

Ann. Mus. civ. Rovereto	Sez.: Arch., St., Sc. nat.	Vol. 12 (1996)	219-242	1998
-------------------------	----------------------------	----------------	---------	------

FABIO CALLIGARIS

INDAGINE SULLE RELAZIONI TRA COMPOSIZIONE
CHIMICA DI FUNGHI AD AZIONE PSICOTROPA
E LORO PROVENIENZA.
STUDIO CHEMIOMETRICO E CROMATOGRAFICO

Abstract - FABIO CALLIGARIS - Inquiry about interrelationship of chemical composition of psychotropic fungi and their provenience. Chemiometric and chromatographic study.

Previous studies about fungi of genus *Panaeolus*, *Psilocybe* and *Stropharia* allowed to identify a series of alkaloids as their distinctive components (among the others psilocin, baeocystin and norbaeocystin), some of which known to be psychotropic. The present study, concerning the chemical characterization of these fungi, was carried out in order to achieve a chemotaxonomic classification method based on the qualitative and quantitative presence of the various substances determined.

Carpophores belonging to different genera or to the same one but coming from different countries have been analyzed.

Separation techniques were processed by multivariate statistical methods in order to draw the maximum of information.

Among the other things it is work mentioning that a definite influence of climatic and environmental conditions on the production of their typical alkaloids by the fungi has been clearly evidenced. In addition in the case of the fungus *Stropharia semiglobata* the presence of psilocybin was assessed.

Key words: Chemotaxonomy - Psychoactive substances.

Riassunto - FABIO CALLIGARIS - Indagine sulle relazioni tra composizione chimica di funghi ad azione psicotropa e loro provenienza. Studio chemiometrico e cromatografico.

Studi precedenti relativi a funghi appartenenti ai generi *Panaeolus*, *Psilocybe* e *Stropharia* hanno consentito di individuare come loro sostanze caratterizzanti una serie di alcaloidi tra i quali la psilocibina, la psilocina, la baeocistina e la norbaeocistina, alcuni dei quali di provata azione psicotropa. Il presente lavoro, incentrato sulla caratterizzazione di tali funghi, è stato elaborato per acquisire un criterio classificatorio chemiotassonomico che tenesse conto dell'intero ventaglio delle sostanze presenti.

A tal fine sono stati studiati sia campioni raccolti su territorio italiano che campioni coltivati

in laboratorio. Carpofori appartenenti a generi diversi o alla stessa specie, ma di diversa provenienza, attraverso uno studio chemiotassonomico hanno evidenziato che differenze climatiche e/o di habitat influiscono sulla produzione dei metaboliti. Inoltre, questo studio ha consentito di poter formulare alcune ipotesi sugli effetti di questa influenza.

Le tecniche di separazione sono state messe a punto in HPLC ed una delle sostanze prodotte dai carpofori è stata isolata e caratterizzata in GC-MS.

Lo studio qualitativo è stato esteso a funghi normalmente classificati come psilocibinico-latenti i quali hanno mostrato non contenere sostanze psicoattive mentre nella specie *Stropharia semiglobata*, ritenuta psilocibinico-sospetta, è stata accertata la presenza di psilocibina.

Parole chiave: Chemiotassonomia - Sostanze psicoattive.

PREMESSA

Quanto ci si è preposti di verificare sono le possibili relazioni tra la composizione chimica dei funghi, di nota e provata azione psicotropa ed i loro attributi di genere, specie e provenienza. I funghi, oggetto di studio, sono campioni di *Stropharia cubensis* e di *Psilocybe semilanceata*.

Per evidenziare le relazioni tra composizione chimica ed altri attributi è stato necessario, da un lato, mettere a punto una tecnica di estrazione esaustiva sui campioni liofilizzati e dall'altro una separazione che consentisse una determinazione quantitativa accurata, nonché qualitativa, per quei metaboliti ritenuti maggiormente significativi.

Si è adottata perciò una procedura basata su separazione in HPLC con rivelatore «photodiode array», il quale consente, tramite l'acquisizione di spettri UV in linea durante la corsa cromatografica, una determinazione più certa rispetto ai soli tempi di ritenzione. Le sostanze ritenute maggiormente significative sono state 14, non tutte comuni ai due generi trattati. Alcune di queste sono state individuate qualitativamente (psilocibina, psilocina, baeocistina e triptofano), ma di tutte le sostanze si sono ricavate le aree cromatografiche che costituiscono il parametro sperimentale riconducibile alla loro concentrazione. Tornando all'obiettivo di questo lavoro, si è trattato di indagare al meglio la molteplice informazione contenuta nelle «impronte digitali» di ciascun carpoforo costituita dalle aree cromatografiche delle 14 sostanze prescelte.

Per evidenziare questa informazione, uno dei metodi più affidabili è di sottoporre i dati ricavati da tutte le misurazioni effettuate ad analisi statistica multivariata, in particolare ad una Analisi delle Componenti Principali (PCA).

Prerogativa di questa procedura è la capacità di trasportare l'informazione contenuta in un numero comunque elevato di variabili (in questo caso, per ogni tipo di fungo, le 14 sostanze la cui presenza è stata ritenuta più caratterizzante) in uno spazio di non più di 2 o 3 dimensioni, definite componenti principali, quindi di facile visualizzazione grafica. Oltre a ciò, l'Analisi delle Componenti

Principali è in grado di assegnare ad ognuna delle variabili dei coefficienti detti *loading*, i quali indicano quanto la variabile originaria contribuisce alla definizione delle nuove componenti. In questo modo è possibile perciò stabilire quante e quali delle sostanze determinate sono davvero essenziali per la caratterizzazione dei diversi funghi.

SEPARAZIONE HPLC E CARATTERIZZAZIONE DELLE SOSTANZE

Descrizione dei campioni

Come è già stato accennato, le specie di funghi oggetto della ricerca sono la *Stropharia cubensis* e la *Psilocybe semilanceata*. Più precisamente, si sono eseguite coltivazioni di *Stropharia cubensis* partendo da spore di carpofori di diversa provenienza: Texas, Tailandia ed Amazzonia (nel corso dello studio verranno chiamati ScT, ScTh e ScA). Campioni di *Psilocybe semilanceata*, invece, sono stati raccolti in due diverse località del torinese, mentre una terza tipologia la si è ottenuta coltivando le spore di uno dei due campioni (verranno chiamati PsG, PsC quelli coltivati a partire da spore di PsG ed infine PsA).

L'inoculazione delle spore di tutti i campioni è stata fatta in un terreno a base Agar contenente glucosio, peptone, estratto di malto e sali (Prof. A. Ceruti, informazione orale).

Dopo circa 30 giorni, 15 dalla comparsa delle prime ife, il micelio è stato trasferito in vaso contenente sabbia, vermiculite, paglia, acqua e carbonato di calcio sterilizzato precedentemente in autoclave a 120°C. Dopo circa 30 giorni, durante i quali il micelio si è ben accresciuto, è stato trasferito in un contenitore di volume maggiore, contenente gli stessi componenti del precedente, ma in quantità superiore. In questa fase il vaso è stato tenuto ancora chiuso per evitare inquinamenti. Passata una settimana circa è stato eseguito il casing, cioè il ricoprimento del micelio con terra, utilizzando torba, sterco equino e sabbia nelle proporzioni 1:1:1.

