie u 1/3 pacjentów w Europie, a 10% pacjentów nie reaguje na żadne obecnie dostępne metody leczenia, ogromne nadzieje pokłada się właśnie w psylocybinie. W czasie badań odkryło, że psylocybina wyłącza wiele z obwodów mózgu, które są nadmiernie aktywne u pacjentów cierpiących na depresję [6].

Nieliczne kliniczne badania przedstawione w ciągu ostatniej dekady wykazują dodatni potencjał terapeutyczny substancji o działaniu psychodelicznym w leczeniu depresji i potencjalnie otwierają się nowe terapie farmakologiczne [2].

Metody izolacji i analizy psylocybiny i psylocyny

Zgodnie z *Ustawą o przeciwdziałaniu narkomanii*, która obowiązuje od 29 lipca 2005 r., posiadanie i handel grzybami zawierającymi substancje narkotyczne, jest przestępstwem i za jego popełnienie grozi kara pozbawienia wolności. Precyzyjna identyfikacja gatunkowa grzybów, które zawierają substancje nielegalne nabiera w związku z tym dużego znaczenia w postępowaniu sądowym [36].

Tradycyjne sposoby przyporządkowania badanej próbki do określonego taksonu, takie jak analiza morfologiczna, biochemiczna czy badania palinologiczne oraz sporologiczne, są mało uniwersalne i często nie dają jednoznacznych wyników. Wiarygodność, wysokie tempo i coraz niższy koszt analiz DNA powoduje, że metody genetyczne są coraz częściej wykorzystywane do określenia przynależności gatunkowej materiału biologicznego. Analiza fragmentu mitochondrialnego genu kodującego cytochrom b jest od dawna stosowana w celach sądowych do identyfikacji gatunkowej zwierząt kręgowych [38].

Analiza morfologiczna

Standardową metodą identyfikacji gatunkowej grzybów jest analiza morfologiczna, składająca się z obserwacji makro- i mikroskopowych. Analiza makroskopowa polega na określeniu barwy, rozmiaru i charakterystycznych struktur grzybów. Obserwacja mikroskopowa polega głównie na porównywaniu wyglądu zarodników, co czasami nie daje zadowalających rezultatów. Wyjątkowe trudności napotyka się w przypadkach zatrucia grzybami. Zabezpieczone resztki pokarmu, które najczęściej ulegają obróbce termicznej i popłuczyny z treści żołądka, to materiały często bardzo zdegradowane. Obserwacje mikroskopowe elementów grzybów w postaci sproszkowanej również mogą sprawiać wiele problemów. Cechy morfologiczne, szczególnie zarodniki, są bardzo podobne u grzybów trujących, jak i u gatunków nietoksycznych. Przy ustalaniu przynależności systematycznej grzybów o działaniu psychodelicznym, głównie do celów sądowych, konieczne jest dokładne określenie gatunku, ponieważ wśród przedstawicieli tego samego rodzaju występują gatunki zawierające i niezawierające substancji psychoaktywnych. Na przykład *Psilocybe semilanceata* i *Psilocybe cubensis* wytwarzają substancje o działaniu psychodelicznym, a *Psilocybe montana* i *Psilocybe merdaria* ich nie wytwarzają [38].

Ekstrakcja

Izolacja psylocybiny i psylocyny z materiału grzybowego jest prostym i szybkim procesem. Najczęściej wykorzystywaną do ich izolacji metodą jest ekstrakcja do rozpuszczalnika, standardowo używa się w tym celu np. chloroformu, metanolu lub wody. Do izolacji substancji psychodelicznych, z użyciem jednego z rozpuszczalników, używa się ultrasonifikatora, który niszczy komórki grzyba, a tym samym zwiększa ich stopień ekstrakcji. Następnym etapem jest oddzielenie supernatantu od zawiesiny, po czym należy odparować

