



DETERMINATION OF PIPERAZINE DERIVATIVES IN “LEGAL HIGHS”

Bogumiła BYRSKA, Dariusz ZUBA, Roman STANASZEK

Department of Toxicology, Institute of Forensic Research, Kraków

Abstract

The paper presents the results of the development of chromatographic methods for determination of piperazine derivatives, including 1-benzylpiperazine (BZP), 1-(3-chlorophenyl)piperazine (mCPP), N-(3-methylbenzyl)piperazine (MeBP), 1-(2-methoxy-phenyl)piperazine (MeOPP), 1-methyl-3-phenylpiperazine (MeP) and 1-(3-trifluoromethylphenyl)piperazine (TFMPP). Qualitative analysis of piperazine derivatives was carried out by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), while quantitative analysis was performed by high performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD). Mass spectra of piperazine derivatives are characteristic, which allows their identification on the basis of ions with the following m/z values: BZP – 91, 134, 176, 56; mCPP – 154, 196, 138, 57; MeBP – 105, 148, 190, 56; MeOPP – 150, 192, 135, 120; MeP – 58, 104, 176, 43; TFMPP – 188, 230, 172, 145. Optimization of HPLC conditions allowed separation of all analytes in less than 4 min (total analysis time was 9 min). Limits of quantification (LOQ) of individual compounds ranged from 0.125 g/ml to 0.5 g/ml. The HPLC method was linear over the entire range of tested concentrations. Precision and accuracy were studied at three concentration levels: 5, 20 and 50 g/ml. The values of both analytical parameters were below 4% in most cases. The developed chromatographic (GC-MS, HPLC) methods allow qualitative and quantitative analysis of piperazine derivatives in samples seized on the illicit drug market and in so-called “legal highs”.

Key words

“Legal highs”; Piperazine derivatives; GC-MS; HPLC-DAD.

Received 5 November 2009; accepted 8 January 2010

1. Introduction

Piperazine derivatives were originally used in veterinary medicine, among other things, to combat parasitic infections in poultry. Studies on their usefulness as a medication dilating blood vessels and inhibiting tumour growth were also conducted. Unfortunately, piperazine derivatives did not meet expectations in this area. What is more, their psychoactive action meant that they found their way onto the drug market. Piperazine derivatives act as stimulants at low doses, while causing hallucinations at higher doses [14]. These substances are classified as designer drugs. They are also

contained in many preparations popularly known as “legal highs”.

1-benzylpiperazine (BZP), also known as Legal E, is the most popular derivative of piperazine. This compound was synthesized for the first time in 1944 in the UK by the Wellcome Research Laboratories and it was used in veterinary medicine. Then, in the seventies, studies on its antidepressive properties were conducted [4], but their results were unsatisfactory. Moreover, it found its way onto the drug (narcotics) market as a stimulant of the central nervous system (CNS) acting similarly to amphetamine, but about 10-fold weaker. In continental Europe, the appearance of BZP on the illegal drug

market was reported for the first time in 1999 in Sweden [16]. The effects of BZP action include agitation, euphoria, increased concentration, sensitivity to external stimuli (i.e. touch, music). The mean active dose for oral administration is 75–150 mg. The duration of the effects varies depending on the ingested dose, but usually falls within 6–8 h. BZP has a very narrow margin of safety, and, depending on genetic and personal conditions, it can cause many adverse effects [7].

BZP is present on the drug market in the form of powder, capsules and tablets, which are usually sold as ecstasy or amphetamine. Therefore, purchasers do not know that they are buying a new, dangerous drug [10]. In the recent amendment of the Act on Counteracting Drug Addiction, dated 20 March 2009, BZP was added to the list of psychotropic substances and placed on schedule II-P (Act of Law of 29 July 2005 on Counteracting Drug Addiction, *Dziennik Ustaw* 2005, 179, item 1485).

1-(3-trifluoromethylphenyl)piperazine (TFMPP) is another popular derivative of piperazine. A single dose of this substance falls within the range 25–100 mg. The duration of action is 5–8 hours [5]. TFMPP is often present in combination with BZP, which enhances its action and also increases side-effects. This mixture produces effects similar to MDMA [1]. The consequences of long-term administration of compounds having piperazine structure are not entirely known, but administration of a mixture of BZP and TFMPP – a combination which occurs often – causes many side effects such as insomnia, anxiety, nausea and vomiting, persistent headaches, flu-like symptoms, periodic impotence, and sometimes psychosis [11]. Other side-effects of piperazines administration include tachycardia, hyperthermia, elevated temperature, and, in higher doses, hallucinations, convulsions and CNS depression. Long-term, uncontrolled administration of such compounds almost certainly leads not only to addiction, but also to destruction of the body, including impaired functioning of the nervous system, heart, liver and kidney. So far, no deaths caused directly by the ingestion of piperazine derivatives have been recorded. On the other hand, piperazine derivatives have been detected in blood and urine in combination with other drugs and alcohol in some fatal cases [3].

Determination of piperazine derivatives is usually performed by chromatographic methods. The most useful and widely practised method in forensic laboratories is gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). This method allows simple identification of piperazine derivatives, both with and without derivatisation. H. Maurer presented the mass spectra of BZP, MDBP, TFMPP, mCPP and MeOPP and

their trimethylsilyl derivatives obtained by GC-MS [8]. Beside GC-MS, gas chromatography with a nitrogen-phosphorus detector (NPD) has also been applied to determination of piperazine derivatives. BZP, MeOPP and TFMPP were determined in capsules by Boer et al. [2].

The GC-MS method is also often used for determination of piperazine derivatives and their metabolites in body fluids. F. Peters et al. have developed a screening method for simultaneous analysis of amphetamine derivatives and piperazine derivatives (BZP, TFMPP, mCPP, MeOPP and MDBP) in plasma [9]. The results of MeOPP and its metabolites determination in urine have been presented in a paper by Staack and Maurer [12]. Another common method used for this purpose is liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS). Results of BZP, TFMPP and their major metabolites determination by LC-MS were published by Tsutsumi et al. [15]. Elliot and Smith determined BZP and TFMPP in blood and urine by LC-MS and HPLC-DAD [3]. The authors also presented the results of determinations of structural isomers of BZP, TFMPP and CPP.

The structural isomers which cannot be distinguished by the GC-MS method can be separated by high performance liquid chromatography, using a chromatograph equipped with a UV spectrophotometric diode array detector (HPLC-DAD), due to different absorption spectra of these compounds. Zuba and Stanaszek presented the results of determinations of two isomers – pCPP and mCPP [13]. The presence of some piperazine derivatives (e.g. BZP and the structural isomers of CPP) has also been detected by immunochemical tests targeted at detection of methamphetamine [6].

