

Keuringsdienst van Waren Zuid
Afdeling Signalering Samengestelde Producten
Sector: Signalering Lab

PSILOCYBINE EN PSILOCINE IN PADDO'S

L.F.J. van de Laak, J.C.A. van der Wielen en P. H. in 't Veld
Keuringdienst van Waren
Postbus 2280
5202 CG 's-Hertogenbosch
Tel: 040-29 11 500
Fax: 040-29 11 600
E-mail: Leo.van.de.laak@kvw.nl

Datum: juli 2002
Identificatienummer van het project of rapport SAZD/01/30/21
Copyright 2002¹

¹**Copyright 2002** Keuringsdienst van Waren Zuid /Afdeling Signalering. Overname van de inhoud is toegestaan mits schriftelijke toestemming van de auteur(s) en met bronvermelding

INHOUD

INHOUDSOPGAVE	2
SAMENVATTING	3
1 INLEIDING	4
1.1 Algemeen	4
1.2 Paddo's	4
1.3 Onderzoekstechnieken	5
2 MATERIALEN EN METHODEN	5
2.1 Methodeontwikkeling	5
2.1.1 Chemicaliën	5
2.1.2 Monstervoorbewerking (bereiding analysemonster)	6
2.1.3 Standaard en monsteroplossingen	6
2.1.4 LC	6
2.1.5 Robuustheidonderzoek	7
2.1.6 Validatieonderzoek	7
2.2 Monitoring Paddo's	7
3 RESULTATEN	8
3.1 Methodeontwikkeling	8
3.2 Monitoringsproject	8
4 DISCUSSIE	9
4.1 Methodeontwikkeling	9
4.2 Monitoringsproject	9
5 CONCLUSIE	10
6 DANKBETUIGING	11
7 LITERATUUR	11
8 BIJLAGEN	12
8.1 Chromatogrammen 1 en 2	12
8.2 Tabellen 1 en 2	13
8.3 Grafieken 1, 2 en 3	15

SAMENVATTING

Ten behoeve van het project "Handhaving en monitoring in de smartshopbranche" werd een onderzoeksmethode voor de bepaling van de hallucinogene stoffen psilocybine en psilocine in paddo's ontwikkeld. Vanwege de eenvoudige monstervoorbereiding en goede scheidingen werd een LC-methode van Musshoff [7] als uitgangspunt genomen voor het onderzoek. Door conditioneringsproblemen van het LC-systeem werd uiteindelijk gekozen om psilocybine en psilocine middels afzonderlijke isocratische analyses te bepalen. De beide analyses werden onderworpen aan een robuustheidsonderzoek waarbij de onderzochte factoren (triltijd en temperatuur in het ultrasoonbad en het percentage acetonitril in het eluens) binnen de gestelde marges niet kritisch bleken te zijn. Uit het validatieonderzoek bleek, dat de analyses met recovery's en bepaalbaarheidsgrenzen van respectievelijk 93.4 % en 0.009% voor psilocybine en van 95.8 % en 0.005% voor psilocine goede resultaten opleverden.

Gebruikmakende van deze gevalideerde analyses werden de bij de smartshops genomen monitoringsmonsters (hoofdzakelijk verse en gedroogde paddo's) en de bij een paddokweker bemonsterde verse paddo's onderzocht.

In sommige verse *Panaeolus cyanescens* monsters werd een veel hoger totaal psilocine gehalte aangetroffen, dan in de smartshops bemonsterde gedroogde variant (2.5 % tegen 1.5 %). De vorm, waarin de psycho-actieve stof aanwezig is (psilocybine of psilocine) is, is bij dit paddo-type geheel willekeurig. Dit geldt zowel voor de verse alsook voor de gedroogde monsters.

De *Psilocybe cubensis* mexican, al dan niet gedroogd, had een totaal psilocine tussen 0.5 en 0.9 %, deze waarde lag voor de verse *Psilocybe cubensis* thai slechts marginaal lager 0.5 – 0.7 %. In de *Psilocybe tampanensis* (truffel) werd een totaal aan psilocine van ca. 0.3% gemeten. De gemeten percentages psilocybine en psilocine in de al dan niet gedroogde paddo's komen overeen met de waarden, die in de literatuur worden vermeld. Alleen de incidentele maar erg hoge psilocybine en psilocine gehalten (en dus ook het totale psilocinegehalte) in versgeplukte *Panaeolus cyanescens* zijn opvallend.

Uit het onderzoek is bovendien gebleken, dat de psycho-actieve stoffen in verse paddo's, behalve in de *Psilocybe tampanensis*, veel minder stabiel zijn, dan in de gedroogde vorm. Het hallucinerende effect neemt door afbraak van de beide psycho-actieve stoffen sterk af.

TREFWOORDEN:

psilocybine, psilocine, smartshop, paddo, indol-alkaloïden

1. INLEIDING

1.1 Algemeen

Paddo's (paddestoelen met hallucinerende werking) behoren tot de oudste bekende tripmiddelen. De handel (via smartshop's) en het gebruik van geestverruimende paddestoelen zijn sinds 1995 in Nederland sterk opgekomen. De laatste tijd lijkt echter het gebruik van paddo's al weer over zijn hoogtepunt heen te zijn [7.15].

De actieve (geestverruimende) stoffen in paddo's zijn psilocine en psilocybine. Beide stoffen staan op lijst 1 van de Opiumwet en worden derhalve als harddrugs beschouwd. Het kweken van psilocybine en psilocine bevattende paddestoelen met de bedoeling deze te bereiden, te bewerken en te verkopen (enzovoorts) is een strafbare handeling in de zin van artikel 10a van de Opiumwet en is dus strafbaar. De handel in verse paddo's en kweekbakjes voor het kweken van paddo's is echter niet verboden, deze activiteiten vallen onder de Warenwet.

In een onderzoek naar de risico's die deze paddo's vormen voor de volksgezondheid, kwam de door het ministerie van VWS ingestelde commissie Coördinatiepunt Assessment en Monitoring nieuwe drugs (CAM) tot de conclusie, dat deze als gering moeten worden ingeschat. Reacties bij acute toxiciteit blijven beperkt tot paniek- en angstaanvallen. Bij chronische toxiciteit kan hoogstens het optreden van flashbacks worden genoemd. Er is bovendien geen sprake van lichamelijke of geestelijke afhankelijkheid [7.15].

Bij de afdeling Signalering van de KvW Zuid is in het kader van het project "Handhaving en monitoring in de smartshopbranche" een analysemethode ontwikkeld, waarmee de gehalten psilocine en psilocybine in paddo's bepaald kunnen worden.

In 2001 werd een onderzoek naar paddo's in de smartshopbranche uitgevoerd. In twee perioden van 3 maanden (maart t/m mei en september t/m november) zijn er tweemaal 20 monsters paddo's voor een monitoring bemonsterd. In deze monsters werden met de nieuw ontwikkelde methode de gehalten psilocybine en psilocine bepaald. Het doel van deze monitoring was om een duidelijk beeld van de actuele situatie in de smartshopwereld te verkrijgen (b.v. vers/gedroogde paddo's, voorkomende gehalten aan psilocine en psilocybine in paddo's, soorten paddo's etc.). De resultaten van deze marktverkenning kunnen in de toekomst als basis dienen om eventuele hogere gehalten aan psilocine en psilocybine in paddo's, verkregen door het toepassen van veranderde kweekmethodes, te onderkennen.