Dopo 1 mese, sono comparsi i primi corpi fruttiferi che sono stati raccolti nel volgere di 10 giorni circa. Dal momento del casing, i contenitori sono stati lasciati aperti all'interno di un acquario di vetro e innaffiati con acqua minerale precedentemente sterilizzata, con una siringa. Si è sempre evitato che il terreno andasse a secchezza. Non sono stati presi altri particolari accorgimenti, oltre a tutte le possibili attenzioni per garantire la massima sterilità. In proposito, si è visto che inoculando sotto cappa a flusso laminare piuttosto che su un bancone di laboratorio con l'accortezza di lavare bene con alcool sia mani che bancone, l'ansa sul bunsen e lavorando in ambiente chiuso, la percentuale di inquinamenti del secondo caso, non è tale da rendere necessaria la prima soluzione. Atten-

zione, pulizia e poche altre accortezze bastano a rendere circa il 90-95% delle provette non inquinate.

Il numero di tubi le cui spore germinano, dipende invece essenzialmente dalla qualità e dalla età di queste ultime più che dal tipo di terreno utilizzato.

Strumentazione HPLC

Tutte le separazioni sono state effettuate su uno strumento HPLC Varian Star 9000. La colonna utilizzata nello studio analitico è una colonna endcapped Lichrospher C-18 con dimensioni delle particelle di 5 micrometri, lunghezza 25 cm e diametro 4.6 mm.

Quella utilizzata nella raccolta delle frazioni (vedi *Raccolta dei dati*) è una cartuccia semipreparativa Lichrospher 300, RP-18 impaccata con particelle di 10 micrometri, lunga 25 cm e con 1 cm di diametro interno.

Il rivelatore è a serie di fotodiodi. Rispetto ad un classico spettrofotometro funzionante attraverso la selezione preventiva di una sola lunghezza d'onda, consente l'ottenimento di più spettri completi (da 190 a 367 nm, fino a 16 al secondo) che consentono di monitorare accuratamente le caratteristiche spettrali UV di tutte le sostanze separate. L'insieme dei dati viene poi digitalizzato consentendo la memorizzazione e la manipolazione al computer. Si possono così identificare sostanze incognite, ad esempio con il confronto di altri spettri contenuti in libreria. La schiera di fotodiodi consente, inoltre, la registrazione del cromatogramma ad una lunghezza d'onda scelta dallo sperimentatore attraverso le misure di assorbanza del relativo canale. Tale lunghezza d'onda può essere cambiata successivamente alla corsa, essendo memorizzati gli assorbimenti su tutti i canali, i quali nel loro insieme costituiscono lo spettro di una sostanza.

Sistema GC-MS

Il gascromatografo utilizzato è il Varian 3400 accoppiato ad uno spettrometro di massa Modello Varian Saturn II. L'iniettore consente l'introduzione del campione direttamente in colonna, a freddo e di tutto il volume prescelto di campione. La colonna è una colonna capillare DB-5 (J&W), di diametro interno 0.25 mm e lunghezza 30 m. L'analizzatore di massa è un sistema a trappola ionica collegata al gascromatografo. La ionizzazione delle molecole uscenti dalla colonna avviene all'interno della trappola per urto con elettroni emessi da un filamento di tungsteno. Gli ioni prodotti vengono poi tenuti all'interno della trappola e mantenuti in orbite stabili a forma di otto da una radiofrequenza di opportuna lunghezza d'onda. La sua variazione destabilizza in rapida successione tutte le orbite relative ai diver-

si ioni. Questi collidono, infine, sul fotomoltiplicatore di elettroni che produce correnti amplificate proporzionali al numero di particelle incidenti.

Il controllo sull'intero sistema è effettuato dal dispositivo Scan Acquisition Processor (SAP) basato su un microprocessore del tipo 80C186 collegato al computer tramite un'interfaccia IEEE-488.

INDAGINE CHEMIOMETRICA

Raccolta dei dati

I funghi analizzati, ad eccezione di quelli di coltivazione, sono stati raccolti nel torinese e nel cuneese nell'ottobre 1993. Una volta identificati, sono stati surgelati quindi liofilizzati nel giro di una quindicina di giorni ed infine, stoccati in freezer a 20°C fino al momento dell'uso. Allo scopo di trovare la composizione della fase mobile che meglio si confacesse alla separazione, sono stati utilizzati estratti metanolici di *Stropharia cubensis* con diversi sistemi eluenti. Dopo alcuni tentativi, è risultata migliore la seguente eluizione in gradiente:

0-2 min., 100% A. 20 min., 100% C.

A: tampone di acetato di ammonio 0,3 M portato a pH 7,5. C: metanolo.

Tempo di corsa: 40 min. Flusso: 1 ml/min.

Lettura del cromatogramma: 268 nm. 269, corrisponde ad uno dei massimi di assorbimenti di psilocibina e psilocina. A questa lunghezza d'onda, non vengono inoltre rivelate sostanze come i glucidi che presentano assorbimenti a lunghezza d'onda inferiore.

Volume di iniezione: 50 microlitri.

Non avendo a disposizione gli standard di psilocibina e psilocina, si è dovuto ricorrere all'utilizzo di metodiche di separazione in HPLC riportate in letteratura (Christiansen, A.L. Rasmussen, K.E. 1982; Wurst, M. Semerdzieva, M. Vokoun, 1984; Borner, S., Brenneisen, R. 1987). Dal confronto degli spettri UV eseguiti dal photodiode array con quelli riportati in letteratura, si sono così potuti identificare i picchi della baeocistina, psilocibina e psilocina ai tempi di circa 4, 7 e 12 min. Ulteriore conferma, si è avuta raccogliendo le frazioni corrispondenti ai picchi della psilocibina e psilocina, verificando che gli spettri UV eseguiti con uno spettrofotometro classico a doppio raggio, sono del tutto simili a quelli riportati in letteratura a parità di solvente (Hofmann, A. ed altri, 1959; Christiansen, A.L. Rasmussen, K.E. 1982). Successivamente, è stato anche individuato il picco del triptofano al tempo di ritenzione di circa 10 min., avendo a disposizione lo standard puro. Quanto appare dai cromatogrammi eseguiti è che le sostanze contenute nel fungo sono ben numerose.

Per il trattamento statistico dei dati, sono state eseguite due estrazioni con 1 ml di metanolo ciascuna su 20 mg, esattamente pesati, di un carpoforo liofilizzato ridotto con mortaio e pestello in polvere finissima. Ogni estrazione è stata condotta per 15 min. nel bagno ad ultrasuoni. È stato verificato che un'ulteriore estrazione risultasse priva di valori superiori all'1 % circa dell'area totale del picco.

