

TOXICOLOGICAL INVESTIGATIONS IN DRUG-FACILITATED SEXUAL ASSAULT

Adam NEGRUSZ, Robert E. GAENSSLEN

College of Pharmacy, University of Illinois, Chicago

ABSTRACT: We present a general overview of the drug-facilitated sexual assault phenomenon in the United States sexual abuse of both women and men, while under the influence of so-called “date-rape” drugs, has been the focus of many investigations. Throughout the 1990s, an alarming increase in anecdotal reports of this crime as well as in the number of scientific publications on drug-facilitated sexual assault has been observed. Reported “date-rape” drugs include flunitrazepam with other benzodiazepines such as diazepam, temazepam, clonazepam, oxazepam, and also GHB, ketamine, scopolamine, and many others. We describe the most recent analytical developments in the toxicological investigation of drug-facilitated rape to confirm the presence of the drug and to help successfully prosecute the perpetrator.

KEY WORDS: Date-rape; Date-rape drugs; Drug-facilitated sexual assault; Forensic science; Forensic toxicology; Drug metabolism; Analytical methods; NCI–GC/MS.

Z Zagadnień Nauk Sądowych, z. XLI, 2000, 7–26

Received 8 May 2000; accepted 17 May 2000

In the past few years, considerable information about so-called “date-rape drugs” and drug-facilitated sexual assault has accumulated; at the same time an increase in the number of scientific publications on the subject has been observed [11, 12, 13, 20, 24, 36]. In a typical scenario, a sexual predator surreptitiously spikes the drink of an unsuspecting person with a sedative drug for the purpose of “drugging” and subsequently sexually assaulting the victim while under the influence of this substance. Victims, both women and men, usually report loss of memory during and after these incidents, they may sometimes wake up in unfamiliar places, inappropriately dressed and often with the sense but not the actual recollection of having had sex. Incidents of this type have prompted federal legislation. There is some evidence too [37] that some of these drugs may be employed recreationally, and that sexual assaults can occur while a person is under their influence. These cases too are drug-facilitated sexual assaults, even though the drug may not have been surreptitiously administered to the victim by the perpetrator.

There were approximately 93 000 reported cases of sexual assault in the US in 1998 [14], the latest year for which data have been published. This number represents a rate of about 34 per 100 000 persons. Both the number

and the rate of reported rapes have been declining throughout most of the 1990s. It is also well known that the number of reported rapes is significantly lower than the actual number. In that same year, 1998, for example, the Bureau of Justice Statistics estimates that there were 330 000 sexual assaults, more than three times the number actually reported [35].

At present, there are no reliable data or estimates on the fraction of sexual assaults – actual or reported – that involve “date-rape” drugs.

The best known but by no means the only “date-rape” drug is Rohypnol® (flunitrazepam). Abuse of this drug in the US was first reported in Florida to the Community Epidemiology Working Group in 1993. According to the US Drug Enforcement Administration (DEA), the drug has been commonly seized by law enforcement authorities along the US southern border. Because of easy access to the Mexican border, the Texas-Florida Rohypnol Response Group was formed in New Orleans in 1994, and in 1995 it identified a “flood” of Roche products entering the US at Laredo, Texas. The problem was so great, the Group recommended closing the border. Also in 1995, Dade County (FL) initiated a flunitrazepam impairment detection program, and in 1996, US Customs, the Food and Drug Administration (FDA) and the DEA banned the importation of flunitrazepam. President Clinton even mentioned flunitrazepam in his new Federal Drug Strategy in April, 1996. The number of state and local law enforcement cases involving flunitrazepam documented as of May 5, 1996 (compiled by Dr. James Tolliver, Drug & Chemical Evaluation Section, Office of Division Control, DEA) showed that, of the 2264 total cases reported, the highest number were in Texas (1084; 47.9%), followed by Florida (741; 32.7%), Louisiana (150; 6.6%), Arizona (84; 3.7%) and Oklahoma (82; 3.6%). Florida and Texas alone accounted for over 80% of the reported cases. Of these cases, the vast majority involved sexual assault.

Flunitrazepam (Rohypnol® – Roche), 5-(2-fluorophenyl)-1,3-dihydro-1-methyl-7-nitro-2H-1,4-benzodiazepin-2-one), belongs to the 7-nitro group of benzodiazepines [26]. Its hypnotic effect predominates over the sedative, anxiolytic and muscle-relaxing effects of other compounds from the same pharmacological group. Flunitrazepam is available in oral tablets and in injectable form [1] in about 80 countries around the world. Flunitrazepam has much stronger affinity for the GABA receptor than diazepam (Valium®). In fact, it is 10 times as potent as diazepam [1, 26]. Flunitrazepam is readily (80–90%) absorbed through the GI tract and metabolized almost completely by the liver. Its metabolism includes reduction to 7-aminoflunitrazepam and then to the N-glucuronide, demethylation to the N-demethyl metabolite, hydrolysis to the 3-OH metabolite and then to the O-glucuronide [4, 12, 26]. Approximately 90% of its metabolites are excreted through the urine and 10% in the faeces [12, 26]. Deaths involving flunitrazepam have oc-

curred in conjunction with other CNS depressants, such as ethanol, but also due to overdose of flunitrazepam alone [10].

The first seizure of Rohypnol[®] in the US took place in 1989, and reports of the misuse of the drug have increased since then [39, 40]. Flunitrazepam is often used to enhance the effects of heroin, alcohol or marijuana [40]. In 1999, Rickert et al. [37] presented results of a cross-sectional survey of 904 sexually active women 14 to 26 years of age in Texas. In this group, 5.9% admitted using flunitrazepam voluntarily one or more times, 7.5% of those who used flunitrazepam reported using it 10 to 19 times, and 11% reported using it 20 or more times. The authors of this study noted that 10% of voluntary users reported subsequent physical or sexual victimisation. In a recent paper, Raymon et al. reported significant involvement of flunitrazepam (among other benzodiazepines) in driving under the influence cases in South Florida between 1995 and 1998 [34]. Rohypnol[®] tablets are smuggled into the US (mainly from Mexico) and sold with street names like: roofies, rophies, roopies, rib, rope, pappas, peanuts, pastas, forget pills, ro-shays, roaches, roche 2 [40]. In the early 1990s flunitrazepam was identified as the drug of choice in drug-facilitated sexual assault [5, 39, 40]. As of 1996, the prescription, sale, and importation of flunitrazepam into the US has been banned. With specific regard to the use of flunitrazepam in rape cases, the "Drug-Induced Rape Prevention and Punishment Act of 1996" was created, setting maximum punishment for a person who, with criminal intent, distributes a controlled substance to an individual without that individual's knowledge, at up to 20 years in prison [33].

Other drugs that have been implicated in sexual assault include gamma-hydroxybutyrate (GHB) [9, 24, 27], ketamine [24, 40], scopolamine, barbiturates, muscle relaxants such as carisoprodol, cyclobenzaprine, and meprobamate, diphenhydramine, clonazepam, and occasionally other benzodiazepines [24]. Clonazepam is a benzodiazepine which exhibits many of the characteristic pharmacologic properties of the class. It has been shown to decrease seizure activity, reduce anxiety, induce muscle weakness and even induce sleep or hypnosis. Because of these effects, clonazepam has been identified as a potential date rape drug [1, 5, 24] and has been classified by DEA as a Schedule IV substance. It has been approved by the Food and Drug Administration only for use in the treatment of seizures. However, physicians are also using clonazepam in the treatment of anxiety, mania, panic disorders, and schizophrenia because of its sedative and anxiolytic properties [1]. It is available in tablets containing 0.5 mg, 1 mg, and 2 mg clonazepam under the trade names Klonopin[™], Clonex, Iktorivil, and Rivotril. In a previously mentioned paper, Raymon et al. reported a significant rise in clonazepam involvement in DUI cases in Florida after 1998 [34].

