

CHIẾT XUẤT PSILOCIN TỪ NẤM THỨC THẦN LÀM NGUYÊN LIỆU THIẾT LẬP CHUẨN

Trần Nguyên Hà^{1*}, Đặng Đức Khanh²
Phạm Đức Trọng³, Nguyễn Xuân Trường³

TÓM TẮT

Mục tiêu: Chiết xuất psilocin từ “nấm Thức thần” làm nguyên liệu thiết lập chuẩn.

Đối tượng và phương pháp: Nghiên cứu thực nghiệm, xây dựng phương pháp chiết xuất psilocin từ “nấm Thức thần”, phục vụ công tác giám định tư pháp về ma túy.

Kết quả: Nghiên cứu đã xây dựng thành công phương pháp chiết xuất, phân lập và nhận dạng psilocin từ nấm Thức thần để làm nguyên liệu thiết lập chuẩn thứ cấp, phục vụ công tác giám định tư pháp về ma túy. Phương pháp sử dụng nhiệt để khử photphat, chuyển psilocybin thành psilocin. Kỹ thuật chiết pha lỏng và phân lập bằng sắc kí cột được sử dụng để thu psilocin tinh khiết. Sản phẩm từ việc ứng dụng phương pháp được khẳng định bằng quang phổ hồng ngoại, phổ khối lượng và đạt độ tinh khiết 96,38% bằng sắc kí lỏng theo phương pháp chuẩn hóa diện tích pic.

Từ khóa: Psilocin, nấm Thức thần, chuẩn thứ cấp, chiết xuất.

ABSTRACT

Objectives: Extract psilocin from “Shiki mushroom” as a standard-setting material.

Subjects and methods: Experimental research, development of a method to extract psilocin from “Psychiatric mushrooms”, serving judicial examination of drugs.

Results: The research and development method for extraction, isolation and identification of Psilocin from Magic Mushrooms as raw materials to establish secondary standards for narcotics examination is reported. This method employs a dephosphorylation of the phosphate ester from psilocybin to psilocin. Liquid phase extraction and column chromatography are used to obtain pure psilocin. The result of applying this method is confirmed by infrared spectroscopy, mass spectrometry. Moreover, it reaches 96.38% purity according to HPLC-DAD.

Keywords: Psilocin, extraction, secondary standards, Psilocybe pelliculosa Strophariaceae.

Chịu trách nhiệm nội dung: Trần Nguyên Hà. Email: Hatn@hup.edu.vn

Ngày nhận bài: 04/9/2023; mời phản biện khoa học: 9/2023; chấp nhận đăng: 15/11/2023.

¹Trường Đại học Dược Hà Nội.

²Viện Pháp y Quân đội.

³Viện Khoa học hình sự (Bộ Công an).

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ma túy đã và đang gây ra những hậu quả hết sức nặng nề về kinh tế, chính trị, văn hóa, xã hội ở nhiều quốc gia trên thế giới. Ma túy làm phát sinh nhiều tệ nạn xã hội, nhiều loại tội phạm nguy hiểm. Sử dụng trái phép chất ma túy làm suy thoái nòi giống, băng hoại đạo đức xã hội, đe dọa an ninh quốc gia và trật tự an toàn xã hội. Ở nước ta, theo quy định pháp luật hiện hành, tất cả các mẫu vật thu giữ nghi ngờ là ma túy đều phải trưng cầu giám định và thời hiệu thực hiện giám định không quá 9 ngày. Trong khi đó, trung bình mỗi năm, lực lượng phòng chống ma túy bắt giữ khoảng 25.000 vụ, với gần 30.000 quyết định trưng cầu giám định về ma túy - là quá trình so sánh giữa đối tượng gửi giám định (mẫu thu giữ) với mẫu so sánh (chất chuẩn ma túy) thông qua các phương pháp, thiết bị thích

hợp. Vì vậy, mẫu chuẩn ma túy là yếu tố không thể thiếu trong hoạt động giám định tư pháp.