1.2. Paddo's

De laatste jaren zijn de paddo's als 'natuurlijke' eco-drug, mede door de opkomst van de housecultuur erg populair geworden. In Nederland worden de volgende paddo's het meest gebruikt:

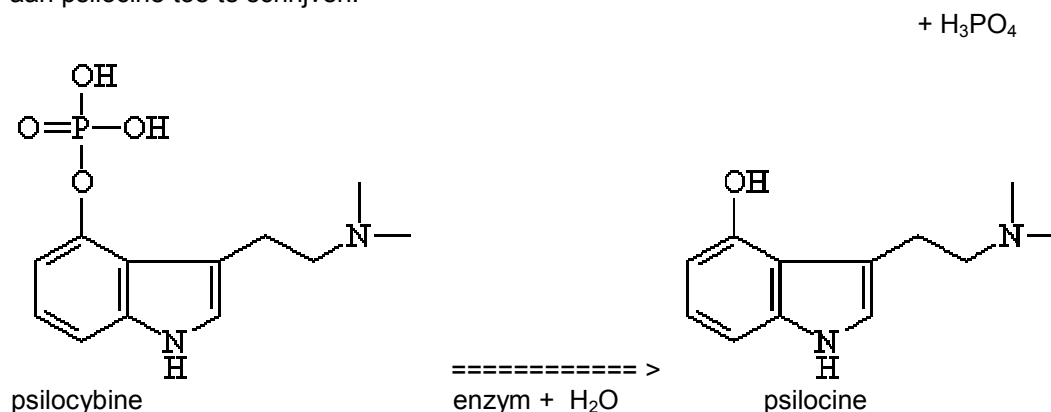
- a) *Psilocybe cubensis* of *Stropharia cubensis* ('Mexicaanse' of 'Thaise' paddo's).
- b) *Psilocybe semilanceata* (inheemse puntig kaalkopje).
- c) *Panaeolus cyanescens* of *Copelandia cyanescens* ('Hawaïaanse' of 'Balinese' paddo's).
- d) *Psilocybe tampanensis* (truffels), knolachtige massa van gehard mycelium met een droge stof gehalte van ongeveer 30 procent.

Het gehalte aan werkzame stof in verschillende paddosoorten, varieert van bijna nihil tot 15 mg/g drooggewicht. In de verse paddo's is dit gehalte een factor 10 lager, aangezien een verse paddestoel (m.u.v. de truffels) voor ca. 90% uit water bestaat.

De paddo's kunnen zowel vers of gedroogd, vaak in combinatie met andere levensmiddelen, worden geconsumeerd. Als gangbare dosis voor een paddo trip geldt een hoeveelheid van 8 tot 10 mg psilocybine/psilocine.

Gemiddeld bevat een paddestoel ongeveer 90 % water, 3 % eiwitten en daarnaast nog kleine hoeveelheden stikstofhoudende verbindingen, koolhydraten, vetten, zouten, mineralen en vitamines. Vooral de eiwitten en stikstofverbindingen spelen een grote rol bij paddestoelvergiftingen. Veel van de in paddestoelen voorkomende toxines bevatten

aminozuren (bouwstenen van de eiwitten) of zijn uit deze aminozuren gevormd. Dit geldt ook voor de indol-alkaloïden psilocybine en psilocine, welke uit het aminozuur tryptofaan zijn gevormd. Psilocybine en psilocine zijn organische verbindingen, waarbij het heterocyclische ingebouwde stikstofatoom verantwoordelijk is voor de basische eigenschappen. Deze verbindingen komen voornamelijk voor in planten en vertonen specifieke werkingen op het zenuwstelsel. De structuurformules van psilocybine en psilocine lijken erg op elkaar. Psilocybine (4-fosforyloxy-N,N-dimethyltryptamine) kan worden beschouwd als de fosforester van psilocine (4-hydroxy-N,N-dimethyltryptamine). Bij opname in het lichaam wordt psilocybine door het enzym alkalische fosfatase snel en volledig omgezet in psilocine. Hierdoor valt de psycho-actieve werking volledig aan psilocine toe te schrijven.



De werkende hoeveelheid 'toxine' in een paddo kan daarom het beste worden weergegeven in een totaal psilocine gehalte. Een betere vergelijking tussen de diverse paddosoorten voor de hallucinogene werking is dan ook mogelijk.

1.3. Onderzoekstechnieken

Diverse technieken zijn toegepast om psilocybine en psilocine in paddo's te bepalen. Naast de papierchromatografie [7.1] en dunne laag chromatografie [7.2 en 7.3] werden later instrumentele technieken ontwikkeld om de indol-alkaloïden kwantitatief te analyseren zoals: de klassieke kolomchromatografie in combinatie met UV- spectrometrie en colorimetrie, gaschromatografie (GC) en massa-spectrometrie (GC-MS). Deze instrumentele technieken zijn echter nogal tijdrovend. Bij de GC en GC-MS technieken [7.4] moeten beide verbindingen bovendien gederivatiseerd moeten, waarbij afbraak van de te bepalen componenten niet uitgesloten kan worden.

Momenteel wordt de LC-methode (reversed phase), gecombineerd met UV-, fluorescentie- of electrochemische detectie [7.2, 7.5, 7.6 en 7.9] steeds frequenter toegepast voor de kwantitatieve bepaling van psilocybine en psilocine in paddo's. Het voordeel van de LC-techniek is de zeer eenvoudige extractie van beide stoffen uit het gemalen gedroogde monstermateriaal met methanol [7.5 en 7.7]. Een bijkomend voordeel is, dat de extracten niet gederivatiseerd hoeven te worden en direct geschikt zijn voor onderzoek (analyse).

Vanwege de eenvoudige monstervoorbereiding, de goede scheidingen en resultaten werd een LC-methode (reversed phase, UV detectie bij 266 nm) [7.7] als basis genomen voor het onderzoek.

2 MATERIALEN EN METHODEN

2.1 Methodeontwikkeling

2.1.1 Chemicaliën

- Standaard psilocybine A: Sandoz Zwitserland, ontvangen van Dr. W.G. van der Sluis van de Faculteit der Farmacie, Sectie Farmacognosie van de Universiteit Utrecht (zuiverheid 99 %).
- Standaard psilocine: Bereid uit de standaard psilocybine volgens een door Dr. W.G. van der Sluis aangereikte procedure, waarbij psilocybine snel en volledig m.b.v. het enzym alkalische phosphatase in psilocine kan worden omgezet..

- Standaard psilocybine B: Alltech/Applied Science USA. (ampullen met 100 µg/ml in methanol).
- Enzym phosphatase, alkaline: Sigma.
- Overige chemicaliën: pro analyse.

Psilocybine en psilocine vallen onder de opiumwet. Voor het bezit van deze stoffen, maar ook voor de handelingen, die uitgevoerd moeten worden om paddo's te kunnen verwerken en te analyseren, dient een opiumverlof voor deze stoffen (locatiegebonden) aanwezig te zijn. Voor bestellingen van standaarden psilocybine en psilocine in het buitenland is bovendien een importlicentie nodig (KVV Zuid is bezit van een opiumverlof voor beide stoffen).

2.1.2 Monstervoorbewerking (bereiding analysemonster)

De bemonsterde gedroogde paddo's werden m.b.v. een analysemolen gemalen en in luchtdichte monsterpotjes bewaard.

De bemonsterde verse paddo's werden direct na ontvangst in kleine stukjes gesneden en op een petrischaal gedurende minimaal 5 dagen aan de lucht gedroogd. Tegelijkertijd werd het vochtverlies (in %) in deze paddo's bepaald. In Tabel 2 (8.2) staat het droogrestpercentage (droogrest% = 100% - vocht%) van de diverse gedroogde paddomonsters (analysemonsters) weergegeven. Vervolgens werden de gedroogde paddo's met behulp van een analysemolen gemalen. Bij sommige monsters werden op deze manier geen homogene monsters verkregen; deze monsters werden dan in een kogelmolen gemalen. Het analysemonster werd in luchtdichte monsterpotjes bewaard.