GHB is sold on the streets under the following names: salty water, scoop, soap, liquid X, natural sleep-500, liquid ecstasy. It is used in date rape because it is effective rapidly, is relatively easy to manufacture and obtain, and presumably has aphrodisiac properties. Possession, sale and clandestine manufacturing of GHB are illegal. Twenty states in the US have already controlled GHB.

All drugs used in drug-facilitated sexual assault have depressant effects on their users. Symptoms reported by victims of alleged drug-facilitated rape include confusion, decreased heart beat, dizziness, drowsiness, impaired judgement, impaired memory, lack of muscle control, loss of consciousness, nausea, reduced blood pressure and reduced inhibition [24]. All these effects can be synergistically enhanced if the drug is taken with alcohol. In addition, however, they induce amnesia, presumably the principal reason for their selection as “date-rape” drugs.

In 1996, there were 95 770 reported rapes in the US according to FBI Uniform Crime Report data as summarised in the Statistical Abstract of the United States [18]. The fraction of these incidents that may have been facilitated by the clandestine administration of drugs to the victim is unknown. The only published data directly relevant to the incidence issue [13] is based on analysis of 1179 urine specimens from a random collection of cases submitted by forensic science/ toxicology labs nation-wide to the investigators, specifically in order to screen for and identify alcohol and “date-rape” and other drugs. Approximately 60% of all samples tested were positive for one or more drugs. GHB was detected in about 4%, and flunitrazepam in about 0.5% of these specimens. About 8.2% of the specimens had confirmed benzodiazepines of some kind, but flunitrazepam was seen only at low levels. This data does not square with the “anecdotal evidence”, which would have us believe that drug-facilitated acquaintance rape is common. In addition, the limit of detection of the electron ionisation gas chromatography – mass spectrometry (EI-GC/MS) method used for detecting the “date-rape” drugs and their metabolites was 1 ng/ml and did not provide enough sensitivity to detect these drugs in urine after a single dose, suggesting that some specimens may have been positive, but below the investigators’ detection limits. In addition, as noted, the data cannot be readily extrapolated to reflect incidence because a statistically based systematic sampling procedure was not employed, nor is it clear how the originating laboratories selected the cases for submission in the first place.

The fact that drug-facilitated sexual assault cases require toxicological analysis in addition to the usual forensic biological examinations and DNA typing that are routine in most sexual assault cases is novel in US forensic science labs. Accordingly, specimens specifically for drug analysis will need to be collected from complainants, in turn requiring changes in sexual as-

sault evidence collection kits and protocols. Blood has typically been collected for blood typing or DNA type, but not for toxicology. Recently, many sexual assault protocols have gone to collecting a small bloodstain, or a buccal swabbing. Neither of these would serve the forensic toxicologist's purpose. It has also been fairly standard procedure to collect head hair specimens from sexual assault complainants for possible microscopical hair comparisons. Such a specimen likewise is not useful for toxicological analysis, in part because it is collected too soon after the incident (assuming prompt reporting) to be of value, and because the quantity of hair is insufficient as a rule. A large, representative group of forensic toxicologists has recently addressed this matter in a general way [24]. It is clear that changes in protocols and kits will be required. These changes may be made somewhat more difficult by the fact that many of the states have their own sexual assault evidence collection kits, and the procedures for changing the protocols and kits can be somewhat involved.

Many drug-facilitated sexual assault victims do not report the incident until several days after the event. The reason for this can be a combination of emotions characteristic of sexual assault victims (including embarrassment, fear, rejection, denial, mistrust in authorities), but often it is the amnesia caused by the drug. It is, therefore, very important to determine how long after a single dose (as would be expected in a drug-facilitated sexual assault) biological samples could be collected from the victim to confirm the illegal drug's presence and possibly help illuminate what happened in the case and successfully prosecute the perpetrator. As noted above, there is evidence that the "date-rape" drugs are recreationally abused [5, 19, 20, 36, 37, 39]. Most of the published information concerns flunitrazepam [37]. There is little doubt that drug and/or alcohol use among young women constitute significant risk factors for sexual assault [19, 20, 37, 40]. From the standpoint of prosecuting the crime *post facto*, however, the known recreational use of the same drugs that can be used to "facilitate" the rape of a woman without her knowledge can be an obstacle. Because of the amnesiac effects of these drugs, victims are often unable to provide good witness accounts of the assaults. The only evidence against the accused might then be identification as the semen depositor by DNA typing. He can then claim the sex was consensual. He may not even deny having sexual relations with the woman to begin with. Detection of the presence of one of the "date-rape" drugs or their metabolites in blood, urine or in hair taken from the victim could help support a contention of a drug-facilitated sexual assault.

In the mid 1990s, law enforcement agencies and rape crisis centres in the US recommended more sophisticated testing of specimens collected from alleged rape victims and a nation-wide urine testing program for drugs used to commit this crime was developed [13]. One of the most important issues that

needs to be considered in drug-facilitated sexual assault investigation is the sensitivity of both screening and confirmatory techniques, since some of the compounds, e.g. benzodiazepines, are typically used in a single low dose [9]. Beck et al. [3] compared three commercially available techniques (EMIT, FPIA, OnLine) for urine screening for benzodiazepines, including flunitrazepam and 7-aminoflunitrazepam. In their study, a much better positive rate was achieved when enzymatic hydrolysis (β -glucuronidase) was included. In another study, Salamone et al. [38] investigated excretion patterns of flunitrazepam and its metabolites in urine after single doses (1, 2 and 4 mg) using Abuscreen OnTrak and OnLine Immunoassays and GC/MS. The last positive result after a 4 mg dose ranged from 18 to 60 hours following drug administration. Enzymatic hydrolysis also increased OnLine values 20–60% but did not increase the detection time. In a recent study, Negrusz et al. [31] employed enzymatic hydrolysis with β -glucuronidase followed by solid-phase extraction for detection of flunitrazepam and its metabolites. Using micro-plate enzyme immunoassay, flunitrazepam and its metabolites were detected in urine of 10 subjects after a single 2 mg oral dose of Rohypnol[®] up to 21 days in one volunteer, 10 days in two cases, 8 days in 4 subjects and 5 days in three subjects. Detectable levels of flunitrazepam and its metabolites were observed in urine five days after drug intake in all test subjects regardless of urine treatment used. The authors, therefore, recommended commercially available micro-plate enzyme immunoassay in sexual assault investigation when flunitrazepam or other benzodiazepine use is expected.

ElSohly et al. published EI-GC/MS methodology for detection of flunitrazepam and its major metabolites in urine [12] and in whole blood and plasma [11] after hydrolysis to benzophenones, solvent extraction and derivatisation. The limits of detection (LOD) for these specimens ranged from 1 ng/ml (urine) to 5 ng/ml (blood) and the drug could be determined in urine only up to 72 hours after a single 1, 2 and 4 mg dose of flunitrazepam. In blood, flunitrazepam was detected only up to 4 hours after a single 2 mg dose of the drug and in plasma 7-aminoflunitrazepam was detected for the entire period of sample collection (12 hours).