rozpuszczalnik, najlepiej w środowisku gazu niereaktywnego. Ekstrakt, otrzymany w ten sposób, poddaje się dalszym badaniom. Inną metodą wykorzystywaną do izolacji halucynogennych alkaloidów jest ekstrakcja materiału grzybowego rozcieńczonym wodnym roztworem kwasu octowego. W tej metodzie otrzymany ekstrakt zakwasza się do pH=4,0 lodowatym kwasem octowym. Roztwór inkubuje się w temperaturze pokojowej przez godzinę, po czym podgrzewa do temperatury 70°C. Następnie ekstrakt ochładza się, filtruje, a otrzymany filtrat doprowadza się do pH=8,0 używając stężonego wodorotlenku amonu. Roztwór poddaje się ekstrakcji eterem dietylowym. Otrzymany w ten sposób ekstrakt eterowy suszy się używając nadsiarczanu sodu, filtruje i odparowuje w środowisku niereaktywnym. W obu metodach otrzymuje się ekstrakty o wystarczającej czystości potrzebnej do przeprowadzenia dalszych badań. Wynikiem ekstrakcji metanolem jest mieszanina psylocyny oraz psylocybiny, a wynikiem ekstrakcji z użyciem wodnego roztworu kwasu octowego i eteru dietylowego jest ekstrakt zawierający jedynie psylocynę, ponieważ w warunkach, w jakich przebiegała ekstrakcja, psylocybina ulega defosforylacji [14].

Strefowa elektroforeza kapilarna

Strefowa elektroforeza kapilarna (capillary zone electrophoresis, CZE) to najprostsza i najczęściej stosowana technika, w której mechanizm separacji opiera się jedynie na różnicy w stosunku ładunku do masy analizowanych cząsteczek. Elektroforeza jest przeprowadzana w kapilarze rozdzielającej o małym przekroju [16]. Głównymi zaletami CZE są: bardzo dobra sprawność, krótki czas analizy, mała objętość próbki analizowanej, rozdział w roztworach wodnych oraz duży stopień automatyzacji [32]. W toksykologii sądowej najczęściej istnieje potrzeba identyfikacji i oznaczenia leków, narkotyków, ich metabolitów oraz innych potencjalnych trucizn w materiale biologicznym, zarówno posekcyjnym, jak i we krwi, moczu, ślinie i włosach pobranych od osób żyjących. Jak dotychczas z powodzeniem zastosowano CZE do oznaczania: heroiny oraz jej zanieczyszczeń i metabolitów; morfiny, kodeiny, kokainy, LSD, barbituranów, trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych, benzodiazepin, kanabinoidów, fencyklidyny (PCP), fentatyli, metakwalonu, metylokatynonu oraz efedryny, amfetaminy, metamfetaminy i ich pochodnych, a także psylocybiny, psylocyny i baecystyny [14, 20].

Metody chromatograficzne

Metoda chromatografii gazowej i spektrofotometrii masowej

Wśród możliwych technik analitycznych w układzie chromatografii gazowej i spektrofotometrii masowej (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS), zastosowanie znalazły dwie techniki: SIR (selected ion recording) oraz SIM (selected ion monitoring) stosowane w niższych stężeniach związków psychoaktywnych [30]. Techniki te służą do monitorowania zmian intensywności wybranych swoistych fragmentów cząsteczki tworzących widmo masowe. Dane uzyskane dla badanego materiału, potwierdza się w komputerowym układzie porównawczym, używając w tym celu odpowiedniego wzorca pochodzącego z banku widm. Metoda GC-MS znajduje również zastosowanie w analizie ilościowej. Ze względu na oznaczalność, w rutynowych badaniach korzysta się z techniki SIM z jednoczesnym użyciem wzorca wewnętrznego, jakim jest pochodna deuterowana oznaczanego związku. Metoda jest z powodzeniem stosowana do identyfikacji psylocyny, zarówno w materiale z grzybów, jak również w materiale biologicznym, takim jak krew i mocz [14].

Chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią masową

Progi detekcji do oznaczeń wielu związków w układzie chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią masową (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) są niższe niż progi uzyskane w układzie GC-MS i przeważnie występują w zakresie od 10 ng/ml. Wykorzystując techniki chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas z jonizacją przez rozpylanie w polu elektrycznym (LC/MSESI), opracowano szybką metodę identyfikacji wielu substancji o właściwościach narkotycznych i psychodelicznych, takich jak na przykład: amfetamina, LSD oraz psylocybina. Czas analizy każdego ze związków nie przekracza 5 min, a zastosowanie łagodnej metody jonizacji ESI ma duże znaczenie w analizach substancji termolabilnych [25]. Wykorzystanie techniki chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas z chemiczną jonizacją pod ciśnieniem atmosferycznym (LC/MS-APCI) pozwoliło na wykrycie i oznaczenie psylocyny w znacznie zredukowanych

objętościach próbek krwi [14].

Wysokosprawna chromatografia cieczowa

Wykorzystanie wysokosprawnej chromatografii cieczowej (high performance liquid chromatography, HPLC) połączonej z użyciem detektorów: UV, fluorescencyjnym, chemiluminescencyjnym, elektrochemicznym, woltametrycznym i masowym, umożliwiło uzyskanie wysokiego stopnia odzysku substancji halucynogennych. Ponadto niewątpliwą zaletą metody jest duża selektywność pomiaru oraz krótki czas potrzebny do wykonania pomiarów. Metoda bardzo dobrze sprawdza się w wykrywaniu i mierzeniu stężenia psylocyny we krwi [19], psylocyny i psylocybiny w suszu grzybowym [34], a także kwasu ibotenowego w sporach i kapeluszach muchomorą czerwonego [31].

Chromatografia cienkowarstwowa

Rozdział z użyciem chromatografii cienkowarstwowej (thin layer chromatography, TLC) wykonuje się na płytkach pokrytych krzemionką. Najlepszy rozdział uzyskano z użyciem takich zestawów eluentów jak: n-butanol, kwas octowy i woda; amoniak, woda i n-propanol; 1,5% rozwór amoniaku w metanolu, n-butanol, kwas octowy i woda. Z użyciem pierwszej z wymienionych grup eluentów otrzymano najlepszy rozdział i nie wystąpiło rozmycie plamek na płytce. Do uwidocznienia rozdzielonych substancji przeważnie używa się odczynnika Ehrlaha, który służy do wykrywania amin. Psylocyna i psylocybina są dobrze widoczne na płytce w niskim pasmie promieniowania UV [14].

Badania genetyczne

Interesującą alternatywą dla analiz morfologicznych i toksykologicznych jest identyfikacja gatunkowa grzybów oparta na badaniach genetycznych. Łańcuchowa reakcja polimerazy (polymerase chain reaction, PCR) jest metodą, która zrewolucjonizowała współczesną biologię molekularną umożliwiając otrzymanie milionów kopii fragmentów DNA w niedługim czasie (kilka godzin). Metoda doskonale sprawdza się w wykrywaniu nawet bardzo niskiego stężenia szukanego metabolitu, przy czym cechuje się dużą swoistością. PCR okazuje się potężnym narzędziem pozwalającym na jednoznaczną identyfikację grzybów z rodzaju *Psilocybe*. Przeprowadzenie testów tą metodą może zostać wykorzystane do odróżniania bezpostaciowych grzybnii i ujawniania łyściki w mieszaninach suszu różnych gatunków grzybów [38]. Poza klasyczną metodą PCR wykorzystywane są techniki: RAPD (random amplification of polymorphic DN), AFLP (amplified fragment length polymorphism) i HRM (high resolution melting) [5,8,26,38].

Wszystkie metody identyfikacji oparte na sekwencjonowaniu DNA wymagają zastosowania odpowiedniej techniki, RAPD, AFLP lub HRM, w zależności od objętości próbki oraz od analizowanego regionu w genomie. Dotychczasowe analizy pozwoliły wyodrębnić regiony charakterystyczne dla rodzaju *Psilocybe*: ATATCTCCACCTGTGCACCTTT oraz m.in. dla gatunków *Psilocybe semilanceata*: ATCTCTCCACCTGTGCACCTTT, ATCTCTCCACCTGTGCACCTTT lub ATCTCTCCACCTGTGCACCTTT i *Psilocybe cubensis*: ATATTTCCACCTGTGCACCTTT lub ATATTTCCACCTGTGCACCTTT [24].

