

Defosforylacja psilocybiny do psylocyny przez alkaliczną fosfatazę

(*Dephosphorylation of psilocybin to psilocin by alkaline phosphatase*)

by

A. Horita and L. J. Weber

Dept. of Pharmacology, University of Washington School of Medicine, Seattle

original report: <https://www.erowid.org/references/texts/show/2623docid2268>

[tłumaczenie: cjuchu]

Spis Treści:

Metody

Wyniki

Omówienie

Podsumowanie

Bibliografia

Wiele związków indolowych zyskało zainteresowanie farmakologiczne i biochemiczne z powodu ich zdolności do wytwarzania stanów psychotycznych u badanych ludzi. Sprawozdano zatem, że związki w rodzaju bufoteniny *N,N*-dimetylotryptaminy i harminy (1), wytwarzają zmiany zachowaniowe u człowieka i różne efekty w centralnym układzie nerwowym zwierząt eksperymentalnych. Najnowszymi dodatkami do tej klasy związków są substancje występujące w grzybie *Psilocybe mexicana* Heim, psilocybina i psylocyna. Chemicznie, związki te to odpowiednio 4-fosfory-*N,N*-dimetylotryptamina i 4-hydroksy-*N,N*-dimetylotryptamina. Ich struktury chemiczne są pokazane poniżej.

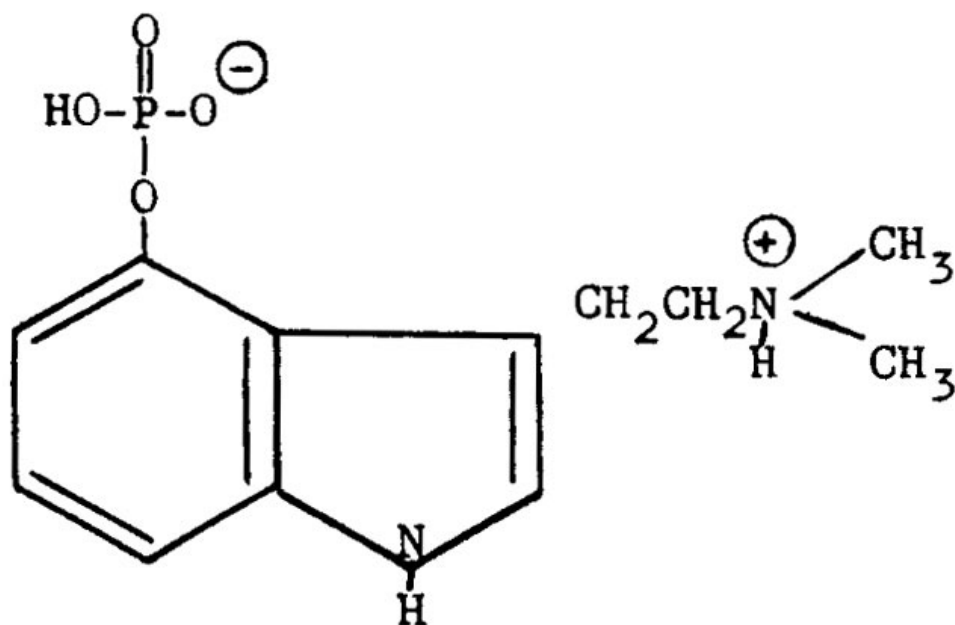
Według Troxlera *et al.* (2) psilocybina i psylocyna są pierwszymi związkami indolowymi ze źródeł naturalnych, posiadającymi zamienniki na 4-pozycyjnym pierścieniu indolowym. Psylocyna różni się od bufoteniny jedynie umiejscowieniem grupy OH, raczej na 4 niż na 5 pozycji.

