



SCREENING FOR DRUG-FACILITATED SEXUAL ASSAULT BY MEANS OF LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED TO ATMOSPHERIC-PRESSURE CHEMICAL-IONISATION-MASS SPECTROMETRY (LC-APCI-MS)

Piotr ADAMOWICZ, Maria KAŁA

Institute of Forensic Research, Krakow, Poland

Abstract

Drug-facilitated crimes (sexual assaults, robbery) are common in many countries. The low concentration of date-rape drugs in blood and (often) the long delay between the crime and clinical examination make analysis of biological fluids collected from victims of rapes for presence of these drugs very difficult. The aim of this study was to develop and apply an LC-APCI-MS screening procedure for date-rape drugs in blood. The elaborated method allows simultaneous screening and detection of forty-two compounds. Target analytes were isolated using liquid-liquid extraction. Analyses were carried out using LC-MS operating in APCI mode. Detection of all compounds was based on pseudomolecular ions that were monitored in 6 groups, up to 19 ions in each group. The developed procedure can easily be expanded for more substances. The LC-APCI-MS procedure was successfully applied in routine casework to the analysis of authentic blood samples collected from victims of rapes.

Key words

Drug-facilitated sexual assault; Drug screening; LC-APCI-MS.

Received 3 July 2008; accepted 28 August 2008

1. Introduction

The phenomenon of crimes (sexual assaults, robbery) facilitated by the use of drugs is common in many countries. Due to their pharmacological properties – especially causing amnesia – many medicines and street drugs are considered to be so-called date-rape drugs. These substances are administered to unaware victims, who are sexually assaulted when under the influence of their action. The great variety of the chemicals used for criminal purposes, their low concentrations and, often, a long time delay between the event and collection of biological material from the crime victims mean that analyses of body fluids of victims of such crimes were only performed rarely until

recently. Detection of a drug used to facilitate sexual assault in biological material collected from a victim can be very important evidence of a committed crime [6, 8, 10].

A systematic increase in the number of crimes perpetrated against persons who have involuntarily been given drugs has also been observed in Poland since 2001. This problem is also reflected in the practice of the Institute of Forensic Research (IFR) in Krakow [1, 2, 3, 5]. In years 2000–2007, biological materials collected from 133 victims of sexual crimes and 35 persons suspected of committing such crimes were analysed. In the last years, materials secured in some 40–50 such cases have been delivered annually to the IFR, and their number is systematically increasing.

Currently, blood is the main material delivered for analyses. Concentrations of many drugs in this material are low, and, moreover, the sexual crimes are reported by the victims to the police often with a long time delay from the event [4, 7, 9]. Therefore most laboratory methods are not appropriate for screening analysis for so-called date-rape drugs, which in Poland are increasingly frequently referred to as "*pigułka gwałtu*" (rape pill). This situation has led us to conduct studies aimed at applying the LC-APCI-MS technique to a screening procedure of determination of drugs used to facilitate sexual assault in blood.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

All standards and their deuterated analogues were purchased from Cerilliant Corporation (LGC Standards, Warsaw, Poland) and Sigma (Sigma-Aldrich Polska, Poznań, Poland).

2.2. Biological material

Control blood samples (analytes-free) used for development and validation of the method were purchased from a blood donation centre. Blood samples analysed in routine casework at the IFR also constituted material for analysis.

2.3. Liquid – liquid extraction

Deuterated derivatives of MDMA-d5, estazolam-d5 and clonazepam-d4, which were used as the internal standards, were added to two blood samples placed in Eppendorf vials, in order to obtain a final concentration of 500 ng/ml. Next, phosphate buffer of pH 3 (0.3 ml) and ethyl ether (1 ml) were added to the first blood sample, whereas phosphate buffer of pH 3 (0.3 ml) and ethyl acetate (1 ml) were added to the other. The samples were extracted for 5 min, followed by centrifugation at 6000 g for 3 min. Next, organic phases were evaporated step by step at 37°C in a nitrogen stream in one vial. Dry residue was dissolved in 200 µl of mobile phase consisting of acetonitrile (ACN) and water (1:1, v/v).