Seguendo dunque questa procedura estrattiva, sono stati trattati tre funghi per ogni specie di interesse. Di uno stesso carpoforo sono state fatte, inoltre, due pesate in modo da convalidare, o meno, la procedura analitica. Il trattamento prevede che per ognuna delle quattro soluzioni della singola specie, vengano eseguite tre repliche quindi, tre misure. Le specie investigate, come già detto, sono la *Stropharia cubensis* (T texana, A colombiana e Th thailandese) e la *Psilocybe semilanceata* (raccolta nel torinese in due diverse località denominate A e G e di coltivazione partendo da spore di carpofori provenienti da G, denominati C). Sono state quindi individuate 14 sostanze, non tutte presenti in entrambe le specie, che per concentrazione significativa, per esito positivo con il reattivo di Erligh (paradimetilamino benzaldeide sciolta in HCl e unita a tre parti di acetone) o per il suo spettro UV, sono state ritenute significative per la caratterizzazione delle specie (vedi appendice A.I.2). Il composto eluito a circa 32 minuti è contenuto in elevata concentrazione ed è presente oltre che nella *Stropharia cubensis*, nella *Psilocybe semilanceata*, anche nei panaeoli e negli altri generi studiati (vedi appendici A.I.1, A.II.1, A.II.2, A.II.3 e A.II.4). L'elevato tempo di ritenzione in HPLC, faceva presupporre caratteristiche prevalentemente apolari e quindi possibile volatilità. Di questa sostanza è stata fatta un'iniezione gascromatografica, con rivelatore di massa. Infatti, senza derivatizzazione, è stato ottenuto uno spettro di massa ben leggibile, identificato dalla libreria dello strumento come ergosterolo, o ergosterina (vedi appendice A.I.6). Questo composto è apolare come si immaginava, ed è notoriamente prodotto dai lieviti, ma mai citato, secondo le nostre conoscenze, a proposito dei funghi psilocibinici. Lo spettro ultravioletto riportato in letteratura, mostra massimi di assorbimento a 262, 271, 282 e 293 nm (in etanolo). È insolubile in acqua, e questo è in accordo con la letteratura. Pur non essendo assolutamente certo che si tratti proprio di ergosterolo, è tuttavia accertata la natura steroidea della sostanza. Combinando i tempi di ritenzione in HPLC con gli spettri ultravioletti corrispondenti, si sono classificati come «possibili steroidei» i composti eluiti ai tempi (approssimati) di 22, 26, 32 e 33 minuti. Per queste sostanze, ad eccezione della già citata eluita a 32 min. circa, non è stato possibile fare l'indagine in gas-massa senza derivatizzazione. Le relative frazioni raccolte dopo la separazione cromatografica, hanno dato responso negativo al saggio di Erligh, evidenziando la natura non indolica. Si è costruita una tabella riportata in appendice A.I.2 contenente oltre ai possibili steroidei, anche i rimanenti dieci composti, evidenziando la specie in cui non sono contenuti, i tempi di ritenzione approssimati e le caratteristiche

che si sono osservate (I/S=insolubile/solubile in acqua, En/p=esito negativo/positivo al saggio di Erligh. P=possibile steroideo). Le sostanze eluite ai tempi 2,3 2,4 e 2,9 non sono state raccolte separatamente quindi non si può dire quale sia delle tre a dare risposta positiva al saggio di Erligh, ammesso che non siano due o tutte e tre. Tornando alla raccolta dei dati sono state lette le aree dei picchi relativi alle sostanze prescelte, dato questo direttamente correlabile alle concentrazioni. Si tenga presente che lo stesso studio non è stato possibile per i carpofori appartenenti al genere *Panaeolus* e per la *Stropharia semiglobata* poiché la composizione chimica del loro estratto metanolico è risultata variabile già nel breve arco di tempo delle analisi. Riportiamo due cromatogrammi in HPLC, esemplificativi, di *Stropharia cubensis* colombiana e di *Psilocybe semilanceata* nell'appendice A.I.1. Nelle successive appendici, A.I.3, A.I.4 e A.I.5, seguono gli spettri ultravioletti di dodici delle sostanze utilizzate nell'analisi chemiometrica.

Trattamento chemiometrico dei dati

Poiché ogni tipo di fungo risulta descritto da un numero elevato di sostanze è impossibile una rappresentazione grafica che li metta a confronto poiché occorrerebbe uno spazio a 14 dimensioni. La tecnica statistica nota come Analisi delle Componenti Principali (PCA) consiste nel proiettare su due o tre assi i dati contenuti in uno spazio a n dimensioni.

Essendo infinite le combinazioni degli assi possibili, è necessario un criterio che ne definisca la composizione ottimale. Con la PCA, la direzione degli assi viene scelta in modo che le nuove collocazioni degli oggetti, rispecchino quanto più è possibile, quella originaria. In termini tecnici vuol dire imporre delle condizioni di massimizzazione della varianza (grandezza statistica associabile all'informazione contenuta nei dati sperimentali) per ciascuna delle componenti principali adottata.

Si seleziona perciò la prima componente principale in modo che mantenga la maggior varianza possibile contenuta nei dati. La seconda componente principale verrà scelta ortogonale alla prima ed in modo tale che contenga la maggior parte della varianza dei dati rimasta non spiegata dalla prima componente principale e così via. In termini matematici si realizza tutto ciò costruendo la matrice delle varianze e covarianze dei dati C_x e risolvendo l'equazione agli autovalori seguente:

$$C_x v = \lambda v.$$

Il vettore v trovato risolvendo questa equazione viene chiamato autovettore delle matrici C_x e λ viene chiamato autovalore.

Le componenti principali risulteranno perciò nuove variabili costruite come funzioni lineari indipendenti delle variabili originali. I coefficienti con cui le variabili originali contribuiscono alla componente principale sono dati dalle coordinate del corrispondente autovettore. Il *loading* di una variabile originale per una componente principale, definito come questa coordinata moltiplicata per la radice quadrata dell'autovalore di questa componente principale, non è nient'altro che una indicazione di quanto quella variabile (originale) contribuisce alla definizione della componente principale stessa.

Le coordinate che definiscono gli oggetti nel nuovo spazio a due o tre dimensioni definito dalle componenti principali così calcolate vengono chiamate *scores*. Tornando ai risultati del trattamento con la PCA dei nostri dati, in appendice A.I.7 sono riportati i diagrammi basati sugli *scores* dei campioni sulle due e tre componenti principali (PC). I valori utilizzati nell'acquisizione di *scores* e *loading*, non sono le aree cromatografiche tal quali, bensì le aree percentuali per ogni sostanza all'interno del carpoforo. Questo consente di evitare differenziazione di funghi aventi diversi valori assoluti di concentrazioni. L'indagine mira quindi ad una classificazione basata sui mutui rapporti delle 14 sostanze.

L'analisi dei *loading* consente infine di risalire a quali delle 14 sostanze si può attribuire un maggior peso nel differenziare gli oggetti (i tipi di funghi) sugli assi delle componenti principali. I dati riferiti alla Ps G evidenziano la distribuzione dei punti in tre famiglie corrispondenti ai tre carpofori, una delle quali costituita da sei oggetti cioè, le sei estrazioni sullo stesso fungo. Questa situazione consente di proseguire l'indagine. Le famiglie si collocano in zone abbastanza lontane e questo implica che la *Psilocybe semilanceata* G sia costituita da campioni di composizione diversa tra loro. La Ps C (si ricordi che sono carpofori di coltivazione le cui spore provengono da Ps G) si colloca in una zona molto meno ampia mentre la distribuzione si allarga nuovamente per Ps A.

La *Stropharia cubensis*, come era logico aspettarsi, trova spazio in una zona diversa dalla prima specie. I dati, escludendo l'oggetto in basso a destra, risultano meno dispersi dei precedenti. Si osserva una netta somiglianza tra la specie thailandese Th e quella colombiana C. Nel grafico tridimensionale, introducendo una nuova variabile, gli oggetti rimangono divisi in due famiglie, ma tendono maggiormente a confondersi tra loro.

L'analisi dei *loading* si effettua cercando tra le variabili quelle che hanno un valore assoluto maggiore. Il caso in esame evidenzia come la differenziazione su PC1 sia dovuta principalmente alle sostanze 2, 3, alla psilocina ed al composto steroideo; su PC2, alla psilocibina e al composto 5. Invece per PC3, ai composti 4,6,7 e 8.

Quanto osservato consente di formulare alcune considerazioni sulle possibilità di caratterizzazione chimica di questo tipo di funghi.

Utilizzando sempre le stesse condizioni di separazione cromatografica, si sono investigate le seguenti specie psilocibinico latenti: *Panaeolus foenisecii*, *Panaeolus campanulatus*, *Panaeolus sphinctrinus*, di diversa provenienza (tutti raccolti comunque nel torinese e cuneese) e periodo di fruttificazione. In nessun caso si è riscontrata la presenza di psilocibina e/o psilocina, ma sempre di triptofano e serotonina, confermata dagli standard. Si riportano gli spettri UV del triptofano e della serotonina il cui tempo di ritenzione è di circa 11 minuti (appendice A.II.1).