Currently, benzyl- and phenyl derivatives of piperazine, such as ones shown in Figure 1, have been found alone or in combination with benzylpiperazine or other piperazine derivatives in preparations commonly known as “legal highs” [2]. Apart from BZP, which has been a controlled substance since 8th May 2009, the other substances meet the statutory definition of “a substitute”, that is a substance in any physical state, which is poisonous or harmful, and is used

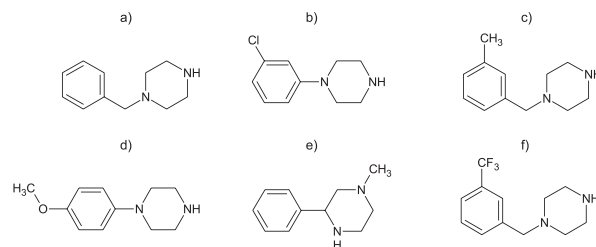


Fig. 1. Chemical structure of piperazine derivatives: a) BZP, b) mCPP, c) MeBP, d) MeOPP, e) MeP, f) TFMPP.

instead of or for the same purposes as – other than medical – a narcotic drug or a psychotropic substance. A possible response of BZP manufacturers to the ban on sale and distribution of this substance will be marketing of other piperazine derivatives, which are its structural analogues, but are not directly banned.

The purpose of the study was to develop and validate chromatographic methods for determination of synthetic derivatives of piperazine: 1-benzylpiperazine (BZP), 1-(3-chlorophenyl)-piperazine (mCPP), N-(3-methylbenzyl)piperazine (MeBP), 1-(2-methoxyphenyl)-piperazine (MeOPP), 1-methyl-3-phenylpiperazine (MeP) and 1-(3-trifluoromethylphenyl)-piperazine (TFMPP). The paper also presents the results of investigation of a wide variety of "legal highs" containing derivatives of piperazine.

2. Materials and methods

Standard solutions of six substances were used in the study. Standards of 1-benzylpiperazine dihydrochloride (BZP) and 1-(3-trifluoromethylphenyl)piperazine hydrochloride (TFMPP) were purchased from the Australian Government National Measurement Institute (Australia), 1-(3-chlorophenyl)piperazine hydrochloride (mCPP) from Sigma-Aldrich company (Germany), while N-(3-methylbenzyl)piperazine dihydrochloride (MeBP), 1-(2-methoxyphenyl)piperazine (MeOPP) and 1-methyl-3-phenylpiperazine (MeP) was purchased from LGC (Germany). All standards were solid. Acetonitrile (gradient grade for HPLC) and methanol (analytical grade) came from Merck (Darmstadt, Germany).

Qualitative analysis of piperazine derivatives was carried out by GC-MS. The study was conducted using an HP 6890N GC system gas chromatograph coupled to a 5973 Network Mass Selective Detector manufactured by Agilent (United States), which is a quadrupole mass analyzer. A 1- μ l sample was injected automatically in splitless mode. Chromatographic separation of the tested substances was performed on an HP-5MS capillary column (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m), in a temperature gradient which consisted of three segments. Initial column temperature (75°C) was maintained for 1 min, then increased linearly at the rate of 20°C/min to 275°C, and finally maintained for 9 min. The total analysis time was 18 min. Helium at a constant flow rate of 1 ml/min was used as a carrier gas. The spectrometer was operated in electron ionization mode (EI) and the electron beam energy was 70 eV. Positive ions were analyzed. Acquisition was carried

out in scan mode, and the entire mass range from 40 to 600 amu was collected.

Quantitative analysis of piperazine derivatives was performed by high-performance liquid chromatography, using a liquid chromatograph equipped with a spectrophotometric diode-array detector (HPLC-DAD). The study was conducted on an Elite LaChrom D-2000 System instrument. Chromatographic separation was carried out on a ChromolithTM RP-18e monolithic column (Merck, 5 μ m, 100 mm), in reversed-phase mode, with a mobile phase gradient. The components of the mobile phase were: a mixture of water with addition of 85% phosphoric acid(V) (100 μ l/liter) (A) and acetonitrile (B). The flow rate of the mobile phase was 1 ml/min. The total analysis time was 9 min. The elution proceeded with the following gradient: 0 min – 99% (A)/1% (B), 4 min – 40% (A)/60% (B), 5 min – 99% (A)/1% (B), 9 min – 99% (A)/1% (B). The column temperature was 40°C. An autosampler was used for sample injection, and the volume of injection was 20 μ l. The spectra of substances were recorded in the spectral range from 200 to 400 nm.

Identification and determination of piperazine derivatives in evidential samples was performed. In total, 78 tablets and capsules were examined. 0.01 g portions of tablets and capsules were weighed out in order to prepare the samples for GC-MS and HPLC-DAD analysis. In the first case, the solid drug samples were dissolved in 0.5 ml of methanol, centrifuged, and then analyzed by the GC-MS method in the worked out conditions. For HPLC analysis, the samples were dissolved in 10 ml of a mixture of methanol and water (MeOH: H₂O, 1:1, v/v), and then diluted (1:50 ratio) with water containing 85% phosphoric acid(V) (100 μ l/l H₂O).

3. Results and discussion

3.1. GC-MS method

In the applied conditions of the GC-MS method, good chromatographic separation of the tested compounds was obtained. A chromatogram of six piperazine derivatives and retention times of the corresponding peaks are shown in Figure 2. The mass spectra of piperazine derivatives are different, and this allows unambiguous identification of these compounds on the basis of major ions with m/z values given in Table I. The mass spectra of the above mentioned compounds are shown in Figure 3.

The limits of detection (LODs) for the GC-MS method were determined. A concentration causing

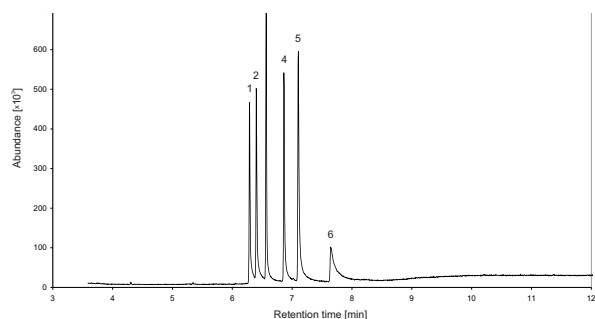


Fig. 2. Chromatogram with retention times of six piperazine derivatives obtained by GC-MS method: 1) MeP – (6,29'), 2) BZP – (6,41'), 3) TFMPP – (6,57'), 4) MeBP – (6,87'), 5) MeOPP – (7,10'), 6) mCPP – (7,65').

a detector signal three times greater than the noise ($S/N = 3$) for the three most intense ions was accepted as the *LOD*. The monitored ions (m/z) and the *LOD* values for the analysed substances for the GC-MS method are shown in Table I. The *LODs* for these six compounds were in the concentration range of 2.5–5 mg/ml. They could be lowered by using the selected ion monitoring (SIM) mode.