Niniejszy raport dotyczy hydrolizy grupy fosforanowej psilocybiny *in vitro* poprzez oczyszczone przygotowanie fosfatazy z jelita cielęcego. Badania te zostały zapoczątkowane z uwagi na tę możliwość, że psilocybina może służyć jako substrat dla enzymu fosfatazy. Wydawało się to rozsądne, ponieważ inne związki aromatyczne z grupą fosforanową, są doskonałymi substratami fosfataz kwaśnych i zasadowych (3).

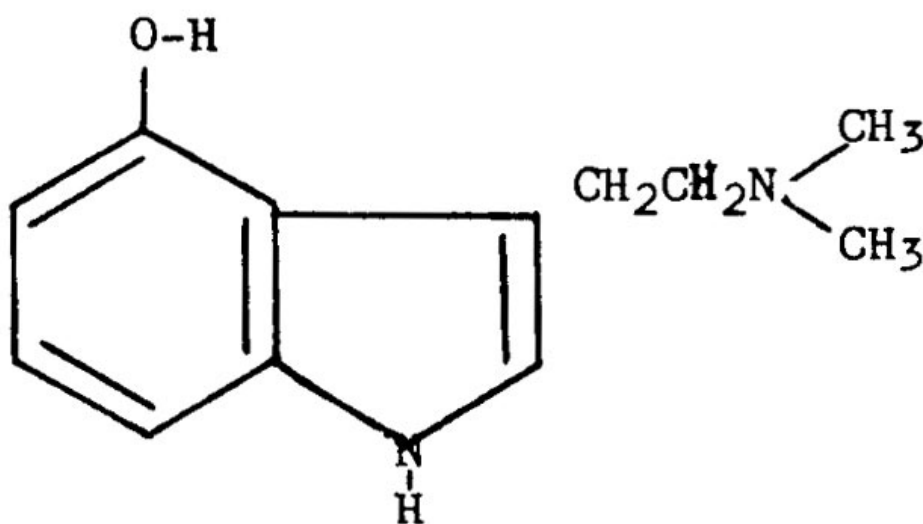
Metody

Wszystkie eksperymenty w tym badaniu zostały przeprowadzone przy użyciu oczyszczonej cielęcej fosfatazy jelitowej, zawierającej 15000 jednostek na miligram (Preparat oczyszczonej fosfatazy zasadowej został zamówiony z Mann Research Labs., w Nowym Jorku). Psilocybina i psylocyna zostały hojnie dostarczone przez Pana Harry'ego Althouse z Sandoz Pharmaceuticals, w San Francisco, Kalifornia.

Nieorganiczny fosforan określano według zmodyfikowanej metody Fiske i Subbarrowa (4). Psylocyna była oznaczana poprzez dostosowanie kolorymetrycznej analizy dla serotoniny, jak opisano przez Udenfriend *et al.* (5). Wszystkie etapy w tej procedurze były podobne do tej dla serotoniny. Końcowa reakcja między nitrozonaftelem a psylocyną w kwaśnym środowisku doprowadziła do powstania brązowawo pomarańczowego koloru w porównaniu do jasno fioletowego koloru serotoniny lub bufoteniny. Kolor przy psylocynie wykazywał maksimum absorpcji przy długości fali 540 i 430 m μ według odczytu na spektrofotometrze. Ustalenia psylocyny zostały wykonane przy 430 m μ , choć w niektórych przypadkach były one również sprawdzone przy 540 m μ . Kolory powstające ze standardowych roztworów czystej psylocyny okazały się postępować według Prawa Beera w zakresie stężenia 0,02 i 1,0 μ moles/ml.



