



IDENTIFICATION OF *N*-DESMETHYLSIBUTRAMINE AS A NEW INGREDIENT IN CHINESE HERBAL DIETARY SUPPLEMENTS

Dariusz BŁACHUT¹, Agnieszka SIWIŃSKA-ZIÓŁKOWSKA², Bogdan SZUKALSKI³,
Krystyna WOJTASIEWICZ⁴, Zbigniew CZARNOCKI⁴, Agnieszka KOBYŁECKA²,
Marta BYKAS-STREKOWSKA¹

¹ Forensic Examination Bureau, The Internal Security Agency, Warsaw, Poland

² Department of Forensic Medicine, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland

³ Institute of Psychiatry and Neurology, Warsaw, Poland

⁴ Faculty of Chemistry, University of Warsaw, Warsaw, Poland

Abstract

Recently a significant modification in the composition of a preparation named LiDa has been observed. GC-MS analysis of capsules content performed at the Forensic Examination Bureau, Internal Security Agency indicates the presence of an individual component similar to sibutramine. After isolating the component by column chromatography and performing a series of examinations using infrared spectroscopy (IR) as well as proton (¹H NMR) and carbon (¹³C NMR) magnetic resonance, the unknown component was identified as *N*-desmethylsibutramine hydrochloride. The correctness of the structure determination was confirmed by synthesis of the reference material.

Key words

Sibutramine; *N*-desmethylsibutramine; LiDA; Meizitang.

Received 9 November 2007; accepted 15 November 2007

1. Introduction

The procedure of adding synthetic compounds with various profiles of pharmacological effect to herbal products has been known about since the early nineteen seventies. In order to increase the efficiency of natural preparations, producers “enhanced” their product with an addition of a medicine whose activity corresponded to that of the “original” plant preparation. In Chinese herbal preparations recommended by specialists of natural medicine and intended to ease rheumatic pains, the presence of typical painkillers, e.g. phenacetins [2], paracetamol [12] and also steroid (prednisone, prednisolone) [11, 12] and non-steroid anti-inflammatory drugs (NSAID), e.g. diclofenac,

mefenamic acid, phenylbutazone and indomethacin [3, 7, 12] was ascertained. Changes in blood morphology and also symptoms of aplastic anaemia were observed in persons taking preparations containing phenylbutazone, which is a medicine withdrawn from the pharmaceutical market. It was ascertained that the presence of pyrimidone in preparations named Chuifong Toukuwan Nan Lien, Fonsuning Tongwan, Hippo Brand Secret Formula Chui Fung Eng was the direct cause of numerous cases of agranulocytosis [13].

As an alternative to synthetic calmatives, a preparation in the form of pills with the brand name Sleeping Buddha (1998) was available. In a herbal preparation produced by the Treasure Box Products, Inc. (Products of China) estazolam was detected [6]. Other

compounds from the group of benzodiazepines: diazepam and chlorodiazepoxide were identified in preparations with the common name “the black pearl” originating from different Chinese and Taiwanese producers [7]. Besides organic compounds, additives in the form of salts of heavy metals were found in preparations of Chinese production. In the literature, there are many reports about poisonings due to preparations containing salts of toxic metals, such as arsenic [16], lead [4], mercury [10] and thallium [14].

In each of the above cases, the producer did not declare the real composition of the product, limiting itself at most to specification of components of plant origin.

In the last two years, preparations that are supposed to successfully aid in the process of slimming have appeared on the market of natural medicine products. In preparations called Meizitang and LiDa, the presence of sibutramine hydrochloride was ascertained. Sibutramine is a synthetic compound which structurally ought to be treated as a distant derivative of 4-chloroamphetamine or *N,N*-dimethyloamphetamine. Influencing the noradrenergic and serotonergic system, this compound is currently used in treating obesity (Meridia, Reductil). We presented the analytic profile of sibutramine and a short characterisation of its pharmacological properties in previous publications [1, 15].

2. Experimental

2.1. The aim of work

The aim of the present paper was to identify and present the analytical profile of *N*-desmethylsibutramine hydrochloride, a new component of Chinese slimming products.

2.2. Materials

A standard sample of sibutramine hydrochloride (98.8 % weight) by Abbott GmbH & Co Kg (Ludwigshafen, Germany) was received from the National Institute of Medicines. Standards of amphetamine sulphate, methylamphetamine hydrochloride, ephedrine hydrochloride, phentermine hydrochloride, fenfluramine hydrochloride, 3,4-methylenedioxyamphetamine hydrochloride (MDA), 3,4-methylenedioxymetamphetamine hydrochloride (MDMA) and 3,4-methylenedioxyethylamphetamine hydrochloride (MDE) originated from Sigma. The ethyl ester of diazocarboxylic acid, *N,N*-dicyclohexylcarbodiimid, (*R*)-2-phenylbutiric acid, the anhydride of acetic acid and silica gel

(70-330 Mesh) originated from Aldrich. Solvents: methanol, dichloromethane, chloroform, toluene, pyridine and water originated from Fluka and Merck and were of the class of purity p.a. or “HPLC grade”. Other auxiliary reagents: sodium carbonate, sodium hydroxide, sodium sulphate, magnesium sulphate, hydrochloric acid and ammonia water (25% aq.) originated from Merck. Toluene and pyridine were dried and cleaned according to the published procedure [17]. 4-methoxyamphetamine hydrochloride (PMA) was obtained according to the published procedure [1].

To perform the synthesis of *N*-desmethylsibutramine [8], to a solution of 150 mg (0.56 mM) sibutramine hydroxide in 2 ml of dry toluene, there was being added dropwise a solution of 150 mg (0.82 mM) of the ethyl ester of diazodicarboxylic acid (DEAD) in 3 ml of toluene. The whole mixture was stirred using a magnetic stirrer and heated at 55°C for 16 h. After evaporation of toluene in a vacuum evaporator, the remainder of the light-brown oil was dissolved in 5ml of solution containing 2 ml of 36% hydrochloric acid and 3 ml of ethanol. The solution was boiled for 3 h and then solvents were evaporated under diminished pressure. The remainder, which was brown oil, was cleaned with the method of column chromatography (silica gel, chloroform as eluent: MeOH:NH₃ 94:5.5:0.5) obtaining 85 mg (60% efficiency) of *N*-desmethylsibutramine in the form of a colourless oil.