Le quantità di carpofori liofilizzata, è stata superiore a 20 mg.

Le specie sospette investigate sono invece la *Stropharia semiglobata*, la *Psatyrella gracilis* e la *Psatyrella conopilus*. Si è riscontrata presenza di psilocibina, forse psilocina (vedi appendice A.II.4) e triptofano per la *Stropharia semiglobata*. Nelle due *Psatyrelle* si è riscontrata la presenza del triptofano.

Si osservi dai cromatogrammi come sia sempre presente la sostanza eluita a un tempo di ritenzione di circa 32 minuti.

CONCLUSIONI

Il lavoro ha consentito di osservare che gli alcaloidi con proprietà psicotrope sono le sostanze che più contribuiscono alla caratterizzazione del fungo da cui provengono e che i contributi in questo senso attribuibili ad altri componenti non alcaloidei sono di gran lunga meno importanti.

In secondo luogo si è evidenziato come i funghi coltivati abbiano una composizione più simile tra loro rispetto ai corrispondenti campioni selvatici. Questo sembra abbastanza ragionevole tenendo conto che le condizioni climatiche e di habitat sono più costanti nel caso della coltivazione.

Inoltre, derivando i campioni di laboratorio tutti da uno stesso carpoforo, è anche possibile che vi siano fattori genetici tali da rendere più simili i tratti chimici.

A proposito dell'influenza determinante delle condizioni climatiche e di habitat è decisivo il riscontro fornito dall'estrema somiglianza caratterizzante funghi provenienti da zone geografiche molto distanti (Tailandia e Amazzonia colombiana), ma molto simili per il tipo di habitat, soprattutto se confrontata con la minore somiglianza tra funghi colombiani e quelli texani che sono provenienti da zone geograficamente assai più vicine, ma climaticamente sicuramente differenti. Sembra quindi di poter concludere che dall'analisi cromatografica di estratti di questi funghi sia non solo possibile risalire alla specie, ma, all'interno di una data specie, sia possibile individuare più somiglianze di condizioni am-

bientali di crescita non di specifica provenienza geografica. Parallelamente a questo lavoro, è stata eseguita una ulteriore caratterizzazione chimica delle 14 sostanze oggetto dello studio.

Queste sono state separate e raccolte utilizzando una colonna semipreparativa e quindi analizzate. Oltre a saggi qualitativi, è stata provata la caratterizzazione delle strutture chimiche per via GC-MS. Solo per una sostanza, l'ultima in ordine di eluizione, si è avuta una risposta attendibile senza ricorrere a derivatizzazione.

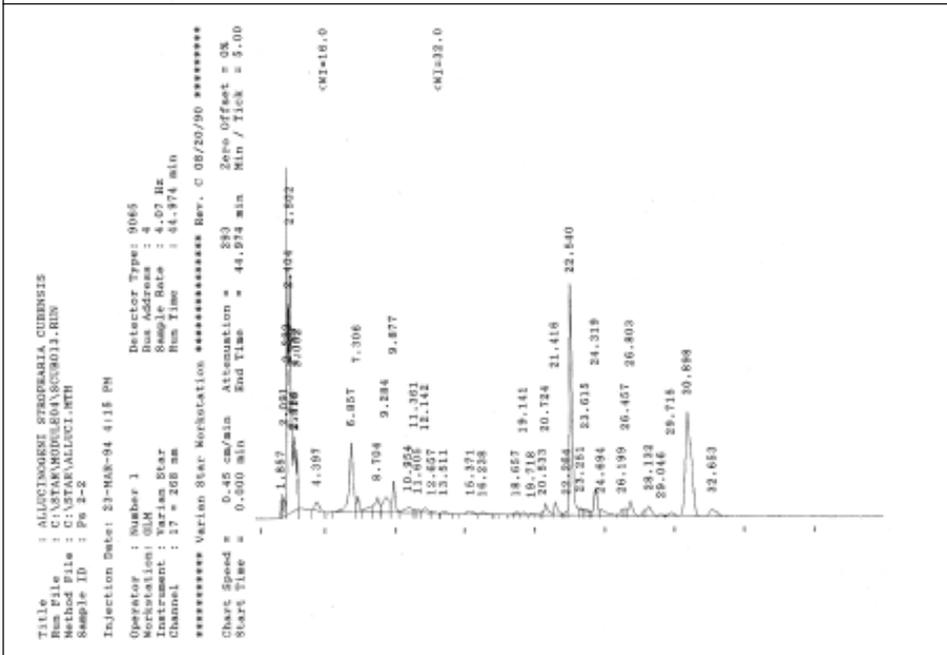
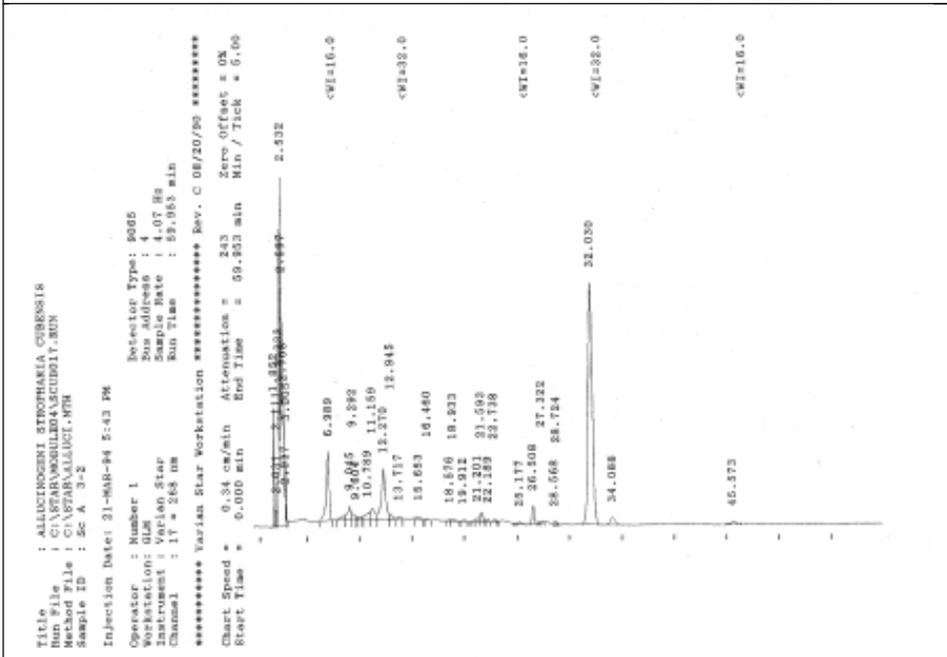
Questa sostanza, verosimilmente, risulta essere l'ergosterolo, provitamina antirachitica e comune nei lieviti.

RINGRAZIAMENTI

Prof. C. Baiocchi per «avermi accolto», il fondamentale aiuto, la discreta, ma tangibile presenza ed il dialogo. Prof. A. Ceruti per il paziente lavoro di classificazione dei funghi. Prof. M. Marzona per la gentilezza e disponibilità sempre dimostrata. Dott. C. Canepa per l'interesse ed i preziosi consigli. Prof.essa Luppi per l'aiuto. Prof. Dolci per l'aiuto e l'incoraggiamento. Giorgio Samorini per il preziosissimo e costante aiuto, la competenza e l'interesse. Dott. C. Barbieri, senza il quale non sarebbe nato il lavoro, per il suo «libero agire» e l'amicizia. Dott. F. Festi primo e fascinoso ispiratore. Dott. J. Gartz e J. Allen per gli aiuti e la disponibilità. Mario Lorenzetti per avermi guidato la prima volta in montagna.