Markerami często wykorzystywanymi do identyfikacji gatunkowej grzybów są regiony ITS1 i ITS2. Użyteczność fragmentów ITS warunkuje obecność polimorfizmów długości oraz sekwencji. To, że występują w licznych kopiach, umożliwia ich amplifikację nawet w bardzo zdegradowanym materiale, co ma niemałe znaczenie w badaniach do celów sądowych. Skuteczność analizy polimorfizmu regionów ITS do identyfikacji gatunkowej grzybów w analizach sądowych została kilkakrotnie potwierdzona. Metoda opracowana przez Lee i wsp. pozwoliła na różnicowanie grzybów halucynogennych z rodzaju *Panaeolus* i *Psilocybe* na podstawie polimorfizmu długości produktów amplifikacji tych regionów [17]. Podobne badania przeprowadzili Adamczyk i wsp., którzy amplifikowali region ITS1 grzybów z gatunku *Psilocybe semilanceata*, dzięki zastosowaniu specjalnych starterów [1].

Większą wiarygodność od analizy polimorfizmów przypisuje się metodom opartym na sekwencjonowaniu DNA, które pozwalają na uzyskanie kompletnej informacji o polimorfizmie badanego locus. W celu sprecyzowania wyników swoich badań, Lee i wsp. także posłużyli się metodą sekwencjonowania. Podejmowane były również

próby zastosowania starterów specyficznych dla danego rodzaju grzyba. Do testów użyto starterów komplementarnych do sekwencji ITS swoistych dla przedstawicieli grzybów z rodzaju *Panaeolus* i *Psilocybe* występujących na terenie Szkocji [17]. W przypadku grzybów rosnących w Ameryce Północnej, podobne testy zakończyły się niepowodzeniem [1]. Badania dowiodły, że w przypadku blisko spokrewnionych gatunków z rodzajów *Panaeolus* i *Psilocybe*, ze względu na duży polimorfizm sekwencji regionu ITS1, ich jednoznaczne zróżnicowanie nie jest możliwe. Zastosowanie dodatkowego regionu jądrowego DNA dla dużej podjednostki rybosomu nLSU [7,23], który charakteryzuje się mniejszym stopniem polimorfizmu, umożliwiło ustalenie przynależności gatunkowej tych przedstawicieli grzybów występujących w Ameryce Północnej, których nie dało się zidentyfikować analizą polimorfizmu sekwencji fragmentu ITS1. W oparciu o wyniki otrzymane w tych badaniach, zaproponowano połączenie analizy regionów ITS1 z wykorzystaniem regionu nLSU jako wiarygodną metodę mającą zastosowanie w systematyce molekularnej grzybów do badań sądowych [1].

Podsumowanie

Zatrucia psylocybiną i jej pochodnymi są wciąż dużym problemem klinicznym i społecznym głównie w grupie młodych osób. Substancje te są tanie, stosunkowo łatwo i szeroko dostępne, także przez Internet, co sprzyja ich spożywaniu i zatruciom. Ponieważ w większości zażywane są świadomie i intencjonalnie, stosunkowo rzadko są przyczyną hospitalizacji. Leczenie zatruc jest głównie objawowe. Mimo że psylocybina i jej pochodne właściwie nie powodują uzależnienia fizycznego, ich używanie może upośledzać funkcje poznawcze, a także być czynnikiem spustowym dla rozwoju psychoz lub reakcji lękowych [21].

Psylocybinę można zaliczyć do kategorii substancji psychodelicznych, względnie bezpiecznych, niezależniących, bez zastosowania w medycynie. Największym zagrożeniem czyhającym na amatorów wrażeń wywoływanych dzięki spożyciu "magicznych grzybków" jest pomyłka podczas zbioru grzybów z rodzaju *Psilocybe*. Eksperymentowania z psylocybiną, psylocyną i jej pochodnymi nie powinny się podejmować osoby ze słabą psychiką, skłonnościami depresyjnymi, niestabilnie emocjonalnie i niedojrzałe. U takich osób wzrasta ryzyko wystąpienia psychoz i trwałych zaburzeń psychicznych.