In het hierboven bereide analysemonster werd het droge stof gehalte bepaald door ca. 100 mg van dit analysemonster 150 minuten te drogen in een droogstoof zonder ventilator bij 102 - 105 °C. Met dit gehalte kan het percentage psilocybine en psilocine op de droge stof berekend worden en kunnen de gehalten van beide stoffen in verse en gedroogde paddo's met elkaar vergeleken worden (8.2: Tabel 1 en 2).

De paddo's werden niet nader getypeerd; voor de soort aanduiding werd de vermelding op het etiket aangehouden.

2.1.3 Standaard en monsteroplossingen

Standaardoplossingen psilocybine:

Weeg kort voor aanvang van de analyse 1.0 -1,5 mg psilocybine op 0.01mg nauwkeurig af in een maatkolpje van 10 ml. Los op en vul tot 10 ml. Bereid uit deze oplossing de overige gewenste concentraties voor het samenstellen van de kalibratielijnen (uitverdunden).

Standaardoplossingen psilocine:

Bereid kort voor aanvang van de analyse uit de standaardoplossing psilocybine met behulp van het enzym phosphatase-alkaline de standaardoplossing psilocine. Bereid uit deze oplossing de overige gewenste concentraties voor het samenstellen van de kalibratielijnen (uitverdunden).

Monsteroplossingen:

Weeg 250 mg gedroogd analysemonster in een maatkolpje van 25 ml. Voeg 20 ml methanol toe en plaats het kolpje gedurende 120 minuten in een ultrasoonbad. Zorg ervoor, dat de temperatuur in het ultrasoonbad niet boven de 40 °C uitstijgt. Controleer de temperatuur in het bad en voeg ijs toe als de temperatuur hoger dan (>) 40 °C grens wordt. Vul aan met methanol tot 25 ml en meng. Centrifugeer (ca. 16000xg) een gedeelte van het extract en breng het heldere extract over in twee vials (zie 2.1.4).

2.1.4. LC

Het gebruik van reversed-phase chromatografie is zeer geschikt om biologische materialen te scheiden en te analyseren. De LC-scheiding werd uitgevoerd op een Merck Lichrospher 60 RP-select B (250 x 4 mm, 5 µm) kolom met een Merck LiChroCART 4-4, LiChrospher 60 RP-select B (5 µm) voorkolom. De componenten werden gedetecteerd bij 266 nm met een UV-detector.

In eerste instantie lag het in de bedoeling om beide componenten door middel van gradiënt elutie in één analyse run te bepalen. De hiervoor gebruikte LC-omstandigheden waren: Solvent A: 20 mM KH_2PO_4 en solvent B: acetonitril; constante flow-rate van 1 ml/min.; gradiënt: 5% B gedurende 8 minuten, daarna oplopend tot 20% B bij 20 minuten en vervolgens gedurende 10 minuten 20 % B (injectievolume 5 µl en temperatuur kolomoven 30 °C).

Beide stoffen konden goed van elkaar gescheiden worden. Het conditioneren en stabiliseren van de kolom na deze gradiënt run duurde echter zeer lang. Dit had tot gevolg, dat de retentietijden van psilocybine en psilocine pas na 5 tot 10 injecties min of meer constant werden.

Op grond van deze ervaringen is besloten om beide stoffen door middel van afzonderlijke isocratische analyses te bepalen.

Het psilocybine werd m.b.v. het eluens 4 % acetonitril in 20 mM kaliumwaterstoffsosfaat-oplossing (v/v) en het psilocine m.b.v. het eluens 12 % acetonitril in 20 mM kaliumwaterstoffsosfaatoplossing (v/v) bepaald. De overige parameters, zoals golflengte, injectievolume en kolomtemperatuur bleven hetzelfde als bij de gradiëntelutie. De analyseresultaten in dit rapport zijn m.b.v. deze aangepaste analysemethoden verkregen.

2.1.5 Robuustheidonderzoek

Beide analyses werden aan een robuustheidonderzoek onderworpen. Als mogelijke kritische factoren werden aangemerkt:

- De triltijd van de monsterextracten in het ultrasoonbad (120 minuten).
Voor zowel de psilocybine als de psilocine analyse werd voor het '+'-niveau een triltijd van 135 minuten en voor het '-'-niveau 115 minuten gekozen.
- De temperatuur in het ultrasoonbad (maximaal 40 °C).
Voor het '+'-niveau werd maximaal 45 °C en voor het '-'-niveau maximaal 35 °C gekozen. Bij het experiment werd gecontroleerd, of deze temperaturen tijdens het extraheren in het ultrasoonbad werden bereikt, maar bovendien werd er voor gezorgd, dat aangegeven grenswaarden niet overschreden werden. Deze kritische factor werd voor beide analyses onderzocht.
- Het gehalte acetonitril in de loopvloeistof (psilocybine analyse: 4 % acetonitril in 20 mM bufferoplossing (v/v); psilocine analyse: 12 % acetonitril in een 20 mM bufferoplossing (v/v) .
Voor het '+'-niveau werd voor beide analyses het gehalte acetonitril in de buffer 1% hoger en voor '-'-niveau 1 % lager dan de aangegeven gehalte gekozen.

2.1.6 Validatieonderzoek

De methoden voor psilocybine en psilocine werden onderworpen aan validatestudie zoals beschreven in SOP KAM05-WV102, versie 2 van de KvW "Valideren van (fysisch-) chemische en (fysisch-) mechanische methoden".

De specificiteit en selectiviteit van de methode werden nader belicht. Ook werden de aantoonbaarheidsgrenzen (3*Ruis), de bepaalbaarheidsgrenzen (6*Ruis), de correlatie coëfficiënten, de recovery's en de standaarddeviaties van de beide analyses bepaald. Omdat de standaarden moeilijk verkrijgbaar waren, werd een alternatieve manier toegepast om de recovery en de standaarddeviatie van beide analyses te bepalen:

De extracten van monsteronderzoek van paddo's met hoge gehalten aan psilocybine werden verzameld, evenals paddo-extracten met hoge gehalten aan psilocine. In deze oplossingen werd het psilocybine respectievelijk psilocine gehalte kwantitatief in duplo bepaald. Aan blanco monsters werden 3 verschillende hoeveelheden van deze oplossingen in duplo toegevoegd en geanalyseerd. Uit de toegevoegde hoeveelheden psilocybine/psilocine (bekende concentratie) en de geanalyseerde gehalten psilocybine/psilocine konden de recovery's op de 3 niveaus berekend worden (eventueel na correcties voor de blanco).

2.2 Monitoring Paddo's

In 2001 werd het project "Handhaving en monitoring in de smartshopbranche" uitgevoerd. Een onderdeel van dit project was een surveillance in de smartshopbranche en in het kader van deze activiteit was de bemonstering en analyse van 40 psilocybine en/of psilocine bevattende

monsters (paddo's) gepland. De producten werden in twee perioden van drie maanden (1^e periode: maart-april-mei en de 2^e periode september-oktober-november) door speciaal geïnstrueerde controleurs bemonsterd (planning 20 monsters per periode). De gehalten psilocybine en psilocine in deze monsters werden met de ontwikkelde methode bepaald. Bij een inspectie van een controleur bij een paddokwekerij bleek, dat de paddo's evenals champignons in vluchten (groeistadia) geplukt worden. Op deze paddokwekerij werden 4 soorten (typen) paddo's gekweekt, nl de *Psilocybe cubensis mexican*, de *Psilocybe cubensis thai*, de *Panaeolus cyanescens* en de *Psilocybe tampanensis*. De eerste drie soorten werden in 3 vluchten geplukt, terwijl de *Psilocybe tampanensis* in een keer werd geoogst. Door de bereidwillige medewerking van de kweker konden onmiddellijk na elke pluk monsters genomen worden van deze paddotypen. Door deze monsters onmiddellijk na binnenkomst op het laboratorium in te zetten, kon een zo betrouwbaar mogelijk beeld van de gehalten psilocybine en psilocine in deze verse paddo's in de verschillende groeistadia worden verkregen.