APPENDICE A.I.1

Cromatogramma HPLC della *Stropharia cubensis* e della *Psilocybe semilanceata*



APPENDICE A.I.2
Caratteristiche delle 14 sostanze

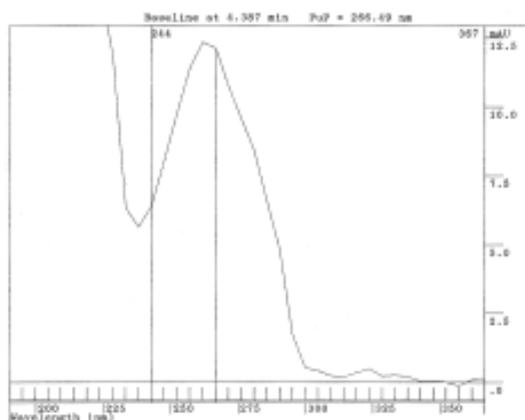
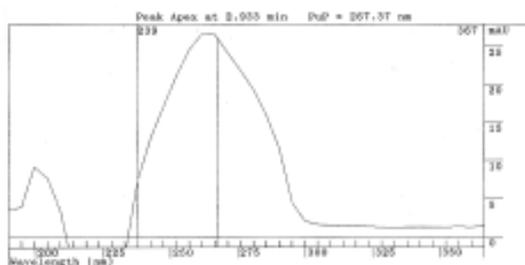
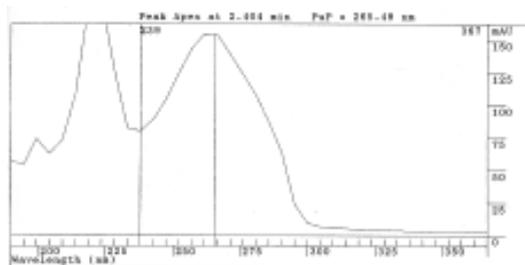
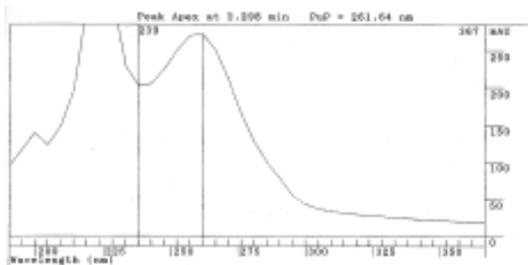
I/S= insolubile/solubile in acqua

E_{er}= esito positivo/negativo al saggio di Erlich

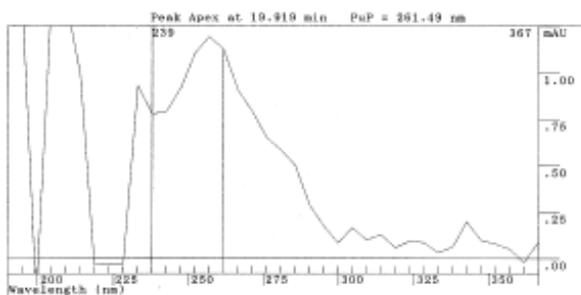
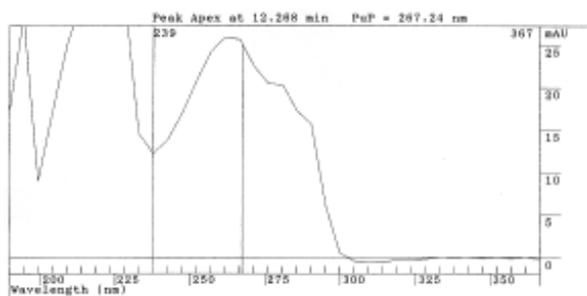
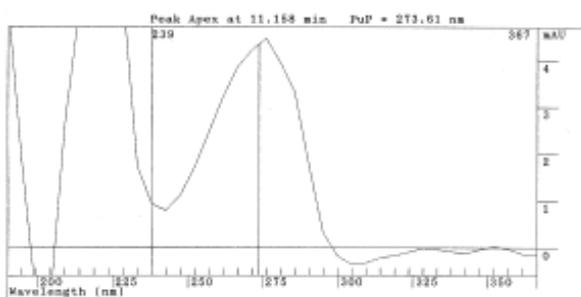
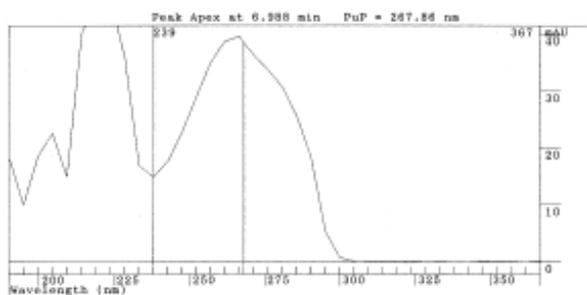
P= possibile steroideo

Sostanza	T _r approssimativo in minuti	Caratteristiche
1	2,3	S, E _p
2 (assente nella Sc)	2,4	S, E _p
3	2,9	S, E _p
baeocistina (assente nella Sc)	4	S, E _p
psilocibina	7	S, E _p
triptofano	10	S, E _p
psilocina	12	I, E _p
4 (assente nella Ps)	13	S, E _p
5	19	--
6 (assente nella Ps)	21	--
7	22	I, P, E _n
8	26	I, P, E _n
9	32	I, P, E _n
10	33	I, P, E _n

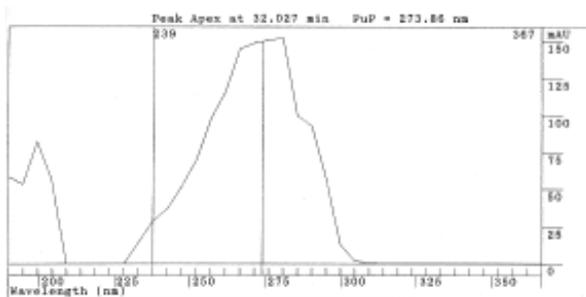
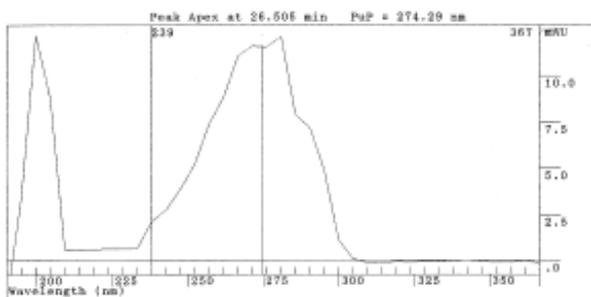
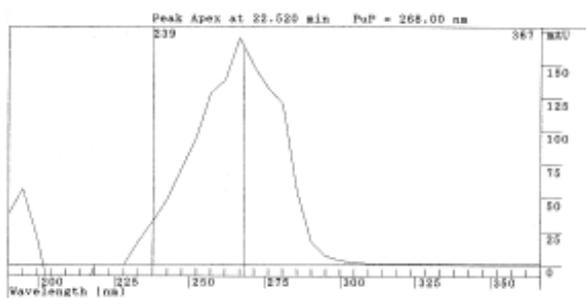
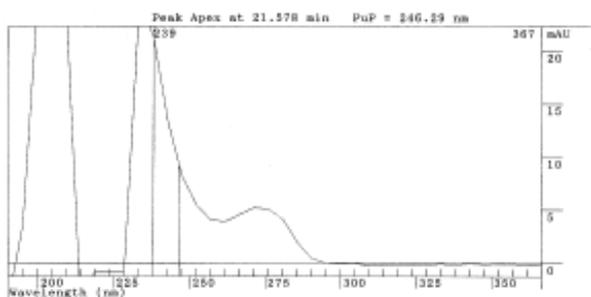
APPENDICE A.I.3
Spettri UV delle sostanze scelte per l'indagine chemiometrica