Những năm gần đây, việc lạm dụng “nấm Thức thần” (còn gọi là nấm ảo giác, nấm ma thuật, nấm psilocybin) đang có xu hướng gia tăng, đặc biệt trong giới trẻ. Psilocin (còn gọi là psilocin hoặc psilocine) và psilocybine là hai hoạt chất chính gây ảo giác có trong bất kì loại nấm Psilocybin nào. Khi vào cơ thể, psilocybine nhanh chóng được dephosphoryl hóa thành chất hoạt tính psilocin, kích hoạt các thụ thể serotonin 2A (5-HT2A) trong hệ thống thần kinh trung ương, bắt chước tác dụng của serotonin tương tự do mescaline và LSD tạo ra. Psilocin và psilocybin không được sử dụng trong y học hiện đại, nhưng nhiều nghiên cứu cho thấy những ứng dụng tiềm tàng trong điều trị chứng lo âu và cải thiện chất lượng cuộc sống cho

bệnh nhân mắc bệnh nan y. Nhiều nghiên cứu trên người đề sáng tỏ về tác động gây ảo giác lên não, cũng như các rối loạn tâm thần và ý thức. Trong hoạt động tư pháp, Psilocine được sử dụng là chất chuẩn so sánh trong quy trình giám định nấm Thức thần và các sản phẩm của nó.

Từ thực tế trên, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm chiết xuất psilocin từ “nấm Thức thần” làm nguyên liệu thiết lập chuẩn.

2. ĐỐI TƯỢNG, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng, hóa chất, thiết bị nghiên cứu

- Đối tượng nghiên cứu: psilocin từ mẫu nấm Thức thần.

- Hóa chất, thuốc thử nghiên cứu: tất cả các dung môi, hóa chất đều đạt tiêu chuẩn tinh khiết phân tích (Hãng Merck), trừ các trường hợp có yêu cầu chất lượng riêng theo thiết bị.

- Chất chuẩn: psilocin 10 mg (Cayman Chemical Company, Item: 11864, Batch 0616191-18).

- Thiết bị: GC-MS Triple Quad: 7890A - Agilent 7000; HPLC-DAD: Agilent; IR: Nicolet Nexus 670 FT-IR (Thermo); Autosample Collector: Unitwist . Quay cất chân không: EYELA; siêu âm: Branson 1510; máy lắc: Unitwist 300; cân phân tích: AE240 (d = 0,01 mg, max 200g)

Các dụng cụ khác: tủ sấy, tủ ẩm, bình hút ẩm, bình định mức, pipet tự động các loại,...

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Thực nghiệm khảo sát lựa chọn yếu tố thời gian (5, 10, 15, 20 phút), nhiệt độ dung dịch (50, 55, 60, 65, 70, 75, 80°C) để khử photphat chuyển psilocybin thành psilocin.

- Thực nghiệm khảo sát yếu tố pH môi trường (đệm photphat pH 6,8; dung dịch natribicarbonat bão hòa pH 8,5; đệm borat pH 9,5) và dung môi chiết (ete, n-Hexan, Toluene, Etylacetat, Cloroform) để xây dựng phương pháp chiết

- Thực nghiệm khảo sát trên sắc ký lớp mỏng (TLC) để tìm điều kiện cho sắc ký cột nhanh.

- Nhận dạng sản phẩm thu từ phương pháp chiết, phân lập bằng quang phổ hồng ngoại, phổ khối lượng và xác định độ tinh khiết sắc ký lỏng theo phương pháp chuẩn hóa diện tích pic.

- Điều kiện phân tích trên HPLC-DAD:

