

ostéocytes et les canaux de Havers sont le siège d'une précipitation localisée, ce qui gêne un peu la lecture de l'image.

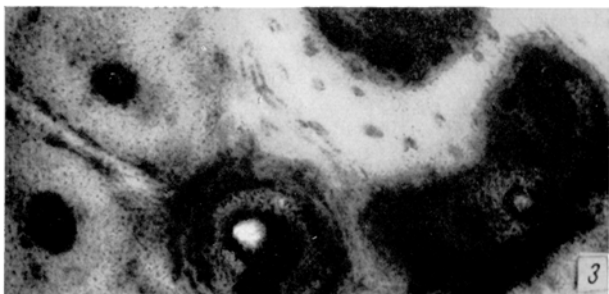
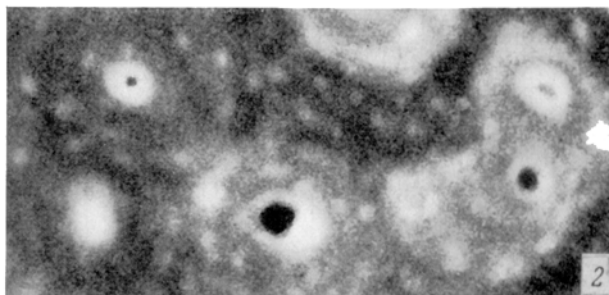
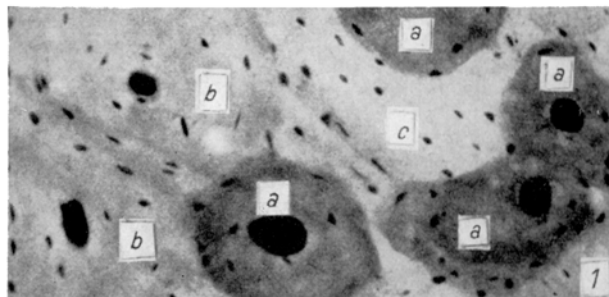


Fig. 1. Microradiographie d'une coupe transversale de la diaphyse humérale d'un chien adulte. Le champ comporte quatre ostéons (marqués a) qui ont fini de déposer leurs lamelles, mais dont la calcification est incomplète, et deux ostéons (marqués b) dont la calcification est achevée ou presque achevée. En c, s'observe un fragment du système des lamelles fondamentales. ($\times 211$.)

Fig. 2. Microradiographie correspondant à la précédente. La coupe a été décalcifiée puis recalcifiée *in vitro* suivant le procédé décrit dans le texte. La recalcification se décelle essentiellement dans les ostéons (marqués a dans la Figure 1) dont la calcification était incomplète. ($\times 211$.)

Fig. 3. La méthode de von Kossa souligne la répartition histologique de la recalcification démontrée par la Figure 2. ($\times 211$.)

Nous avons cherché à mieux mettre en évidence l'enseigne de la microradiographie. La méthode de von Kossa (Fig. 3) est très utile car elle révèle, ça et là, des nuances mal discernables aux rayons X (voir, par exemple, dans la Figure 2 et dans la Figure 3, les régions répondant aux éléments b et c de la Figure 1).

Bien qu'on l'ait nié, nous montrons donc qu'il est possible de recalcifier *in vitro* de l'os compact décalcifié. Le succès dépend de nombreux facteurs. L'ATP ne peut être remplacé ni par un orthophosphate, ni par un glycérophosphate, ni par un pyrophosphate. Le mode de décalcification a son importance: après l'acide nitrique, par exemple, la recalcification ultérieure n'est plus obtenue. Enfin le matériel doit être frais ou avoir été conservé à la congélation.

Le phénomène que nous venons de décrire peut aussi être constaté par la méthode autoradiographique: il suffit d'ajouter une trace de $\text{Ca}^{45}\text{Cl}_2$ à la solution dont la composition a été donnée ci-dessus.

Notre expérience comporte une signification qui lui est propre: elle prouve que la portion organique de l'os compact n'est pas homogène en ce qui concerne son affinité pour le calcium: seuls fixent le calcium de façon notable les ostéons qui, *in vivo*, étaient incomplètement calcifiés (et dont on connaît par ailleurs les affinités tinctoriales particulières⁴). La calcification de ces ostéons semble donc déterminée par une configuration critique des fibrilles collagènes et des mucopolysaccharides de la substance fondamentale. C'est précisément l'hypothèse que des expériences portant non pas sur l'os, mais sur le cartilage préosseux, ont suggérée à SOBEL⁵.