Psilocybina



Psylocyna

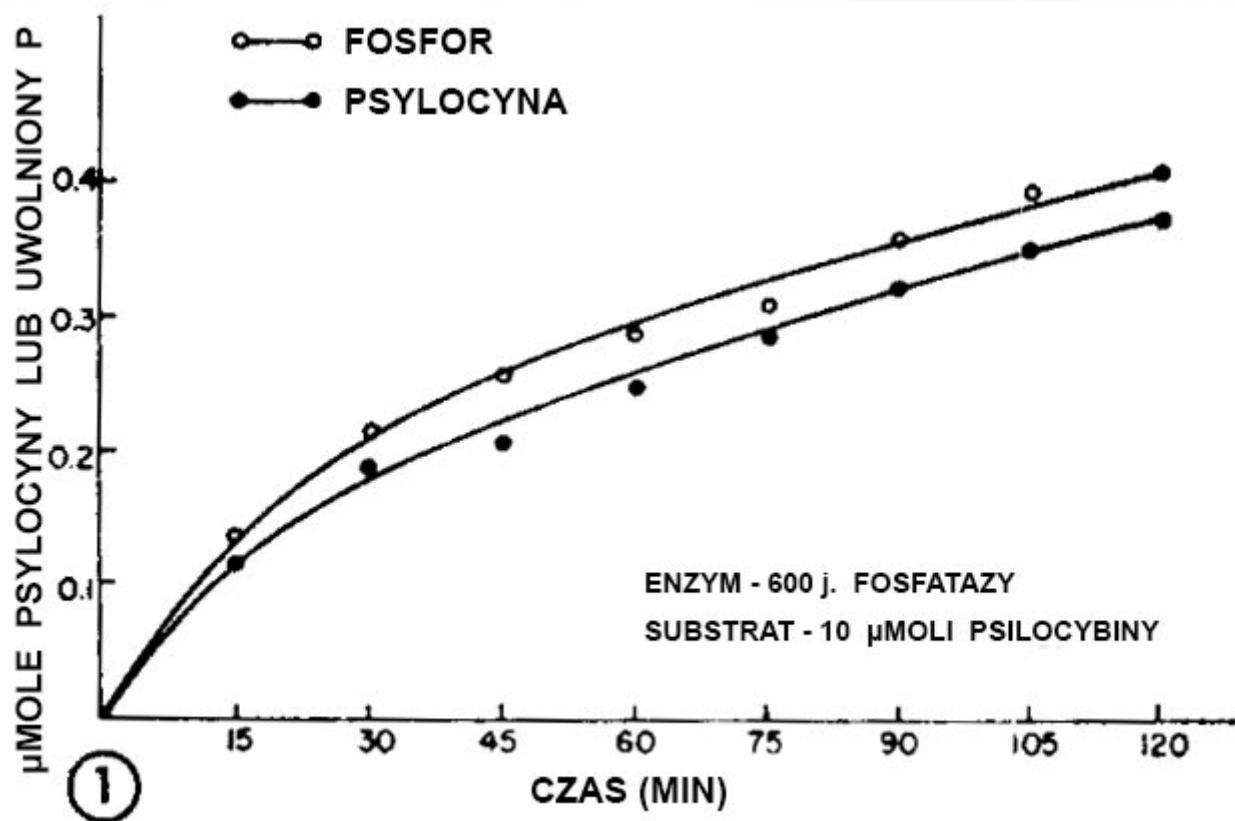
Psilocybina reagowała również z nitrozonaftelem lecz tylko w znacznie wyższych stężeniach. Ukazała ona jasnożółty kolor, ale nie kolidowało to z odczytami psylocyny przy 430 mμ. Jednakże psilocybina, nie jest ekstraktowana do fazy butanolu, a końcowy ekstrakt kwasowy nie dał żadnej reakcji kolorowej z nitrozonaftelem. Pozwala to na selektywną ekstrakcję psylocyny przez butanol i zapobiega ingerencji jakiegokolwiek obecnej psilocybiny.

Mieszanka inkubacyjna składała się z rzeczy następujących: 0,4 ml fosfatazy jelitowej (1500 jednostek/ml) i 5,0 ml psilocybiny (2 μmole/ml) rozpuszczonych w buforze weronalowym (pH 9,2). Psilocybina była wstępnie inkubowana przez 5 minut w celu zrównoważenia do 37°C. Następnie dodano roztwór enzymu, i w różnym czasie, próbki były wyjmowane i oznaczane na psylocynę i nieorganiczny fosforan. Dla każdej próbki przeprowadzono podwójne testy.