Negative chemical ionisation GC/MS improves the sensitivity and specificity for quantitation of benzodiazepines in various biological specimens, significantly exceeding those for traditional electron ionisation GC/MS [6, 15, 41]. In the previously mentioned study Negrusz et al. [31] developed a highly sensitive NCI-GC/MS method for quantitation of 7-aminoflunitrazepam and flunitrazepam in urine. The limit of quantitation for 7-aminoflunitrazepam (after derivatisation with HFBA) was 10 pg/ml and for flunitrazepam 100 pg/ml. Urine samples were hydrolysed with β -glucuronidase and the analytes were extracted using solid-phase mixed mode columns. The ap-

plication of NCI-GC/MS allowed investigators to detect and quantify 7-aminoflunitrazepam in urine samples (using two ions) after a single 2 mg dose of Rohypnol[®] up to 28 days in three out of ten subjects, 21 days in one subject and 14 days in the remaining six subjects. Unchanged flunitrazepam was present in urine samples up to 5 days in only one subject, 3 days in seven subjects and 24 hours in two subjects. The study clearly indicated that the urine specimens could most likely be collected from drug-facilitated rape complainants for at least 14 days after an alleged incident involving a single dose, and still successfully detect the presence of the drug metabolite.

Drug-facilitated sexual assault victims often do not report the incident in a timely manner because of amnesia and doubt about what may have happened, and possibly other psychological reasons. It would not be unusual for a urine or blood analysis to provide a negative result when the drug had in fact been ingested because of the likelihood of a single low dose, urine volume and the length of time since the drug was taken. Use of hair for analysis may provide a solution to this problem. The analysis of drugs in hair has progressed rapidly since 1978, when Baumgartner et al. first reported the determination of heroin/morphine in hair using radioimmunoassay processes. He subsequently extended his work to include the determination of phencyclidine, marijuana, cocaine, digoxin, methadone and benzodiazepines in hair [2]. A summary of milestones in drug detection in hair is given in the Table I below.

TABLE I. MILESTONES IN HAIR ANALYSIS

Year	Author	Discovery	Technique	References
1978	Baumgartner	Heroin & morphine	RIA	2
1991	Harkey	Cocaine metabolites	PCI-GC/MS	17
1993	Polettini	Heroin & metabolites	GC/MS/MS	32
1995	Wilkins	Codeine & metabolites	PCI-GC/MS	42, 43
1995	Kintz	THC-COOH in hair	NCI-GC/MS	21
1996, 97	Cirimele	Flunitrazepam in hair	NCI-GC/MS	6, 7, 8
1997	Yegles	Flunitrazepam in hair	GC/MS	44

Throughout the 1980's, procedures were developed for the analysis of various drugs in hair, but sensitivity was always a drawback to routine use of the technology. Recent advances in analytical instrumentation have allowed improved sensitivity, for example positive ion chemical ionisation gas chromatography – mass spectrometry (PCI-GC/MS) [17, 42, 43], negative ion chemical ionisation GC/MS [21] or GC/MS/MS [32]. It is well known that 7-nitro benzodiazepines metabolise to 7-amino compounds and tend to incorporate into hair and remain there for much longer periods of time than they do in either urine or blood. NCI-GC/MS offers much better sensitivity than the conventional EI-GC-MS and has been successfully applied to the detection of various forensically relevant benzodiazepines in human hair [6, 7, 8, 22, 23, 28]. The presence of flunitrazepam and 7-aminoflunitrazepam in hair in relatively high quantities following earlier drug ingestion has been well documented [6, 7, 8, 23, 28]. Cirimele et al. [8] found 26 hair specimens collected from corpses positive for 7-aminoflunitrazepam, flunitrazepam or both. Flunitrazepam was found in only 14 samples. All the specimens were positive for 7-aminoflunitrazepam. The same author described the determination of chronic flunitrazepam abuse by analysis of a 10 cm hair strand divided into 3 cm segments collected from a chronic drug user [7]. In another study [28], concentrations of 7-aminoflunitrazepam in two post-mortem hair samples were found to be higher than corresponding flunitrazepam levels. Yegles et al. [44] reported concentrations of several benzodiazepines in hair samples obtained from 21 corpses using EI-GC/MS. Recently, LeBeau et al. [24] suggested that hair may be a valuable specimen in cases of drug-facilitated sexual assault where reporting of the crime has been delayed. Negrusz et al. [28] described a sensitive micro-plate enzyme immunoassay screening procedure as well as a solid-phase extraction followed by highly sensitive NCI-GC/MS quantitation of flunitrazepam and 7-aminoflunitrazepam in hair, and applied it for the first time to hair samples collected from alleged drug-facilitated rape victims. The same group [30] demonstrated deposition of clonazepam and its major metabolite 7-aminoclonazepam in hair by NCI-GC/MS analysis of segmented hair samples collected from people taking therapeutic doses of clonazepam. The study revealed that the 7-aminoclonazepam concentrations in hair are higher than concentrations of the parent drug, and it remains in hair for much longer periods of time. The data further suggests that 7-aminoclonazepam can be detected in hair after a single dose of clonazepam, as would be expected in drug-facilitated sexual assault scenarios.

In developing background information for the construction and optimisation of analytical methods for the drugs and their metabolites, one important component is a controlled, clinical dosing study with the drugs. In such a study, healthy volunteers are given single doses of a drug under careful

medical supervision, then monitored for drug and metabolite concentrations in urine and hair for 30 days afterward. Such a clinical study has been done for the first time with flunitrazepam by Negrusz et al. [29]. 7-aminoflunitrazepam was found in hair samples collected from volunteers who received a single 2 mg dose of Rohypnol® throughout the entire 30-day study period. A similar study for clonazepam is currently planned.

Much has been made of the drug-facilitated sexual assault problem in the U.S. in the popular media and, to some extent, in the scientific literature. There is no doubt that the involvement of flunitrazepam and some other benzodiazepines, ketamine, GHB and some other drugs with similar pharmacologic effects, in sexual assaults is a relatively new problem. The true extent of the problem is not yet known.

The need for methods to detect these drugs in the body fluids and/or hair of complainants has drawn forensic toxicologists into the analysis of sexual assault evidence. This development has prompted considerable research in our laboratories and in others on the development of better, more sensitive methods of detection for the drugs and their metabolites. Controlled clinical studies on the time course of drug and metabolite elimination of some of the substances have also been done where feasible.

Considerable progress has been made over the past 20 or so years in the standardisation of sexual assault evidence collection protocols and devices [16, 25]. These efforts have been co-ordinated in many places (sometimes pursuant to statute) by groups with representation from police, prosecutors, clinicians, victim services advocates and forensic laboratories. Until now, however, there has never been any need to consider or discuss the routine collection of urine and/or hair for forensic toxicological analysis. To the extent that the “date-rape” drug phenomenon turns out to be a major problem, there will have to be significant changes in the initial response to complainants, in evidence collection kits, in the kind of forensic analysis done, and in follow-up procedures. Improvements in drug detection methodology and knowledge of drug elimination will help in designing those changes in order that they prove most useful in assisting victims, and identifying and convicting perpetrators of drug facilitated sexual assault.

References:

1. Ballenger J., Benzodiazepines, [in:] Schatzberg A., Nemeroff C. [eds], *Textbook of Psychopharmacology*, The American Psychiatric Press, Washington 1995.
2. Baumgartner W., Berka C., Hair analysis for drugs of abuse, *In-Service & Continuing Education* 1989, vol. 10, pp. 7–21.