APPENDICE A.I.4
Spettri UV delle sostanze scelte per l'indagine chemiometrica



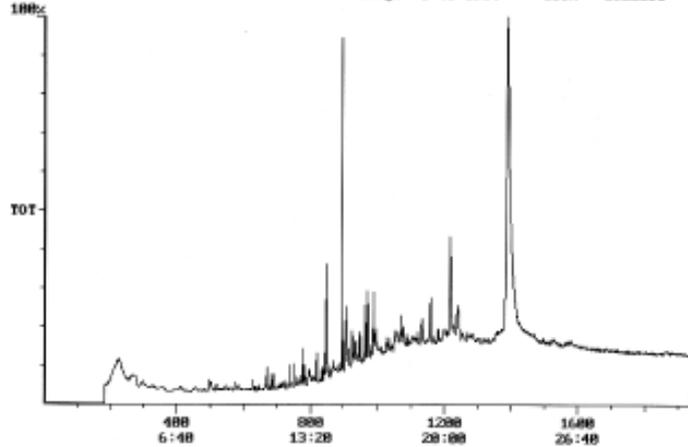
APPENDICE A.I.5
Spettri UV delle sostanze scelte per l'indagine chemiometrica



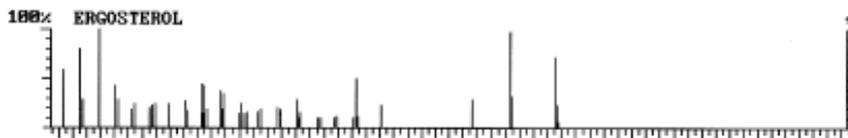
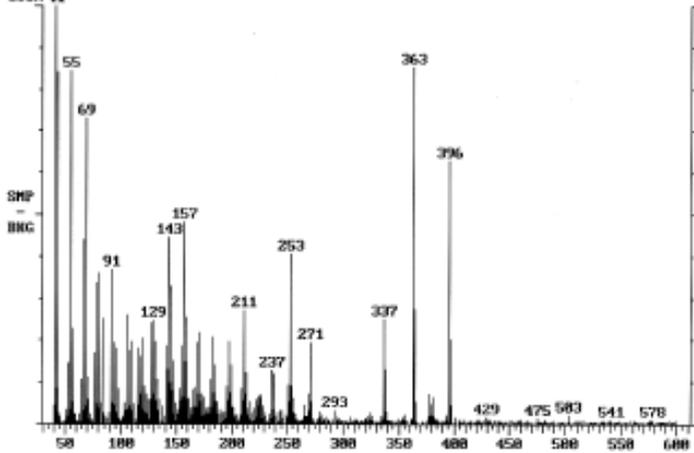
APPENDICE A.I.6

Spettro di massa della sostanza incognita supposta ergosterolo

Chromatogram Plot C:\SATURN\METHODS\PS1 Date: 06/18/94 14:55:03
 Comment: X PPM IN METANOLO PICCO A 32 MIN FUNGO FS G 011
 Scan No: 1 Retention Time: 8:01 RIC: 8 Mass Range: 0 - 8
 Plotted: 1 to 1934 Range: 1 to 1934 100% = 1622281

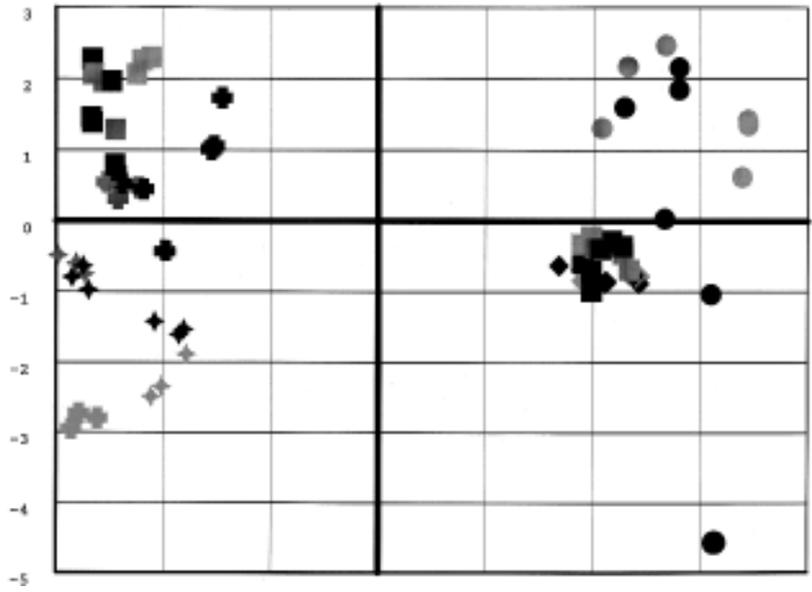


Background Subtract C:\SATURN\METHODS\PS1 Date: 06/18/94 14:55:03
 Comment: X PPM IN METANOLO PICCO A 32 MIN FUNGO FS G 011
 Average of: 1386 to 1398 Minus: 1359 to 1363 100% = 53514