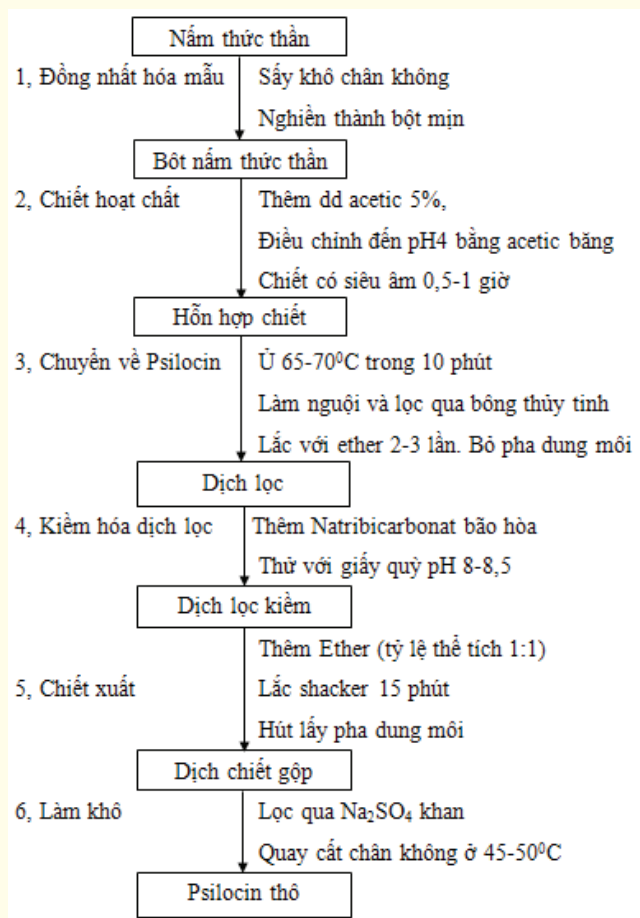
- + Cột RP18 (4,5 mm x 150 mm, 3,5 µm).
- + Bước sóng UV 210 nm.
- + Tốc độ dòng: 1,0 ml/min.
- + Thể tích bơm mẫu: 5.0 µL

+ Pha động: 4 phút đầu chạy hoàn toàn đệm; 2 phút tiếp theo đệm giảm xuống 95% và acetonitrile 5%; cuối cùng giữ 8 phút.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

3.1. Xây dựng phương pháp chiết pha lỏng

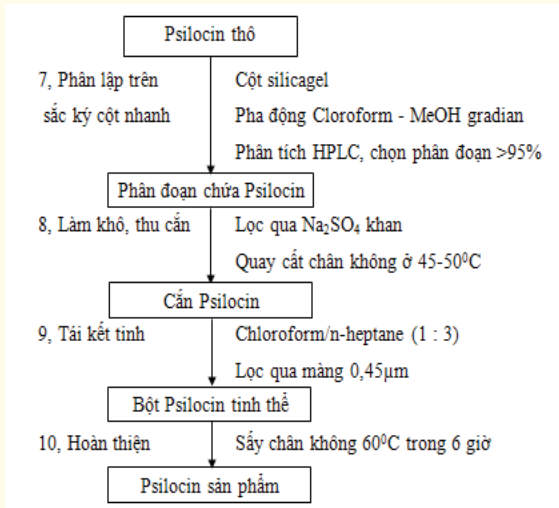
Từ kết quả thực nghiệm khảo sát, lựa chọn các yếu tố phù hợp, phương pháp chiết như sau: cân khoảng 20g nấm Thức thần, sấy dưới áp suất giảm ở nhiệt độ phòng. Nghiền mẫu bằng cối chày sứ thành dạng bột mịn, cho vào bình tam giác dung tích 500 ml. Thêm khoảng 200 ml dung dịch acid acetic 5%, khuấy đều và điều chỉnh bằng acid acetic băng đến pH = 4, ngâm khoảng 1 giờ. Cung cấp nhiệt cho bình ngâm bằng đèn cồn hoặc nồi cách thủy, giữ nhiệt độ dung dịch trong bình 65-70°C trong 10 phút. Sau đó, làm nguội đến nhiệt độ phòng, lọc qua bông thủy tinh, thu dịch lọc. Thêm đồng lượng ether, lắc chiết 2 hoặc 3 lần (bỏ pha dung môi). Pha nước được kiểm hóa bằng natribicarbonat bão hòa, chiết 3 lần với ether đồng lượng. Gộp dịch chiết ether, lọc qua Natrisunphat khan. Quay cất chân không ở 45-50°C thu cần là psilocin thô.



Hình 1. Sơ đồ tóm tắt quy trình chiết pha lỏng psilocin thô.