3. Beck O., Lin Z., Brodin K. [et al.], The online screening technique for urinary benzodiazepines: Comparison with EMIT, FPIA, and GC-MS, *Journal of Analytical Toxicology* 1997, vol. 21, pp. 554–557.
4. Bogusz M. J., Maier R. D., Krüger K. D. [et al.], Determination of flunitrazepam and its metabolites in blood by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *Journal of Chromatography B* 1998, vol. 713, pp. 361–369.
5. Calhoun S. R., Wesson D. R., Galloway G. P. [et al.], Abuse of flunitrazepam (Rohypnol) and other benzodiazepines in Austin and South Texas, *Journal of Psychoactive Drugs* 1996, vol. 28, pp. 183–189.
6. Cirimele V., Kintz P., Ludes B., Screening for forensically relevant benzodiazepines in human hair by gas chromatography-negative ion chemical ionization-mass spectrometry, *Journal of Chromatography B* 1997, vol. 700, pp. 119–129.
7. Cirimele V., Kintz P., Mangin P., Determination of chronic flunitrazepam abuse by hair analysis using GC-MS-NCI, *Journal of Analytical Toxicology* 1996, vol. 20, pp. 596–598.
8. Cirimele V., Kintz P., Staub C. [et al.], Testing human hair for flunitrazepam and 7-amino-flunitrazepam by GC/MS-NCI, *Forensic Science International* 1997, vol. 84, pp. 189–200.
9. Couper F. J., Logan B. K., Determination of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in biological specimens by gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Analytical Toxicology* 2000, vol. 24, pp. 1–7.
10. Drummer O. H., Syrjanen M. L., Cordner S. M., Deaths involving the benzodiazepine flunitrazepam, *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology* 1993, vol. 14, pp. 238–243.
11. ElSohly M. A., Feng S., Salamone S. J. [et al.], GC-MS determination of flunitrazepam and its major metabolite in whole blood and plasma, *Journal of Analytical Toxicology* 1999, vol. 23, pp. 486–489.
12. ElSohly M. A., Feng S., Salamone S. J. [et al.], A sensitive GC-MS procedure for the analysis of flunitrazepam and its metabolites in urine, *Journal of Analytical Toxicology* 1997, vol. 21, pp. 335–340.
13. ElSohly M. A., Salamone S. J., Prevalence of drug used in cases of alleged sexual assault, *Journal of Analytical Toxicology* 1999, vol. 23, pp. 141–146.
14. FBI, Uniform Crime Reports, <http://www.fbi.gov/ucr.htm>.
15. Fitzgerald R. L., Rexin D. A., Herold D. A., Benzodiazepine analysis by negative chemical ionization gas chromatography/mass spectrometry, *Journal of Analytical Toxicology* 1993, vol. 17, pp. 342–347.
16. Goddard M., Sexual assault: a hospital/community protocol for forensic and medical examination. Washington DC: U.S. Dept. of Justice, Office of Justice Programs, Office for Victims of Crime, Final Report, Grant no. 85-SN-CX-0009.
17. Harkey M. R., Henderson G. L., Zhou C., Simultaneous determination of cocaine and its major metabolites in human hair by GC-CI-MS, *Journal of Analytical Toxicology* 1991, vol. 15, pp. 260–265.
18. <http://www.census.gov/prod/3/98pubs/98statab/cc98stab.htm>
19. Jenny C., Adolescent risk-taking behavior and the occurrence of sexual assault, *American Journal of Deceases in Children* 1988, vol. 14, pp. 770–772.

20. Kilpatrick D. G., Acierno R., Resnick H. S. [et al.], A 2-year longitudinal analysis of the relationships between violent assault and substance use in women, *Journal of Consulting and Clinical Psychology* 1997, vol. 65, pp. 834–847.
21. Kintz P., Crimele V., Mangin P., Testing human hair for cannabis. II. Identification of THC-COOH by GC-MS-NCI as an unique proof, *Journal of Forensic Sciences* 1995, vol. 40, pp. 607–610.
22. Kintz P., Crimele V., Vaysette F. [et al.], Hair analysis for nordiazepam and oxazepam by gas chromatography-negative-ion chemical ionization mass spectrometry, *Journal of Chromatography* 1996, vol. 677, pp. 241–244.
23. Kintz P., Tracqui A., Mangin P., Detection of drugs in human hair for clinical and forensic applications, *International Journal of Legal Medicine* 1992, vol. 105, pp. 1–4.
24. LeBeau M., Andollo W., Lee H. W., [et al.], Recommendations for toxicological investigations of drug-facilitated sexual assault, *Journal of Forensic Sciences* 1999, vol. 44, pp. 227–230.
25. Lee H. C., Gaensslen R. E., Sexual Assault Evidence – National Assessment and Guidebook. Washington DC: U.S. Dept. of Justice, National Institute of Justice, Draft Final Report, Grant no. 92-IJ-CX-0041, July 1996.
26. Mattila M. A. K., Larni H. M., Flunitrazepam: A review of its pharmacological properties and therapeutic use, *Drugs* 1980, vol. 20, pp. 353–374.
27. McCusker R. R., Paget-Wilkes H., Chronister C. W. [et al.], Analysis of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in urine by gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Analytical Toxicology* 1999, vol. 23, pp. 301–305.
28. Negrusz A., Moore C., Deitermann D. [et al.], Highly sensitive micro-plate enzyme immunoassay screening and NCI-GC-MS confirmation of flunitrazepam and its major metabolite 7-aminoflunitrazepam in hair, *Journal of Analytical Toxicology* 1999, vol. 23, pp. 429–435.
29. Negrusz A., Moore C. M., Hinkel K. [et al.], Detection of 7-aminoflunitrazepam in hair and urine after a single dose of Rohypnol [in press].
30. Negrusz A., Moore C. M., Kern J. L. [et al.], Quantitation of clonazepam and its major metabolite 7-aminoclonazepam in hair, submitted, *Journal of Analytical Toxicology* [in press].
31. Negrusz A., Moore C. M., Stockham T. L. [et al.], Elimination of 7-aminoflunitrazepam and flunitrazepam in urine after a single dose of Rohypnol, *Journal of Forensic Sciences* [in press].
32. Polettini A., Groppi A., Montagna M., Rapid and highly selective GC/MS/MS detection of heroin and its metabolites in hair, *Forensic Science International* 1993, vol. 63, pp. 217–225.
33. Public Law 104-305, October 13, 1996.
34. Raymon L. P., Steele B. W., Walls H. C., Benzodiazepines in Miami-Dade County, Florida Driving Under the Influence (DUI) cases (1995–1998) with emphasis on Rohypnol®: GC-MS confirmation, patterns of use, psychomotor impairment, and results of Florida legislation, *Journal of Analytical Toxicology* 1999, vol. 23, pp. 490–499.
35. Rennison C. M., Criminal victimization 1998. Changes 1997–98 with trends 1993–98. Bureau of Justice Statistics, National Crime Victimization Survey, July 1999, publication NCJ 176353.

36. Rickert V. I., Wiemann C. M., Date rape among adolescent and young adults, *Journal of Pediatrics and Adolescent Gynecology* 1998, vol. 11, pp. 167–175.
37. Rickert V. I., Wiemann C. M., Berenson A. B., Prevalence, patterns, and correlates of voluntary flunitrazepam use, *Pediatrics* 1999, vol. 103, pp. 1–5.
38. Salamone J. S., Honasoge C., Brenner C. [et al.], Flunitrazepam excretion patterns using the Abuscreen OnTrak and OnLine immunoassays: comparison with GC-MS, *Journal of Analytical Toxicology* 1997, vol. 21, pp. 341–345.
39. Simmons M. M., Cupp M. J., Use and abuse of flunitrazepam, *Annals of Pharmacotherapy* 1998, vol. 32, pp. 117–119.
40. Smith K. M., Drugs used in acquaintance rape, *Journal of American Pharmaceutical Association* 1999, vol. 39, pp. 519–525.
41. Song D., Zhang S., Kohlhof K., Quantitative determination of clonazepam in plasma by gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry, *Journal of Chromatography B* 1996, vol. 686, pp. 199–204.
42. Wilkins D. G., Haughey H. M., Krueger G. G. [et al.], Disposition of codeine in female human hair after multiple-dose administration, *Journal of Analytical Toxicology* 1995, vol. 19, pp. 492–498.
43. Wilkins D. G., Rollins D. E., Seaman J. [et al.], Quantitative determination of codeine and its major metabolites in human hair by gas chromatography-positive ion chemical ionization mass spectrometry: A clinical application, *Journal of Analytical Toxicology* 1995, vol. 19, pp. 269–274.
44. Yegles M., Mersch F., Wennig R., Detection of benzodiazepines and other psychotropic drugs in human hair by GC/MS, *Forensic Science International* 1997, vol. 84, pp. 211–218.