2.3. Equipment

GC-MS analysis of *N*-desmethylsibutramine and mixtures of psychoactive amines was performed using an HP 6890 gas chromatograph coupled with a mass detector HP 5973. A chromatographic column of type HP-5-MS of length 30 m, inner diameter 0.25 mm and thickness of phase 0.25 mm was used. The temperature programme was as follows: start at 110°C, increase 10°C/min, final temperature 280°C maintained for 3 minutes. The remaining parameters of the apparatus: dosing option – split, partition of the stream 30:1, temperature of the dosing chamber *t* = 250°C, carrying gas – helium with a flow of 0.6 ml/min. Spectra were collected in the range of mass between 40–400 a.m.u.

For separation of diastereomeric derivatives of *N*-desmethylsibutramine, the above mentioned apparatus and the same chromatography column was used. The temperature program: start at 140°C, increase 15°C/min, end temperature 300°C maintained for 2 min. The remaining parameters – as described above.

Measurements of IR spectra were performed using an infrared spectrometer with Fourier transformation Bruker IFS 113v (Germany) equipped with a micro-

scope attachment. The standard material and the investigated sample were put on the mirror, which was placed in the field of vision of the lens of the IR microscope and the spectrum was measured with a resolution of 4 cm^{-1} .

Spectra of proton and carbon nuclear magnetic resonance (NMR) were measured using Varian Unity Plus with frequency 500 MHz for proton and 200 MHz for carbon spectra. Samples were dissolved in deuterated chloroform.

2.4. Methods

2.4.1. Isolation of *N*-desmethysibutramine

A solid sample of beige colour (total mass 2.189 g) taken from eight capsules was placed in a cone-shaped flask of 100 ml capacity and then 70 ml of water was added. After draining off the insoluble parts, a clear and colourless solution was alkalisied with sodium carbonate to pH 10. The aqueous solution was extracted by methyl chloride (3–40 ml). The joined organic layers were dried with dehydrated magnesium sulphate. After evaporation of solvent on a rotary evaporator (temperature of water baths 40°C), 58 mg of yellow oil was obtained. The raw *N*-desmethysibutramine hydroxide obtained in this way was additionally cleaned by column chromatography using silica gel as the adsorbent and solvent system chloroform:MeOH: NH_3 aq. in proportion 93:6.5:0.5 as the eluent. After evaporation of solvent 42 mg of a colourless oil was obtained.

2.4.2. The procedure of derivatisation

Acetic derivative – a mixture of about 1 mg *N*-desmethysibutramine, 100 μl of acetic anhydride in 0.5 ml of pyridine was heated at 120°C for 30 min. After cooling, the excess of pyridine was evaporated in a nitrogen stream and then 1 ml of methanol was added to the remains. The whole mixture was heated at 60°C for 30 min. After cooling the solution was immediately analysed by means of the GC-MS method.

(*R*)-2-phenylbutyric derivative – to 1 ml of dichloromethane containing 0.5 M *N,N*-dicyclohexylcarbodiimide, 5 mg of *R*-2-phenylbutyric acid was added. After about 30 min, 300 μl of the above solution was added to 0.5 ml of dichloromethane containing about 0.5 mg of *N*-desmethysibutramine. The whole mixture was transferred to a reaction vessel (Micro Reaction Vessel, Supelco) and was heated for 3 h at 60°C . After cooling the mixture was immediately analysed by means of the GC-MS method.

2.4.3. Preparation of samples for GC-MS analysis

Salts of amines were dissolved in water obtaining solutions of concentration 1 mg/ml. After taking 0.5 ml of aqueous solution of the appropriate compound, the solution was alkalisied by adding 0.2 ml of 10% Na_2CO_3 in water. The aqueous solution was extracted by methyl chloride (0.5 ml). After separating the organic layer, it was dried using anhydrous sodium sulphate and analysed by means of the GC-MS method.

3. Results and discussion

The subject of the study was solid matter of white colour found in eight capsules of length 1.9 cm, diameter 6 mm and of light or dark green colour. There was a printed graphic symbol on the capsules and the number 0871-8335000 printed in white. The average net mass of a capsule was 273.6 mg ($SD = 5.0$). The range of net masses of capsules was between 264.3 and 282.3 mg. Capsules were packed in so-called “blisters” of aluminium having printed graphic characters in blue and violet colour and the inscription “Dai Dai Hua Jiao Nang”.

The IR spectrum of the unknown compound was recorded directly from the matrix of the capsule (starch), whilst the spectrum obtained after alkaline extraction was characterised by the presence of bands characteristic of sibutramine hydrochloride and sibutramine in the alkaline form (Figures 1 and 2). The essential feature of the spectra was the presence of a broad band originating from stretching oscillations of the OH group connected with the presence of hydration water and the presence of a characteristic band system in the region from about 800 to 600 cm^{-1} .

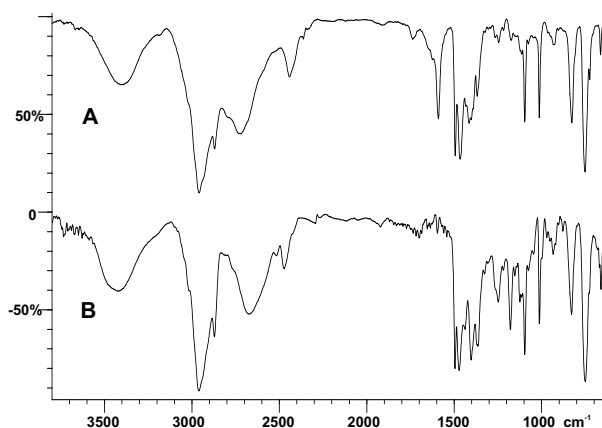


Fig. 1. IR spectra: A – hydrochloride of the capsule component; B – sibutramine hydrochloride.