3 RESULTATEN

3.1 Methodeontwikkeling

- LC scheidingen

Psilocybine en psilocine werden middels aparte LC-analyses bepaald. Bij beide bepalingen werden goede scheidingen met de overige componenten in de matrix waargenomen (zie chromatogrammen 1 en 2, zie Bijlage 8.1). De retentietijden van psilocybine/psilocine waren onder deze omstandigheden goed constant.

- Robuustheidonderzoek

De onderzochte factoren (triltijd, temperatuur en % acetonitril in het eluens) bleken zowel voor de bepaling van psilocybine alsook voor de bepaling van psilocine (beide met 2 verschillende monsterextracten uitgevoerd) binnen de gestelde marges niet kritisch te zijn.

- Selectiviteit en specificiteit

De analysemethoden voor psilocybine en psilocine worden uitsluitend uitgevoerd in paddo's en direct aanverwante producten (b.v. paddenstoelenthee). Van matrixproblemen (b.v. veroorzaakt door vetten en koolhydraten) is derhalve geen sprake.

Ook interferentie-effecten, die mogelijk zouden kunnen ontstaan met verwante componenten in het extract, kunnen uitgesloten worden. De enige indol-alkaloïden in oplossing zijn de beide te onderzoeken stoffen en gezien het verschil in polariteit van de beide verbindingen, zijn er geen interferentie-effecten te verwachten.

- Aantoonbaarheids- en de bepaalbaarheidsgrenzen

De aantoonbaarheidsgrens (3*Ruis) en de bepaalbaarheidsgrens (6*Ruis) zijn voor de bepaling psilocybine in paddo's respectievelijk 0.005% en 0.009% (w/w).

Voor de psilocinebepaling in paddo's zijn deze parameters 0.002% en 0.003% (w/w).

- Correlatiecoëfficiënten

De psilocybine en de psilocine analyses werden tijdens het monitoring- en robuustheid- en validatieonderzoek respectievelijk 7 en 5 maal uitgevoerd. De berekende kalibratielijnen waren lineair. De correlatiecoëfficiënten van psilocybine-kalibratielijnen lagen tussen 0.9997 en 1.0000. Bij de kalibratielijnen van de psilocine bepaling werden waarden tussen de 0.9994 en 0.9999 gevonden. Het meetbereik bij zowel de psilocybine, alsook bij psilocine analyses lag tussen de 0.001 – 0.1 mg psycho-actieve per ml (5 meetpunten).

- Recovery's en relatieve standaardafwijkingen

De recovery van de psilocybine bepaling voor het werkgebied (j_w) bedraagt 93.4 % met een relatieve standaardafwijking (RSD_w) van 0.7%. Bij de psilocine bepaling is de recovery voor het werkgebied (j_w) 95.8 % en de relatieve standaardafwijking (RSD_w) 1.5%.

3.2 Monitoringsproject

In totaal werden er ten behoeve van het monitoringsproject in 11 verschillende smartshops 19

gedroogde paddomonsters (al dan niet gemalen) en 3 paddo bevattende producten bemonsterd. Het veruit grootste deel hiervan (19 gedroogde paddo's en 1 paddo bevattende product) werd in de 1^e periode bemonsterd.

Naast de bemonstering van gedroogde paddo's, werden er ook verse paddo's bemonsterd. In de 2^e bemonsteringsperiode werden er in totaal 7 monsters verse paddo's genomen bij 4 verschillende smartshops. Opvallend was, dat alle in de smartshops bemonsterde verse paddo's ook van deze paddokweker afkomstig waren.

Bij deze paddokweker werden bovendien nog eens 22 monsters verse paddo's genomen.

Alle resultaten van de gedroogde paddo's staan vermeld in Tabel 1; de resultaten van de verse paddo's in Tabel 2 (8.2).

De monsters 37085286 en 37099821 komen in de tabel tweemaal voor. De reden hiervan is, dat beide bemonsteringen uit 2 bakjes bestonden, waarvan de paddestoelen qua grootte, kleur en consistentie zoveel van elkaar verschilden, dat aparte opwerking als deelmonsters gewenst was. In de tabellen en grafieken (8.2 en 8.3) staan codes vermeld, welke bij het onderzoek op het laboratorium zijn toegepast. Deze codes corresponderen met ISI-nummers.

4. DISCUSSIE

4.1 Methodeontwikkeling

De extractie van de hallucinogene stoffen uit het fijngemalen analysemonster met methanol in een ultrasoonbad is eenvoudig en reproduceerbaar uit te voeren. Met behulp van beide isocratische analyses konden psilocybine en psilocine goed gescheiden worden van de overige componenten in de paddomatrix. Met gevonden recovery's (bepaald m.b.v. de alternatieve validatieprocedure § 2.1.6) van 93.4 % voor psilocybine en 95.8 % voor psilocine kan geconcludeerd worden, dat beide stoffen goed uit de paddomatrix geëxtraheerd kunnen worden. De bepaalbaarheidsgrens van psilocybine is 0.009% w/w en van psilocine 0.005% w/w.

Musshoff [7.7] vond met een gelijkende methode een bepaalbaarheidsgrens 0.003% voor de psilocybine en 0.01% voor de psilocine. Beide componenten werden bij zijn onderzoek echter in één analysegang, door het toepassen van gradiënt elutie bepaald.

4.2 Monitoringsproject

De 2^e bemonsteringsperiode was, in tegenstelling tot de 1^e periode, een gezamenlijke actie van de KvW met de politie; alle gedroogde monsters (overtreding opiumwet) werden door de gerechtelijke instanties in beslag genomen. Daardoor zijn er in de 2^e periode beduidend minder monsters (alleen verse paddo's en twee theemonsters) voor onderzoek binnengekomen.

Uit het overzicht van de gedroogde paddo's uit de 1^e bemonsteringsperiode blijkt, dat paddo's van het *Panaeolus cyanescens* type, de hoogste percentages hallucinogene stoffen bevatten. Voor het totaal aan psilocine in de droge stof (de beste maat om het hallucinerend effect van paddo's te meten) werden waarden tussen de 1.0 en 1.6 % gevonden. Opvallend was de wisselende bijdrage van psilocybine (0.2-0.9 %) en psilocine (0.4-1.3 %) aan het totale gehalte psilocine. Andere onderzoekers [7.2 en 7.7] vonden vergelijkbare resultaten voor psilocybine en psilocine in deze paddosoort.

De meeste gedroogde paddo's (7.9) waren van het zogenaamde *Psilocybe cubensis mexican* type; de gevonden gehalten varieerden voor psilocybine tussen 0.7 en 1.2 % en voor psilocine tussen 0 en 0.3 % (op de droge stof). Ook deze waarden lagen op hetzelfde niveau als de resultaten, die door Musshoff [7.7] voor dit type paddo werden gevonden. Het totaal aan psilocine (op droge stof) van dit paddotype ligt tussen de 0.5 en 0.9 %. Voor het monster *Psilocybe semilanceata* (kaalkopje) werden identieke waarden gevonden als bij de *Psilocybe cubensis mexican*.