TOKSYKOLOGICZNE BADANIA LEKÓW UŁATWIAJĄCYCH WYKORZYSTANIE SEKSUALNE

Adam NEGRUSZ, Robert E. GAENSSLEN

Liczba informacji na temat leków potocznie nazywanych w Stanach Zjednoczonych *date-rape drugs* (leki typu „gwałt na randce”) oraz ich stosowania w przypadkach wykorzystania seksualnego uległa znacznemu wzrostowi w ostatnich latach. Zaobserwowano również znaczny wzrost liczby publikacji naukowych na powyższy temat [11, 12, 13, 20, 24, 36]. Typowy przebieg gwałtu z wykorzystaniem *date-rape drugs* ma następujący scenariusz: gwałcielem ukradkiem dodaje lek do napoju (najczęściej alkoholowego) niczego nie spodziewającej się ofiary w celu jej „odurzenia”, a następnie zgwałcenia, gdy znajduje się ona pod wpływem działania leku. Ofiary, zarówno kobiety jak i mężczyźni, zeznają zwykle o utracie pamięci podczas trwania incydentu oraz po jego zakończeniu; czasami budzą się w nieznanym sobie miejscu, niekompletnie ubrani, z niejasnym poczuciem, że mieli stosunek seksualny. Przypadki tego typu były przyczyną działań legislacyjnych na poziomie federalnym (w Stanach Zjednoczonych). Istnieją również dowody na to, że niektóre z tych leków są stosowane w celach relaksacyjnych, a wykorzystanie seksualne może nastąpić w momencie, kiedy dana osoba znajduje się pod ich wpływem. Przypadki te również traktuje się jako wykorzystanie seksualne, pomimo że lek nie został podany ofierze przez napastnika potajemnie.

W roku 1998 zanotowano w Stanach Zjednoczonych 93 000 zgłoszonych przypadków gwałtów [14], czyli 34 przypadki na 100 000 mieszkańców. Zarówno liczby bezwzględne, jak i procentowe zgłoszonych gwałtów, zmalały w latach dziewięćdziesiątych. Powszechnie jednak wiadomo, że liczba zgłoszonych gwałtów nie jest tożsama z liczbą gwałtów rzeczywiście dokonanych. Na przykład Biuro Statystyki Prawnej (Bureau of Justice Statistics) szacuje, że liczba gwałtów w tym samym 1998 roku wynosiła 330 000, a więc była ponad trzykrotnie większa niż liczba gwałtów zgłoszonych [35].

Obecnie nie ma wiarygodnych statystyk lub danych szacunkowych dotyczących gwałtów – rzeczywistych lub zgłoszonych – ułatwionych zastosowaniem leków typu *date-rape*.

Najbardziej znanym, choć nie jedynym lekiem typu *date-rape*, jest Rohypnol® (flunitrazepam). W Stanach Zjednoczonych stosowanie tego leku w celach przestępczych odnotowane zostało po raz pierwszy na Florydzie przez Społeczną Grupę Roboczą ds. Epidemiologii (Community Epidemiology Working Group) w roku 1993. Według Biura ds. Zwalczenia Narkotyków (Drug Enforcement Administration, DEA) lek ten był często konfiskowany przez policję wzdłuż południowej granicy Stanów Zjednoczonych. Z powodu bliskości granicy z Meksykiem w roku 1994 w Nowym Orleanie utworzono Grupę Reagowania ds. Rohypnolu (Texas-Florida Rohypnol Response Group), która w roku 1995 stwierdziła masowy „przepływ” produktów firmy Roche przez granicę w mieście Laredo. Problem stał się tak poważny, że postulowano nawet zamknięcie granicy. Również w roku 1995 hrabstwo Dade (Floryda) zainicjowało program antyflunitrazepamowy, a w roku 1996 Biuro do spraw Żywności i Le-

ków (Food and Drug Administration) zakazało importu tego leku. Nawet prezydent Clinton wspominał o flunitrazepamie w „Nowej strategii zwalczania narkotyków” z kwietnia 1996 roku. Na podstawie ewidencji stanowych i lokalnych przestępstw kryminalnych związanych z użyciem flunitrazepanu (dr Jamesa Tollivera z Sekcji Zagrożenia Narkotykami i Związkami Chemicznymi DEA) wynika, że na dzień 5 maja 1996 ze wszystkich 2264 przypadków największą ich liczbę stwierdzono w Teksasie (1084; 47,9%), następnie na Florydzie (741; 32,7%); w Luizjanie (150; 6,6%), Arizonie (84; 3,7%) i Oklahomie (82; 3,6%). W dwóch stanach, Teksasie i Florydzie, odnotowano ponad 80% wszystkich zgłoszonych przypadków, w większości dotyczących wykorzystania seksualnego.

Flunitrazepam (Rohypnol® – Roche), 5-(2-fluorofenyl)-1,3-dwuwodoro-1-metylo-7-azoto-2H-1,4 benzodiazepin-2-1), należy do grupy 7-azotowych benzodiazepin [26]. Jego działanie nasenne dominuje nad działaniem uspokajającym oraz relaksującym w przeciwieństwie do innych leków z tej samej grupy farmakologicznej. Flunitrazepam jest dostępny w tabletkach oraz w formie do wstrzyknięć [1] w około 80 krajach na całym świecie. Flunitrazepam wykazuje silniejsze powinowactwo z receptorami gabamimergicznymi (GABA) niż diazepam (Valium®) i działanie dziesięciokrotnie silniejsze niż diazepam [1, 26]. Flunitrazepam jest łatwo wchłaniany z przewodu pokarmowego (w 80-90%) i prawie całkowicie metabolizowany w wątrobie. Jego metabolizm polega na redukcji do 7-aminoflunitrazepamu, a następnie sprzęganiu z kwasem glukuronowym (N-glukuronidy), demetylacji do pochodnej N-demetylowej, hydrolizy do 3-hydroksy pochodnej, a następnie sprzęganiu do O-glukuronidu [4, 12, 26]. Średnio 90% metabolitów jest wydalanych z moczem, a 10% z kałem [12, 26]. Wypadki śmiertelne spowodowane przyjęciem flunitrazepamu były obserwowane nie tylko w przypadku podania tego leku z innymi związkami działającymi depresyjnie na ośrodkowy układ nerwowy, takimi jak etanol, lecz również z powodu nadużycia samego leku [10].