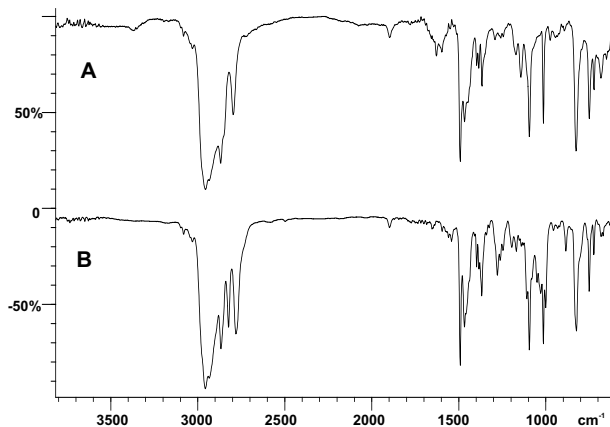


Fig. 2. IR spectra: A – the capsule component as a base; B – sibutramine as a base.

typical of a 1,4-substituted aromatic ring. In the case of the spectrum of the unknown compound, the broad band in the region of $2600\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$, which is typical for amine hydrochlorides, was slightly shifted towards higher value of wave-numbers in comparison to the appropriate band in the spectrum of sibutramine hydrochloride. This observation pointed to the presence of an amino arrangement other than tertiary in the compound's structure.

GC-MS analysis showed the presence of a component with retention time close to but slightly shorter than sibutramine. Chromatograms of total ionic current of a mixture of the unknown component (peak number 10, $t_r = 12.2\text{ min}$), sibutramine, two anorexic medicines and some popular psychoactive amines from the amphetamine group are shown in Figure 3.

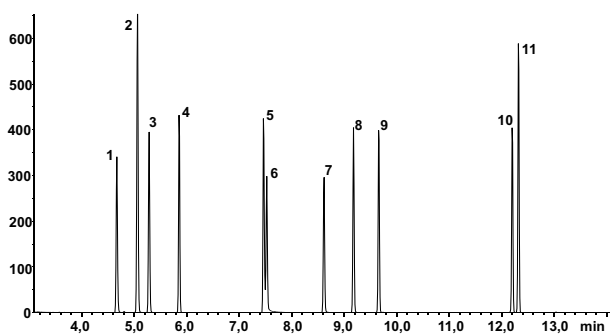


Fig. 3. TIC chromatogram of a mixture of the unknown component, sibutramine, a substance of anorexic activity and some psychoactive amines. Component identification: 1 – amphetamine, 2 – phentermine, 3 – metamphetamine, 4 – fenfluramine, 5 – efedrin, 6 – PMA, 7 – MDA, 8 – MDMA, 9 – MDE, 10 – capsule component, 11 – sibutramine.

The obtained MS spectrum ($EI = 70\text{ eV}$) of the component was characterised by a similar peak system (Figure 4) to that of sibutramine. The important difference was a decrease of m/z value of each peak by 14 a.m.u. The presence of a single atom of chlorine was confirmed by the typical system of isotopic peaks at m/z values 264, 265, 266 and 267, which could correspond to the mother ion of composition $C_{16}H_{24}ClN$ and to the product of the loss of a hydrogen atom by this ion. The molecular composition $C_{16}H_{24}ClN$ corresponds to the molecular composition of sibutramine diminished by removing one methylene group. Confirmation of the molecular composition of the unknown compound was obtained after the transformation of the compound to the acetyl derivative and observing in the spectrum of the derivative the set of isotopic peaks corresponding to a molecular ion of mass 308 a.m.u., which corresponds to the molecular formula $C_{18}H_{26}ClNO$ (Figure 5).

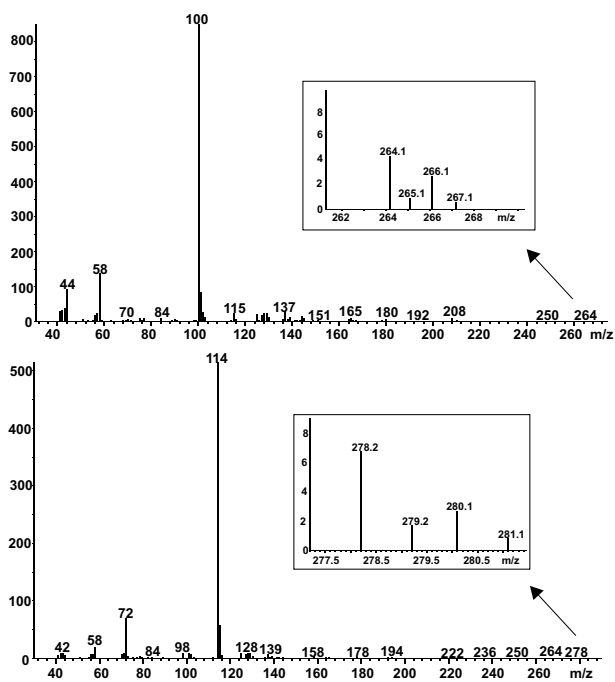


Fig. 4. MS spectra ($EI = 70\text{ eV}$) of the capsule component (the upper spectrum) and sibutramine (the lower spectrum).

To obtain additional data which would be useful in the reconstruction of the structure of the unknown compound, published methods of the synthesis of sibutramine [5, 8, 9] were analysed. It was established that the medicine and its derivatives can be constructed in three elementary steps (Figure 6). The first step of transformations aims to obtain the arrangement of derivatives of 4-chlorophenylcyclobutane (A). The second is the building of the side chain in a reaction

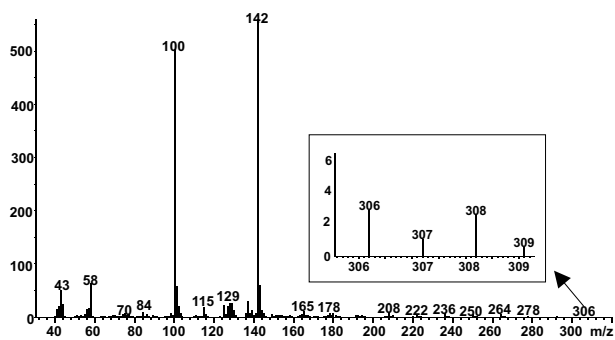


Fig. 5. MS spectrum of acetylic derivative of capsule component.

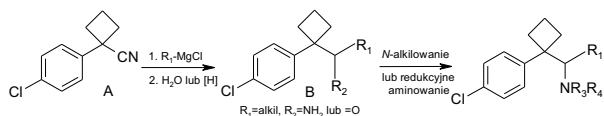


Fig. 6. The general scheme of synthesis of sibutramine and its derivatives.

