

Die Strukturformel I konnte durch Totalsynthese gesichert werden. Ausgehend von 4-Benzoyloxy-indol<sup>4</sup> wurde nach der Oxalylchlorid-Methode<sup>5</sup> 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<sub>12</sub>H<sub>17</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub>P (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.

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

<sup>5</sup> 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 milieu<sup>1</sup>. L'activité catalytique des ions Cu<sup>++</sup> dans l'oxydation de l'acide ascorbique est le plus souvent diminuée ou complètement éliminée en présence de complexant<sup>2,3</sup>.

On admet que le Cu<sup>++</sup> forme un complexe avec l'acide ascorbique (AH<sub>2</sub>). Ce complexe dissocie après le passage d'un électron de la vitamine sur le métal: AH<sup>-</sup> + Cu<sup>++</sup> ⇌ [AH-Cu<sup>++</sup>] ⇌ [AHCu]<sup>+</sup> + AH + Cu<sup>+</sup>. Le Cu<sup>+</sup> serait ensuite reoxydé en Cu<sup>++</sup> et le radical libre AH réagirait avec l'oxygène. Ainsi en présence d'un excès d'AH<sub>2</sub> les ions Cu<sup>++</sup> formeraient pratiquement pendant toute la durée

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

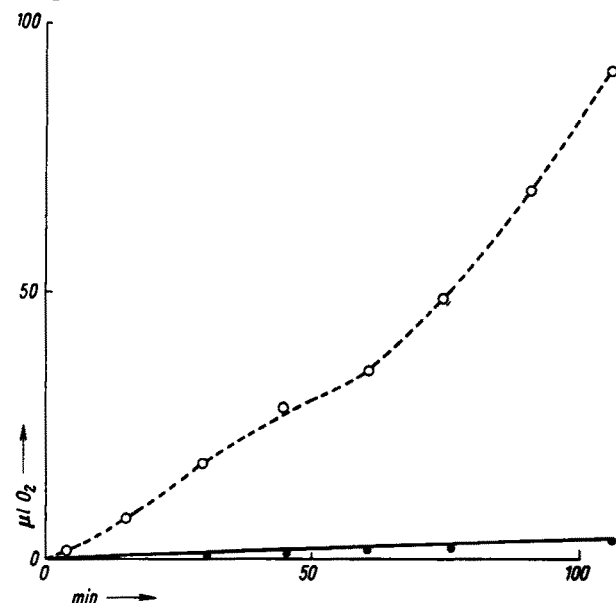


Fig. 1. Inhibition de l'oxydation de l'acide ascorbique par le complexon (— 0,1 μM); Cu<sup>++</sup> 0,1 μM. o---o sans complexon; pH 6,20, 36,5°C

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<sub>1</sub> et les ions Cu<sup>++</sup>. 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<sup>++</sup>, 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<sup>++</sup>, on mesure l'oxydation de l'AH<sub>2</sub>, puis à un moment déterminé on ajoute l'inhibiteur de l'autre diverticule. L'inversion de l'ordre des réactifs (inhibiteur d'abord, Cu<sup>++</sup> 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<sup>++</sup>. 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<sup>++</sup> (log K = 18,7<sup>4</sup>) et comme l'inhibition atteint la valeur théorique de 50% (avec 0,5 μM d'EDTA, 1 μM Cu<sup>++</sup> et 28 μM AH<sub>2</sub>) étant probable que l'affinité de l'AH<sub>2</sub> pour le Cu<sup>++</sup> soit de beaucoup inférieure à celle de l'EDTA. Le Cu<sup>++</sup> ajouté à un mélange de EDTA et d'AH<sub>2</sub> 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<sup>+</sup>] doit être beaucoup moins

\* Note N° 2 sur l'oxydation cuprique de l'acide ascorbique. Note N° 1, voir réf. <sup>3</sup>.

<sup>1</sup> A. K. SIJPESTEYN, M. J. JANSSEN et G. J. M. VON DER KERK, *Biochim. biophys. Acta* 23, 550 (1957).

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

<sup>3</sup> E. NIADAS, *C. R. Acad. Athènes* 31, 454 (1956).

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

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

dissociable que le complexe  $[AH-Cu^{++}]$ . L'activation du complexe doit être rapide et la réaction limitant la vitesse d'oxydation devrait donc être la dissociation du complexe activé. La Figure 3 montre la stoichiométrie de l'inhibition par l'EDTA. L'inhibition n'atteint pas les 100%.