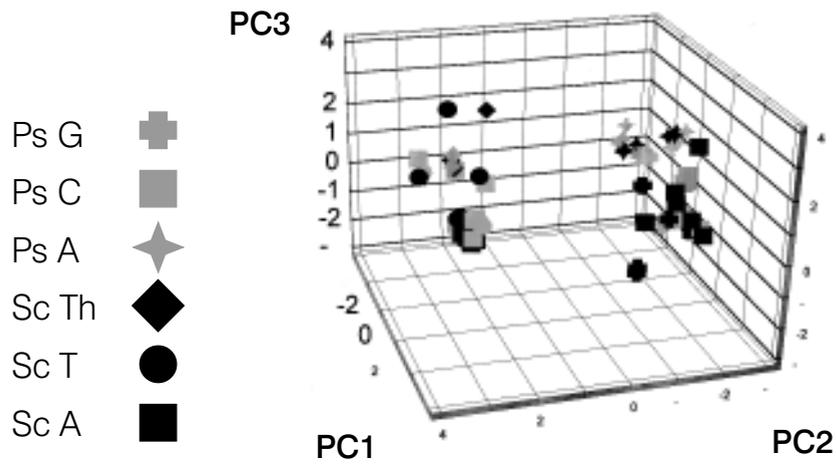


APPENDICE A.I.7
Grafici PC1-PC2 e PC1-PC2-PC3

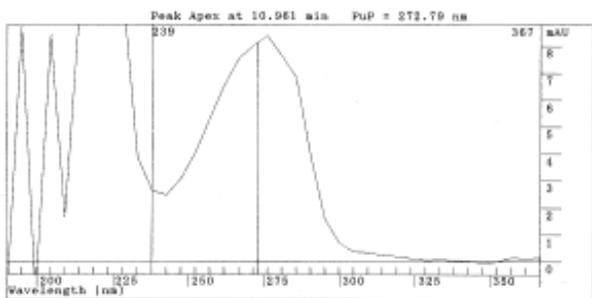
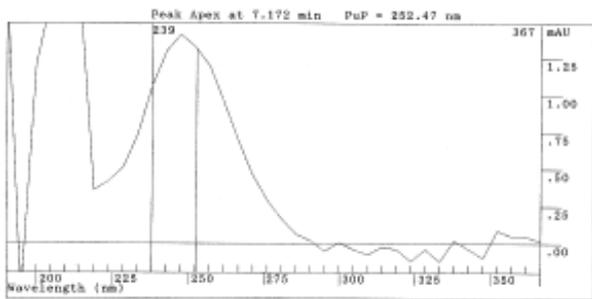
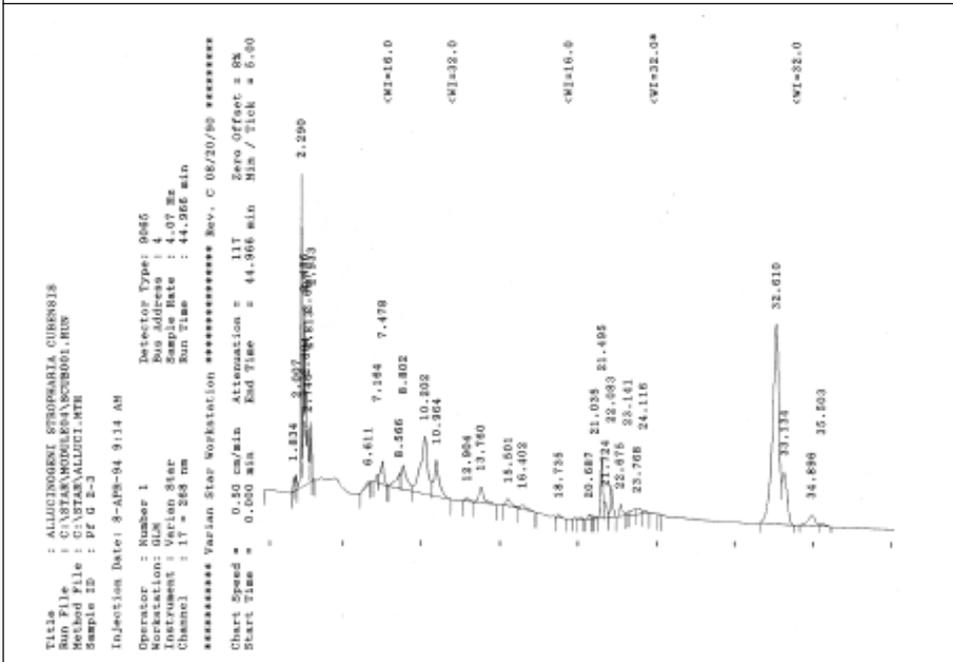
SCATTER PLOT PC1-PC2



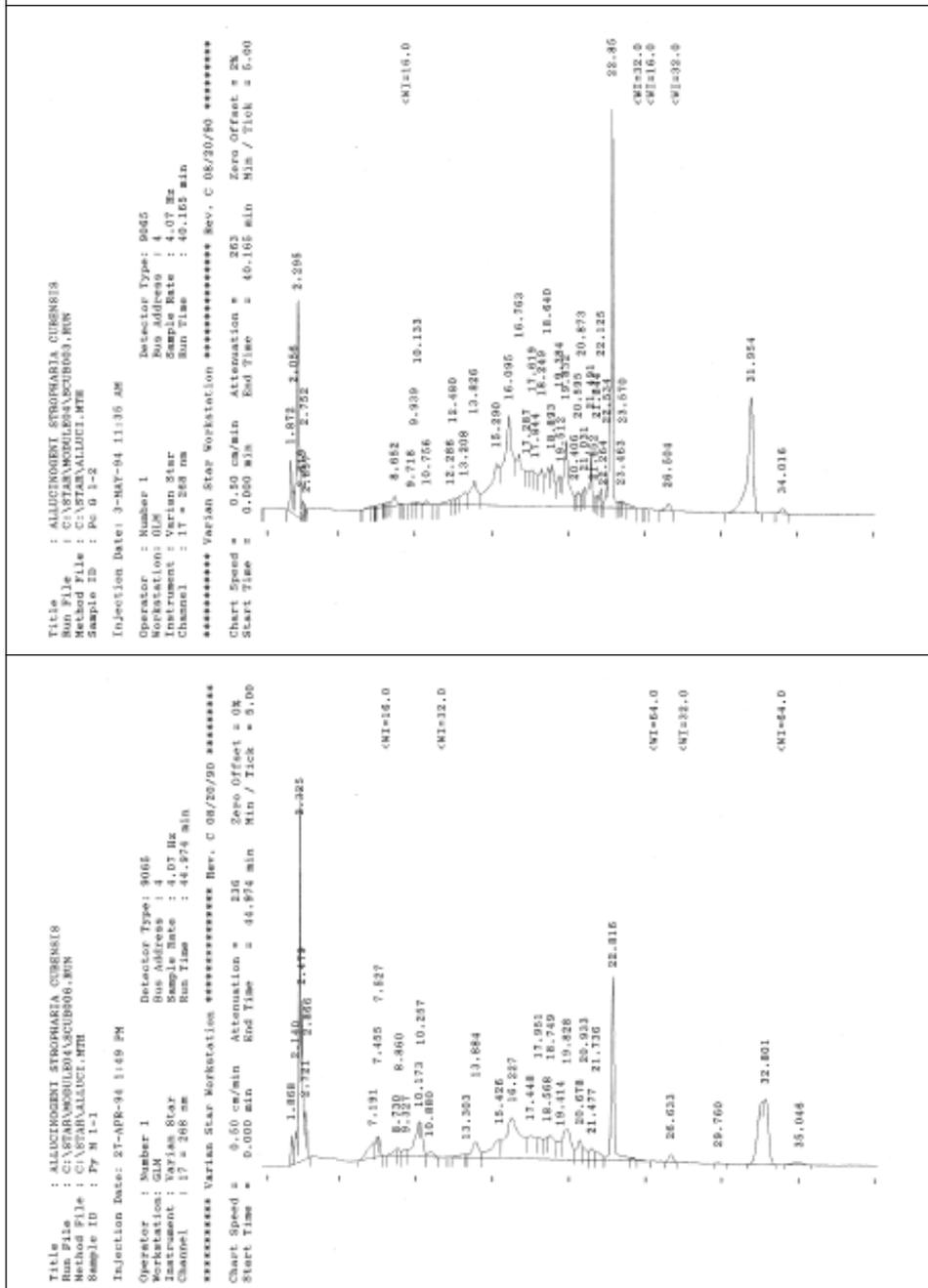
3D SCATTER PLOT PC1-PC2-PC3



APPENDICE A.II.1
 Cromatogramma del *Panaeolus feoniseii* ed alcuni spettri UV

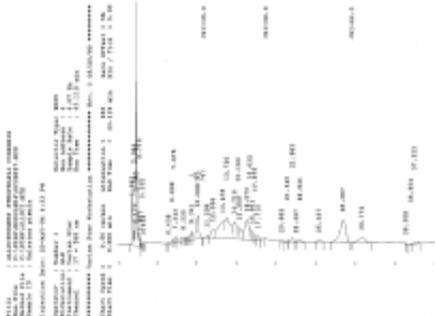
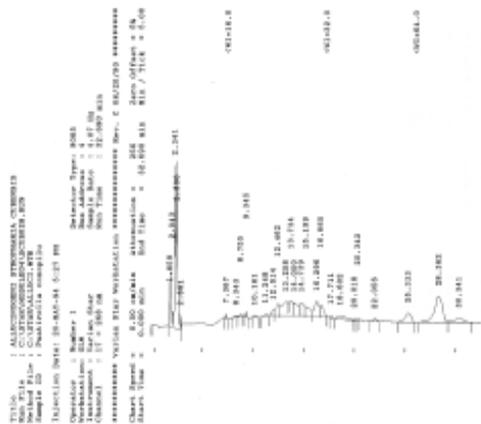
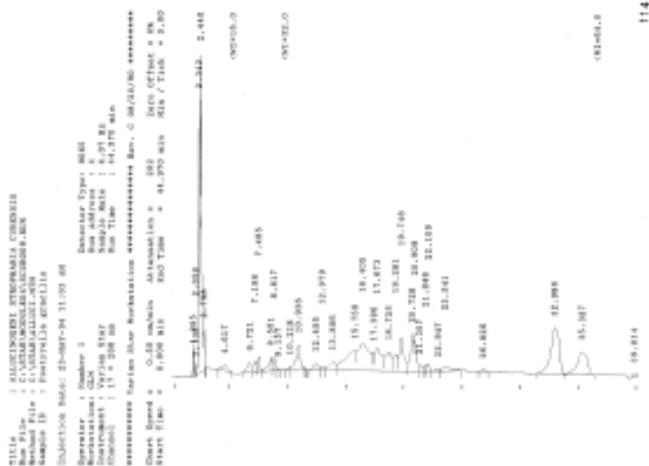