- Việc sử dụng cồn hoặc cồn nước hoặc cồn nước có acid HCl đều chiết được psilocin và psilocybin trong mẫu bột nấm. Tuy nhiên, dịch chiết chứa nhiều tạp từ mẫu và khả năng lấy hoạt chất từ bột nấm cũng khó khăn hơn. Kết quả khảo sát cho thấy, dung dịch acid acetic 5%

có khả năng chiết nhanh, hiệu quả đối với cả 2 hoạt chất này, đồng thời, dịch chiết không quá nhiều tạp. Khoảng nhiệt độ từ 65-70°C trong môi trường pH = 4 là điều kiện phù hợp nhất để chuyển psilocybin thành psilocin. Khi nhiệt độ thấp thì tốc độ dephosphat hóa rất chậm. Ngược lại, khi nhiệt độ trên 70°C thì lượng psilocin thu được rất kém, có thể psilocin đã bị phân hủy một phần. Bước làm sạch dịch lọc acid bằng dung môi ether cũng đã loại đi nhiều tạp chất, tạo điều kiện cho dịch chiết môi trường kiềm ở bước sau được sạch hơn. pH = 8 là môi trường thuận lợi để psilocin tồn tại nhiều ở dạng phân tử trung hòa và được chiết sang pha dung môi với hiệu suất cao hơn các môi trường pH khác. Hiệu suất chiết của dung môi ether không có sự khác biệt lớn so với các dung môi khảo sát, nhưng nó là dung môi cho dịch chiết sạch nhất. Vì vậy, chọn dung môi ether với số lần chiết có thể 3-4 lần (nếu cần).



Hình 2. Sơ đồ phân lập, tinh chế psilocin tinh khiết.

3.2. Kết quả xây dựng phương pháp phân lập psilocin trên sắc kí cột

- Chuẩn bị mẫu: lấy 200 mg cân thu được từ quá trình chiết xuất ở trên, hòa tan bằng lượng tối thiểu methanol (khoảng 1 ml), lọc qua màng lọc 0,45 µm. Thêm vào dịch lọc 0,5g silicagel và quay cất chân không, thu bột khô.

- Chuẩn bị cột sắc kí với pha tĩnh 100g silica gel, kích thước hạt 40-63 µm. Dùng phương pháp nhồi cột ướt cho pha tĩnh lên cột thủy tinh đường kính trong 2,5 cm.

- Đưa mẫu lên cột; đặt các thông số collector.

- Tiến hành sắc kí với pha động: hệ dung môi cloroform - MeOH gradien: 1000 ml (1:1), 500 ml (1:2), 500 ml (1:5), 500 ml (1:10).

- Phân tích trên HPLC, lựa chọn phân đoạn có độ tinh khiết sắc kí của psilocin trên 95%.

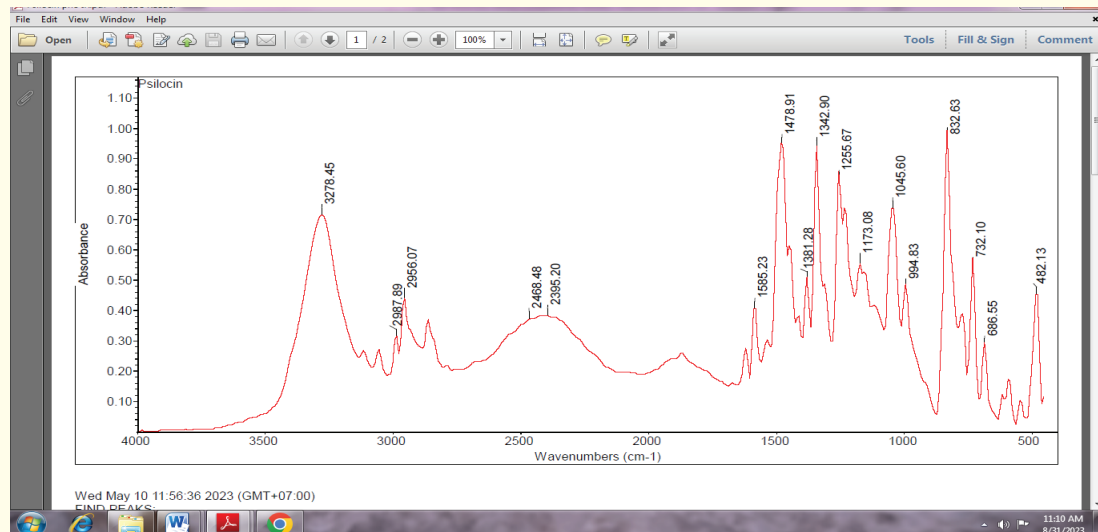
- Gộp phân đoạn đã chọn, bay hơi dung môi trên máy quay cất chân không ở 45-50°C, thu được cần.