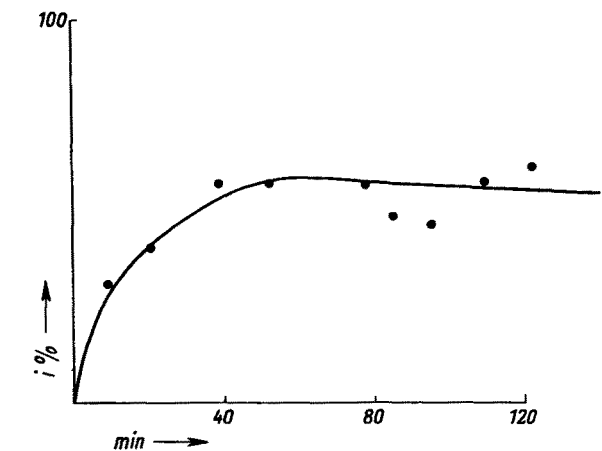


Fig. 2. Cinétique de l'inhibition par le complexon. Ordonnées: inhibition en %; Abscisses: temps en minutes après l'addition du complexon (0,05  $\mu M$ ); acide ascorbique 5 mg,  $Cu^{++}$  0,1  $\mu M$ .

même avec un excès de complexant. Ceci peut être due à une faible activité catalytique du complexe  $Cu-EDTA$  ainsi qu'à l'autoxydation de l' $AH_2$ <sup>2</sup>.

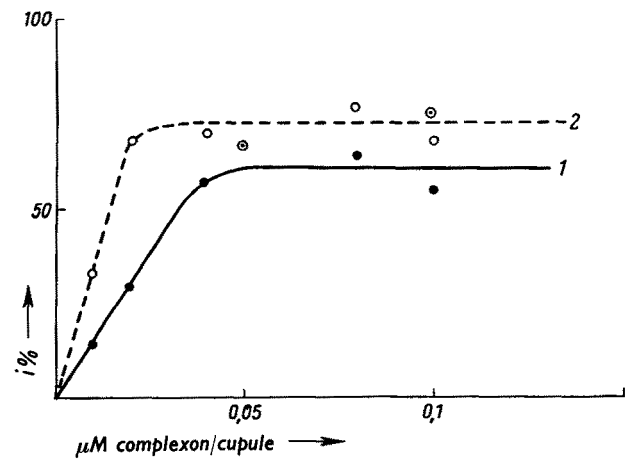


Fig. 3. Inhibition de l'oxydation de l'acide ascorbique (5 mg) en fonction de la concentration en complexon.  $Cu^{++}$  0,1  $\mu M$ , pH 6,35, 36,5° C.

o---o vitesse initiale d'oxydation } résultats obtenus par la méthode  
—•—•—  $Q_{120}$  } de Warburg;  
○ ○ : résultat obtenu par la méthode spectrophotométrique.

FLITMAN et FRIEDEN<sup>6</sup> trouvent des résultats analogues aux nôtres avec la différence qu'en milieu alcoolique l'inhibition par le complexone semble être instantanée. Mais à part la présence de 50% d'alcool dans le milieu, ces auteurs ajoutent 2 moles de complexone par g atomes de  $Cu^{++}$ . En répétant ces expériences par la même méthode (disparition de la bande de l' $AH_2$  à 265  $m\mu$ ) nous trouvons les résultats suivants (Tableau).

Les inhibitions ainsi obtenues sont de même ordre que celles constatées par la méthode manométrique (voir Fig. 3).

<sup>6</sup> R. FLITMAN et E. FRIEDEN, J. Amer. chem. Soc. 79, 5198 (1957).