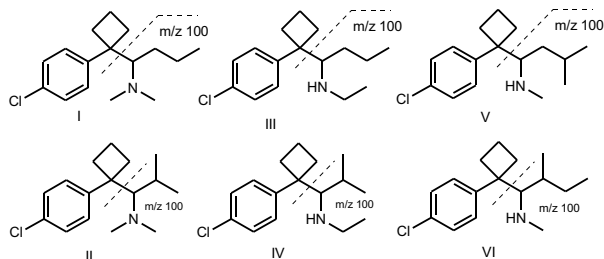


Fig. 7. Propositions of structure for the unknown capsule component.

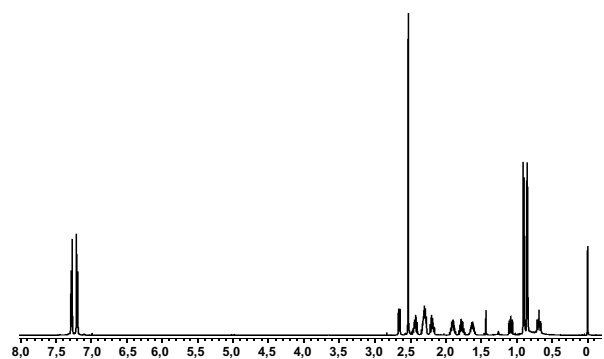


Fig. 8. ¹H NMR spectrum of *N*-desmethylsibutramine.

with alkylmagnesium halogens. Depending on the kind of the alkyl remains of the used Grignard compound, one can obtain derivatives of sibutramine differing in the structure of the alkyl side chain (B). The final step is the modification of the primary amino group or the transformation of phenylcyclobutylalkyloketone as result of any reductive amination reac-

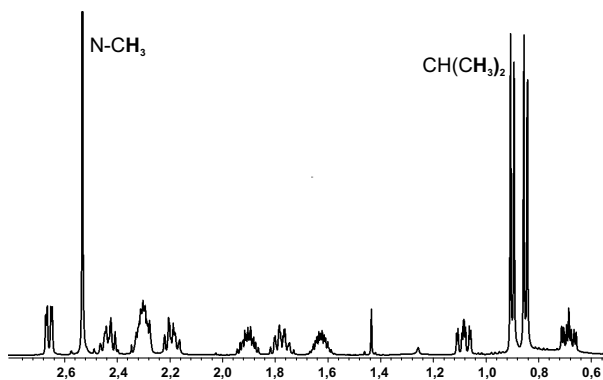


Fig. 9. A chosen fragment of ¹H NMR spectrum of *N*-desmethylsibutramine. There is shown the region of signals of aliphatic protons.

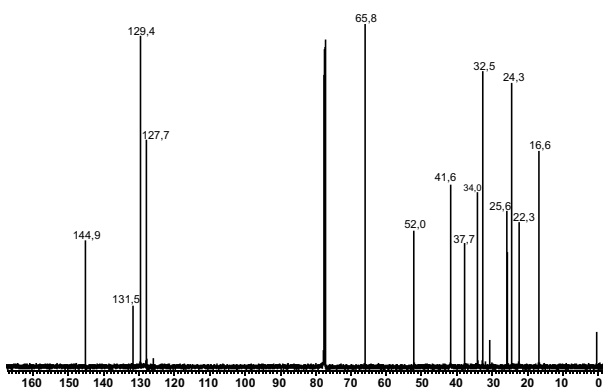


Fig. 10. ¹³C NMR spectrum of *N*-desmethylsibutramine.

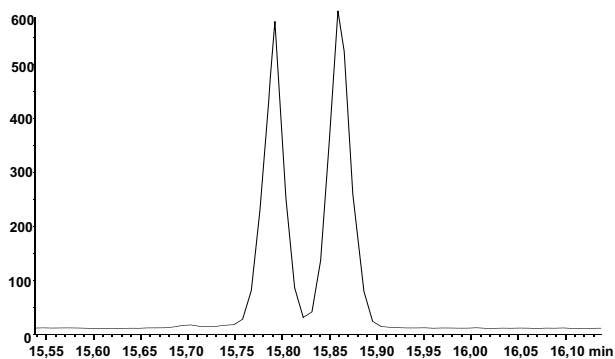


Fig. 11. TIC chromatogram of diastomeric derivatives of *N*-desmethylsibutramine.

tion. Assuming that the modification of sibutramine occurred after the step of obtaining the 4-chlorophenylcyclobutyl system, it was expected that changes in the compound structure would concern the side-chain or the manner of substitution of the nitrogen atom.

Analysing the published path of fragmentation of sibutramine [9], some of its derivatives were chosen (Figure 7), for which the decomposition path ought to

be in agreement with formation of the main ions observed in the MS spectrum of the unknown compound. For each structure I–VI, the breaking of a bond $C_{\text{cyclobutyl}}-C$ should result in formation of an intensive peak corresponding to a cation m/z 100. Due to the fact that the unknown amino compound reacted with acetic anhydride, from the considered group of possible structures, propositions I and II were removed. In accordance with the proposed path of fragmentation of sibutramine [1], the cation m/z 100 should further fragmentise with transfer of hydrogen atom (1,3-shift) and formation of an even-electron ion m/z 58. This type of transformation is impossible in the case of structure IV, whereas for derivatives III and IV, it would deliver a secondary ion with value m/z 72. On the basis of the above data, the structure of *N*-desmethylsibutramine V was initially proposed for the unknown compound.

To confirm this hypothesis, the unknown compound was isolated from the matrix of the capsules, cleaned by the column chromatography method and then its proton ^1H NMR (Figures 8 and 9) and carbon ^{13}C NMR magnetic resonance spectra (Figure 10) were measured. The signal at 3.5 ppm corresponded to the CH_3 group bonded to nitrogen atom, whereas four signals in the range 0.8–1.0 ppm confirm, as in the case of sibutramine, the presence of two diastereotopic methyl groups in the form of an isopropyl system. Such a pattern of NMR spectrum automatically excludes structures III, IV and VI. A comparison of the intensity of both signals shows, that to the nitrogen atom there is bonded only one methyl group that indicates the presence of structure V. In the ^{13}C NMR spectrum of the unknown component there was observed the presence of eight signals corresponding to the number of magnetic non-equivalent carbon atoms in the proposed structure of *N*-desmethylsibutramine. The correctness of assigning of the structure was confirmed through synthesis of *N*-desmethylsibutramine and a comparison of the analytical data obtained for the unknown compound with data recorded for the standard.