In het monster *Psilocybe azurens* en één van *Psilocybe cubensis thai* werden waarden tussen de 0.5 en 0.9 % voor het totale psilocine (op droge stof) gemeten. Het psilocine aandeel bij deze monsters is echter aanzienlijk hoger dan bij de *Psilocybe cubensis mexican*.

De overige monsters, waaronder de paddenstoelentheemonsters, bevatten slechts geringe hoeveelheden hallucinogene stof (< 0.05%).

De gehalten psilocybine en psilocine in de verse *Panaeolus cyanescens* monsters van de paddokweker vertoonden een zeer afwisselend beeld. In sommige monsters werden zeer hoge percentages psilocybine (tot 3 % op de droge stof) in combinatie met relatief lage percentages aan psilocine (tot 0.5%) gemeten. In andere monsters werden daarentegen hoge percentages psilocine (tot 1.8 % op de droge stof) gevonden en waren de psilocybine percentages zeer laag (<0.1%). De vorm, waarin de hallucinerende stoffen aanwezig zijn, is dus willekeurig; de ene keer is de hallucinogene stof grotendeels in de vorm van psilocybine aanwezig, de andere keer bijna geheel in de vorm van psilocine. Een verklaring voor deze grote variaties kon niet worden gegeven. Ook het totaal aan psilocine (op droge stof) varieert sterk: van 0.8 % tot 2.5 %. Deze percentages aan hallucinogene stof, in welke vorm dan ook, liggen bij sommige versgeplukte *Panaeolus cyanescens* monsters echter beduidend hoger dan andere onderzoekers [7,2 en 7,8] in het verleden hebben gepubliceerd (en ook hoger dan in de onderzochte gedroogde variant van dit paddotype). Het toegepaste droogproces en het plukmoment zijn mogelijk de oorzaken voor de lagere percentages aan psycho-actieve stoffen in de gedroogde vorm. Bij vergelijking van de *Panaeolus cyanescens* monsters, die uit verschillende vluchten (groeistadia, waarna de paddo's geplukt worden) afkomstig waren, werden geen verbanden geconstateerd tussen de gehalten psilocybine/psilocine en de vlucht, waaruit de monsters afkomstig waren (Grafiek 3).

De psilocybine-, psilocine-, alsook het totale psilocinegehalte (0.5-0.9 %) in de verse *Psilocybe cubensis* mexican monsters lagen op hetzelfde niveau als in de gedroogde monsters uit de smartshops.

De *Psilocybe cubensis* thai lijkt niet alleen qua uiterlijk, maar ook wat de analyseresultaten betreft, erg op de *Psilocybe cubensis* mexican. De gevonden gehalten aan psycho-actieve stoffen in dit paddotype waren slechts marginaal lager (totaal aan psilocine: 0.5 -0.7 %).

De gehalten aan psycho-actieve stof in de verse *Psilocybe cubensis* thai, die genomen zijn in een smartshop (code 41 en 43), echter wel afkomstig van dezelfde paddokweker, waren bijzonder laag. Dit wijst erop, dat het psilocybine (dat afbreekt via psilocine) en het psilocine in deze verse paddo's veel minder stabiel zijn dan in gedroogde paddo's.

Dit strookt ook met ervaringen, opgedaan met demo-monsters. Twee verse demo-monsters (1 *Psilocybe cubensis* mexican en 1 *Psilocybe cubensis* thai), beide bij de paddokweker bemonsterd (voor een instructiebijeenkomst) werden pas na 4 weken gedroogd en geanalyseerd. In beide monsters konden slechts sporen hallucinogene stof aangetoond worden.

Er werden ook bij de *Psilocybe cubensis* mexican en thai geen verbanden waargenomen tussen enerzijds de percentages psilocybine, psilocine en totaal psilocine en anderzijds de vlucht, waarin de monsters genomen werden (8.3: Grafiek 3).

Het totaal aan psilocine (op de drogestof) in *Psilocybe tampanensis* monsters bedroeg ca. 0.3%. De hallucinogene stoffen (vooral psilocybine) zijn in deze paddosoort veel stabieler dan bij de overige onderzochte verse paddo's. De bij de smartshops bemonsterde *Psilocybe tampanensis* monsters bevatten namelijk, ondanks dat de droogrest door indroging (tijdens bewaring in de smartshop) was toegenomen tot 60-65%, nagenoeg evenveel psycho-actieve stof als de vers geoogste monsters. Ook een demo-monster, dat net als bovenstaande monsters ook pas na 4 weken werd gedroogd en geanalyseerd, had nog een totaal psilocine van bijna 0.3 %.

5. CONCLUSIE

De indol-alkaloïden psilocybine en psilocine kunnen door toepassing van methanol extractie in combinatie met de reversed phase LC-techniek snel en accuraat in paddo's bepaald worden.

De gehalten psycho-actieve stof van eenzelfde paddotype lagen in de gedroogde alsook in de verse vorm globaal op hetzelfde niveau en kwamen overeen met de in de literatuur vermelde waarden. Uitzondering hierop zijn de incidentele maar erg hoge psilocybine en psilocine gehalten in de versgeplukte *Panaeolus cyanescens*.

Er werden geen verbanden waargenomen tussen enerzijds het psilocybine-, psilocine- en totale psilocinegehalte en anderzijds de vlucht waaruit de paddo's afkomstig waren.

Uit het onderzoek is bovendien gebleken, dat de psycho-actieve stoffen psilocybine en psilocine in verse paddo's veel minder stabiel zijn, dan in de gedroogde vorm.

6. DANKBETUIGING

De auteurs van dit rapport willen Dr. W.G. van der Sluis van de Faculteit der Farmacie, Sectie Farmacognosie van de Universiteit Utrecht hartelijk bedanken voor zijn adviezen, het kosteloos beschikbaar stellen van het standaardmateriaal psilocybine en de procedure waarmee psilocine uit deze standaard bereid kan worden.