2.4. LC-APCI-MS analysis

Analyses were performed by means of the Agilent Technologies, 1100 series liquid chromatograph coupled to a mass spectrometer and it was used in atmo-

spheric-pressure chemical-ionisation (APCI) mode. Separation was carried out on a LiChroCART 125 × 4 column filled with Purospher RP-18e (Merck), which was thermostated at 25°C. The mobile phase was composed of a solution of formic acid in ACN and water (0.1%, v/v) flowing at 1 ml/min. Its composition changed in the following gradient conditions: 0 min – 5% ACN, 20 min – 60% ACN, 21 min – 80% ACN, 23 min – 80% ACN, 24 min – 5% ACN, 30 min – 5% ACN. The injection volume was 20 µl. Parameters of the mass detector, which was operated in positive ionisation mode, were as follows: fragmentor voltage – 60 V, vaporiser temperature – 325°C, capillary voltage – 4000 V, drying gas flow – 4 l/min, drying gas temperature – 320°C, nebulizer pressure – 30 psi, corona current – 4.0 A.

3. Results and discussion

The developed LC-APCI-MS method allows simultaneous detection and determination of 42 compounds considered to be amongst substances used to facilitate sexual assault. The list of chemicals included in the study was prepared on the basis of information available in the literature and own experience of authors from expert opinions. GHB and its analogues as well as derivatives of barbituric acid were excluded from the study, because the applied LC-APCI-MS method is not suitable for their analysis. Identification of all compounds was performed on the basis of retention times and *m/z* values of pseudomolecular ions ($M+H^+$), which were recorded in selected ion monitoring (SIM) mode in 6 groups, up to 19 ions in each group. The monitored ions and the retention times of all analysed compounds are shown in Table I. Ions of the compounds, for which the retention times were less than the group threshold by 1 min, were monitored in two neighbouring (adjacent) groups. This approach allowed us to be certain that none of the compounds would be omitted in the case of a small change in retention time. The biggest limitation of the method is that the applied instrument allows monitoring of only one ion of each tested compound in the SIM mode (the applied software enabled monitoring of only 20 ions in one group). This approach cannot be used as a reliable method of identification, but only to preliminarily detect a compound, in other words to ascertain that it is probable that this substance is present in the bio-sample. Confirmation of the identification has to be performed by another method.

During development of the method, analysis of extracts of eight control blood samples was carried out in