The enantiomeric content of the identified amine was determined by GC method after its transformation to a diastereomeric derivative in reaction with optically active (*R*)-2-phenylbutyric acid (Figure 11). The MS spectrum of the obtained derivative is shown in Figure 12. The obtained result indicates that the capsule component is a racemic mixture of *N*-desmethylsibutramine.

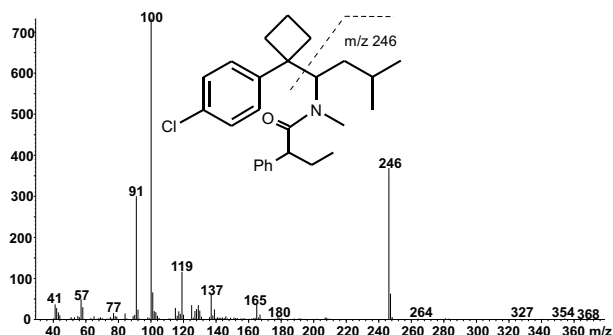


Fig. 12. MS spectrum of (*R*)-2-phenylbutyric derivative of *N*-desmethylsibutramine.

4. Summary

After performance of instrumental investigations, it was confirmed unequivocally that there had occurred a modification in the content of “herbal” slimming aids named Meizitang and LiDA. In place of sibutramine, Chinese producers had introduced *N*-desmethylsibutramine hydrochloride as the active compound, which is a metabolite of sibutramine that has stronger anorexic activity than the mother compound. This is an especially disturbing situation because, apart from the fact that the preparation ingredients listed on the packaging are incorrect and misinform customers, resulting in a threat to their health and life, this new active component is a compound whose pharmacological profile has not been examined *ad finem* and so it is potentially dangerous for consumers who are unaware of the threat.

References

1. Błachut D., Siwińska-Ziółkowska A., Kobyłecka A. [i in.], Analysing the composition of Chinese “herbal” slimming aids, *Problems of Forensic Sciences* 2006, 66, 199–211.
2. Brooks P. M., Lowenthal R. M., Chinese herbal arthritis cure and agranulocytosis, *The Medical Journal of Australia* 1977, 2, 860.
3. Cairns T, Siegmund E. G., Rader B. R., Identification of prescription drugs in adulterated Chinese herbal medicines, *Pharmaceutical Research* 1987, 4, 126–129.
4. Chan H., Yeh Y. Y., Billmeier G. J. [et al.], Lead poisoning from ingestion of Chinese herbal medicine, *Clinical Toxicology* 1977, 10, 237.
5. Fang Q. K., Senanayake C. H., Han Z. [et al.], First preparation of enantiomerically pure sibutramine and its major metabolite, and determination of their absolute configura-

- tion by single crystal X-ray analysis, *Tetrahedron-Asymmetry*, 1999, 10, 4477–4480.
6. Frazer D. B., Chinese herbal medicines – manufacturing flaws and misuse, *Forensic Science Review* 1998, 10, 68–80.
 7. Gertner E, Marshall P. S., Filandrinos D. [et al.], Complication resulting from the use of Chinese herbal medications containing undeclared prescription drugs, *Arthritis and Rheumatism* 1995, 38, 614–617.
 8. Han Z., Krishnamurthy D., Pflum D. [et al.], First practical synthesis of enantiomerically pure (R)- and (S)-desmethylsibutramine (DMS) and unambiguous determination of their absolute configuration by single-crystal X-ray analysis, *Tetrahedron-Asymmetry* 2002, 13, 107–109.
 9. Jeffery J. E., Kerrigan F., Miller T. K., [et al.], Synthesis of sibutramine, a novel cyclobutylalkylamine useful in the treatment of obesity, and its major human metabolites, *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions* 1996, 1, 2583–2589.
 10. Kang-Yum E., Oransky S. H., Chinese patent medicine as a potential source of mercury poisoning, *Veterinary and Human Toxicology* 1992, 34, 235.
 11. Myerson G. E., Myerson A. S., Miller S. B. [et al.], “Herbal medicine” mail order syndrome – A cause of hypercortisolemia, *Arthritis and Rheumatism* 1982, suppl. 4, S87.
 12. Offerhause L., Duke M. N. G., Smits H. M., “Herbal” medicines and rheumatoid arthritis, *British Medical Journal* 1979, 2, 668.
 13. Ries C. A., Sahud M. A., Agranulocytosis caused by Chinese herbal medicines; danger of medications containing aminopyrine and phenylbutazone, *Journal of the American Medical Association* 1975, 231, 352.
 14. Schaumburg H. H., Berger A., Alopecia and sensory polyneuropathy from thallium in a Chinese herbal medication, *Journal of the American Medical Association* 1992, 340, 3430.
 15. Szukalski B., Błachut D., Siwińska-Ziółkowska A. [i in.], Fałszowanie środków leczniczych: sibutramina, *Problemy Kryminalistyki* 2007, 257, 13–22.
 16. Tay C. H., Seah C. S., Arsenic poisoning from ant-asthmatic herbal preparations, *Medical Journal of Australia* 2, 424.
 17. Wróbel J. T., Preparatyka organiczna, PWN, Warszawa 1976.

Corresponding author

Dariusz Błachut
Biuro Badań Kryminalistycznych ABW
ul. 1. Sierpnia 30A
PL 02-134 Warszawa
e-mail: blachutd@op.pl

IDENTYFIKACJA *N*-DESMETYLOSIBUTRAMINY W ZIOŁOWYCH SUPLEMENTACH DIETY PRODUKCJI CHIŃSKIEJ

1. Wstęp

Proceder dodawania do produktów zielarskich substancji syntetycznych o różnym profilu oddziaływania farmakologicznego znany jest już od początku lat siedemdziesiątych dwudziestego wieku. W celu zwiększenia skuteczności preparatów pochodzenia naturalnego, wytwórcy „wzmocniali” swój produkt dodatkiem określonego leku, którego działanie korespondowało z przeznaczeniem „oryginalnego” preparatu roślinnego. W preparatach ziołowych produkcji chińskiej, zalecanych przez specjalistów medycyny naturalnej i mających przynosić ulgę w bólach pochodzenia reumatycznego, stwierdzano obecność typowych substancji przeciwbólowych, np. fenacetyny [2], paracetamolu [12], a także sterydowych (prednison, prednisolon) [11, 12] oraz niesterydowych środków przeciwzapalnych, np. diklofenaku, kwasu mefenowego, fenylbutazonu i indometacinu [3, 7, 12]. U osób zażywających preparaty zawierające fenylbutazon, który jest lekiem wycofanym z obrotu farmaceutycznego, obserwowano zmiany w obrazie krwi, a także objawy anemii aplastycznej. Stwierdzono, że obecność aminopiryny w preparatach o nazwie Chuiifong Toukuan Nan Lien, Fonsuning Tongwan, Hippo Brand Secret Formula Chui Fung Eng była bezpośrednią przyczyną licznych przypadków agranulocytozy [13].