Pierwsza konfiskata Rohypnolu® miała miejsce w Stanach Zjednoczonych w roku 1989, a od tego czasu notuje się stały wzrost przypadków nielegalnego używania tego leku [39, 40]. Flunitrazepam jest często stosowany w celu wzmocnienia działania heroiny, alkoholu lub marihuany [40]. W roku 1999 Rickert i in. [37] przedstawili wyniki badań prowadzonych na grupie 904 seksualnie aktywnych kobiet z Teksasu w wieku od 14 do 26 lat. W badanej grupie 5,9% osób przyznało się do dobrowolnego użycia flunitrazepamu jeden raz lub więcej, 7,5% osób, które przyjęły flunitrazepam, stwierdziło, że robiły to 10 do 19 razy, a 11% oświadczyło, że stosowały go 20 razy lub więcej. Autorzy badania ustalili, że 10% kobiet, które przyjęły lek dobrowolnie, skarżyło się, że następnie stały się ofiarą agresji fizycznej bądź seksualnej. W niedawno opublikowanym artykule Raymon i in. [34] ustalili znaczny udział flunitrazepamu (oraz innych benzodiazepin) w stwierdzonych przez policję na Florydzie w latach 1995-1998 przypadkach prowadzenia samochodu pod wpływem środków działających podobnie do alkoholu. Tabletki Rohypnolu® są przemycane do Stanów Zjednoczonych (głównie z Meksyku) i sprzedawane na ulicy pod takimi nazwami, jak: „roofies”, „rophies”, „rib”, „roopies”, „rope”, „pappas”, „peanuts”, „pastas”, „forget pills”, „ro-shays”, „roaches” lub „roche 2” [40]. Na początku lat dziewięćdziesiątych flunitrazepam został zidentyfikowany jako najczęściej stosowany lek w przypadkach gwałtów ułatwionych przez narkotyki [5, 39, 40]. Począwszy od roku 1996 przepisywanie, sprzedaż i importowanie flunitrazepamu do Stanów Zjednoczonych zostało

zakazane. Właśnie ze względu na stosowanie flunitrazepamu w przypadkach gwałtu uchwalono w roku 1996 ustawę o „zapobieganiu i karaniu gwałtów ułatwionych podaniem narkotyku”, zwiększając do 20 lat maksymalną karę więzienia dla osoby, która w celach przestępczych podaje innej osobie narkotyków lub podobnie działającą substancję bez jej wiedzy [33].

Inne leki stosowane podczas napaści o charakterze seksualnym to kwas gamma-hydroksymasłowy (GHB) [9, 24, 27], ketamina [24, 40], skopolamina, barbiturany, leki powodujące zwiótczenie mięśni, takie jak carisoprodol, cyclobenzaprin i meprobamat, difenhydramina, klonazepam i czasami inne benzodiazepiny [24]. Klonazepam jest benzodiazepiną wykazującą wiele charakterystycznych cech farmakologicznych leków należących do tej grupy. Stwierdzono, że zmniejsza występowanie drgawek, znosi stany lękowe, powoduje zwiótczenie mięśni i wywołuje sen. Z powodu jego działania, klonazepam został uznany za lek mogący mieć zastosowanie jako *date-rape* [1, 4, 24] i zakwalifikowany przez DEA do grupy „Schedule IV”. Został on zaaprobowany przez FDA tylko w przypadku leczenia drgawek. Pomimo to lekarze stosują klonazepam także w leczeniu stanów niepokoju, lęku, manii i schizofrenii z racji jego właściwości uspokajających [1]. Jest on dostępny w tabletkach 0,5 mg, 1 i 2 mg pod nazwami firmowymi: Klonopina, Clonex, Iktorivil i Rivotril. We wspomnianej wcześniej pracy Raymon i in. stwierdzili na Florydzie po 1998 roku znaczny wzrost użycia klonazepamu w przypadkach gwałtów ułatwionych przez podanie leku [34].

GHB jest pokątnie sprzedawany na ulicy pod następującymi nazwami: „salty water”, „scoop”, „soap”, „liquid X”, „natural sleep-500”, „liquid ecstasy”. Jest używany jako *date-rape drug*, ponieważ działa szybko i efektywnie, stosunkowo prosto się go produkuje i rzekomo ma takie właściwości jak afrodyzjak. Posiadanie, sprzedaż i produkcja GHB bez zezwolenia są nielegalne już w dwudziestu amerykańskich stanach.

Wszystkie specyfiki wykorzystywane podczas gwałtów wywołują działanie depresyjne. Efekty ubocznego działania tych leków, zgłoszone przez ofiary, obejmują: zaburzenia orientacji, zwolnienie akcji serca, zawroty głowy, senność, niemożność racjonalnego osądu sytuacji, niepamięć wsteczną, zwiótczenie mięśni, utratę przytomności, nudności, zmniejszone ciśnienie krwi i obniżony poziom zahamowania psychicznego [24]. Wszystkie te efekty ulegają wzmocnieniu, jeśli przyjęciu leku towarzyszy spożycie alkoholu. Ponadto leki te powodują amnezję, co prawdopodobnie jest głównym powodem ich wykorzystania jako *date-rape drugs*.

Według danych, jakimi dysponuje FBI, w 1996 roku w Stanach Zjednoczonych dokonano 95 770 gwałtów, co odnotował też rocznik statystyczny [18]. Trudno jest oszacować, w ilu przypadkach gwałt ten był ułatwiony przez ukradkowe podanie przez sprawcę leku ofierze. Jedyne opublikowane dane odnoszące się bezpośrednio do częstotliwości występowania tego typu spraw [13] są oparte na badaniach 1179 przypadkowo wybranych próbek moczu udostępnionych przez laboratoria sądowe z terenu całego kraju w celu dokonania ich analizy na obecność alkoholu oraz stwierdzenia obecności leków typu *date-rape* lub innych. W 60% tych próbek zidentyfikowano jeden lub więcej tego typu specyfików. GHB wykryto w około 4% próbek, a flunitrazepam w około 0,5%. W około 8,2% próbek stwierdzono obecność różnego rodzaju benzodiazepin, chociaż flunitrazepam stanowił ich znikomy procent. Dane te nie są zgodne z przekazami ustnymi, które świadczą o częstych przypadkach gwałtów ułatwionych przez podanie leków. Co więcej, wykrywalność za pomocą metody

EI-GC/MS (chromatografii gazowej sprzężonej z spektrometrem masowym z jonizacją elektronową) używanej do oznaczania leków typu *date-rape* i ich metabolitów wynosiła 1 ng/ml i nie była na tyle czuła, aby wykryć te leki w moczu po przyjęciu tylko jednej dawki. Należy założyć, że wynik analizy niektórych próbek mógł być pozytywny, czego nie potrafili stwierdzić badający. Jak zaznaczono powyżej, dane te nie mogą świadczyć o częstotliwości występowania omawianych przypadków, ponieważ nie zastosowano systematycznej, opartej na podstawach statystycznych, procedury wyboru próbek. Nie jest również wiadomo, jaki czynnik decydował o tym, że laboratorium przekazało daną próbkę do analizy.

Fakt, że przypadki gwałtu ułatwione dzięki podaniu leków wymagają analizy toksykologicznej – oprócz zwykłych badań rutynowych biologicznych i profilowania DNA – stanowi *novum* dla pracowników amerykańskich laboratoriów sądowych. Okazuje się bowiem, że wymagane jest pobranie od ofiar próbek w celu ich badania na obecność leków, co z kolei zmienia procedury zbierania dowodów. Na przykład, krew była pobierana do określenia jej grupy lub typowania DNA, lecz nie dla potrzeb toksykologicznych.

Ostatnio wiele protokołów postępowania w sprawach o gwałt zaleca zabezpieczenie małych plam krwi, co nie jest wystarczające dla toksykologa sądowego. Pobieranie próbek włosów od ofiar gwałtów w celu wykonania badań mikroskopowych również stało się standardową procedurą. Niestety, taka próbka jest również mało użyteczna z punktu widzenia toksykologicznego, ponieważ jest pobierana zaraz po wypadku (jeśli takowy został natychmiast zgłoszony) i zazwyczaj ilość włosów jest niewystarczająca do przeprowadzenia analizy. Niedawno grupa naukowców – specjalistów z dziedziny toksykologii sądowej – poruszyła podstawowe zagadnienia związane z tym problemem [24]. Jest rzeczą oczywistą, że istnieje potrzeba modyfikacji protokołów postępowania w sprawach związanych z wykorzystaniem seksualnym. Modyfikacje te mogą okazać się trudne, jako że wiele stanów posiada swoje własne procedury i ich zmiana może potrwać dłuższy czas.