Do dalszej identyfikacji psylocyny została zastosowana chromatografia bibułowa zstępująca mieszanin inkubacyjnych. Mieszanina butanol-kwas octowy-woda (4:1:1) działała jako rozpuszczalnik wywołujący, a plamki zostały wykryte odczynnikiem cynamoaldehydu-HCl (6).

Wyniki

Zdolność oczyszczonej alkalicznej fosfatazy jelitowej do defosforylacji psilocybiny z uwolnieniem psylocyny i nieorganicznego fosforanu jest zilustrowana graficznie na Ryc. 1. Szybka defosforylacja jest wyraźna w początkowych 15-30 minutach a później przebiega w wolniejszym tempie liniowym. Wygląda na to, że w opisanych tu warunkach, około 5×10^4 μ moli psylocyny było uwalniane przez jednostkę enzymu na godzinę. W przeciwieństwie do tego, defosforylacja disodowego mono-fenylofosforanu przez fosfatę alkaliczną uwalnia około dwa razy tyle fenolu i nieorganicznego fosforanu. We wszystkich przypadkach uwolnienie nieorganicznego fosforanu następuje zaraz po pojawieniu się psylocyny podczas okresu inkubacyjnego.

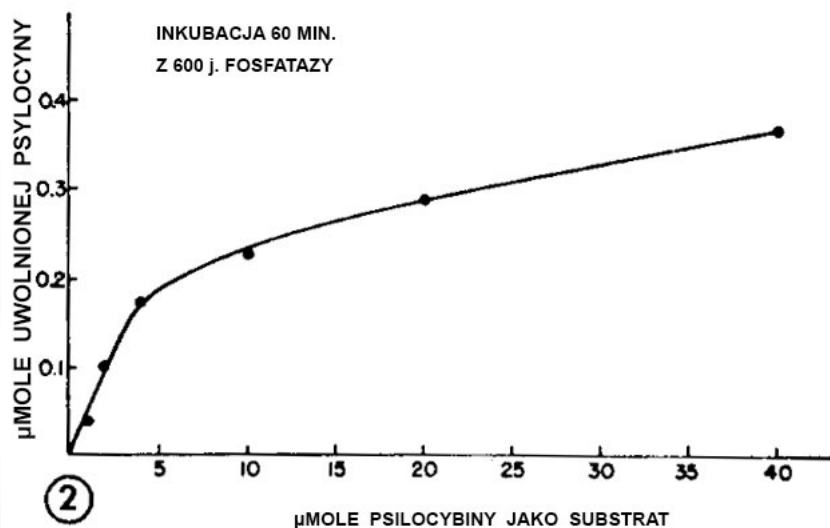


Ryc. 1. Tempo uwalniania fosforu i psylocyny przez działanie oczyszczonej fosfatazy alkalicznej działającej na psilocybinę. Inkubacja w buforze weronalowym, pH 9,2 przy 37°C.

To że psylocyna została uwolniona z psilocybiny przez fosfatę było oczywiste nie tylko z testów kolorymetrycznych lecz także z wartości R_f po chromatografii bibułowej. Wywołanie bibuły poprzez spryskanie odczynnikami cynamoaldehydu-HCl ujawniło jedynie jedno identyczne pod względem położenia miejsce na standardowym pasku psylocyny. Średnia wartość R_f zarówno standardowego jak i nieznanego paska wynosiła 0,74 (średnia wartość 4 pasków). Psilocybina nie zareagowała z odczynnikami by dać wyraźny test plamkowy.