7. LITERATUUR

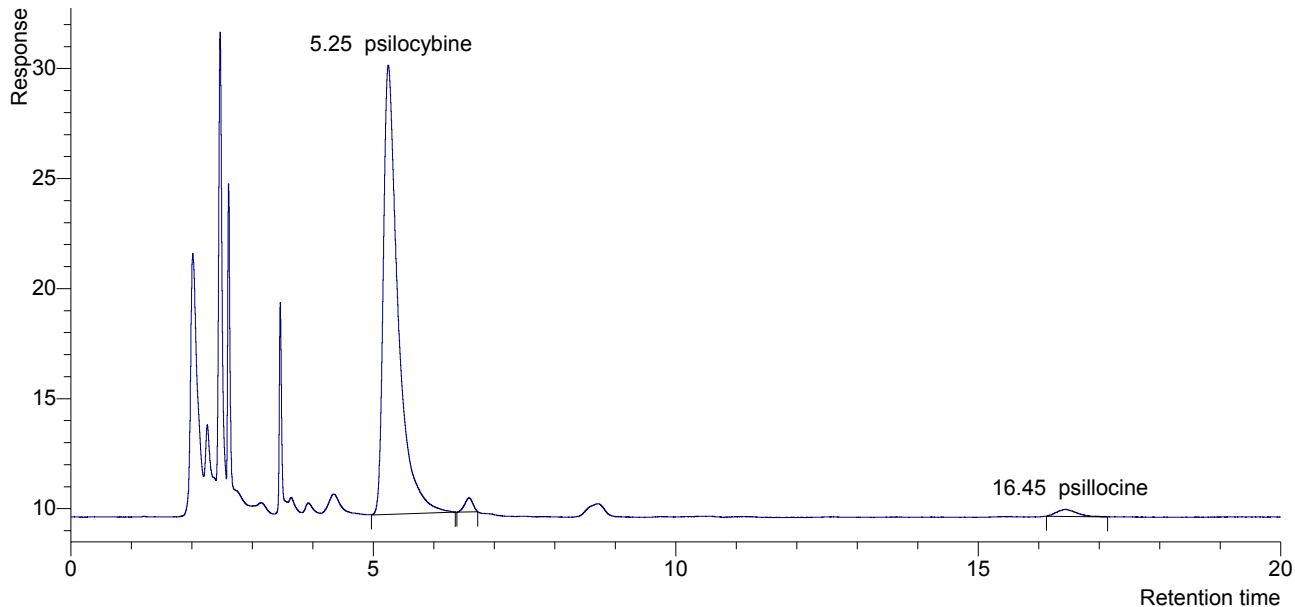
- 7.1 Block S.S. et. al. 1958 *A manual of paper chromatography and paper electrophoresis*, 2nd edition, Academic Press, New York.
- 7.2 Beug M.W., Bigwood J. 1982. *Psilocybin and psilocin levels in twenty species from seven genera of wild mushrooms in the pacific northwest, U.S.A.* J. Ethnopharm. 5: 271-285.
- 7.3 Stahl E. 1965 *Thin layer chromatography, a laboratory handbook*. Springer Verlag, New York.
- 7.4 Stich G., Käferstein H. 2000. *Detection of psilocin in body fluids*. Forensic Science Int. 113: 403-407.
- 7.5 Borner S., Brenneisen R. 1987. *Determination of tryptamine derivatives in hallucinogenic mushrooms using HPLC with photodiode array detection*. J. Chromatogr. 408: 402-408.
- 7.6 Perkal M., Blackman G. 1980. *Determination of hallucinogenic components of Psilocybe mushrooms using high-performance liquid chromatography*. J. Chromatogr. 196: 180-184.
- 7.7 Musshoff F., Madea B. en Beike J. 2000. *Hallucinogenic mushrooms on the German market – simple instruction for examination and identification*. Forensic Science Int. 113: 389-395.
- 7.8 Stijve T., Kuiper Th.W. 1985. *Occurrence of psilocybin in various higher fungi from several european countries*. Planta Medica 50: 385-387.
- 7.9 Vanhaelen-Fastre R., Vanhaelen M. 1984. *Qualitative and quantitative determinations of hallucinogenic components of Psilocybe mushrooms by reversed-phase high-performance liquid chromatography*. J. Chromatogr. 312: 467-472.
- 7.10 Beltman W., Riel van A., Wijnands-Kleukers A., Vriesman M., Hengel-Koot I., Vries de I., Meulenbelt J. 1999. *Smartshops, een overzicht van producten, geclaimde werking en hun medisch-toxicologische werking*. KvW, RIVM.
- 7.11 Christiansen A.L., Rasmussen K.E. 1983. *Screening af hallucinogenic mushrooms with HPLC and multiple detection*. J.Chromatogr. 271: 293-299.
- 7.12 Gartz J. 1989. *Biotransformation of tryptamine in fruiting mycelia of Psilocybe cubensid*. Planta Medica 55: 249-250.
- 7.13 Kysilka R., Wurst M. 1990. *A novel extraction procedure for psilocybin and psilocin; determination in mushroom samples*. Planta Medica 56: 327-328.
- 7.14 Lincoff D.H., Mitchel M.D. 1977. *Toxic and hallucinogenic mushroom poisoning – A handbook for physicians and mushroom hunters*. Van Nostrand Reinhold Company International, New York.
- 7.15 Persbericht Trimbos-instituut 4 september 2000 *Cannabisgebruik onder scholieren stabiliseert*. (<http://www.trimbos.nl/nlpers/archief/pers0016.html> 21-05-2002) .
- 7.16 Rapport werkgroep Smartshops 2 “*Smart Shops Anno 2000*”.
- 7.17 Soldaat A. 1997. *Gids voor de mind-traveler*. Chemisch Magazine. April: 128-129.
- 7.18 Van der Sluis W.G. 1997. *Collegedictaat: Farmacognosie, tweede deel*. Faculteit der Farmacie Sectie Farmacognosie, Universiteit Utrecht.

8. BIJLAGEN

8.1 Chromatogrammen

20 (12,1)

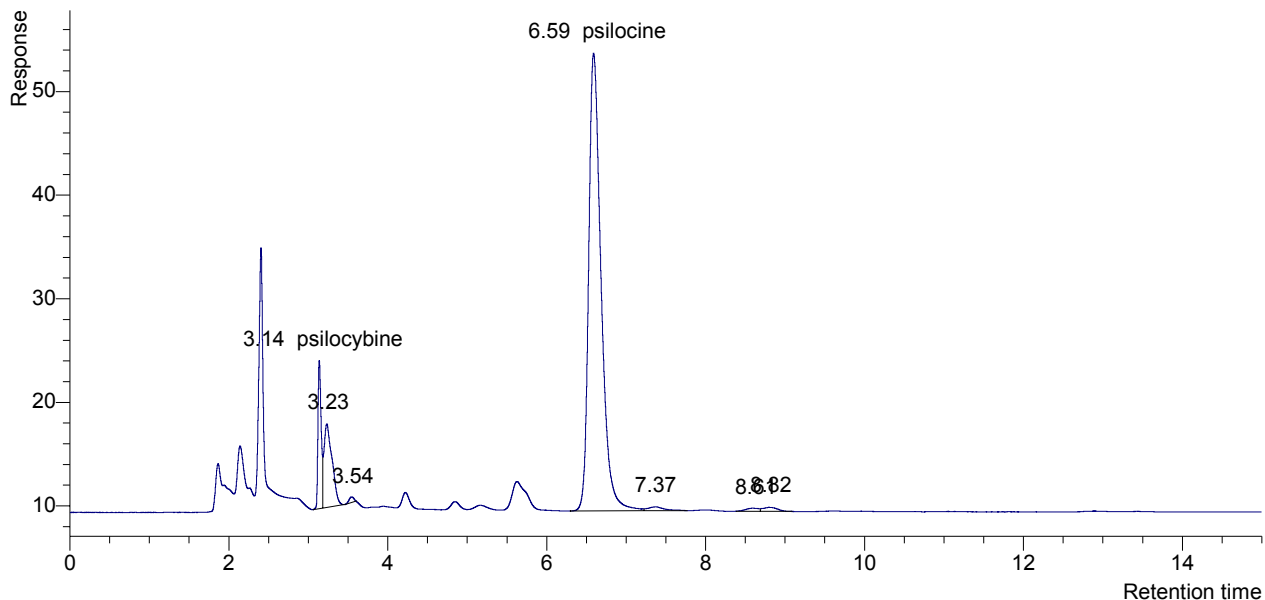
Signalering,Instrument10.paddo psilocybine1a,12,1



Chromatogram 1: extract van een paddo, type *Psilocybe cubensis mexican*; bepaling psilocybine met elues 4 % acetonitril in 20 mM bufferoplossing (v/v).

15 (22,1)

Signalering,Instrument10.paddo psilocine,22,1



Chromatogram 2: extract van een paddo, type *Panaeolus cyanescens*; bepaling psilocine met elues 12 % acetonitril in 20 mM bufferoplossing (v/v).