Wiele ofiar znajdujących się podczas gwałtu pod wpływem leku zgłasza się na policję dopiero po kilku dniach. Przyczyną takiego stanu rzeczy może być odczuwana przez ofiarę cała gama emocji charakterystycznych przy wykorzystaniu seksualnym (wstyd, strach, poczucie odrzucenia, zaprzeczanie, brak wiary w działania organów ścigania), jak również amnezja spowodowana działaniem leku. Jest zatem niezwykle ważne, aby ustalić, w jakim czasie po zaistnieniu zdarzenia (tzn. po podaniu leku) można pobierać próbki materiału biologicznego od ofiar w celu potwierdzenia obecności leku i odtworzenia prawdopodobnego przebiegu zajścia, co następnie umożliwi skuteczne ściganie sprawcy. Jak wspomniano powyżej, istnieją dowody na to, że leki typu *date-rape* są używane w celach relaksacyjnych [5, 19, 20, 36, 37, 39]. Większość opublikowanych informacji dotyczy flunitrazepamu [37]. Nie ma wątpliwości, że używanie alkoholu, narkotyków lub leków przez kobietę stanowi czynnik ryzyka zagrożenia gwałtem [19, 20, 37, 40]. Z punktu widzenia ścigania przestępstwa *post facto*, użycie „dla relaksu” tych samych specyfików, które da się wykorzystać w celu ułatwienia gwałtu, może stanowić przeszkodę. Ze względu na fakt, iż leki typu *date-rape* czasami powodują amnezję, ofiary omawianych przestępstw nie są dobrymi świadkami. Jedynym dostępnym dowodem przeciwko sprawcy jest zatem identyfikacja spermy dokonana poprzez ustalenie kodu genetycznego. Sprawca może jednak wówczas stwierdzić, że stosunek płciowy nastąpił za obopólną zgodą. Nie zaprze-

cza więc faktu odbycia stosunku z ofiarą. Wykrycie jednego z leków typu *date-rape* lub jego metabolitów we krwi, moczu lub włosach ofiary może ułatwić dochodzenie w postępowaniu w sprawie o gwałt ułatwiony przez podanie leku.

W połowie lat dziewięćdziesiątych w Stanach Zjednoczonych organy ścigania oraz centra kryzysowe utworzone dla ofiar gwałtów zaproponowały bardziej precyzyjne sposoby testowania próbek pobranych od ofiar gwałtów oraz stworzenie ogólnokrajowego programu badania moczu w celu wykrywania leków, których użyto, aby ułatwić dokonanie tych czynów [13].

Jednym z najważniejszych elementów prowadzonych śledztw w sprawach dotyczących gwałtów z użyciem leków jest zapewnienie odpowiedniej czułości metody oraz zastosowanie technik potwierdzających, ponieważ niektóre z używanych związków, np. benzodiazepiny, są zwykle przyjmowane w jednej małej dawce [9]. Beck i in. [3] porównali trzy dostępne techniki: EMIT, FPIA i OnLine wykorzystywane do badań moczu na obecność benzodiazepin, w tym flunitrazepamu i 7-aminoflunitrazepamu. W badaniach tych uzyskano znacznie lepszy wynik, gdy oznaczanie poprzedziła hydroliza enzymatyczna (β -glukuronidaza). Z kolei Salamone i in. [38] prześledzili wydalanie flunitrazepamu i jego metabolitów w moczu po przyjęciu jednorazowych dawek (1, 2 i 4 mg) przy użyciu metod Abuscreen OnTrak, OnLine Immunoassays i GC/MS. Ostatni pozytywny rezultat, po dawce 4 mg, otrzymano w czasie od 18 do 60 godzin po przyjęciu leku. W tych badaniach hydroliza enzymatyczna również zwiększyła uzyskiwane wartości oznaczeń o 20–60%, lecz nie wydłużyła czasu, w jakim wykrywano te leki. W niedawno przeprowadzonych badaniach Negrusz i in. [31] zastosowali do wykrywania flunitrazepamu i jego metabolitów ekstrakcję na fazach stałych poprzedzoną hydrolizą enzymatyczną (β -glukuronidaza). Przy użyciu metody immunoenzymatycznej na mikropłytkach flunitrazepam i jego metabolity zostały wykryte w moczu u 10 badanych po jednorazowej doustnej dawce 2 mg Rohypnolu[®] – po 21 dniach u jednego badanego, po 21 dniach u dwóch badanych, po 8 dniach u czterech badanych i po 5 dniach u trzech badanych. Wykrywalne stężenia flunitrazepamu i jego metabolitów obserwowano w moczu do 5 dni po przyjęciu leku u wszystkich badanych, niezależnie od metody oznaczania. Autorzy proponują zatem używanie ogólnie dostępnych metody immunoenzymatycznej na mikropłytkach podczas śledztw prowadzonych w sprawach o gwałt, gdy istnieje podejrzenie użycia flunitrazepamu lub innej benzodiazepiny.

ElSohly i in. opracowali metodologię El-GC/MS do wykrywania flunitrazepamu i jego głównych metabolitów w moczu [12], we krwi i w osoczu [11] po hydrolizie do benzofenonów, a następnie ekstrakcji rozpuszczalnikowej i derywatywacji. Granice wykrywalności (LOD) dla tych próbek wahały się od 1 ng/ml (mocz) do 5 ng/ml (krew). Lek może być wykryty w moczu do 72 godzin po przyjęciu jednorazowej dawki (1, 2 i 4 mg) flunitrazepamu. We krwi flunitrazepam był wykrywany tylko do 4 godzin po podaniu jednorazowej dawki (2 mg) leku, a w osoczu 7-aminoflunitrazepam był wykrywalny w całym okresie pobierania próbki (12 godzin).

GC/MS z ujemną jonizacją chemiczną (NCl-GC/MS) polepsza czułość i specyficzność analizy ilościowej benzodiazepin w różnych próbkach biologicznych, wyraźnie przewyższając tradycyjną jonizację elektronową [6, 15, 41]. W poprzednio wspomnianych badaniach Negrusz i in. opracowali bardzo czułą metodę NCl-GC/MS ilościowej analizy 7-aminoflunitrazepamu i flunitrazepamu w moczu. Granicą oznaczalności metody dla 7-aminoflunitrazepamu (po derywatywacji z HEBA) było 10 pg/ml, a dla

flunitrazepamu 100 pg/ml. Próbkę moczu były hydrolizowane β -glukuronidazą, po czym badane związki zostały ekstrahowane z zastosowaniem fazy stałej. Zastosowanie metody NCI-GC/MS umożliwiło wykrycie i dokonanie analizy ilościowej 7-aminoflunitrazepamu w próbkach po przyjęciu jednorazowej dawki 2 mg Rohypnolu[®] – do 28 dni po zażyciu u trzech z dziesięciu badanych, do 21 dni u jednego badanego i do 14 dni u pozostałych sześciu badanych. Niezmieniony flunitrazepam był obecny w próbkach moczu do 5 dni po zażyciu u jednego badanego, do 3 dni u siedmiu badanych i do 24 godzin u dwóch badanych. Badania te wyraźnie wskazują, że próbki moczu mogą być pobrane od ofiar gwałtu, którym podano flunitrazepam w jednorazowej dawce, przynajmniej do 14 dni po wydarzeniu i możliwe jest wówczas wykrycie metabolitów tego leku.