TABLE I. THE MONITORED IONS (M/Z) AND THE LIMITS OF DETECTION (*LOD*) FOR SIX PIPERAZINE DERIVATIVES

Substance	m/z	<i>LOD</i> [$\mu\text{g/ml}$]
MeP	58, 104, 176, 43	2.5
BZP	91, 134, 176, 56	5.0
TFMPP	188, 230, 172, 145	2.5
MeBP	105, 148, 190, 56	5.0
MeOPP	150, 192, 135, 120	5.0
mCPP	154, 196, 156, 57	5.0

A chromatogram of six piperazine derivatives obtained by HPLC-DAD is shown in Figure 4. The obtained separation of the components was satisfactory. The UV/VIS spectra of piperazine derivatives are different, and they have absorption maxima at different wavelengths. These features can be used for confirmation of the presence of a specific derivative of piperazine (Figure 5). Quantitative analysis of these compounds was performed at a wavelength of 205 nm.

3.2. Validation of HPLC method

The developed HPLC method was validated. The validation covered determination of limit of method

linearity, limits of determination and quantification (*LOQ*) as well as precision and accuracy. The values of calibration curves parameters are presented in Table II. First-degree equations were fitted to all obtained calibration relationships. The HPLC method was linear over the entire range of tested concentrations, i.e. from 5 to 100 mg/ml for all investigated compounds.

The validation parameters were calculated using Validation Manager software by Merck. The results are shown in Table III. The determined *LODs* ranged from 0.05 to 0.25 mg/ml, and the *LOQs* from 0.125 to 0.5 mg/ml. The intra- and intergroup precision were determined at three concentration levels: 5, 20 and 50 mg/ml. The measurements were conducted for 4 consecutive days, and five determinations were done for each concentration. The intra- and intergroup precision were expressed as a percent coefficient of variation (*CV*). The *CV* values of both parameters were below 5% for all tested compounds and their concentrations. These values were higher only for BZP at 5 g/ml. This could result from the fact that during elution of BZP from the column, a rapid change in composition of the mobile phase occurred. This could affect the signal repeatability, and thus the precision at such low concentrations of this compound. The relative error was assumed as a measure of accuracy. For most of the tested compounds, the differences in measurements did not exceed 5%, except BZP at concentrations of 5 g/ml.

3.3. Application of the developed chromatographic methods to determination of piperazine derivatives in evidential samples

Seventy eight samples of “legal highs” products seized on the drug market were investigated at the Institute of Forensic Research, Kraków. The results of piperazine derivatives determinations in the evidential samples are presented in Table IV.

The performed analyses indicated that one or more piperazine derivatives were contained in 18 tested capsules and 27 analysed tablets, although their presence was not declared in the product specification. The packages of several of these products bore the statement “the product does not contain benzylpiperazine” (in Polish). BZP was the sole active ingredient only in 2 tested tablets. By contrast, TFMPP was detected together with BZP in 23 tablets and 6 capsules. As can be seen, the range of concentrations of both compounds in the investigated preparations was quite broad. In some products, BZP content was substantial and TFMPP was at trace amounts, whereas in others BZP content was about two times higher than TFMPP content.

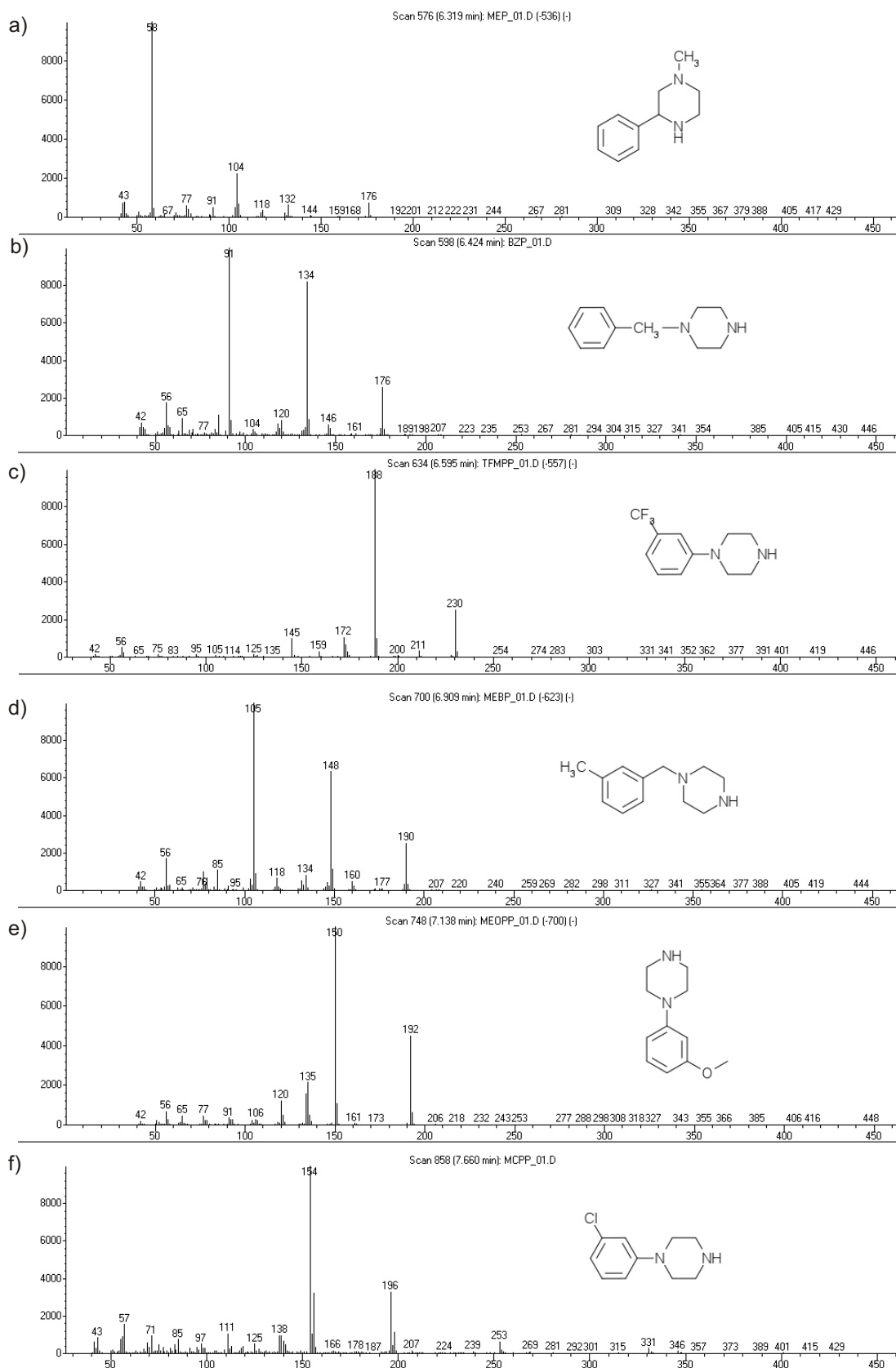


Fig. 3. Mass spectra and chemical structures of piperazine derivatives: a – MeP, b – BZP, c – TFMPP, d – MeBP, e – MeOPP, f – mCPP.