Wpływ stężenia psilocybiny na tworzenie psylocyny jest ukazany na Ryc. 2. W tych przypadkach inkubacja była przeprowadzana przez jedną godzinę z 600 jednostkami fosfatazy alkalicznej. Jako substrat, wykorzystane zostały stężenia 1 μ mola do 40 μ moli psilocybiny. Liniowa zależność pomiędzy stężeniami psilocybiny a tworzeniem psylocyny została odnotowana aż do około 4 μ moli substratu. Poza tym stężeniem, tempo tworzenia psylocyny osiągnęło plateau, wskazując na nasycenie enzymu przy nadmiarze substratu i osiągnięciu reakcji zerowego rzędu.

Ponieważ wiadomo, że jon Mg^{++} aktywuje fosfatę alkaliczną, jego wpływ został również przebadany z psilocybiną jako substratem. Stwierdzono, że przy stężeniach 0,35% $MgSO_4$, uwolniona psylocyna i nieorganiczny fosforan wzrosły o około 30% ponad kontrolne.



Ryc. 2. Wpływ stężenia psilocybiny na uwalnianie psylocyny przez oczyszczoną fosfatazę alkaliczną. Inkubacje były przeprowadzane w buforze weronalowym (pH 9,2) przy 37°C przez 60 min.

Omówienie

Psilocybina jest łatwo defosforylowana przez fosfatazę jelitową do postaci nieorganicznego fosforanu i psylocyny. Nasuwa to pytanie, czy działanie psilocybiny na centralny układ nerwowy jest wytwarzane przez zdefosforylowany kongener, gdyż wiele tkanek ssaków, jak również serum, zawiera różne fosfatazy. Doświadczenia w toku wskazują, że zarówno tkanka ssacza jak i plazma są w stanie szybko defosforylować psilocybinę.

Wydaje się rozsądne, że psylocyna może wytwarzać psilocybinowy wpływ na centralny układ nerwowy gdyż ta druga byłaby wysoce zjonizowana i z mniejszym prawdopodobieństwem przenikałaby barierę krew-mózg. Oznaczenia rozpuszczalności tych 2 związków w rozpuszczalnikach organicznych i w roztworze Tyrode'a o pH 7,4 ukazały, że psylocyna jest ponad 100 razy bardziej rozpuszczalna w chloroformie niż psilocybina (wyniki niepublikowane).

Uwalnianie psylocyny z psilocybiny było łatwo określić specyficznymi metodami testowymi. Choć ściśle związane strukturą, te 2 związki reagowały dość różnie na różne odczynniki kolorystyczne. Obecnie badamy możliwość wykorzystania spektrofotofluorometru jako sposobu na identyfikowanie małych ilości obu tych związków.

Podsumowanie

Inkubacja psilocybiny z oczyszczoną fosfatazą jelitową skutkowała uwolnieniem psylocyny i nieorganicznego fosforanu. Powstała psylocyna została określona zarówno ilościowo, dzięki specyficznej metodzie kolorymetrycznej, stosującej odczynnik nitroazonaftolu, jak i jakościowo, dzięki chromatografii bibułowej. Opisane zostały niektóre cechy działania fosfatazy na psilocybinę. Omówiona została możliwość podobnej reakcji występującej w całym zwierzęciu.

Bibliografia

1. Carr, C. J., *Int. Rec. Med.*, 1959, v172, 702.
2. Troxler, F., Seeman, F., Hofmann, A., *Helv. Chim. Acta*, 1959, v42, 2074.
3. Roche, J., in *The Enzymes*, by J. B. Sumner and K. Myrback, 1950, v1, pt. 1, 473.
4. Fiske, C. H., Subbarow, Y., *J. Biol. Chem.*, 1925, v66, 375.
5. Udenfriend, S., Weissbach, H., Brodie, B. B., *Methods of Biochem. Anal.*, 1958, v6, 95.
6. Block, R. J., Durrum, E. L., Zweig, G., *Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, 2nd ed., Academic Press, Inc., New York, 1958.

[tłumaczenie: cjuchu]