Jako alternatywę dla syntetycznych środków uspokajających oferowano preparat w postaci pigułek o nazwie handlowej Sleeping Buddha (1998 r.). W preparacie ziołowym wytwarzanym przez firmę Treasure Box Products, Inc. (Products of China) stwierdzono obecność estazolamu [6]. Inne związki z grupy benzodiazepin: diazepam i chlorodiazepoksyd identyfikowano w preparatach o potocznej nazwie „czarna perła” pochodzących od różnych wytwórców chińskich i tajwańskich [7]. Oprócz związków organicznych, w preparatach produkcji chińskiej spotykano dodatki w postaci soli metali ciężkich. W literaturze przedmiotu znajduje się szereg doniesień o zatruciach wywołanych preparatami zawierającymi sole metali toksycznych, w tym arsenu [16], ołowiu [4], rtęci [10] i talu [14].

W każdym z powyższych przypadków wytwórca nie deklarował rzeczywistego składu swojego produktu, ograniczając się co najwyżej do wyszczególnienia składników pochodzenia roślinnego.

Od dwóch lat na rynku produktów medycyny naturalnej oferuje się preparaty mające wspomagać skutecznie proces odchudzania. W preparatach o nazwie Meizitang i LiDa stwierdzono obecność chlorowodoru sibutraminy. Sibutramina jest związkiem syntetycznym, który struk-

turalnie należy traktować jako daleką pochodną 4-chloroamfetaminy lub *N,N*-dimetyloamfetaminy. Oddziałując na układ noradrenergiczny i serotonergiczny, związek ten znajduje aktualnie zastosowanie w terapii otyłości (Meridia, Reductil). Profil analityczny sibutraminy oraz krótką charakterystykę jej właściwości farmakologicznych przedstawiliśmy w poprzednich opracowaniach [1, 15].

2. Część eksperymentalna

2.1. Cel pracy

Celem niniejszego opracowania była identyfikacja oraz przedstawienie profilu analitycznego chlorowodoru *N*-desmetylosibutraminy, nowego składnika preparatów odchudzających produkcji chińskiej.

2.2. Materiały

Wzorzec chlorowodoru sibutraminy (98,8% wag.) produkcji firmy Abbott GmbH & Co Kg (Ludwigshaen, Niemcy) otrzymano z Narodowego Instytutu Leków. Wzorce siarczanu amfetaminy, chlorowodoru metyloamfetaminy, chlorowodoru efedryny, chlorowodoru fenterminy, chlorowodoru fenfluraminy, chlorowodoru 3,4-metylenodioksyamfetaminy (MDA), chlorowodoru 3,4-metylenodioksyamfetaminy (MDMA) i chlorowodoru 3,4-metylenodioksyetyloamfetaminy (MDE) pochodziły z firmy Sigma. Ester etylowy kwasu diazokarbonylowego, *N,N*-dicykloheksylokarbodiimid, kwas (*R*)-2-fenylbutyrowy, bezwodnik kwasu octowego oraz żel krzemionkowy (70–330 Mesh) pochodziły z firmy Aldrich. Rozpuszczalniki w postaci metanolu, chlorku metylenu, chloroformu, toluenu, pirydyny i wody pochodziły z firm Fluka i Merck i posiadały klasę czystości cz.d.a. lub „HPLC grade”. Inne odczynniki pomocnicze: węgiel sodu, wodorotlenek sodu, siarczan sodu, siarczan magnezu, kwas solny oraz wodny roztwór amoniaku (25% aq.) pochodziły z firmy Merck. Toluen i pirydynę suszono i oczyszczano wg opublikowanego przepisu [17]. Chlorowodorek 4-metoksyamfetaminy (PMA) otrzymano wg opublikowanej procedury [1].

Aby donosić syntezy *N*-desmetylosibutraminy [8], do roztworu 150 mg (0,56 mM) zasady sibutraminy w 2 ml suchego toluenu dodano kroplami roztwór 150 mg (0,82 mM) estru etylowego kwasu diazodikarbonylowego (DEAD) w 3 ml toluenu. Całość mieszano magnetycznie i ogrzewano w temperaturze 55°C przez 16 go-

dzin. Po usunięciu toluenu na wyparce próżniowej, pozostałość w postaci jasnobrażowego oleju rozpuszczono w 5 ml roztworu zawierającego 2 ml 36% kwasu solnego i 3 ml etanolu. Roztwór ogrzewano do wrzenia przez 3 godziny, a następnie rozpuszczalniki odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość, którą był brązowy olej, oczyszczano metodą chromatografii kolumnowej (żel krzemionkowy, eluent chloroform: MeOH: NH₃ 94:5,5:0,5), otrzymując 85 miligramów (wydajność 60%) *N*-desmetylosibutraminy w postaci bezbarwnego oleju.

2.3. Aparatura

Analizę GC-MS *N*-desmetylosibutraminy oraz mieszaniny amin psychoaktywnych wykonano na chromatografie gazowym HP 6890 sprzężonym z detektorem mas HP 5973. Zastosowano kolumnę chromatograficzną typu HP-5-MS o długości 30 m, średnicy wewnętrznej 0,25 mm i grubości fazy 0,25 μ m. Program temperaturowy przebiegał następująco: temperatura początkowa 110°C, przyrost 10°C/min, temperatura końcowa 280°C utrzymywana przez 3 minuty. Pozostałe parametry instrumentu: opcja nastrzyku – split, podział strumienia 30:1, temperatura komory nastrzykowej $t = 250^\circ\text{C}$, gaz nosny – hel o przepływie 0,6 ml/min. Widma rejestrowano w zakresie mas 40–400 a.j.m.