Istnieje wiele metod pozwalających na wykrycie psylocybiny w niewielkich ilościach materiału biologicznego, najpowszechniej są stosowane techniki oparte na chromatografii gazowej oraz cieczowej, jednak dzięki zdecydowanie większej czułości i swoistości, coraz większą popularność zyskują techniki molekularne.

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.

Piśmiennictwo

1. Adamczyk A., Sadakierska-Chudy A., Janoszka J., Rymkiewicz A., Dobosz T.: Hallucinogenic fungi (psilocybe). Part II. Identification of *Psilocybe semilanceata* by PCR. Arch. Med. Sadowej Kryminol., 2007; 57: 285-288
2. Baumeister D., Barnes G., Giaroli G., Tracy D.: Classical hallucinogens as antidepressants? A review of pharmacodynamics and putative clinical roles. Ther. Adv. Psychopharmacol., 2014; 4: 156-169
3. Bojko P.: Psylocybina; <http://knmn.us.edu.pl/teksty/nauka/386-psylocybina> (10.04.2014)
4. Boroviška J.: The wood-rotting bluing *Psilocybe* species in Central Europe - an identification key. Czech Mycol., 2008; 60: 173-192
5. Broda Z., Mikołajczyk S., Tomkowiak A., Weigt D.: Genetic similarity between the populations of haploid and diploid maize established with the use of RAPD-PCR markers. Acta Sci. Pol., Agric., 2013; 12: 15-22
6. Carhart-Harris R.L., Bruggler S., Nutt D.J., Stone J.M.: Psychiatry's next top model: cause for a re-think on drug models of psychosis and other psychiatric disorders. J. Psychopharmacol., 2013; 27: 771-778
7. Drehmel D., Moncalvo J.M., Vilgalys R.: Molecular phylogeny of *Amanita* based on large-subunit ribosomal DNA sequences: implications for taxonomy and character evolution. Mycologia, 1999; 91: 610-618
8. Erali M., Voelkerding K.V., Wittwer C.T.: High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. Exp. Mol. Pathol., 2008; 85: 50-58
9. Gartz J., Samorini G., Festi F.: On the presumed fatality caused in France by ingestion of Liberty Caps, Eleusis. J. Psychoact. Pl. Comp., 1996; 6: 3-13
10. Gerault A., Pickart D.: Fatal poisoning after a group of people voluntarily consumed hallucinogenic mushrooms. Bull. Soc. Mycol., 1996; 112: 1-14
11. Hasler F., Bourquin D., Brenneisen R., Vollenweider F.X.: Renal excretion profiles of psilocin following oral administration of psilocybin: a controlled study in man. J. Pharm. Biomed. Anal., 2002; 30: 331-339
12. Hofmann A.: Les alcaloides de psilocybe Mexicana. Experientia, 1959; 15: 101-106
13. Janoszka J., Rymkiewicz A., Dobosz T.: Hallucinogenic fungi (Psilocybe). Part I. Characteristics, results of consumption,