TABLE II. PARAMETERS OF CALIBRATION CURVES FOR HPLC METHOD

Parametr	MeP	BZP	TFMPP	MeBP	MeOPP	mCPP
A	111287	97951.6	142960	89104.3	297974	259835
S_a	660.7	715.6	$1.0 \cdot 10^4$	848.3	$1.8 \cdot 10^4$	601.9
B	-86268.6	7731.9	999824	39480.8	$-1.6 \cdot 10^6$	41386.9
S_b	$3.1 \cdot 10^4$	$3.3 \cdot 10^4$	$4.8 \cdot 10^5$	$4.0 \cdot 10^4$	$8.5 \cdot 10^5$	$2.8 \cdot 10^4$
R	0.9999	0.9999	0.9899	0.9998	0.9926	0.9999

a – slope, b – intercept, s_a and s_b – the errors of a and b estimation, r – correlation coefficient.

TABLE III. VALIDATION PARAMETERS FOR HPLC METHOD OF PIPERAZINE DERIVATIVES DETERMINATION

Substance concentration [$\mu\text{g/ml}$]	MeP	BZP	MeBP	MeOPP	mCPP	TFMPP
Intergroup precision ($CV_{\text{intergroup}}$) [RSD, %]						
5	1.78	1.56	1.02	0.64	0.77	1.42
20	0.27	0.37	0.18	0.09	0.10	0.14
50	0.93	1.46	0.59	0.25	0.23	0.32
Intragroup precision ($CV_{\text{intragroup}}$) [RSD, %]						
5	3.89	5.66	3.55	2.11	0.77	1.87
20	0.93	2.23	1.17	0.55	0.12	0.44
50	0.95	2.39	1.06	0.88	0.65	0.44
Accuracy (the obtained concentration; relative error (bias) [%])						
5	4.78 (-4.40)	5.50 (10.00)	5.22 (4.40)	4.86 (-2.78)	4.84 (-3.30)	4.92 (-1.57)
20	19.35 (-3.26)	20.23 (1.44)	20.02 (0.10)	20.27 (1.37)	20.08 (0.42)	19.94 (-0.32)
50	49.61 (-0.79)	50.28 (0.56)	50.18 (0.35)	50.72 (1.43)	50.58 (1.16)	50.13 (0.27)
Limits of detection (LOD) [$\mu\text{g/ml}$] and quantification (LOQ) [$\mu\text{g/ml}$]						
LOD	0.125	0.250	0.125	0.050	0.050	0.050
LOQ	0.250	0.500	0.250	0.125	0.125	0.125

However, it should be noted that the resolutions concerning these cases were issued before the entry into force of the amended act on counteracting drug addiction, that is before May 8th, 2009.

In terms of the content of other derivatives of piperazine, MeO (methoxyphenylpiperazine) was found in 2 tablets, pFPP (1-(p-fluorophenyl)piperazine) in 3 capsules, and a mixture of MeO and pFPP was contained in 6 of the tested capsules. Piperazine derivatives were not found in 23 of the examined tablets nor in 10 capsules, although the description on the packages suggested that they (may) contain this type of compound. These capsules contained, among other

things, benzophenone and diphenylprolinol, which is also often taken for recreational purposes as an agent acting similarly to amphetamine, while the tablets contained, among other things, lauroscholtzine, which is a substance of plant origin with anaesthetic properties. The presence of medicines, including mexiletine and fenfluramine, was also ascertained in the tested samples.

4. Conclusions

The developed chromatographic methods allow qualitative and quantitative analysis of piperazine de-

TABLE IV. RESULTS OF PIPERAZINE DERIVATIVES DETERMINATIONS IN EVIDENTIAL SAMPLES

Sample description	Number of samples	BZP [mg]	TFMPP [mg]	Other piperazine derivatives	Other substances
Pink tablets: "Groove Party Pills"	4	–	–	–	Lauroscholtzine
Green capsules: "Chemistry"	3	–	–	–	Benzophenone, diphenylprolinol
Blue tablets: "Mind Music"	3	–	–	–	Lauroscholtzine
Greek-white capsules: "The Big Grin"	6	–	–	MeO (methoxyphenyl-piperazine), pFPP (1-(p-fluorophenyl)-piperazine)	Caffeine, nicotinamide
Black-white tablets: "Diablo XXX"	2	241	107	–	–
Black tablets : "Crank 4 Pack Turn It Up"	4	72	0.6	–	Chavicine, caffeine
Pink tablets: "e.p.e.p. New Super Strength"	2	185	93	–	–
Pink tablets: "Mind Candy"	2	256	128	–	–
White tablets: "Doves Original"	2	124	19	–	–
White-red capsules: "Jump R18"	3	66	6	–	Nicotinamide
Red tablets: "X Extreme Energy Pills"	3	120	12	–	Nicotinamide
White tablets: "Doves"	2	–	–	–	Fenfluramine
Blue tablets: "Move Energy Pills"	4	–	–	–	Caffeine
Yellow tablets: "Hummer Energy Pills"	4	–	–	–	Caffeine
Pink tablets: "MeO Summer Pills"	2	–	–	MeO (methoxyphenyl-piperazine)	–
Blue tablets: "Mind Music"	2	–	–	–	Lauroscholtzine
Pink tablets: "Groove Party Pills"	4	–	–	–	Lauroscholtzine
Cream tablets: "Groove Party Pills"	2	49	25	–	–
Red tablets: "Diablo"	4	208	98	–	–
Red tablets: "Exotic"	2	196	98	–	Chavicine
White tablets: "Exotic"	2	3	–	–	Nicotinamide

derivatives in samples originating from the (illegal) drug market and in so-called "legal highs". The results

show that both tablets and capsules contain various derivatives of piperazine, whose presence has not been

declared on the packages, and the level of their concentration is highly diverse and unpredictable. High variability of the content of the detected substances in particular products could easily lead to poisoning without the possibility of a clear identification of its cause.

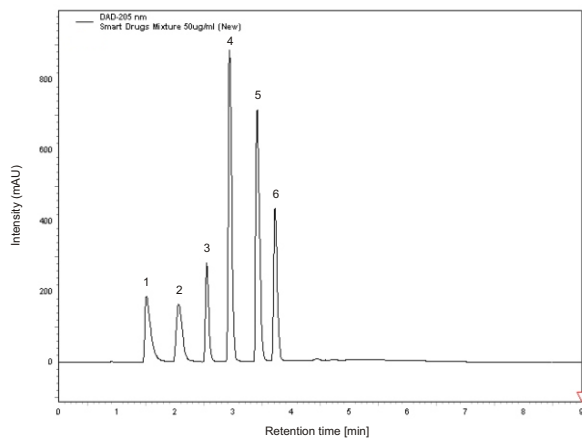


Fig. 4. Chromatogram of six piperazine derivatives obtained by HPLC with corresponding retention times: 1. MeP (1.69'), 2. BZP (2.16'), 3. MeBP (2.61'), 4. MeOPP (3.00'), 5. mCPP (3.49'), 6. TFMPP (3.79').