Le rôle joué par l'ATP dans notre recalcification artificielle, son éventuel intérêt dans l'étude de la calcification normale, sont des questions de biochimie échappant à la compétence de notre groupe, qui entend s'en tenir à l'aspect morphologique du sujet.

Sous cet angle, la recalcification *in vitro* semble se prêter à certains développements. Nous songeons aux différences de teneur en calcium d'une lamelle à la suivante au sein d'un même ostéon et à leurs rapports avec la constitution fibrillaire⁶. Nous songeons surtout aux nouvelles possibilités qui s'ouvrent dans les recherches sur les relations collagène-cristaux: suivie au microscope électronique, la recalcification serait peut-être aussi instructive que l'a été la décalcification, étudiée par ROBINSON et WATSON⁷.

P. LACROIX, R. PONLOT et A. DHEM

Institut d'Anatomie, Université de Louvain (Belgique) et Institut Interuniversitaire des Sciences Nucléaires, le 7 juillet 1958.

Summary

We report the possibility of recalcifying decalcified sections of adult compact bone. Recalcification occurs mainly in those osteons which had a low calcium content *in vivo*.

⁴ J. VINCENT, *Recherches sur la constitution de l'os adulte*, Thèse Université Louvain, Ed. Arsia (Bruxelles 1955).

⁵ A. E. SOBEL, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **60**, 713 (1955).

⁶ J. VINCENT, *Exp. Cell Res.* **12**, 422 (1957).

⁷ R. A. ROBINSON et M. L. WATSON, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **60**, 596 (1955).

Konstitutionsaufklärung und Synthese von Psilocybin

Vor einigen Monaten gelang es, das psychotrop wirksame Prinzip aus dem mexikanischen Rauschpilz *Psilocybe mexicana* Heim in kristallisierter Form zu isolieren^{1,2}. Der neue Wirkstoff, der Psilocybin genannt wurde, konnte seither auch noch in andern mexikanischen Psilocybe-Arten, nämlich in *P. caerulea* Murr. var. *Mazatecorum* Heim, *P. semperviva* Heim et Cailleux, *P. Zapotecorum* Heim und *P. Aztecorum* Heim und in *Stropharia cubensis* Earle aufgefunden werden³. Aus dem

¹ A. HOFMANN, R. HEIM, A. BRACK und H. KOBEL, *Exper.* **14**, 107 (1958).

² R. HEIM, A. BRACK, H. KOBEL, A. HOFMANN und R. CAILLEUX, *C. R. Acad. Sci.* **246**, 1346 (1958).

³ R. HEIM und A. HOFMANN, *C. R. Acad. Sci.* **247**, 557 (1958).