8.2 Tabellen

Tabel 1: Gedroogde paddo's monitoringsproject

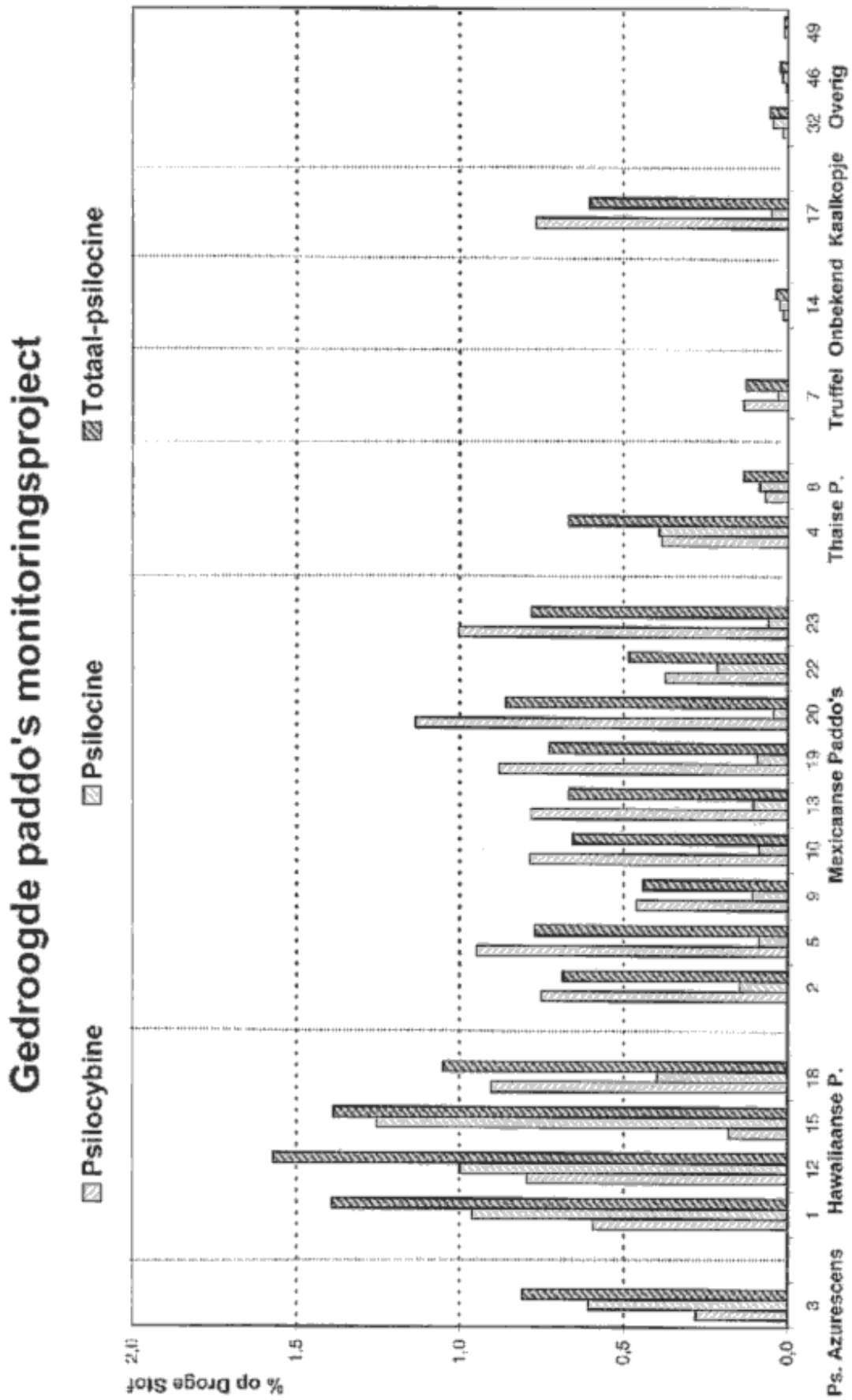
ISI-nummer	code	Aanduiding Etiket	Soort	Dr.Stof.% in Droogrest	in Gedroogde Paddo (w/w)			in Droge Stof (w/w)		
					% psilocyb.	% psilocine	Tot %psilocine	% psilocyb.	% psilocine	Tot %psilocine
35389431	3	Azuresens	Psilocybe azuresens	93,3	0,26	0,57	0,75	0,28	0,61	0,81
38254839	1	Hawaiaanse paddo's	Panaeolus cyanescens	93,5	0,56	0,90	1,30	0,59	0,96	1,39
38254782	12	Hawaiaanse paddo's	Panaeolus cyanescens	94,0	0,75	0,94	1,48	0,79	1,00	1,57
35389415	15	Hawaiaanse paddo's	Panaeolus cyanescens	92,0	0,17	1,16	1,27	0,18	1,26	1,39
35389423	18	Psilocybe cyanesens	Panaeolus cyanescens	90,1	0,81	0,36	0,95	0,90	0,40	1,05
38254804	2	Mexicaanse paddo's	Psilocybe cubensis Mex.	94,1	0,71	0,14	0,64	0,75	0,14	0,69
35440968	5	Mexicaanse paddo's	Psilocybe cubensis Mex	94,8	0,90	0,08	0,73	0,95	0,09	0,77
36280913	9	Mexicaanse paddo's	Psilocybe cubensis Mex	92,9	0,43	0,10	0,41	0,46	0,11	0,44
36280735	10	Mexicaanse paddo's	Psilocybe cubensis Mex	93,7	0,74	0,08	0,61	0,79	0,09	0,65
38254774	13	Mexicaanse paddo's	Psilocybe cubensis Mex	93,4	0,73	0,10	0,62	0,78	0,10	0,67
36280727	19	Mexicaanse paddo's	Psilocybe cubensis Mex	92,7	0,82	0,09	0,67	0,88	0,09	0,73
38254812	20	Mexicaanse paddo's	Psilocybe cubensis Mex	93,6	1,06	0,04	0,80	1,14	0,04	0,86
35389466	22	Mexicaanse paddo's	Psilocybe cubensis Mex	92,7	0,35	0,20	0,45	0,37	0,22	0,48
36280778	23	Mexicaanse paddo's	Psilocybe cubensis Mex	95,0	0,95	0,06	0,74	1,00	0,06	0,78
35389458	4	Thaise paddo's	Psilocybe cubensis Thai	89,3	0,34	0,35	0,59	0,38	0,39	0,67
37257605	8	Thaise paddo's	Psilocybe cubensis Thai	91,9	0,06	0,08	0,12	0,07	0,09	0,14
35389474	7	Truffel	- I	93,2	0,13	0,03	0,12	0,14	0,03	0,13
24006247	14	Onbekend	-	93,0	0,01	0,02	0,03	0,01	0,03	0,04
36280751	17	Kaalkopjes	Psilocybe semilanceata	94,2	0,72	0,05	0,57	0,77	0,05	0,60
24006255	32	Magic Mushrooms (pillen)	-	-	0,02	0,04	0,06	-	-	-
38234072	46	Paddenstoenthee	-	95,4	0,01	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02
38291114	49	Paddenstoenthee	-	94,6	0,00	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01