References

1. Bauman M., Clark R., Budzynski A. [et al.], N-substituted piperazines abused by humans mimic the molecular mechanism of 3, 4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, or "Ecstasy"), *Neuropsychopharmacology* 2005, 30, 550–560.
2. De Boer D., Bosman I.J. [et al.], Piperazine-like compounds: a new group of designer drugs-of-abuse on the European market, *Forensic Science International* 2001, 121, 47–56.
3. Elliot S., Smith C., Investigation of the first deaths in the United Kingdom involving the detection and quantitation of the piperazines BZP and 3-TFMPP, *Journal of Analytical Toxicology* 2008, 32, 172–177.
4. Gee P., Richardson S. [et al.], Toxic effects of BZP-based herbal party pills in humans: a prospective study in Christchurch, New Zealand, *Journal of the New Zealand Medical Association* 2005, 1227–1231.
5. <http://talk.hyperreal.info/thread/11282>.
6. <http://www.emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/bzp>.
7. Krawczyk W., Nowe narkotyki syntetyczne, *Problemy Kryminalistyki* 2007, 257, 5–12.

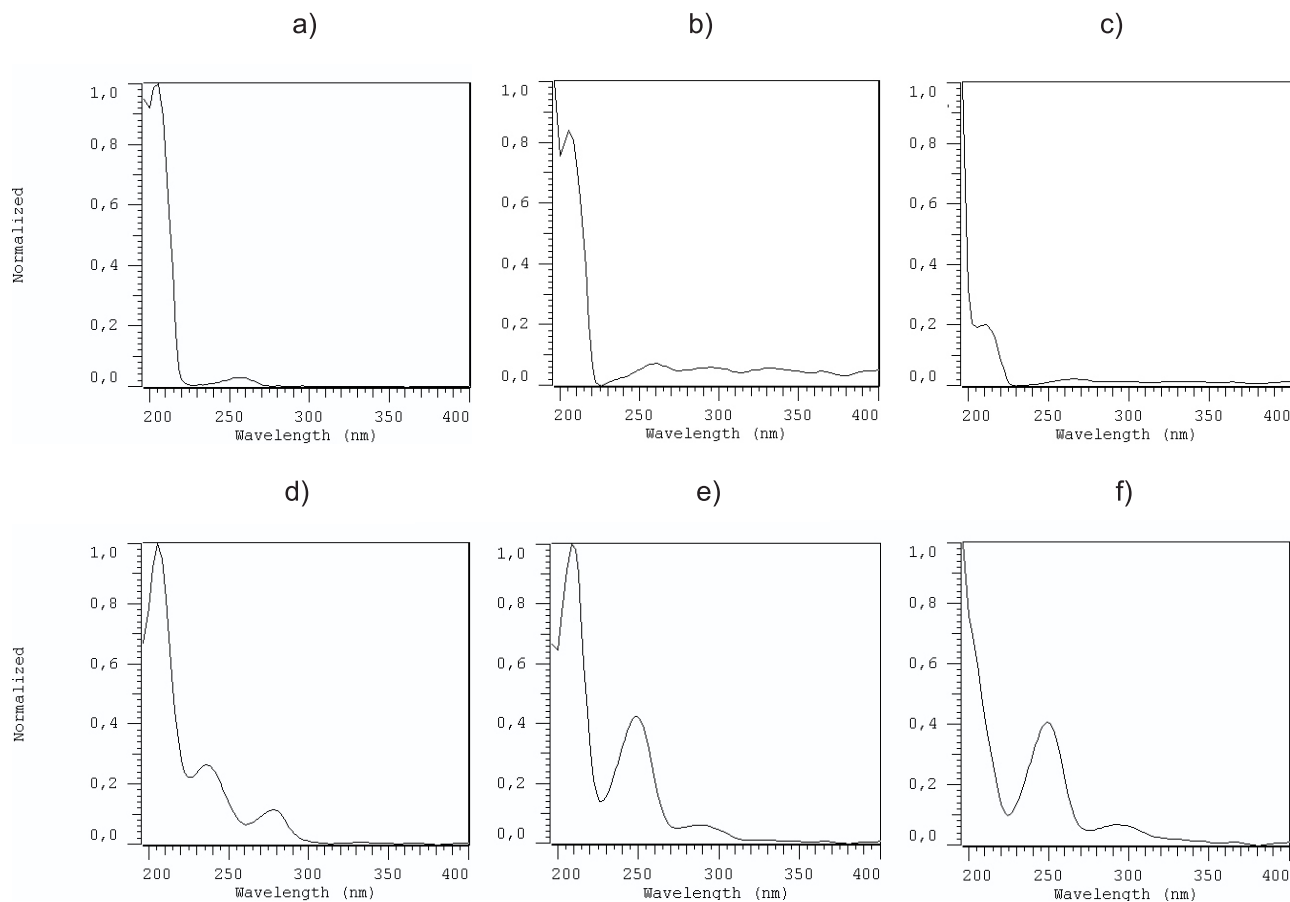


Fig. 5. UV/VIS spectra of piperazine derivatives: a) MeP, b) BZP, c) MeBP, d) MeOPP, e) mCPP, f) TFMPP.

8. Maurer H. H., Mass Spectra of Select Benzyl- and Phenyl-Piperazine Designer Drugs, *Microgram Journal* 2004, 2, 22–26.
9. Peters F. T., Schaefer S. et al., Screening for and validated quantification of amphetamine- and piperazine-derived designer drugs in human blood plasma by gas chromatography/mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry* 2003, 38, 659–676.
10. Staack R. F., Piperazine drugs of abuse, *The Lancet* 2007, 369, 9571.
11. Staack R. F., Frischi G., Maurer H. H., New designer drugs 1-(3-trifluoromethylphenyl) piperazine (TFMPP): gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/mass spectrometry studies on its phase I and II metabolism and its toxicological detection in rat urine, *Journal of Mass Spectrometry* 2003, 38, 971–981.
12. Staack R. F., Maurer H. H., Toxicological detection of the new designer drug 1-(4-methoxyphenyl)piperazine and its metabolites in urine and differentiation from an intake of structurally related medicaments using gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography B* 2003, 798, 333–342.
13. Stanaszek R., Zuba D., 1-(3-chlorophenyl)piperazine (mCPP) – a new designer drug that is still a legal substance, *Problems of Forensic Sciences* 2006, 66, 220–228.
14. Szukalski B., Pochodne piperazyny, pirolidyny, benzimidazolu i tryptaminy – nowe narkotyki zmodyfikowane, *Problemy Kryminalistyki* 2005, 249, 9–15.
15. Tsutsumi H., Katagi M. [et al.], Development of simultaneous gas chromatography-mass spectrometric and liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometric determination method for the new designer drugs, N-benzylpiperazine (BZP), 1-(3-trifluoromethylphenyl)piperazine (TFMPP) and their main metabolites in urine, *Journal of Chromatography B* 2005, 819, 315–322.
16. Wilkström M., Holmgren P., Alhner J., A2 (N-benzylpiperazine) a new drug of abuse in Sweden, *Journal of Analytical Toxicology* 2004, 28, 67–70.