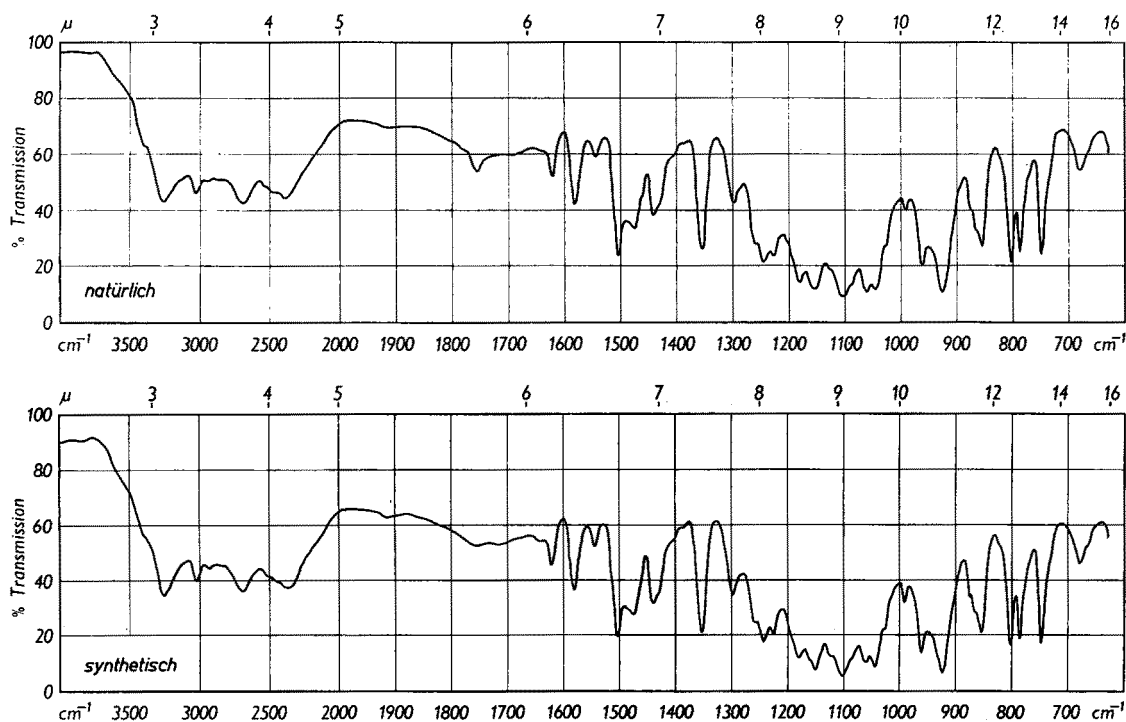


Abb. 1. IR.-Spektrum von natürlichem und synthetischem Psilocybin in KBr.

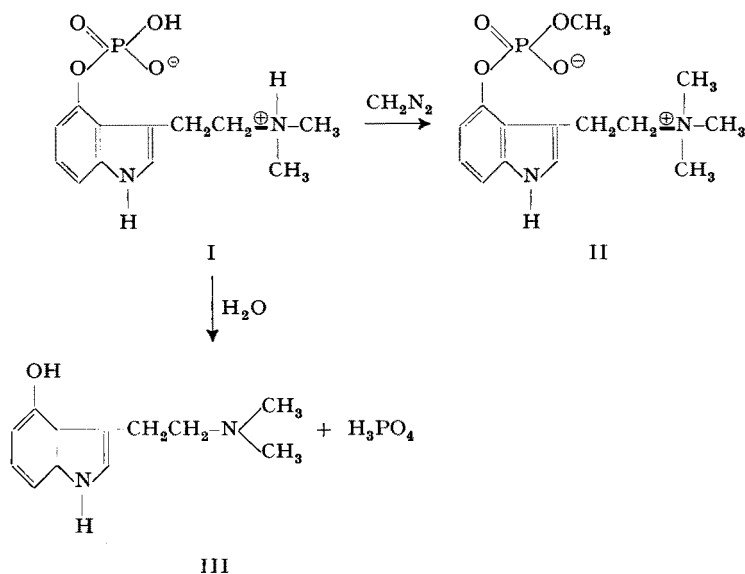
in künstlicher Kultur verhältnismässig leicht zugänglichen sklerotienhaltigen Mycel² liess sich dann eine grössere Menge Psilocybin gewinnen, die für die Konstitutionsaufklärung ausreichte. Nachstehend geben wir das Resultat dieser Untersuchungen in Form einer vorläufigen Mitteilung bekannt.

Die Abbauprobe und weitere Elementaranalysen ergaben für Psilocybin die Bruttoformel $C_{12}H_{17}O_4N_2P$. (Berechnet C 50,7%, H 6,0%, N 9,9%, P 10,9%; gefunden C 50,9%, H 6,2%, N 9,8%, P 10,9%.) Psilocybin ist schwer analysierbar. Bei den ersten Elementaranalysen bereiteten die Phosphorbestimmungen Schwierigkeiten und führten zu einer provisorischen Bruttoformel $C_{13}H_{18/20}O_3N_2P_2$, die sich als unrichtig erwies. Die richtige Bruttoformel konnte erst anhand der nachstehend beschriebenen Abbauprobe endgültig festgelegt werden.

Bei der Methylierung des Psilocybins mit Diazomethan treten zwei Methylgruppen in das Molekül ein, und es entsteht eine neutral reagierende Verbindung (II) $C_{14}H_{21}O_4N_2P$ (berechnet C 53,8%, H 6,8%, N 9,0%, P 9,9%; gefunden C 53,4%, H 7,0%, N 9,1%, P 10,4%). Beim Erhitzen von II wird Trimethylamin abgespalten, das in Form seines Pikrates identifiziert wurde.