- Kết tinh lại: hòa tan cần với lượng tối thiểu cloroform. Thêm n-heptan với lượng khoảng gấp 3 lần lượng cloroform đã dùng, lọc qua màng lọc 0,45 µm thu tủa là psilocin tinh khiết.

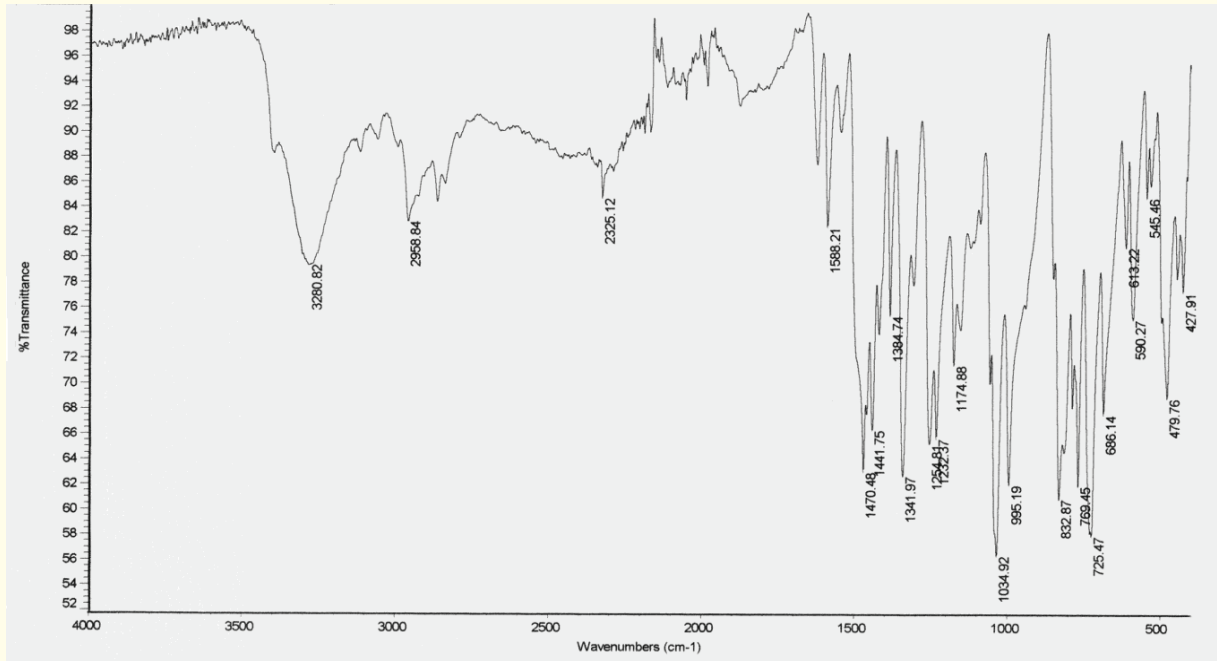
- Sấy áp suất giảm ở 60°C trong 6 giờ.

Với pha động cloroform-methanol, cột silicagel cho khả năng phân tách rất tốt đối với psilocin và psilocybin, cũng như một số tạp chất khác. Phân đoạn psilocybin rửa giải rất sớm và tách hoàn toàn khỏi psilocin. Sản phẩm psilocin thô từ giai đoạn chiết là bột tinh thể màu xanh, nhưng sau khi phân tách và kết tinh lại cho sản phẩm psilocin kết tinh màu trắng.