Corresponding author:

Bogumiła Byrska
Instytut Ekspertyz Sądowych
ul. Westerplatte 9
PL 31-033 Kraków
e-mail: bbyrska@ies.krakow.pl

OZNACZANIE POCHODNYCH PIPERAZYNY W PRODUKTACH TYPU „DOPALACZE”

1. Wstęp

Pochodne piperazyny były początkowo wykorzystywane w weterynarii m.in. do zwalczania pasożytniczych infekcji drobiu. Prowadzono również prace badawcze nad ich przydatnością jako środków rozszerzających naczyń krwionośne oraz hamujących wzrost guzów nowotworowych. Nie spełniły one jednak oczekiwań w tym zakresie, trafiły natomiast na rynek narkotykowy ze względu na właściwości psychoaktywne. W małych dawkach działają stymulująco, w większych wywołują halucynacje [14]. Substancje te zalicza się do tzw. narkotyków projektowanych (ang. designer drugs). Wchodzą one również w skład wielu preparatów zwanych potocznie dopalaczami.

Najbardziej popularną pochodną piperazyny jest 1-benzylopiiperazyna (BZP), znana również pod nazwą Legal E. Związek ten zsyntetyzowano po raz pierwszy w roku 1944 w Wielkiej Brytanii i stosowano w weterynarii, potem w latach siedemdziesiątych dwudziestego wieku prowadzono badania pod kątem jego właściwości przeciwdepresyjnych [4]. Nie spełnił on jednak oczekiwań w tym zakresie, znalazł się natomiast na rynku narkotykowym jako środek stymulujący ośrodkowy układ nerwowy (OUN), działający podobnie do amfetaminy, jednak około 10-krotnie słabszy. W Europie kontynentalnej po raz pierwszy odnotowano pojawienie się BZP na rynku narkotykowym w 1999 roku w Szwecji [16]. Efekty działania BZP obejmują pobudzenie, euforię, zwiększenie koncentracji, wyczerpanie na bodźce zewnętrzne (tj. dotyk, muzykę). Średnia dawka aktywna po podaniu doustnym wynosi 75–150 mg. Czas trwania efektów waha się w zależności od przyjętej dawki, ale zwykle mieści się w granicach 6–8 godzin. BZP ma bardzo wąski margines bezpiecznego zażywania i w zależności od uwarunkowań genetycznych i osobowych może wywoływać wiele negatywnych skutków [7].

BZP występuje na rynku narkotykowym w postaci proszku, kapsułek i tabletek sprzedawanych najczęściej jako ekstazy lub amfetamina – więc nabywcy nie wiedzą, że kupują nowy, niebezpieczny narkotyk [10]. Ostatnia nowelizacja Ustawy O przeciwdziałaniu narkomanii z dnia 20 marca 2009 roku spowodowała, że BZP została uznana za substancję psychotropową z grupy II-P (Ustawa z dnia 29 lipca 2005 r. O przeciwdziałaniu narkomanii, *Dziennik Ustaw* 2005, 179, 1485). Inną popularną pochodną piperazyny jest 1-(3-trifluorometylofenylo)piiperazyna (TFMPP). Jednorazowa dawka tej substancji mieści się w granicach 25 do 100 mg. Czas jej działania wynosi 5–8 godzin [5]. TFMPP często występuje w połą-

czeniu z BZP, wzmacnia jej działanie i jednocześnie nasila efekty uboczne. Taka mieszanina wywołuje efekty podobne do MDMA [1]. Następstwa wieloletniego przyjmowania związków o strukturze piperazyn nie są całkowicie zbadane, ale już dzisiaj wiadomo, że występująca często mieszanina BZP i TFMPP powoduje wiele efektów ubocznych, takich jak bezsenność, niepokój, mdłości i wymioty, uporczywe bóle głowy, objawy grypopodobne, okresowa impotencja, a także niekiedy psychozy [11]. Przyjmowaniu związków o charakterze piperazyn towarzyszy także tachykardia, hipertermia i podwyższona temperatura, a wyższe dawki wywołują halucynacje, drgawki i depresję OUN. Przy długotrwałym i niekontrolowanym przyjmowaniu tego typu związków niemal pewne jest nie tylko uzależnienie, ale również wyniszczenie organizmu, łącznie z zaburzeniem funkcjonowania układu nerwowego oraz pracy serca, wątroby i nerek. Dotychczas nie zanotowano zgonów, których bezpośrednią przyczyną byłoby zażycie pochodnych piperazyny. Obserwowano jednak przypadki zgonów, po których we krwi i moczu wykrywano, oprócz innych narkotyków i alkoholu, również pochodne piperazyny [3].

Oznaczanie pochodnych piperazyny najczęściej jest prowadzone przy zastosowaniu metod chromatograficznych. Najbardziej użyteczną i najczęściej używaną metodą w laboratoriach sądowych jest chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrem mas (GC-MS). Metoda ta umożliwia łatwą identyfikację zarówno derywatyzowanych pochodnych piperazyny, jak również bez przeprowadzania procesu derywatyzacji. H. Maurer przedstawił widma masowe uzyskane metodą GC-MS dla BZP, MDBP, TFMPP, mCPP i MeOPP oraz ich trimetylosilolowych pochodnych [8]. Oprócz techniki GC-MS do oznaczania pochodnych piperazyny stosowano również chromatografię gazową z detektorem azotowo-fosforowym (NPD). Boer i inni oznaczali tą metodą BZP, MeOPP i TFMPP w kapsułkach [2].

Metoda GC-MS jest również często stosowana do oznaczania pochodnych piperazyny i ich metabolitów w płynach ustrojowych. Peters F. i inni opracowali metodę do skryningowej i jednoczesnej analizy pochodnych amfetaminy oraz pochodnych piperazyny (BZP, TFMPP, mCPP, MeOPP i MDBP) w osoczu [9]. Staack i Maurer przedstawili w swojej pracy wyniki oznaczania MeOPP i jej metabolitów w moczu [12]. Drugą rozpowszechnioną metodą wykorzystywaną do tego celu jest chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (LC-MS). Tsutsumi i inni zaprezentowali wyniki oznaczeń BZP i TFMPP oraz ich głównych metabolitów metodą LC-MS [15]. Elliot i Smith oznaczali zawartość poziomów stężeń

BZP i TFMPP we krwi i moczu metodą LC-MS i HPLC-DAD [3]. Autorzy w swojej pracy przedstawili również wyniki oznaczeń izomerów strukturalnych BZP, TFMPP i CPP.