Psilocybin zerfällt bei der Hydrolyse in 4-Hydroxydimethyltryptamin (III), $C_{12}H_{18}ON_2$ (berechnet C 70,6%, H 7,9%, O 7,8%, N 13,7%; gefunden C 70,5%, H 7,6%, O 7,9%, N 13,4%), und ein Äquivalent Phosphorsäure, die als Ammonium-Magnesium-Salz bestimmt wurde.

Aus diesen im nachstehenden Formelschema dargestellten Umsetzungen ergibt sich für Psilocybin die Konstitution I.



Die Strukturformel I konnte durch Totalsynthese gesichert werden. Ausgehend von 4-Benzoyloxy-indol⁴ wurde nach der Oxalylchlorid-Methode⁵ 4-Hydroxy-dimethyltryptamin (III) aufgebaut, das mit dem phosphorfreien Hydrolysenprodukt des Psilocybins identisch war. Veresterung der phenolischen Hydroxylgruppe in III mit Dibenzylphosphorylchlorid und anschliessende reduktive Debenzylierung führte zu I, $C_{12}H_{17}O_4N_2P$ (berechnet C 50,7%, H 6,0%, N 9,9%, P 10,9%; gefunden C 50,3%, H 5,9%, N 9,7%, P 10,5%). IR.-Spektrum (vgl. Abb. 1) und alle übrigen Eigenschaften stimmten mit denen des natürlichen Psilocybins überein.

Psilocybin ist die erste in der Natur aufgefundene phosphorylierte Indol-Verbindung. Ferner liegt hier das erste natürlich vorkommende Tryptamin-Derivat vor, das in der 4-Stellung des Indol-Systems mit einer Hydroxylgruppe substituiert ist.

Die Analysen wurden im mikroanalytischen Laboratorium Sandoz (Dr. W. SCHÖNIGER) ausgeführt, die Spektren in der spektralanalytischen Abteilung (Dr. H. G. LEEMANN) aufgenommen.

A. HOFMANN, A. FREY,
H. OTT, TH. PETRZILKA
und F. TROXLER

Pharmazeutisch-chemisches Laboratorium Sandoz A.G.,
Basel, 16. September 1958.

Summary

The structure of Psilocybin, the psychotropic active principle of the Mexican mushroom *Psilocybe mexicana* Heim, has been elucidated. Psilocybin is the phosphoric acid ester of 4-hydroxy-dimethyltryptamine. This structure was confirmed by total synthesis.

⁴ A. STOLL, F. TROXLER, J. PEYER und A. HOFMANN, *Helv. chim. Acta* 38, 1452 (1955).

⁵ M. E. SPEETER und W. C. ANTHONY, *J. Amer. chem. Soc.* 76, 6209 (1954).

Cinétique de l'inhibition de l'oxydation cuprique de l'acide ascorbique par certains complexants*

L'activité catalytique des ions métalliques est fortement influencée par l'addition au milieu de complexants. Souvent on assiste à une inhibition, parfois à une activation et les deux effets peuvent avoir lieu alternativement selon la composition du milieu¹. L'activité catalytique des ions Cu^{++} dans l'oxydation de l'acide ascorbique est le plus souvent diminuée ou complètement éliminée en présence de complexant^{2,3}.

On admet que le Cu^{++} forme un complexe avec l'acide ascorbique (AH_2). Ce complexe dissocie après le passage d'un électron de la vitamine sur le métal: $AH^- + Cu^{++} \rightleftharpoons [AH-Cu^{++}] \rightleftharpoons [AHCu]^+ + AH + Cu^+$. Le Cu^+ serait ensuite reoxydé en Cu^{++} et le radical libre AH réagirait avec l'oxygène. Ainsi en présence d'un excès d' AH_2 les ions Cu^{++} formeraient pratiquement pendant toute la durée

de la réaction un complexe avec l' AH_2 . L'inhibition des complexants ajouté au mélange $AH_2 + Cu^{++}$ peut donc s'exercer selon 2 mécanismes différents: a) entrer en compétition avec l' AH_2 et capter les ions Cu^+ ou Cu^{++} , ou b) réagir avec le complexe $[AH-Cu^{++}]$ d'une façon non-compétitive.