Do rozdziału pochodnych diastereomerycznych *N*-desmetylosibutraminy użyto powyższego urządzenia oraz tej samej kolumny chromatograficznej. Program temperaturowy: temperatura początkowa 140°C, przyrost 15°C/min, temperatura końcowa 300°C utrzymywana przez 2 minuty. Pozostałe parametry – jak podano wyżej.

Pomiary widm IR przeprowadzono na spektrometrze podczerwieni z transformacją Fouriera firmy Bruker (Niemcy), model IFS 113v z przystawką mikroskopową. Substancję wzorcową i materiał badany nakładano na lustro, które umieszczano w polu widzenia obiektywu mikroskopu IR i mierzono widmo z rozdzielczością 4 cm^{-1} .

Widma protonowego i węglowego jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR) mierzono na urządzeniu Varian Unity Plus przy częstotliwości 500 MHz dla widm protonowych i 200 MHz dla widm węglowych. Próbkę rozpuszczano w deuterowanym chloroformie.

2.4. Metody

2.4.1. Izolacja *N*-desmetylosibutraminy

Substancję stałą koloru beżowego (łącznie 2,189 grama) pobraną z ośmiu kapsułek umieszczono w kolbie stożkowej o pojemności 100 ml, a następnie dodano 70 ml wody. Po odsączeniu części nierozpuszczalnych, klarowny i bezbarwny roztwór zalkalizowano węglanem sodu do pH 10. Roztwór wodny ekstrahowano chlorkiem

metylenu (3–40 ml). Połączone warstwy organiczne suszono bezwodnym siarczanem magnezu. Po odparowaniu rozpuszczalnika na wyparce obrotowej (temperatura łaźni wodnej 40°C) otrzymano 58 mg żółtego oleju. Otrzymaną w ten sposób surową zasadę *N*-desmetylosibutraminy oczyszczano dodatkowo metodą chromatografii kolumnowej, stosując żel krzemionkowy jako adsorbent i układ rozpuszczalnikowy chloroform: MeOH: NH₃ aq. w proporcjach 93:6, 5:0,5 jako eluent. Po odparowaniu rozpuszczalnika otrzymano 42 mg bezbarwnego oleju.

2.4.2. Procedura derywatywacji

Pochodna acetylowa – mieszaninę ok. 1 mg *N*-desmetylosibutraminy, 100 μ l bezwodnika octowego w 0,5 ml pirydyny – ogrzewano w temperaturze 120°C przez 30 min. Po ochłodzeniu nadmiar pirydyny odparowano w strumieniu azotu, a następnie do pozostałości dodano 1 ml metanolu. Całość ogrzewano w temperaturze 60°C przez 30 min. Po ochłodzeniu roztwór bezpośrednio analizowano metodą GC-MS.

Pochodna (*R*)-2-fenylobutyrowa – do 1 ml dichlorometanu zawierającego *N,N*-dicykloheksylokarbodimid o stężeniu 0,5 M, dodano 5 mg kwasu *R*-2-fenylobutyrowego. Po ok. 30 min 300 μ l powyższego roztworu dodano do 0,5 ml dichlorometanu zawierającego około 0,5 mg *N*-desmetylosibutraminy. Całość przeniesiono do naczynia reakcyjnego (*micro reaction vessel*, Supelco) i ogrzewano przez 3 godziny w temperaturze 60°C. Po ochłodzeniu mieszaninę bezpośrednio analizowano metodą GC-MS.

2.4.3. Przygotowanie materiału do analizy metodą GC-MS

Sole amin rozpuszczono w wodzie, otrzymując roztwory o stężeniu 1 mg/ml. Po pobraniu 0,5 ml roztworu wodnego odpowiedniego związku, roztwór zalkalizowano, dodając 0,2 ml 10% Na₂CO₃ w wodzie. Roztwór wodny ekstrahowano chlorkiem metylenu (0,5 ml). Po oddzieleniu warstwę organiczną suszono bezwodnym siarczanem sodu i analizowano metodą GC-MS.

3. Wyniki i dyskusja

Badaniom poddano substancję stałą koloru białego znajdującą się w ośmiu kapsułkach o długości 1,9 cm, średnicy 6 mm i o kolorze jasno- bądź ciemnozielonym. Kapsułki posiadały nadrukowany znak graficzny oraz numer 0871-8335000 w kolorze białym. Średnia masa netto kapsułki wynosiła 273,6 mg ($SD = 5,0$). Zakres mas netto kapsułek wynosił od 264,3 do 282,3 mg. Kapsułki opakowane były w tzw. „blistry” aluminiowe noszące na-

drukowane znaki graficzne w kolorze niebieskim i fioletowym oraz napis o treści „Dai Dai Hua Jiao Nang”.

Widmo IR nieznanego składnika zarejestrowano bezpośrednio w matrycy kapsułki (skrobia), zaś widmo otrzymane po ekstrakcji zasadowej charakteryzowało się obecnością pasm charakterystycznych dla chlorowodoru sibutraminy i sibutraminy w postaci zasady (rycina 1 i 2). Cechą istotną widm była obecność szerokiego pasma pochodzącego od drgań rozciągających OH, związanych z obecnością wody hydratacyjnej oraz obecność charakterystycznego układu pasm w rejonie od ok. 800 do 600 cm^{-1} typowego dla 1,4-podstawionego pierścienia aromatycznego. W przypadku widma związku nieznanego, szerokie pasmo w rejonie 2600–2800 cm^{-1} , które jest typowe dla chlorowodorów amin, było przesunięte nieznacznie w kierunku liczb falowych o wyższej wartości w porównaniu z analogicznym pasmem w widmie chlorowodoru sibutraminy. To spostrzeżenie wskazywało na obecność w strukturze związku układu aminowego innego niż trzeciorzędowy.

Analiza GC-MS wykazała obecność składnika o czasie retencji zbliżonym, ale nieco krótszym niż sibutramina. Chromatogram całkowitego prądu jonowego mieszaniny składnika nieznanego (pik numer 10, $t_r = 12,2$ min), sibutraminy, dwóch leków anorektycznych oraz kilku popularnych amin psychoaktywnych z grupy amfetaminy, przedstawia rycina 3.