3.3. Nhận dạng sản phẩm chiết xuất, phân lập



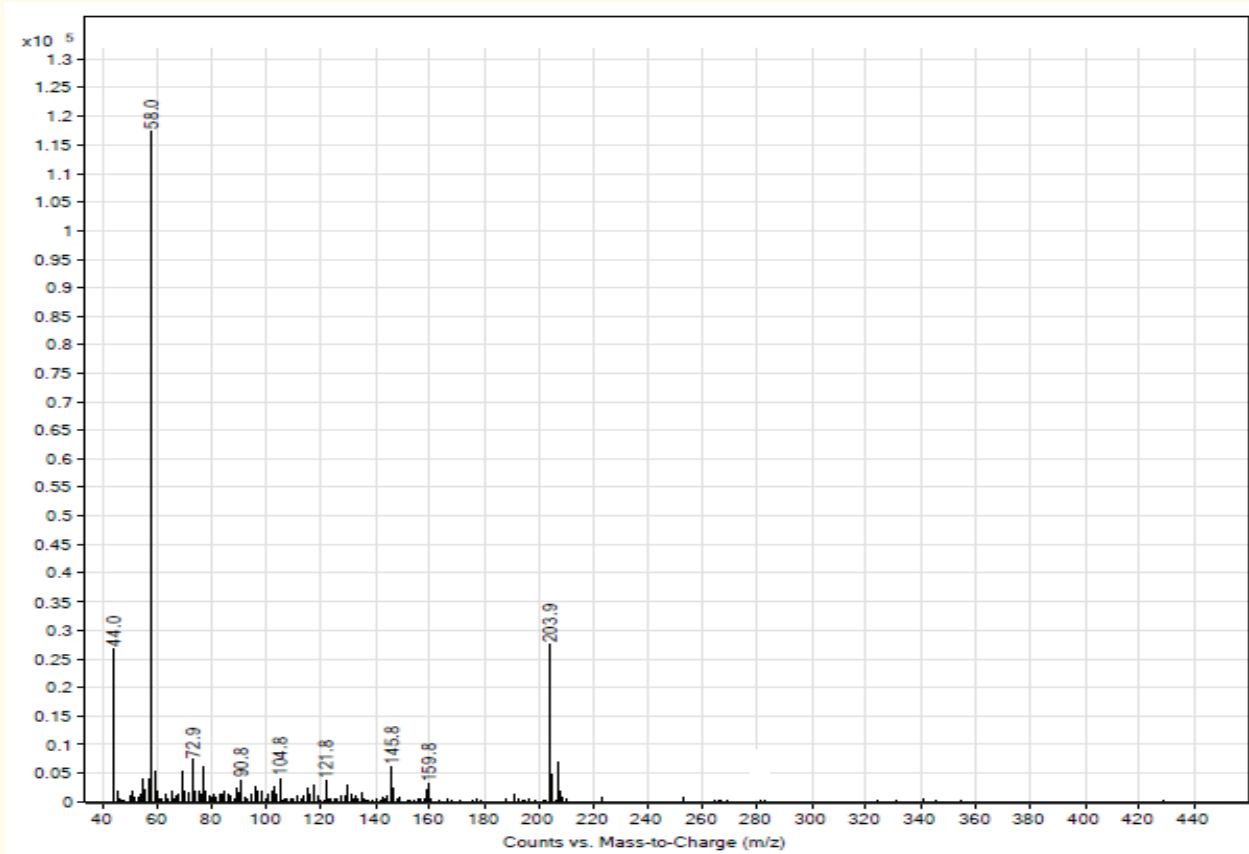
Hình 3. Ảnh phổ IR của psilocin mẫu sản phẩm.



Hình 4. Ảnh phổ IR của psilocin mẫu chuẩn thư viện.

- Nhận dạng bằng quang phổ hồng ngoại: so sánh sản phẩm psilocin thu được (phân tích trên máy quang phổ hồng ngoại với kĩ thuật ép bánh nén KBr - hình 3) với phổ chuẩn psilocin trong thư viện (hình 4). Kết quả thấy đáng phổ mẫu sản phẩm giống phổ chuẩn: các pic lớn tương ứng

với pic của phổ chuẩn, sự sai khác dịch chuyển không quá 20 cm^{-1} . Như vậy, sử dụng quang phổ hồng ngoại để nhận dạng sản phẩm psilocin tinh chế cho độ tin cậy cao. Các pic lớn nhất của mẫu gồm 1479, 1343, 1256, 1200, 1173, 1046, 995, 833, 732, 482 cm^{-1} .



Hình 5. Khối phổ đồ của mẫu sản phẩm Psilocin.