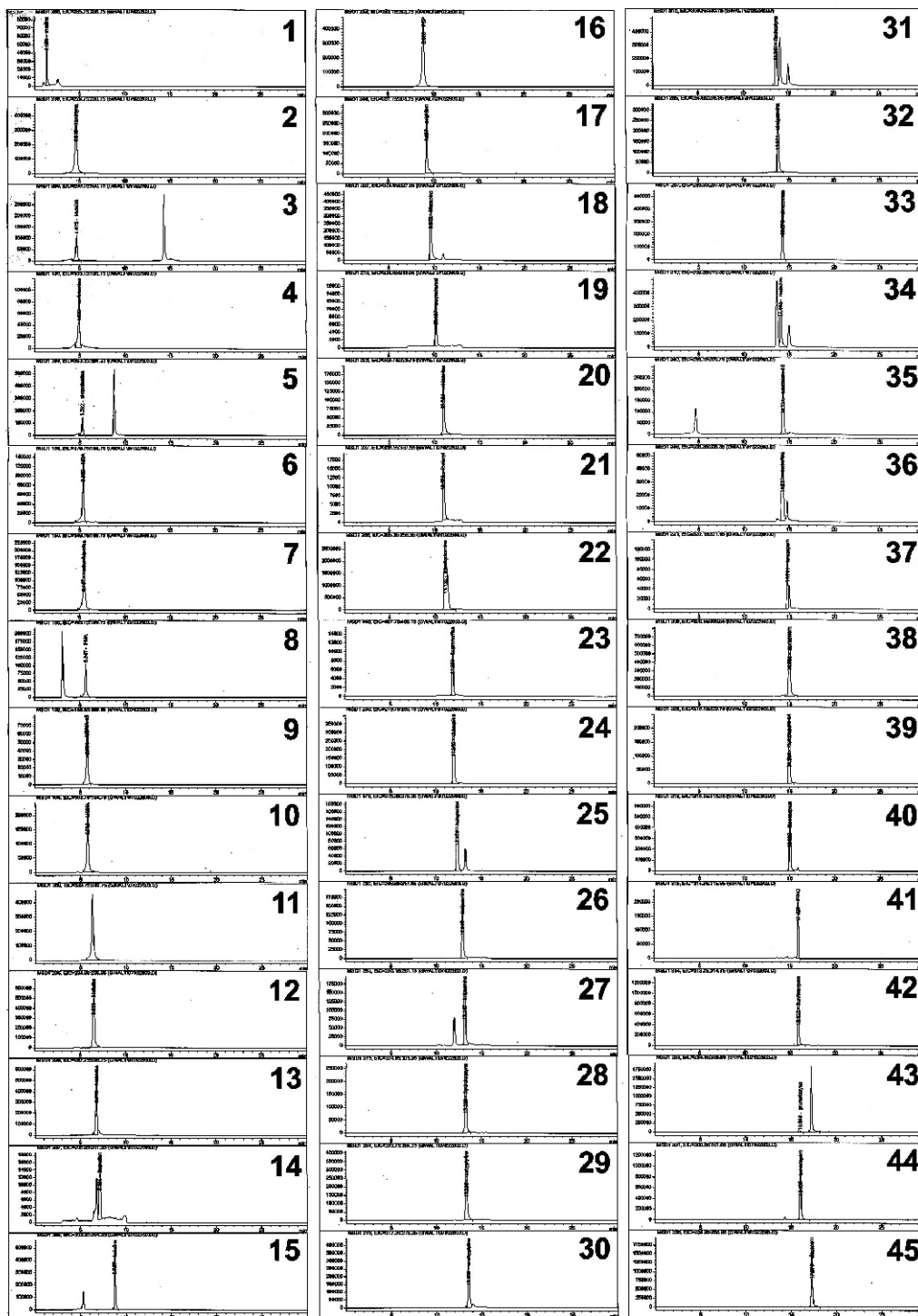


Fig. 1. Selected ion chromatograms of extracts of blood spiked with 42 analysed compounds and 3 internal standards to a concentration of 500 ng/ml (for fentanyl to 25 ng/ml). 1 – morphine; 2 – clonidine; 3 – codeine; 4 – amphetamine; 5 – scopolamine; 6 – MDA; 7 – methamphetamine; 8 – PMA; 9 – MDMA-d5; 10 – MDMA; 11 – zopiclone; 12 – lidocaine; 13 – ketamine; 14 – ibuprofen; 15 – cocaine; 16 – PCP; 17 – zolpidem; 18 – clozapine; 19 – meprobamate; 20 – midazolam; 21 – fentanyl; 22 – diphenhydramine; 23 – buprenorphine; 24 – doxepin; 25 – haloperidol; 26 – desipramine; 27 – imipramine; 28 – hydroxyzine; 29 – nortriptyline; 30 – amitriptyline; 31 – fluoxetine; 32 – trimipramine; 33 – oxazepam; 34 – methadone; 35 – estazolam-d5; 36 – sertraline; 37 – lorazepam; 38 – alprazolam; 39 – clonazepam-d4; 40 – clonazepam; 41 – 9-THC; 42 – flunitrazepam; 43 – promethazine; 44 – temazepam; 45 – diazepam.

TABLE I. ION GROUPS, MONITORED IONS IN THE SIM MODE, AND RETENTION TIMES OF ANALYSED COMPOUNDS

Time [min]	Group	Ion [m/z]	Retention time [min]	Compound
0.00	1	286	1.39	Morphine
3.00	2	230	4.62	Clonidine
		300	4.67	Codeine
		136	4.93	Amphetamine
		304	5.28	Scopolamine
		180	5.37	MDA
		150	5.46	Methamphetamine
		166	5.65	PMA
		199	5.77	MDMA-d5 (ISTD 1)
		194	5.79	MDMA
		389	6.22	Zopiclone
		235	6.48	Lidocaine
		238	6.77	Ketamine
7.00	3	207	7.13	Ibuprofen
		304	8.77	Cocaine
		244	8.94	PCP
		308	9.24	Zolpidem
		327	9.60	Clozapine
10.00	4	219	10.19	Meprobamate
		337	10.92	Fentanyl
		326	10.94	Midazolam
		256	11.13	Diphenhydramine
		468	11.88	Buprenorphine
		280	11.96	Doxepin
		376	12.34	Haloperidol
		267	12.90	Desipramine
13.00	5	281	13.15	Imipramine
		375	13.24	Hydroxyzine
		264	13.29	Nortriptyline
		278	13.54	Amitriptyline
		310	13.64	Fluoxetine
		295	13.83	Trimipramine
		310	14.09	Methadone
		287	14.27	Oxazepam
		306	14.23	Sertraline
		300	14.32	Estazolam-d5 (ISTD 2)
		321	14.78	Lorazepam

TABLE I. ION GROUPS, MONITORED IONS IN THE SIM MODE, AND RETENTION TIMES OF ANALYSED COMPOUNDS (cont.)