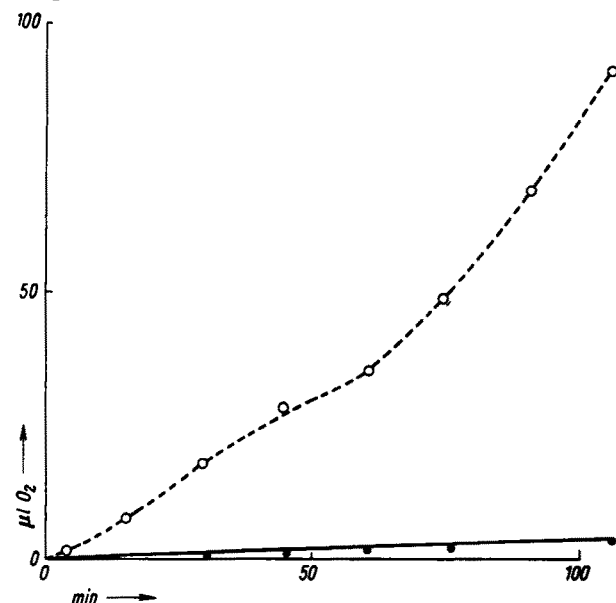


Fig. 1. Inhibition de l'oxydation de l'acide ascorbique par le complexon (---o 0,1 μM); Cu^{++} 0,1 μM . o---o sans complexon; pH 6,20, 36,5° C

On peut citer comme exemple de la première catégorie l'inhibition par l'aneurine, dont GERO a montré qu'elle est due à la formation d'un complexe entre la vitamine B_1 et les ions Cu^{++} . Les Figures 1, 2 et 3 montrent l'inhibition par l'éthylène diamine tétraacétate (EDTA). Pour obtenir la cinétique de l'inhibition, nous avons placé dans l'un des diverticules d'une fiole de Warburg le Cu^{++} , dans l'autre l'inhibiteur. Le compartiment central contient l'acide ascorbique et le tampon. Au bout de 10 min d'équilibration thermique on ajoute le Cu^{++} , on mesure l'oxydation de l' AH_2 , puis à un moment déterminé on ajoute l'inhibiteur de l'autre diverticule. L'inversion de l'ordre des réactifs (inhibiteur d'abord, Cu^{++} ensuite) complète l'expérience. L'étude des courbes obtenues permet de tirer des conclusions intéressantes sur le mécanisme de l'inhibition.

La Figure 1 montre l'inhibition de l'oxydation de 5 mg d'acide ascorbique (28 μM) en fonction du temps, pour 0,05 μM de complexone, 0,1 μM de Cu^{++} . L'inhibition augmente progressivement pour atteindre la valeur théorique au bout de 40 min environ. Comme l'affinité de l'EDTA est très élevée pour les ions Cu^{++} ($\log K = 18,7^6$) et comme l'inhibition atteint la valeur théorique de 50% (avec 0,5 μM d'EDTA, 1 μM Cu^{++} et 28 μM AH_2) étant probable que l'affinité de l' AH_2 pour le Cu^{++} soit de beaucoup inférieure à celle de l'EDTA. Le Cu^{++} ajouté à un mélange de EDTA et d' AH_2 se fixe presque exclusivement sur le premier et l'inhibition est d'emblée à sa valeur théorique (Fig. 2) comme d'autre part l'inhibition n'est pas instantanée si on ajoute l'EDTA en dernier, il s'ensuit que le «complexe activé» $[AH-Cu^+]$ doit être beaucoup moins

* Note N° 2 sur l'oxydation cuprique de l'acide ascorbique. Note N° 1, voir réf. 3.

¹ A. K. SJPSTEYN, M. J. JANSSEN et G. J. M. VON DER KERK, *Biochim. biophys. Acta* 23, 550 (1957).

² E. NIADAS et L. ROBERT, *Bull. Soc. Chim. biol.* (1958), sous presse.

³ E. NIADAS, *C. R. Acad. Athènes* 31, 454 (1956).

⁴ E. GERO, *C. R. Acad. Sci., Paris* 235, 397 (1952); *Bull. Soc. Chim. biol.* 36, 1003, 1035 (1954).

⁵ R. W. SCHMID et C. N. REILLEY, *J. Amer. chem. Soc.* 78, 5513 (1956).