Tableau  
Inhibition de l'oxydation de l'acide ascorbique (0,35  $\mu M$ ) par le complexone. Méthode spectrophotométrique, tampon «tris» 0,01 M, pH 7,6 (33,5  $\mu M$ ), volume final 3,35 ml, t: 21,5° C

$Cu^{++}$ $\mu M$	Complexone $\mu M$	Complexone ( $Cu^{++}$ )	$K_{ms} \cdot 10^{-3}$	% inhibition
0,02	—	—	5,2	—
0,02	1,0	50	0,0	100
0,02	—	—	4,5	—
0,02	—	—	5,1	—
0,02	—	—	5,1	—
0,02	0,01	0,5	1,67	67
0,01	—	—	1,3	—

Les résultats sont différents si on utilise une protéine comme inhibiteur. La Figure 4 montre l'effet de la sérum-albumine sur l'oxydation cuprique de l' $AH_2$ , l'inhibition est instantanée même si l'on ajoute la protéine en dernier. Pourtant l'affinité de la sérumalbumine pour le  $Cu^{++}$  n'est pas plus élevée que celle de l'EDTA:  $\Delta F^\circ$  de l'association albumine  $Cu^{++}$  à 26° C est selon KLOTZ<sup>7</sup> de - 5,908 cal/mol pour le premier ion fixé et de - 1,700 cal/mol pour le 16<sup>e</sup> donc log K est de l'ordre de 10 pour le premier ion

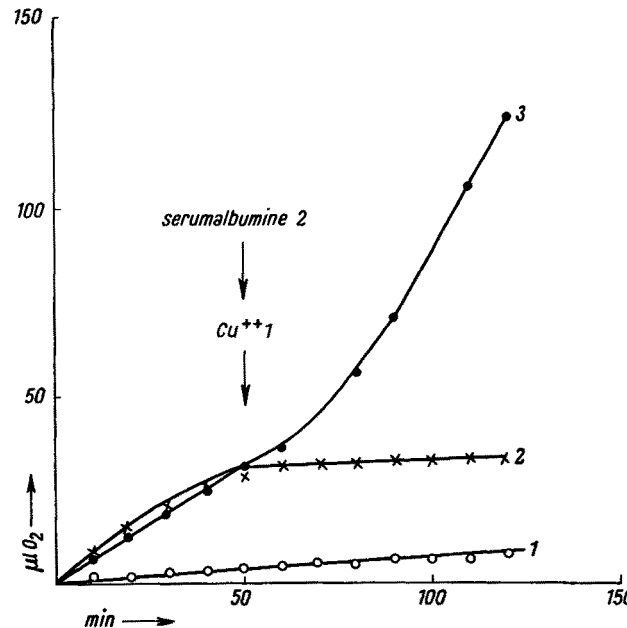


Fig. 4. Inhibition de l'oxydation de l'acide ascorbique (5 mg) par la sérumalbumine de bœuf (2 mg)  $Cu^{++}$  0,1  $\mu M$ ; 36,5° C.

1.  $Cu^{++}$  ajouté à 50 min (flèche) pH 6,05;  
2. sérumalbumine ajoutée à 50 min (flèche);  
3. acide ascorbique sans sérumalbumine.

fixé. Pour expliquer ce phénomène nous suggérons l'hypothèse de l'interaction de la sérumalbumine avec le complexe  $[AH-Cu^{++}]$  et non seulement avec le  $Cu^{++}$  libre. Des expériences ultérieures sont nécessaires pour étayer cette hypothèse. L'importance biologique de ce 2<sup>e</sup> type d'inhibition serait grande, car le radical libre  $AH$  pourrait être stabilisé au sein de ce complexe et réagir avec des donneurs et accepteurs d'électrons, comme c'est le cas dans la réaction DPNH-oxydasique<sup>8</sup> où l' $AH$  joue

<sup>7</sup> I. M. KLOTZ, Cold Spring Harbor Symp. Biol. 14, 97 (1949).  
<sup>8</sup> H. KERSTEN, W. KERSTEN et HJ. STAUDINGER, Biochim. biophys. Acta 27, 598 (1958).

le rôle d'un transporteur d'électrons. Cette hypothèse est étayée par les constatations récentes de KERTESZ<sup>9</sup>; cet auteur a pu montrer que le cuivre de la polyphénoloxydase se trouve sous la forme cupreux, même en présence de substrat et d'oxygène. Des expériences sont en cours pour vérifier cette hypothèse.

E. NIADAS\* et L. ROBERT

*Service de Chimie, Faculté de Médecine, Paris, le 5 août 1958.*

#### Summary

The authors studied the kinetics of the inhibition of the copper-catalysed oxydation of ascorbic acid by versene and some proteins. The versene-inhibition attains slowly the theoretical value, when added after the  $\text{Cu}^{++}$  to ascorbic acid. Proteins inhibit non-competitively and completely, when added to the vitamine either after or before the copper. This result may be interpreted as indicating an interaction between protein and the complex ( $\text{AH}^- \text{Cu}^{++}$ ).