Time [min]	Group	Ion [m/z]	Retention time [min]	Compound
13.0	5	320	14.96	Clonazepam-d4 (ISTD 3)
		309	14.99	Alprazolam
		316	15.02	Clonazepam
		315	15.92	9-THC
16.00	6	285	16.05	Promethazine
		301	16.07	Temazepam
		314	16.20	Flunitrazepam
		285	17.28	Diazepam

order to test its specificity. No interfering substances were observed on the obtained chromatograms. Limits of detection (*LODs*) of the worked out method were from 0.1 to 20 ng/ml (*S/N* = 3), depending on the compounds. The method was linear starting from sub-therapeutic (0.5–1.0 ng/ml) or low therapeutic concentrations (2–10 ng/ml) to 1 µg/ml. The coefficients of linear regression based on 9-point calibration curves (*n* = 5) were not less than 0.990. The analytes dissolved in the extracts were stable for more than 24 h (for extracts stored at room temperature) or 3 days (for extracts stored at –20°C). The elaborated procedure can be easily expanded to encompass other compounds.

The method accuracy was verified by international proficiency testing (qualitative screening analysis – QSA). Analysis of a serum sample according to the described approach indicated that it contained clonidine at a concentration of 43 ng/ml. The final report revealed that 50 ng/ml of clonidine had been added to the distributed serum sample, whereas the mean concentration determined by the participating laboratories was 40.4 ng/ml.

The procedure was also successfully applied in routine casework to blood samples secured from rape victims and persons suspected of committing such crimes. The detected compounds are listed in Table II, together with the number of cases in which they were de-

TABLE II. LIST OF COMPOUNDS DETECTED AND QUANTIFIED IN BLOOD SAMPLES BY THE LC-APCI-MS METHOD

Compound	Number of cases	Concentration range [ng/ml]	Confirmation methods
Diazepam	5	1.1–164	LC-ESI-MS-MS
Nordazepam	4	<i>LOD</i> –834	LC-ESI-MS-MS
Oxazepam	2	18–262	LC-ESI-MS-MS
Lorazepam	1	47	LC-ESI-MS-MS
Estazolam	1	164	LC-ESI-MS-MS
Bromazepam	1	474	LC-ESI-MS-MS
Clonazepam	5	13–30	LC-ESI-MS-MS
7-aminoclonazepam	3	<i>LOD</i> – <i>LOQ</i>	LC-ESI-MS-MS
Chlordiazepoxide	1	240	LC-ESI-MS-MS
Amphetamine	19	3–99	LC-ESI-MS-MS
Methamphetamine	1	415	LC-ESI-MS-MS
MDMA	3	8–407	LC-ESI-MS-MS
MDA	1	53	LC-ESI-MS-MS
9-THC	8	0.4–1.4	GC-NCI-MS

TABLE II. LIST OF COMPOUNDS DETECTED AND QUANTIFIED IN BLOOD SAMPLES BY THE LC-APCI-MS METHOD (cont.)

Compound	Number of cases	Concentration range [ng/ml]	Confirmation methods
THCCOOH	12	4.5–30.4	GC-NCI-MS
Lidocaine	3	4–440	LC-APCI-MS
Ibuprofen	2	46,000; <i>LOD</i> – <i>LOQ</i>	HPLC-DAD
Ketoprofen	2	4,700; <i>LOD</i> – <i>LOQ</i>	HPLC-DAD
Morphine	2	<i>LOD</i> –28	LC-APCI-MS
Tramadol	1	1,800	LC-APCI-MS
Phenobarbital	1	200	HPLC-DAD
Propranolol	1	136	LC-APCI-MS
Carbamazepine	1	3,200	HPLC-DAD
10,11-epoxycarbamazepine	1	84	HPLC-DAD
Acetaminophen	1	<i>LOD</i> – <i>LOQ</i>	HPLC-DAD
Diphenhydramine	1	11	LC-APCI-MS
Venlafaxine	1	51	LC-APCI-MS
Fluvoxamine	1	36	LC-APCI-MS
Naproxene	1	<i>LOD</i> – <i>LOQ</i>	HPLC-DAD
Hydroxyzine	1	33	LC-APCI-MS

LOD – *LOQ* – compound present in concentration below *LOQ* of both methods used.

tected. Each of 87 preliminarily positive results was confirmed by one of the following methods: LC-APCI-MS, LC-ESI-MS-MS, GC-NCI-MS and HPLC-DAD. These methods are routinely used in the Section for Toxicological Analyses of the IFR for particular compounds or groups of compounds. Quantitative analysis of the identified compound was performed by the described method and a routine one. The values of the determined concentrations were comparable. Moreover, 38 samples were refrigerated and reanalysed by the presented LC-APCI-MS method after two years.