Zarejestrowane widmo MS ($EI = 70$ eV) składnika charakteryzowało się podobnym, jak w przypadku sibutraminy, układem pików (rycina 4). Istotną różnicą było zmniejszenie wartości m/z każdego pików o 14 ajm. Potwierdzeniem obecności pojedynczego atomu chloru był typowy układ pików izotopowych przy wartościach m/z 264, 265, 266 i 267, co mogło odpowiadać jonowi macierzystemu o składzie $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{ClN}$ oraz produktowi utraty atomu wodoru przez ten jon. Skład cząsteczkowy $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{ClN}$ odpowiada składowi cząsteczkowemu sibutraminy pomniejszonej po odjęciu jednej grupy metylenowej. Potwierdzenie składu cząsteczkowego substancji nieznannej uzyskano po przeprowadzeniu związku w pochodną acetylową i zaobserwowaniu w widmie pochodnej pakietu pików izotopowych odpowiadających jonowi molekularnemu o masie 308 ajm, co odpowiada wzorowi cząsteczkowemu $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{ClNO}$ (rycina 5).

W celu uzyskania dodatkowych danych, które mogłyby być przydatne w rekonstrukcji struktury nieznanego związku, przeanalizowano opublikowane metody syntezy sibutraminy [5, 8, 9]. Stwierdzono, że układ leku oraz jego pochodnych może być skonstruowany w trzech zasadniczych etapach (rycina 6). Pierwszy cykl przekształceń zmierza do otrzymania układu pochodnych 4-chlorofenylocyklobutanu (A). Drugi obejmuje rozbudowę łańcucha bocznego w reakcji z halogenkami alkilomagnezowymi. W zależności od rodzaju reszty alkilowej użytego związku Gringarda, otrzymać można pochodne

sibutraminy różniące się budową bocznego łańcucha alkilowego (B). Etapem końcowym jest modyfikacja pierwszorzędowej grupy aminowej lub przekształcenie fenylcyklobutyloalkiloketonu w wyniku dowolnej reakcji redukcyjnego aminowania. Zakładając, że modyfikacja sibutraminy nastąpiła po etapie otrzymania układu 4-chlorofenylocyklobutylowego, należało oczekiwać, że zmiany struktury związku dotyczą łańcucha bocznego lub sposobu podstawienia atomu azotu.

Analizując opublikowaną drogę fragmentacji sibutraminy [9], wytypowano kilka jej pochodnych (rycina 7), dla których droga rozpadu powinna przebiegać wraz z produkcją głównych jonów obserwowanych w widmie MS związku nieznanego. Dla każdej ze struktur I–VI rozpad wiązania $\text{C}_{\text{cyclobuty}}-\text{C}$ powinien przebiegać z powstaniem intensywnego pików odpowiadającemu kationowi m/z 100. Ze względu na fakt, że nieznanemu związkowi aminowemu reagował z bezwodnikiem octowym, z rozważanej grupy struktur usunięto propozycje I i II. Zgodnie z proponowaną ścieżką fragmentacyjną dla sibutraminy [1], kation m/z 100 powinien ulegać dalszej fragmentacji przebiegającej z transferem atomu wodoru (1,3-shift) i otrzymaniem jonu parzystoelektronowego m/z 58. Tego typu przekształcenie jest niemożliwe w przypadku struktury IV, natomiast dla pochodnych III i IV dostarczyłoby jonu potomnego o wartości m/z 72. Na podstawie powyższych danych zaproponowano wstępnie dla nieznanego związku strukturę *N*-desmetylosibutraminy V.

W celu potwierdzenia tej hipotezy, związek nieznanego izolowano z matrycy kapsułek, oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej i wykonano jego widmo protonowe ^1H NMR (rycina 8 i 9) oraz węglowe ^{13}C NMR rezonansu magnetycznego (rycina 10). Sygnał przy 3,5 ppm odpowiadał grupie CH_3 związanej z atomem azotu, natomiast cztery sygnały w przedziale 0,8–1,0 ppm potwierdzają, jak w przypadku sibutraminy, obecność dwóch diasterotopowych grup metylowych w postaci układu izopropylowego. Taki obraz widma NMR wyklucza automatycznie struktury III, IV i VI. Porównanie intensywności obu sygnałów wskazuje, że z atomem azotu związana jest tylko jedna grupa metylowa, co wskazywałoby na obecność struktury V. W widmie ^{13}C NMR nieznanego składnika zaobserwowano obecność ośmiu sygnałów, co koresponduje z liczbą nierównocennych magnetycznie atomów węgla w zaproponowanej strukturze *N*-desmetylosibutraminy. Trafność przyporządkowania struktury potwierdzono syntezą *N*-desmetylosibutraminy, a następnie porównaniem danych analitycznych uzyskanych dla związku nieznanego z danymi zarejestrowanymi dla wzorca.

Skład enancjomeryczny zidentyfikowanej aminy ustalono metodą GC po przeprowadzeniu jej w pochodną diasteromeryczną w reakcji z optycznie czynnym kwasem (*R*)-2-fenylbutyrowym (rycina 11). Widmo MS otrzymanej pochodnej przedstawiono na rycinie 12.

Otrzymany wynik wskazuje, że składnik kapsułek to mieszanina racemiczna *N*-desmetylosibutraminy.

4. Podsumowanie

Po przeprowadzeniu badań instrumentalnych potwierdzono jednoznacznie, że nastąpiła modyfikacja składu „ziołowych” preparatów wspomagających odchudzanie o nazwie Meizitang i LiDA. W miejsce chlorowodoru sibutraminy producenci chińscy wprowadzili jako substancję aktywną chlorowodorek *N*-desmetylosibutraminy, która jest metabolitem sibutraminy o działaniu anorektycznym silniejszym od związku macierzystego. Jest to sytuacja podwójnie niepokojąca, gdyż oprócz faktu, że podane na opakowaniu informacje dotyczące składu preparatu są nieprawdziwe, wprowadzają nabywcę w błąd i stanowią zagrożenie dla jego zdrowia i życia, to dodatkowo nowy aktywny składnik jest związkiem o niezbadanym do końca profilu farmakologicznym, a więc związkiem potencjalnie niebezpiecznym dla nieświadomych zagrożenia konsumentów.