- Nhận dạng bằng phổ khối lượng: psilocin tinh khiết thu được từ quá trình ứng dụng phương pháp chiết phân lập mang đo khối phổ và so sánh với khối phổ đồ chuẩn thư viện (hình 5). Kết quả thấy, cấu trúc của psilocin không phức tạp, khối lượng phân tử thấp, do đó, thông tin về khối phổ nghèo nàn. Tuy nhiên, các mảnh m/z chính có thứ tự giống nhau ở mẫu phân tích và phổ chuẩn. Như vậy, sử dụng khối phổ cho phép nhận dạng đúng psilocin. Các m/z lớn nhất của mẫu sản phẩm gồm: 58, 204, 146, 42, 59, 117, 130, 159, 89, 118 cm⁻¹.

- Xác định độ tinh khiết sắc kí: xác định độ tinh khiết mẫu sản phẩm tinh chế trên thiết bị HPLC với phương pháp chuẩn hóa diện tích pic. Kết quả độ tinh khiết hoạt chất sắc kí của mẫu psilocin tinh chế là 96,38% với độ không bảo đảm đo 0,036. Như vậy, mẫu sản phẩm psilocin tinh chế theo quy trình xây dựng có thể sử dụng làm nguyên liệu thiết lập chuẩn thứ cấp phục vụ các hoạt động hợp pháp về ma túy.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu chiết xuất psilocin từ nấm Thức thần làm nguyên liệu thiết lập chuẩn, chúng tôi thu được kết quả như sau:

- Đã xây dựng được phương pháp chiết xuất psilocin từ nấm Thức thần. Acid acetic loãng cho phép chiết 2 hoạt chất psilocin và psilocybin từ nấm Thức thần hiệu quả, đơn giản so với dung môi cồn. Khử phosphat hóa chuyển hoàn toàn psilocybin thành psilocin trong 10 phút đạt được tại điều kiện 65-70°C trong môi trường acid. pH = 8 và dung môi diethylether là lựa chọn phù hợp để chiết psilocin trong dung dịch.

- Đã xây dựng được phương pháp phân lập psilocin thô - sản phẩm quy trình chiết lỏng-lỏng ra psilocin tinh khiết trên 95% làm nguyên liệu thiết lập chuẩn thứ cấp. Pha tĩnh silica gel và chương trình dung môi hệ cloroform-Methanol cho phép phân tách, nâng độ tinh khiết của psilocin từ trên 90% lên độ tinh khiết trên 95%.

- Thực tế ứng dụng quy trình chiết, phân lập đã lấy được psilocin có độ tinh khiết sắc kí 96,38% từ nguyên liệu nấm Thức thần khô. Sản phẩm được nhận dạng khẳng định bằng quang phổ hồng ngoại và khối phổ đồ so sánh với chuẩn thư viện. Độ tinh khiết xác định trên HPLC theo phương pháp chuẩn hóa diện tích pic.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Nghiên cứu tinh chế 8 loại mẫu chuẩn ma túy phục vụ công tác giám định tư pháp trong lực lượng công an nhân dân*, Đề tài cấp Bộ, Viện Khoa học hình sự - Bộ Công an, 2016.
2. *Nghiên cứu tinh chế 6 loại mẫu chuẩn ma túy phục vụ công tác giám định tư pháp trong lực lượng công an nhân dân*, Đề tài cấp Bộ, Viện Khoa học hình sự - Bộ Công an, 2021.
3. Trung tâm Thông tin Khoa học và Công nghệ thành phố Hồ Chí Minh (2013), *Điều chế và thiết lập chất chuẩn từ thiên nhiên để phục vụ công tác nghiên cứu, kiểm nghiệm và tiêu chuẩn hóa dược liệu, đông dược*.
4. A.C Moffat, M.D Osselton, B Widdop, J Watts (2011), "Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, Fourth edition", *Pharmaceutical Press*, 01/2011.
5. Christopher M Riley and Thomas W. Rosanske (2006), "Development and validation of analytical method", *Pergamon*.
6. *General guidelines for the establishment, maintenance and distribution of chemical reference substances*, WHO Technical Report Series, No. 943, 2007, (Annex 3).
7. Haynes W.M (ed.), *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 95th Edition. CRC Press LLC, Boca Raton: FL 2014-2015.
8. O'Neil M.J. (ed.) (2013), "The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals", *Cambridge*, UK: Royal Society of Chemistry.
9. UNODC (2019), "New psychoactive substances: overview of trends, challenges and legal approaches", *New York*.
10. U.S (2003), *Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Guidance for Industry Q1A (R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products*, November 2003. □