4. Summary

In spite of differences in chemical structure of the analysed compounds and their possible very low concentration ranges in blood, the elaborated LC-APCI-MS method allows screening for 42 compounds described as “rape pills”. Quantitative results can also be obtained by the proposed approach, but only after verification of the presence of the detected chemical by another method. The developed method was successfully applied in routine casework to blood samples col-

lected from victims and perpetrators of crimes, mainly rapes, which were facilitated by the use of a pharmaceutical substance.

Acknowledgements

The work was financed by the Ministry of Science and Higher Education from the budget for scientific activity in the years 2007–2010 as scientific project no. N N404 2291 33.

References

1. Adamowicz P., Toxicological analysis in cases of facilitation of rape by administration of pharmacological compound, *Problemy Kryminalistyki* 2005, 248, 26–30.
2. Adamowicz P., Kała M., Date-rape drugs scene in Poland, *Przegląd Lekarski* 2005, 62, 572–575.
3. Adamowicz P., Kała M., Drugs and alcohol as agents used for facilitation of sexual assault, *Problems of Forensic Sciences* 2004, 58, 79–90.
4. Adamowicz P., Kała M., Urinary excretion rates of ketamine and norketamine following therapeutic ketamine administration: method and detection window consider-

- ations, *Journal of Analytical Toxicology* 2005, 28, 376–382.
5. Adamowicz P., Zuba D., Kała M., Ketamine: A new substance on the Polish drug market, *Problems of Forensic Sciences* 2003, 56, 26–39.
 6. ElSohly M. A., Salamone S. J., Prevalence of drugs used in cases of alleged sexual assault, *Journal of Analytical Toxicology* 1999, 23, 141–146.
 7. Kasprzak K., Adamowicz P., Kała M., Determination of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in urine by gas chromatography-mass spectrometry with positive chemical ionization (PCI-GC-MS), *Problems of Forensic Sciences* 2006, 67, 289–300.
 8. LeBeau M. A., Mozayani A., Drug-facilitated sexual assault. A forensic handbook, Academic Press, San Diego 2001.
 9. Negrusz A., Adamowicz P., Saini B. K. [et al.], Detection of ketamine in urine of nonhuman primates after single dose using microplate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and NCI-GC-MS, *Journal of Analytical Toxicology* 2005, 29, 163–168.
 10. Negrusz A., Gaensslen R. E., Toxicological investigations in drug-facilitated sexual assault, *Problems of Forensic Sciences*, 2000, 41, 7–26.

Corresponding author

Piotr Adamowicz
Instytut Ekspertyz Sądowych
ul. Westerplatte 9
PL 31-033 Kraków
e-mail: padamowicz@ies.krakow.pl

WYKRYWANIE ŚRODKÓW STOSOWANYCH W CELU UŁATWIENIA WYKORZYSTANIA SEKSUALNEGO Z ZASTOSOWANIEM CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ POŁĄCZONEJ ZE SPEKTROMETRIĄ MAS Z CHEMICZNĄ JONIZACJĄ POD CIŚNIENIEM ATMOSFERYCZNYM (LC-APCI-MS)

1. Wstęp

Zjawisko przestępstw (seksualnych, grabieży) ułatwionych środkami farmakologicznymi jest znane w wielu krajach. Ze względu na swoje farmakologiczne właściwości, a w szczególności wywoływanie amnezji, wiele leków i narkotyków zostało zaliczone do tzw. *date-rape drugs*. Substancje te są podawane nieświadomej ofierze, która, będąc pod ich działaniem, zostaje wykorzystana seksualnie. Duża różnorodność środków stosowanych w celach przestępczych, ich niskie stężenia oraz często długi czas pomiędzy zaistniałym zdarzeniem a pobraniem prób materiału biologicznego od ofiar przestępstw powodują, że analiza płynów ustrojowych ofiar tego typu przestępstw była do niedawna rzadko przeprowadzana. Wykazanie obecności jednego ze środków farmakologicznych stosowanych w celu ułatwienia wykorzystania seksualnego w materiale biologicznym pobranym od ofiary może być bardzo ważnym dowodem zaistniałego przestępstwa [6, 8, 10].