- recognition. Arch. Med. Sądowej Kryminol., 2005; 55: 215-219
14. Jasicka-Misiak I., Młynarz P., Kafarski P.: Identyfikacja grzybów halucynogennych ze wskazaniem najpowszechniej stosowanych metod oznaczania substancji halucynogennych z grzybów we krwi. Opole i Wrocław 2006, http://www.biotech.dcz.t.wroc.pl/opracowania_merytoryczne.xml (23.01.2015)
 15. Jastrzębski M., Bala A.: Wpływ psilocybiny na percepcję wzrokową i orientację przestrzenną - ujęcie neuropsychologiczne. Psychiatr. Pol., 2013; 47: 1157-1167
 16. Kocjan R.: Chemia analityczna dla studentów, tom 2: Analiza instrumentalna Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2000
 17. Lee J.C., Cole M., Linacre A.: Identification of members of the genera *Panaeolus* and *Psilocybe* by a DNA test. A preliminary test for hallucinogenic fungi. Forensic Sci. Int., 2000; 112: 123-133
 18. Leo P., Chiu W.: Differential diagnosis and management of hallucinations. Hong Kong Med. J., 1989; 41: 292-297
 19. Lindenblatt H., Kramer E., Holzmann-Erens P., Gouzoulis-Mayfrank E., Kovar K.A.: Quantitation of psilocin in human plasma by high-performance liquid chromatography and electrochemical detection: comparison of liquid-liquid extraction with automated online solid-phase extraction. J. Chromatogr. B., 1998; 709: 255-263
 20. Madej K.: Capillary electrophoresis as a new tool in forensic toxicological analysis. Probl. Forensic Sci., 2001; 48: 31-52
 21. Majewska M., Szponar J., Karakuła H., Kołodziej M., Lewandowska-Stanek H.: Zatrucia psilocyną i jej pochodnymi. Curr. Probl. Psychiatry, 2012; 13: 192-195
 22. Marciniak B., Ferenc T., Kusowska J., Cieciewicz J., Kowalczyk E.: Zatrucia wybranymi grzybami o działaniu neurotropowym i halucynogennym. Med. Pr., 2010; 61: 583-595
 23. Moncalvo J.M., Dreihel D., Vilgalys R.: Variation in modes and rates of evolution in nuclear and mitochondrial ribosomal DNA in the mushroom genus *Amanita* (Agaricales, Basidiomycota): phylogenetic implications. Mol. Phylogenet. Evol., 2000; 16: 48-63
 24. Nugent K.G., Saville B.J.: Forensic analysis of hallucinogenic fungi: a DNA-based approach. Forensic Sci. Int., 2004; 140: 147-157
 25. Pihlainen K., Sippola E., Kostianen R.: Rapid identification and quantitation of compounds with forensic interest using fast liquid chromatography-ion trap mass spectrometry and library searching. J. Chromatogr. A., 2003; 994: 93-102
 26. Ranamukhaarachchi D.G., Kane M.E., Guy C.L., Li Q.B.: Modified AFLP technique for rapid genetic characterization in plants. Biotechniques, 2000; 29: 858-866
 27. Rostkowska-Nadolska B., Machoń Z.: Halucynogeny: Część I. Halucynogeny pochodzenia naturalnego. Farm. Pol., 2009; 65: 138-146
 28. Stamets P., Chilton J.S.: The mushroom cultivator. A practical guide to growing mushrooms at home, Agarkion Press, Olympia, Washington 1983
 29. Stamets P., Gartz J.: A new caeruleous *Psilocybe* from the Pacific Coast of Northwestern America. Integration: J. Mind Moving Plants Culture, 1995; 6: 21-28
 30. Sticht G., Kaferstein H.: Detection of psilocin in body fluids. Forensic Sci. Int., 2000; 113: 403-407
 31. Stroemer F.C., Koller G.E., Janak K.: Ibotenic acid in *Amanita muscaria* spores and caps. Mycologist, 2004; 18: 114-117
 32. Szczepaniak W.: Metody instrumentalne w analizie chemicznej, PWN, 1996
 33. Szukalski B.: Środki halucynogenne. Alkoholizm i Narkomania, 1998; 11: 161-178
 34. Thomson B.M.: Analysis of psilocybin and psilocin in mushroom extracts by reversed-phase high performance liquid chromatography. J. Forensic Sci., 1980; 25: 779-785
 35. Usdin E., Efron D.H.: Psychotropic drugs and related compounds, 2nd ed. Usdin, Washington DC, 1972
 36. Ustawa o przeciwdziałaniu narkomanii, Załącznik nr 2, str. 58-60, Dz. U., 2005; Nr 179: poz. 1485
 37. Wieczorek M.: The effect of particular active substances of hallucinogenic mushrooms. Folia Biologica et Oecologica, Acta Universitatis Lodziensis, 2014; 10: 40-48
 38. Zuber A., Kowalczyk M., Sekuła A., Mleczo P., Kupiec T.: Methods used in species identification of hallucinogenic and other poisonous mushrooms in forensic investigations. Probl. Forensic Sci., 2011; 86: 151-161