Ofiary gwałtów ułatwionych przez podanie leków często nie zgłaszają natychmiast wypadku z powodu amnezji oraz wątpliwości co do tego, co się rzeczywiście zdarzyło lub też z innych przyczyn psychologicznych. Jeśli lek został podany w małej dawce, ilość moczu lub krwi oddana do analizy była niewielka lub upłynął dłuższy czas od chwili zdarzenia, nie jest rzeczą niezwykłą, że analiza daje wynik negatywny. Wykorzystanie do badań włosów może przyczynić się do rozwiązania tego problemu.

Metody analizy narkotyków we włosach zaczęły szybko się rozwijać w 1978 roku, kiedy Baumgartner i in. po raz pierwszy opublikowali dane o oznaczeniu heroiny i morfiny we włosach przy użyciu radioimmunofluorescencji. Następnie Baumgartner poszerzył swoje badania, dokonując oznaczeń fencyklidyny, marihuany, kokainy, digoksyny, metadonu i benzodiazepin we włosach [2]. Zestawienie najważniejszych wydarzeń związanych z wykrywaniem narkotyków i leków we włosach przedstawia tabela I.

W latach osiemdziesiątych opracowano inne metody analizy różnych narkotyków we włosach, lecz ich wspólną wadą była zbyt niska czułość używanych technik. Ostatnie postępy w dziedzinie technik analitycznych doprowadziły do zwiększenia czułości (na przykład chromatografia gazowa z detekcją masową z chemiczną jonizacją pozytywną (PCI-GC/MS) [17, 42, 43] czy chemiczną jonizacją ujemną (NCI-GC/MS) [21] lub itandemem detektorów masowych (GC-MS/MS) [32]). Jest rzeczą dobrze znaną, że 7-nitro-benzodiazepiny metabolizują do związków 7-aminowych, które mają tendencję do kumulowania się we włosach i pozostawania tam znacznie dłużej niż w moczu lub we krwi. Metoda NCI-GC/MS posiada znacznie większą czułość niż konwencjonalna metoda EI-GC/MS i była już stosowana do wykrywania benzodiazepin w ludzkich włosach [6, 7, 22, 23, 28]. Obecność flunitrazepamu i 7-aminoflunitrazepamu we włosach w po przyjęciu stosunkowo dużych dawek leku została dobrze udokumentowana [6, 7, 8, 23, 28]. Cirimele i in. [8] w 26 próbkach włosów pobranych ze zwłok stwierdzili obecność 7-aminoflunitrazepamu, flunitrazepamu lub obu tych specyfików. Flunitrazepam został wykryty tylko w 14 próbkach, natomiast we wszystkich próbkach wykryto 7-aminoflunitrazepam. Ten sam autor opisał, w jaki sposób można stwierdzić fakt chronicznego nadużywania flunitrazepamu za pomocą analizy włosów (o długości 10 cm podzielonych na 3 cm segmenty), pobranych od osoby stale stosującej ten lek [7]. W innych badaniach [28] stwierdzono, że koncentracja 7-aminoflunitrazepamu w dwóch próbkach włosów pobranych *post mortem* była wyższa niż odpowiednie poziomy stężenia flunitrazepamu we krwi. Yegels i in. [44] wyznaczyli stężenia kilku benzodiazepin w próbkach włosów pobranych z 21 zwłok przy użyciu metody EI-GC/MS. Ostatnio LeBeau i in. [24] zasugerowali

wali, że włosy mogą stać się wartościowym materiałem do badań w przypadkach gwałtu ułatwionego przez podanie leku, kiedy przestępstwo zostało zgłoszone zbyt późno. Negrusz i in. [28] opisali bardzo czułą metodę o nazwie skryning enzymoimmunologiczny na mikroplątkach, jak również wysoce czułą metodę NCI-GC/MS po ekstrakcji na fazach stałych do analizy ilościowej flunitrazepamu i 7-aminoflunitrazepamu we włosach, a następnie zastosowali je po raz pierwszy do badania próbek włosów pobranych od ofiar gwałtów ułatwionych za pomocą podania leku. Ci sami autorzy [30] wykazali obecność klonazepamu i jego głównego metabolitu, 7-aminoklonazepamu, za pomocą metody NCI-GC/MS, badając próbki włosów pobrane od osób, które przyjmowały lecznicze dawki klonazepamu. Badania wykazały, że stężenie 7-aminoklonazepamu we włosach jest wyższe niż stężenie podawanego leku i że pozostaje on we włosach znacznie dłużej niż lek macierzysty. Dane sugerują, że 7-aminoklonazepam może być wykryty we włosach po zażyciu jednorazowej dawki klonazepamu, tak jak to może mieć miejsce podczas typowego gwałtu ułatwionego przez podanie leku.

Ważnym elementem niezbędnym przy gromadzeniu informacji potrzebnych do opracowania, optymalizacji i walidacji metod analitycznych oznaczania leków oraz ich metabolitów, są badania kliniczne z kontrolowanym dawkowaniem leków. Podczas tego typu badań zdrowym ochotnikom podaje się jednorazowe dawki leku pod ścisłą kontrolą medyczną, a następnie monitoruje się stężenie leku i jego metabolitów w moczu i we włosach przez 30 dni. Takie badanie kliniczne zostało przeprowadzone po raz pierwszy przez Negrusza i in. [29] po podaniu flunitrazepamu. 7-aminoflunitrazepam wykryto w próbkach włosów pobranych od ochotników, którzy otrzymali jednorazową dawkę 2 mg Rohypnolu® podczas trzydziestodniowych badań. Obecnie planowane jest wykonanie podobnego doświadczenia po podaniu klonazepamu.

Problem gwałtów ułatwionych przez podanie leków znalazł w Stanach Zjednoczonych swoje odzwierciedlenie w mediach – i do pewnego stopnia – w literaturze naukowej. Nie ma wątpliwości, że stosowanie podczas gwałtu flunitrazepamu, benzodiazepin, ketaminy, 6HB oraz innych leków posiadających podobne działanie farmakologiczne, jest stosunkowo nowym zjawiskiem. Prawdziwa jego wielkość nie jest jednak jeszcze dokładnie znana.

Zapotrzebowanie na metodę wykrywania takich leków w płynach ustrojowych i we włosach ofiar spowodowało, że przedstawiciele toksykologii sądowej zajęli się analizą materiału dowodowego w sprawach o gwałt. Fakt ten zapoczątkował rozwój dalszych badań w amerykańskich i innych laboratoriach nad stworzeniem lepszych, bardziej czułych metod wykrywania narkotyków i ich metabolitów. Dokonano również kontrolowanych, klinicznych badań nad eliminacją narkotyków i ich metabolitów.

W ciągu ostatnich dwudziestu kilku lat dokonano znacznego postępu w dziedzinie metod zbierania dowodów gwałtu oraz stosowanych technik [16, 25]. Wysiłki te były często skoordynowane (czasami decyzją odgórną) poprzez wspólne działania grup złożonych z przedstawicieli policji, prokuratury, nauki, pracowników laboratoriów sądowych oraz działaczy organizacji zajmujących się pomocą dla ofiar gwałtów. Dotychczas jednak nie istniała potrzeba dyskusowania lub rozważania metod pobierania próbek moczu lub włosów dla potrzeb sądowej analizy toksykologicznej, jednak w miarę, jak problemy związane z lekami typu *date-rape* będą się nasilać, niezbędne staną się znaczące zmiany w sposobie postępowania z ofiarami gwałtów, w techni-

kach zbierania dowodów, w analityce sądowej i dalszych procedurach. Udoskonalenia metodologii wykrywania takich leków i wiedza o procesach ich eliminacji z organizmu pomogą we wprowadzeniu wspomnianych zmian, co okaże się pomocne dla ofiar gwałtów oraz w identyfikacji i ściganiu sprawców gwałtów ułatwionych przez podanie leku.