Systematyczny wzrost liczby przestępstw kryminalnych dokonanych na osobach, którym podano środki farmakologiczne, jest również obserwowany w Polsce od 2001 roku. Problem ten ma także odzwierciedlenie w praktyce Instytutu Ekspertyz Sądowych w Krakowie (IES) [1, 2, 3, 5]. W latach 2000–2007 przebadano w IES materiał biologiczny pobrany od 133 ofiar przestępstw seksualnych oraz 35 osób podejrzanych o dokonanie tego typu przestępstw. W ostatnich latach corocznie do IES nadsyłany jest materiał zabezpieczony w około 40–50 tego typu sprawach, ale liczba ta systematycznie wzrasta.

Obecnie krew jest głównym materiałem nadsyłanym do badań. Stężenia wielu środków farmakologicznych w tym materiale są niskie, a ponadto ofiary przestępstw seksualnych często zgłaszają się na policję po dłuższym czasie od zdarzenia [4, 7, 9]. Dlatego większość metod laboratoryjnych nie jest odpowiednia do przesiewowej analizy w kierunku tzw. *date-rape drugs*, które ostatnio coraz częściej określane są w Polsce jako „pigułka gwałtu”. W obliczu tych faktów celem przeprowadzonych badań było zastosowanie techniki LC-APCI-MS do opracowania przesiewowej metody oznaczania we krwi środków stosowanych w celu ułatwienia wykorzystania seksualnego.

2. Materiał i metody

2.1. Odczynniki

Wszystkie substancje wzorcowe oraz ich deuterowane analogi pochodziły z firmy Cerilliant Corporation (LGC Standards, Warszawa, Polska) i Sigma (Sigma-Aldrich Polska, Poznań, Polska).

2.2. Materiał biologiczny

Próby krwi kontrolnej (wolnej od analitów) stosowane do opracowania i walidacji metody pochodziły ze stacji krwiodawstwa. Materiał do badań stanowiły również próby krwi pochodzące z ekspertyz rutynowo opracowywanych w IES.

2.3. Ekstrakcja ciecz-ciecz

Do dwóch prób krwi (0,5 ml) umieszczonych we fiolkach Eppendorfa dodawano jako wzorce wewnętrzne deuterowane pochodne – MDMA-d₅, estazolam-d₅ oraz klonazepam-d₄, aby osiągnąć stężenie każdego z nich wynoszące 500 ng/ml. Następnie do jednej próby krwi dodano bufor fosforanowy o pH 3 (0,3 ml) oraz eter dietylowy (1 ml), a do kolejnej bufor węglanowy o pH 9 (0,3 ml) oraz octan etylu (1 ml). Próbkę ekstrahowano przez 5 min, a następnie odwirowywano przy 6000 g przez 3 min, po czym odparowywano sukcesywnie fazy organiczne w jednej fiołce w temperaturze 37°C w strumieniu azotu. Suchą pozostałość rozpuszczano w 200 l fazy ruchomej składającej się z acetonitrylu (ACN) i wody (1:1, v/v).

2.4. Analiza LC-APCI-MS

Analizę prowadzono przy zastosowaniu chromatografu cieczowego połączonego ze spektrometrem mas serii 1100 firmy Agilent Technologies pracującego w trybie jonizacji chemicznej pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI). Rozdzielanie uzyskano przy użyciu kolumny LiChroCART 125 4 z wypełnieniem Purospher RP-18e firmy Merck utrzymywanej w temperaturze 25°C. Fazę ruchomą, przepływającą z szybkością 1 ml/min w warunkach gradientu składu, stanowił roztwór kwasu mrów-

kowego (0,1%, v/v) w ACN i wodzie. Zastosowano następujący program gradientowy: 0 min – 5% ACN, 20 min – 60% ACN, 21 min – 80% ACN, 23 min – 80% ACN, 24 min – 5% ACN, 30 min – 5% ACN. Objętość nstrzyku wynosiła 20 l. Detektor mas, rejestrujący w trybie jonizacji dodatniej, pracował w następujących warunkach: napięcie fragmentora – 60 V, temperatura odparownika – 325°C, napięcie kapilary – 4000 V, przepływ gazu osuszającego – 4 l/min, temperatura gazu osuszającego – 320°C, ciśnienie nebulizera – 30 psi, prąd korony – 4,0 A.