Izomery strukturalne, których nie można rozróżnić przy zastosowaniu techniki GC-MS, mogą być rozróżniane przy zastosowaniu metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej przy użyciu chromatografu wyposażonego w detektor spektrofotometryczny UV z szeregiem diod (HPLC-DAD), ze względu na zróżnicowane widma absorpcji tych związków. Zuba i Stanaszek przedstawili wyniki oznaczeń dwóch izomerów – mCPP i pCPP [13].

Obecność niektórych pochodnych piperazyny (m.in. BZP i izomerów strukturalnych CPP) jest wykrywana również przy zastosowaniu testów immunochemicznych, celowanych na obecność metamfetaminy [6].

Obecnie benzylo- i fenylo pochodne piperazyny, takie jak przedstawione na rycinie 1, występują pojedynczo lub w kombinacjach z benzylopiperazyną lub innymi pochodnymi piperazyny w preparatach popularnie zwanych dopalaczami [2]. Oprócz BZP, która od 8 maja 2009 roku znajduje się na liście substancji kontrolowanych, pozostałe substancje odpowiadają ustawowej definicji środka zastępczego, czyli substancji w każdym stanie fizycznym, która jest trucizną lub środkiem szkodliwym, używaną zamiast lub w takich samych celach, innych niż medyczne, jako środek odurzający lub substancja psychotropowa. Reakcją producentów na zakaz sprzedaży i dystrybucji benzylopiperazyny będzie zapewne wprowadzenie na rynek pochodnych piperazyny, będących jej strukturalnymi analogami, które nie podlegają bezpośredniej kontroli.

Celem pracy było opracowanie i walidacja chromatograficznych metod oznaczania syntetycznych pochodnych piperazyny: 1-benzylopiperazyny (BZP), 1-(3-chlorofenylo)-piperazyny (mCPP), N-(3-metylobenzylo)piperazyny (MeBP), 1-(2-metoksyfenylo)-piperazyny (MeOPP), 1-metylo-3-fenylo-piperazyny (MeP) i 1-(3-trifluorometylofenylo)-piperazyny (TFMPP). W pracy przedstawiono również wyniki badań szerokiej grupy produktów typu „dopalacze” zawierających pochodne piperazyny.

2. Materiały i metody

W badaniach wykorzystano wzorce 6 substancji. Wzorce dwuchlorowodoru 1-benzylopiperazyny (BZP) i chlorowodoru 1-(3-trifluorometylofenylo)piperazyny (TFMPP) zostały zakupione w firmie Australian Government National Measurement Institute (Australia), natomiast chlorowoderek 1-(3-chlorofenylo)piperazyny (mCPP) w firmie Sigma-Aldrich (Niemcy). Dwuchlorowoderek N-(3-metylobenzylo)piperazyny (MeBP) i 1-(2-metoksyfenylo)-piperazyny (MeOPP) oraz 1-metylo-3-fenylo-piperazyna

(MeP) zostały zakupione w firmie LGC (Niemcy). Wszystkie wzorce były w postaci substancji stałych. Acetonitryl (*Gradient Grade for HPLC*) i metanol (*analytical grade*) pochodziły z firmy Merck (Darmstadt, Niemcy).

Analizę jakościową pochodnych piperazyny przeprowadzono metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS). Badania prowadzono, wykorzystując chromatograf gazowy serii HP 6890 N GC System sprzężony ze spektrometrem mas 5973 Network Mass Selective Detektor firmy Agilent (Stany Zjednoczone), będącym kwadrupolowym analizatorem mas. Próbkę w ilości 1 µl dozowano automatycznie, systemem bez podziału. Chromatograficzny rozdział badanych substancji prowadzono na kolumnie kapilarnej HP-5MS (30 m 0,25 mm 0,25 m) przy zastosowaniu programu temperaturowego, który składał się z trzech segmentów. Temperatura początkowa kolumny (75°C) była utrzymywana przez 1 min, następnie wzrastała liniowo z szybkością 20°C/min do 275°C i pozostawała niezmienną przez 9 min. Całkowity czas analizy wynosił 18 min. Jako gaz nośny stosowano hel o stałej szybkości przepływu wynoszącej 1 ml/min. Spektrometr pracował w elektronowym trybie jonizacji (EI), a energia wiązki bombardujących elektronów wynosiła 70 eV. Analizowano jony dodatnie. Akwizycję prowadzono w trybie skanowania całego zakresu mas, od 40–600 amu.

Analizy ilościowej pochodnych piperazyny dokonano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej, stosując chromatograf cieczowy wyposażony w detektor spektrofotometryczny z szeregiem diod (HPLC-DAD). Do badań wykorzystano aparat Elite LaChrom D-2000 System. Rozdział chromatograficzny przeprowadzono na kolumnie monolitycznej Chromolith RP-18e (Merck, 5 m, 100 mm) w odwróconym układzie faz, przy gradientowej zmianie składu fazy ruchomej. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina wody z dodatkiem 85% kwasu fosforowego(V) (100 l/litr) (A) oraz acetonitrylu (B). Przepływ fazy ruchomej wynosił 1 ml/min, a całkowity czas analizy 9 min. Elucja przebiegała w następujących warunkach gradientowych: 0 min – 99% (A)/1% (B), 4 min – 40% (A)/60% (B), 5 min – 99% (A)/1% (B), 9 min – 99% (A)/1% (B). Temperatura kolumny wynosiła 40°C. Dozowanie próbki na kolumnę odbywało się przez automatyczny podajnik próbek. Objętość próbki наносzonej na kolumnę wynosiła 20 µl. Widma substancji rejestrowano w zakresie spektralnym od 200 do 400 nm.

Przeprowadzono identyfikację i oznaczenia zawartości pochodnych piperazyny w próbkach dowodowych. Łącznie poddano badaniom 78 tabletek i kapsułek, z których pobrano naważki o masie 0,01 g w celu przygotowania próbek do analizy metodą chromatografii gazowej i wysokosprawnej chromatografii cieczowej. W pierwszym przypadku stałe próbki narkotyków rozpuszczano w 0,5 ml metanolu i odwirowywano, a następnie poddano analizie GC-MS w warunkach opracowanej metody. Do

analizy metodą HPLC próbki rozpuszczano w 10 ml mieszaniny metanolu z wodą (MeOH : H₂O, 1:1, v/v), a następnie rozcieńczano (w stosunku 1:50) wodą z dodatkiem 85% kwasu fosforowego(V) (100 l/l H₂O).