Tabel 2: **Monsters verse paddo's van Paddo-kweker**

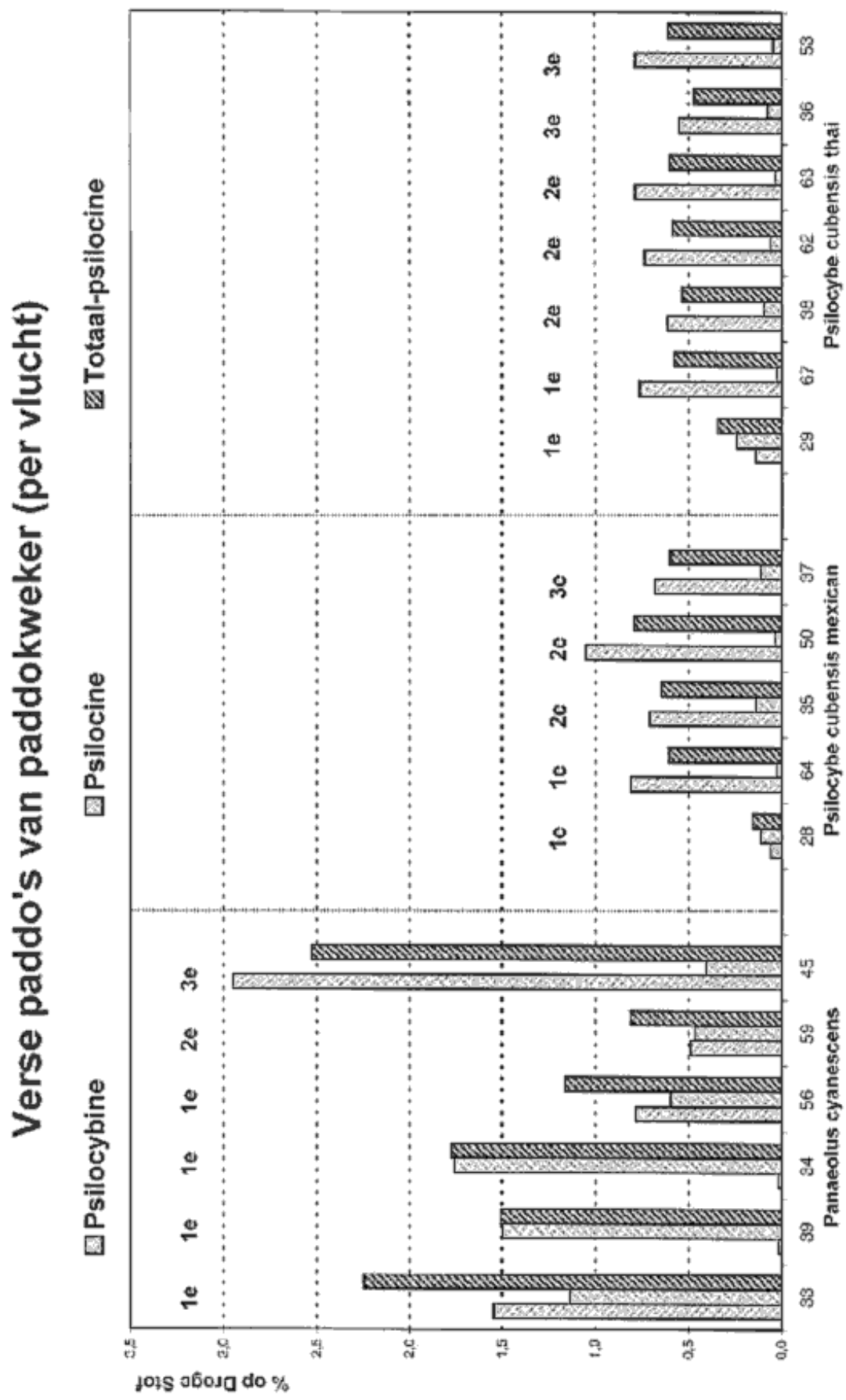
ISI-nummer	code	Soort (vlucht)	Plaats Bemonstering	Droogrest % in paddo	Dr.Stof,% in Droogrest	in Verse Paddo (w/w)		in Droge Stof (w/w)	
						% psilocyb.	Tot %psilocine	% psilocyb.	Tot %psilocine
37085065	6	Panaeolus cyanescens (n.b.)	Kweker	7,7	94,6	0,206	0,027	2,83	0,37
37085189	31	Panaeolus cyanescens (n.b.)	Kweker	8,5	89,1	0,002	0,112	0	1,48
37085286	33	Panaeolus cyanescens (1e vl)	Kweker	7,1	95,1	0,104	0,076	1,55	1,13
37085286A	39	Panaeolus cyanescens (1e vl)	Kweker	6,6	93,4	0,001	0,092	0	1,50
37085294	34	Panaeolus cyanescens (1e vl)	Kweker	8,5	94,2	0,002	0,140	0,02	1,76
37099813	45	Panaeolus cyanescens (3e vl)	Kweker	6,0	93,6	0,164	0,022	2,95	0,40
37099783	56	Panaeolus cyanescens (1e vl)	Kweker	6,8	92,9	0,050	0,038	0,78	0,60
37099791	59	Panaeolus cyanescens (2e vl)	Kweker	5,8	93,4	0,026	0,025	0,49	0,46
37085073	11	Psilocybe cubensis Mex. (n.b.)	Kweker	10,3	92,2	0,087	0,009	0,91	0,09
37085162	28	Psilocybe cubensis Mex. (1e vl)	Kweker	7,4	88,8	0,004	0,007	0,06	0,11
37085235	35	Psilocybe cubensis Mex. (2e vl)	Kweker	6,4	95,2	0,043	0,008	0,71	0,14
37085243	37	Psilocybe cubensis Mex. (3e vl)	Kweker	6,4	94,5	0,041	0,007	0,68	0,11
37099325	50	Psilocybe cubensis Mex. (2e vl)	Kweker	6,1	92,9	0,059	0,002	1,05	0,03
37099848	64	Psilocybe cubensis Mex. (1e vl)	Kweker	6,2	91,9	0,046	0,001	0,81	0,02
36282126	40	Psilocybe cubensis Mex. (n.b.)	Smartshop	12,18	92,4	0,033	0,029	0,29	0,26
36282177	44	Psilocybe cubensis Mex. (n.b.)	Smartshop	7,3	91,0	0,034	0,018	0,51	0,27
36234293	48	Psilocybe cubensis Mex. (n.b.)	Smartshop	7,2	94,0	0,077	0,002	1,14	0,03
37085014	16	Psilocybe cubensis Thai (n.b.)	Kweker	7,0	92,2	0,052	0,003	0,81	0,05
37085154	29	Psilocybe cubensis Thai (1e vl)	Kweker	7,8	88,0	0,010	0,017	0,14	0,24
37085251	38	Psilocybe cubensis Thai (2e vl)	Kweker	6,4	94,7	0,037	0,006	0,61	0,10
37085278	36	Psilocybe cubensis Thai (3e vl)	Kweker	7,1	95,0	0,037	0,005	0,55	0,07
37099333	53	Psilocybe cubensis Thai (3e vl)	Kweker	6,1	92,3	0,044	0,002	0,78	0,04
37099821-A	62	Psilocybe cubensis Thai (2e vl)	Kweker	6,4	92,3	0,044	0,003	0,73	0,06
37099821-B	63	Psilocybe cubensis Thai (2e vl)	Kweker	6,0	92,3	0,043	0,002	0,79	0,04
37099856	67	Psilocybe cubensis Thai (1e vl)	Kweker	6,7	91,8	0,047	0,002	0,76	0,03
36282134	41	Psilocybe cubensis Thai (n.b.)	Smartshop	8,1	90,2	0,001	0,002	0,01	0,03
36282169	43	Psilocybe cubensis Thai (n.b.)	Smartshop	6,3	91,6	0,000	0,001	0,00	0,01
37085057	21	Psilocybe tampanensis	Kweker	36,0	93,1	0,121	0,017	0,36	0,05
37085146	30	Psilocybe tampanensis	Kweker	34,8	94,6	0,124	0,009	0,38	0,03
36282142	42	Psilocybe tampanensis	Smartshop	64,2	95,9	0,216	0,015	0,35	0,02
38234285	47	Psilocybe tampanensis	Smartshop	61,4	93,9	0,204	0,023	0,35	0,04

8.3 Grafieken

Grafiek 1



Grafiek 2



Grafiek 3