APPENDICE A.II.2
Cromatogramma del *Panaeolus campanulatus spinctrinus*



APPENDICE A.II.3

Cromatogramma della *Psatyrella gracilis*, *Psatyrella conopilus* e *Galerina pimula*



081614.0

114

BIBLIOGRAFIA

- BEUG M.W., BIGWOOD J., 1981 - Quantitative analysis of psilocybin and psilocin in *Psilocybe baeocystis* (Sinsger and Smith) by high performance liquid chromatography and by thin layer chromatography. *Journal of Chromatography*. 3, pp. 379-385.
- BEUG M.W., BIGWOOD J., 1982 - Psilocybin and psilocin levels in twenty species from seven genera of wild mushrooms in the Pacific Northwest. *J. Ethnopharmacol.* Vol.5, pp. 271-285.
- BORNER S., BRENNISEN R., 1987 - Determination of Tryptamine derivatives in hallucinogenic mushrooms using high-performance liquid chromatography with photodiode array detector. *Journal of Chromatography*. 408, pp. 402-408.
- CHRISTIANSEN A.L. RASMUSSEN K.E. TONNESEN F., 1981 - Determination of psilocybin in *Psilocybe semilanceata* using high-performance liquid chromatography on a silica column. *Journal of Chromatography*. 210, pp. 163-166.
- CHRISTIANSEN A.L. RASMUSSEN K.E., HOILAND K. 1981 - The content of Psilocybin in Norwegian *Psilocybe semilanceata*. *Planta Medica*. Vol. 42, pp. 229-235.
- CHRISTIANSEN A.L. RASMUSSEN K.E., 1982 - Analysis of indole alkaloids in norwegian *Psilocybe semilanceata* using high performance liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography*. 244, pp. 357-364.
- CHRISTIANSEN A.L. RASMUSSEN K.E., 1983 - Screening of hallucinogenic mushrooms with high performance liquid chromatography and multiple detection. *Journal of Chromatography*. 270, pp. 293-299.
- CHRISTIANSEN A.L. RASMUSSEN K.E., HOILAND K., 1984 - The detection of Psilocybin and Psilocin in Norwegian species of *Pluteus* and *Conocybe*. *Planta Medica*. Vol. 53, pp. 341-343.
- FESTI F., 1985 - Funghi allucinogeni. *Manfrini Editori*.
- GARTZ J., 1985 - Zur Untersuchung von *Psilocybe semilanceata* (Fr.) Kummer. *Pharmazie*, Vol 40, pp. 506.
- GARTZ J., 1989 - Analysis and cultivation of fruit bodies and mycelia of *Psilocybe bohemica*. *Biochem. Physiol. Pflanzen*. Vol 184, pp. 337-341.
- GARTZ J., 1992 - Further investigations on psychoactive mushrooms of the genera *Psilocybe*, *Gymnopilus* and *Conocybe*. *Annali dei Musei civici- Rovereto*. Vol. 7, pp. 265-274.
- Gartz J., 1994 - Extraction and analysis of indole derivates from fungal biomass. *J. Basic Microbiol.* Vol 34, pp. 17-22.
- HOFMANN A. HEIM, R. BRACK, A. KOBEL H., 1958 - Psilocybin, ein psychotroper Wirkstoff aus dem mexikanischen Rauschpilz. *Exper*. 14, pp. 107-109.
- HOFMANN A., TROXLER F., SEEMANN F., 1959 - Abwandlungsprodukte von *Psilocybin* und *Psilocin*. *Helv.* 42.
- HOFMANN A., SCHULTES R.E., 1983 - Botanica e chimica degli allucinogeni. *Cesco Capanna Editore*.

- KYSILA R., WURST, M., *et al.*, 1985 - High-performance liquid chromatographic determination of hallucinogenic indolamines with simultaneous UV photometric and voltammetric detection. *Journal of Chromatography*. 320, pp. 414-420.
- KYSILA R., WURST M., 1989 - High-performance liquid chromatographic determination of some psychotropic indole derivatives. *Journal of Chromatography*. 464, pp. 434-437.
- Kysila R., Wurst M., 1990 - A novel extraction procedure for psilocybin and psilocin determination in mushrooms samples. *Planta Medica*. Vol 56, pp. 327-328.
- LEUNG A.Y., PAUL A.G., 1968 - Baeocystin and norbaeocystin: new analogs of psilocybin from *Psilocybe baeocistis*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol. 57, pp. 1667-1671.
- REPKE D.B., DALE T.L., 1977 - Baeocystin in *Psilocybe semilanceata*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol. 66, pp. 113-114.
- REPKE D.B., LESLIE D.T., GUZMAN G., 1977 - Baeocystin in *Psilocybe*, *Conocybe* and *Panaeolus*. *Lloydia*. Vol. 40, pp. 566-578.
- REPKE D.B., LESLIE D.T., *et al.* 1977 - GLC-Mass spectral analysis of psilocin and psilocybin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol. 66, pp. 743-744.
- SAMORINI G., 1989 - Sullo stato attuale della conoscenza dei Basidiomiceti psicotropi italiani. *Annali dei Musei civici - Rovereto*. Vol. 5, pp. 167-184.
- SNYDER S.H., 1984 - Farmaci, droghe e cervello. *Zanichelli Editore*. 1986.
- VANHAELLEN-FASTRÉ, R., 1984 - VANHAELLEN, M. Qualitative and quantitative determinations of hallucinogenic components of psilocybe mushrooms by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*. 312, pp. 467-472.
- STIJVE T., 1981 - High performance thin-layer chromatographic determination of the toxic principles of some poisonous mushrooms. *Mitt. Gebiete Lebensm, Hyg.* Vol 72, pp. 44-54.
- STIJVE T. 1984 - *Psilocybe semilanceata* als hallucinogene paddestoel. *Coolia*. Vol 27, pp. 36-43.
- STIJVE T., HISCHENHUBER C., ASHLEY D., 1984 - Occurrence of 5-hydroxylated indole derivatives in *Panaeolina foenicicii* (Fries) Kuhner from various origin. *Z. Mycol.* Vol 50, pp. 361-366.
- STIJVE T., KUYPER W., 1985 - Occurrence of Psilocybin in various higher fungi from several European countries. *Planta Medica*. Vol. 5, pp. 385-387.
- STIJVE T., 1992 - Psilocin, psilocybin, serotonin and urea in *Panaeolus cyanescens* from various origin. *Persoonia*. Vol. 15, pp. 117-121.
- WIER, J.K. TYLER V.E., 1963 - Quantitative determination of serotonin in *Panaeolus* species. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol. 52, pp. 419-422.
- WURST M., SEMERDZIEVA M., VOKOUN J., 1984 - Analysis of psychotropic compounds in fungi of the genus *Psilocybe* by high-performance liquid chromatographic. *Journal of Chromatography*. 268, pp. 229-235.

Indirizzo dell'autore:
Fabio Calligaris., Via Finalmarina, 32 - I-10126 Torino