3. Wyniki i dyskusja

3.1. Metoda GC-MS

W zastosowanych warunkach metody GC-MS uzyskano dobry rozdział chromatograficzny badanych związków. Na rycinie 2 przedstawiono chromatogram sześciu pochodnych piperazyny oraz czasy retencji pików im odpowiadających. Widma masowe pochodnych piperazyny różnią się między sobą, co pozwala na jednoznaczna identyfikację tych związków na podstawie głównych jonów o *m/z* podanych w tabeli I. Widma masowe ww. związków przedstawiono na rycinie 3.

Wyznaczono granice wykrywalności dla metody GC-MS. Za granicę wykrywalności przyjęto stężenie wywołujące sygnał detektora trzykrotnie większy niż wysokość szumów (*S/N* = 3) dla trzech najbardziej intensywnych jonów. W tabeli I przedstawiono monitorowane jony (*m/z*) oraz wartości granic wykrywalności metody GC-MS chromatografowanych substancji. Granice wykrywalności dla tych sześciu związków mieściły się w zakresie stężeń od 2,5–5 g/ml. Mogą one zostać obniżone poprzez zastosowanie trybu monitorowania wybranych jonów (SIM).

Na rycinie 4 przedstawiono chromatogram sześciu pochodnych piperazyny otrzymany metodą HPLC-DAD. Uzyskano zadawalający rozdział poszczególnych składników. Widma UV/VIS pochodnych piperazyny różnią się między sobą i wykazują maksimum absorpcji przy różnych długościach fal, co można wykorzystać do potwierdzenia obecności konkretnej pochodnej piperazyny (rycina 5). Analizy ilościowe tych związków prowadzono dla długości fali równej 205 nm.

3.2. Walidacja metody HPLC

Opracowaną metodę HPLC poddano walidacji, w ramach której wyznaczono zakres liniowości metody, granice oznaczalności i wykrywalności oraz precyzję i dokładność. W tabeli II przedstawiono wartości parametrów krzywych kalibracyjnych. Dla wszystkich otrzymanych zależności kalibracyjnych dopasowano równania I-go stopnia. Metoda HPLC zachowywała liniowość w całym zakresie badanych stężeń, tj. od 5 do 100 g/ml dla wszystkich badanych związków.

Do obliczenia parametrów walidacyjnych wykorzystano program Validation Manager firmy Merck. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli III. Wyznaczone granice wykrywalności mieściły się w zakresie 0,05–0,25 g/ml,

natomiast granice oznaczalności w zakresie 0,125–0,5 g/ml. Precyzję wewnątrz- i zewnątrzgrupową wyznaczono na trzech poziomach stężeń wynoszących 5, 20 i 50 g/ml. Oznaczenia prowadzono przez 4 kolejne dni, wykonując po pięć oznaczeń każdego ze stężeń. Precyzję wewnątrz- i zewnątrzgrupową wyrażono jako procentowy współczynnik zmienności (*CV*). Dla wszystkich badanych związków oraz wszystkich badanych stężeń wartości *CV* dla obu parametrów wynosiły poniżej 5%. Jedynie dla BZP na poziomie stężenia 5 g/ml wartości te były wyższe. Mogło to być wynikiem tego, że w czasie wymywania BZP z kolumny następowała szybka zmiana składu fazy ruchomej, co mogło wpływać na powtarzalność sygnału, a co za tym idzie, precyzję oznaczeń tak niskich stężeń tego związku. Jako miarę dokładności przyjęto błąd względny. Dla większości badanych związków różnice w wynikach pomiarowych nie przekraczały 5% z wyjątkiem BZP na poziomie stężenia 5 g/ml.

3.3. Zastosowanie opracowanych metod chromatograficznych do oznaczania pochodnych piperazyny w próbkach dowodowych

W Instytucie Ekspertyz Sądowych przebadano 78 próbek w związku z pojawieniem się na rynku narkotycznym produktów typu „dopalacze”. Wyniki oznaczeń pochodnych piperazyny w próbkach dowodowych przedstawiono w tabeli IV.

Przeprowadzone analizy wykazały, że 18 badanych kapsulek i 27 badanych tabletek zawierało jedną lub więcej pochodnych piperazyny, mimo że ich obecność nie była deklarowana w opisie produktu. Na opakowaniach niektórych z nich była zamieszczona informacja w języku polskim „produkt nie zawiera benzylopiperazyny”. Tylko w dwóch badanych tabletkach BZP było jedynym składnikiem aktywnym. Natomiast w 23 tabletkach i 6 kapsułkach oprócz BZP wykryto również TFMPP. Jak można zauważyć, zakres stężeń obu związków w badanych preparatach był dość szeroki. Obserwowano przypadki, w których – przy znacznej zawartości BZP – TFMPP znajdowało się w śladowych ilościach, jak i takie, w których zawartość BZP była około dwukrotnie wyższa niż zawartość TFMPP. Zdarzało się również, że zawartości obu związków były praktycznie identyczne. Należy jednak zaznaczyć, że postanowienia w tych sprawach zostały wydane przed wejściem w życie znowelizowanej Ustawy O przeciwdziałaniu narkomanii, a więc przed 8 maja 2009 roku.

Spośród innych pochodnych piperazyny 2 tabletki zawierały MeO (metoksyfenilo-piperazynę), 3 kapsułki zawierały pFPP (1-(p-fluorofenilo)piperazynę), a 6 badanych kapsulek zawierało mieszaninę MeO i pFPP. 23 tabletki i 10 kapsulek nie zawierało pochodnych piperazyny, jakkolwiek opisy na opakowaniach sugerowały, że

mogą zawierać tego typu środki. W kapsułkach tych wykryto m. in. benzofenon i difenyloprolinol, który również bywa przyjmowany w celach rekreacyjnych jako środek działający podobnie do amfetaminy. W tabletkach stwierdzono natomiast obecność m.in. laurosoltzyny – substancji pochodzenia roślinnego o właściwościach znieczulających. Badane próbki zawierały również leki, m.in. meksyletynę i fenfluraminę.

4. Wnioski

Opracowane metody chromatograficzne pozwalają na przeprowadzenie analizy jakościowej i ilościowej pochodnych piperazyny w próbkach pochodzących z nielegalnego rynku narkotykowego i tzw. dopalaczy. Wyniki badań pokazują, że zarówno tabletki, jak i kapsułki zawierają różne pochodne piperazyny, których obecność nie była deklarowana na opakowaniach, a poziom ich stężeń jest wysoce różnorodny i nieprzewidywalny. Duża zmienność zawartości wykrytych substancji w poszczególnych produktach powoduje, że łatwo może dojść do przypadków zatruc bez możliwości jednoznacznej identyfikacji przyczyny.