<sup>9</sup> D. KERTESZ, *Nature* 180, 506 (1957).

\* Adresse actuelle: 54, rue Solomou, Athènes (Grèce).

### Mast Cell Destruction Caused by Distilled Water

It is well known that histamin liberators<sup>1,2</sup>, anaphylactic shock<sup>3</sup>, and intraperitoneal injection of distilled water<sup>2,4</sup> produce disruption of mast cells. The explanation for this latter phenomenon is not yet at hand. For this reason we wanted to discover whether the primary cause of mast cell destruction is the shock caused by intraperitoneal injection of distilled water or the osmotic effect of the water.

Albino rats weighing 220–260 g were used in this study; 10–10 animals in each series. In the first experimental series, 10 ml distilled water/100 g of weight were injected intraperitoneally and afterwards the animals were killed 1, 2, 3, or 4 h later. In the second series the animals were killed 10 min after the injection. Their mesenteries were kept in distilled water for 4 h stretched on a cork plate. In the third series, the rats were killed without intraperitoneal injection and their mesenteries were also kept in distilled water. Finally the mesenteries were stretched on glass slides, fixed in methanol, and stained with alcoholic toluidin blue.

In the first and second series, we have experienced that the destruction of mast cells occurred similiary as FAWCETT<sup>2</sup> and HILL<sup>4</sup> had described, nevertheless we have to point out that some of the animals showed no signs of mast cell disruption, but minor granula expulsion only. On the other hand, in the third series, minor granula expulsion and swelling was the only morphological symptom.

These findings indicate that the shock caused by intraperitoneal injection of distilled water plays an extraordinary great role in the mast cell destruction. The osmotic effect without shock produces a much slower mast cell destruction than with it.

<sup>1</sup> J. F. RILEY, *J. Path. Bact.* 65, 471 (1953).

<sup>2</sup> D. W. FAWCETT, *J. exp. Med.* 100, 217 (1954).

<sup>3</sup> I. MOTA, *Brit. J. Pharmacol.* 12, 453 (1957).

<sup>4</sup> M. HILL, *Exper.* 13, 395 (1957).

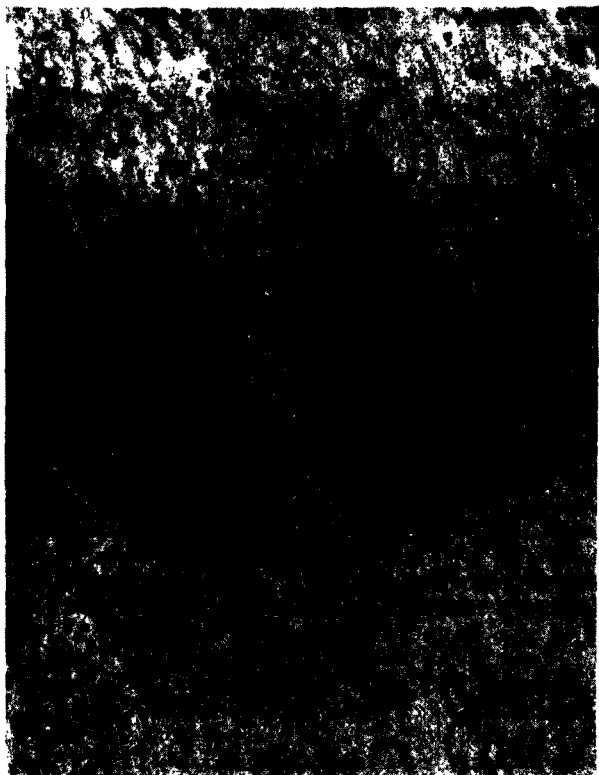


Fig. 1.—Mesentery mast cells of rat killed after 4 h after distilled water injection. ( $\times 900$ .)



Fig. 2.—Mesentery mast cells of rat killed without intraperitoneal distilled water injection and afterwards keeping 4 h in distilled water.

It is possible that the lack of disruption of mast cells, which sometimes occurred in the first and second series, can be attributed to diminished disposition of these rats to get a shock reaction.

G. GONDA and L. MAGOS

*Department of Pathology, Laszlo-Hospital for Infectious Diseases and Department of Industrial Hygiene, State Institute of Occupational Medicine, Budapest, June 23, 1958.*