3. Wyniki i dyskusja wyników

Opracowana metoda LC-APCI-MS umożliwia jednoczesną detekcję i oznaczenie 42 związków zaliczanych do środków stosowanych w celu ułatwienia wykorzystania seksualnego. Lista objętych badaniami związków została przygotowana na podstawie informacji dostępnych w piśmiennictwie oraz własnych doświadczeń pochodzących z pracy opiniodawczej. Wśród analizowanych związków nie znalazły się GHB i jego analogi oraz leki z grupy pochodnych kwasu barbiturowego, dla których metoda LC-APCI-MS nie jest odpowiednia. Identyfikację wszystkich składników prowadzono na podstawie czasu retencji oraz wartości m/z pozornych jonów molekularnych ($M+H^+$), które rejestrowano w trybie monitorowania wybranych jonów (SIM) w 6 grupach, do 19 jonów w każdej z grup. Monitorowane jony oraz czasy retencji wszystkich analizowanych związków przedstawiono w tabeli I. Jony związków, które charakteryzowały się czasami retencji mniejszymi o 1 minutę od granicy grupy, monitorowano w dwóch sąsiednich grupach. Dzięki temu uzyskano pewność, że nie zostanie pominięty żaden ze związków w przypadku niewielkiej zmiany czasu retencji. Najważniejszym ograniczeniem metody jest fakt, że zastosowana aparatura pozwala na monitorowanie tylko jednego jonu każdego badanego związku w trybie SIM (w zastosowanym programie nie można monitorować więcej niż 20 jonów w 1 grupie). Monitorowanie jednego jonu związku nie może stanowić podstawy do jego identyfikacji. Można więc w ten sposób jedynie wstępnie typować związek, czyli stwierdzić prawdopodobną jego obecność w biopróbce, zaś jego identyfikację należy przeprowadzić inną metodą.

Podczas opracowywania metody w celu sprawdzenia jej specyficzności przeprowadzono analizę ekstraktów ośmiu kontrolnych prób krwi. Na otrzymanych chromatogramach nie zaobserwowano żadnych interferujących pików. Granice detekcji (*LOD*) opracowanej metody wynosiły od 0,1 do 20 ng/ml (*S/N* = 3). Metoda zachowywała liniowość od stężeń subterapeutycznych (0,5–1,0 ng/ml) lub niskich terapeutycznych (2–10 ng/ml) do 1 g/ml. Współczynniki regresji liniowej 9-punktowych

krzywych kalibracyjnych ($n = 5$) były nie mniejsze niż 0,990. Anality znajdujące się w rozpuszczonych ekstraktach były stabilne przez okres dłuższy niż 24 godziny (ekstrakty utrzymywane w temperaturze pokojowej) lub 3 dni (ekstrakty przechowywane w temperaturze –20°C). Opracowana procedura może być z łatwością rozszerzona na kolejne związki.

Precyzja metody została zweryfikowana podczas międzynarodowego testu kompetencji z zakresu jakościowej analizy przesiewowej (QSA). W opisany sposób oznaczono w próbie surowicy klonidynę w stężeniu 43 ng/ml. Ze zbiorczego raportu wyników testu wynikało, że do rozesłanej próby surowicy dodano klonidynę w stężeniu 50 ng/ml, a średnie stężenie wyznaczone przez biorące udział w teście laboratorium wynosiło 40,4 ng/ml.

Procedura była także z powodzeniem stosowana w rutynowej pracy opiniodawczej do analizy prób krwi zabezpieczonych od ofiar zgwałceń lub podejrzanych o popełnienie tego typu przestępstw. Wykryte związki zestawiono w tabeli II wraz z liczbą przypadków, w których je wykazano. Każdy z 87 wstępnie dodatnich wyników był potwierdzany jedną z metod – LC-APCI-MS, LC-ESI-MS-MS, GC-NCI-MS i HPLC-DAD – rutynowo stosowaną w Pracowni Analiz Toksykologicznych IES dla danego związku lub grupy związków. Analizę ilościową zidentyfikowanego związku prowadzono omawianą metodą oraz rutynowo stosowaną. Wartości wyznaczonych stężeń były porównywalne. 38 próbek krwi było analizowane przedstawianą metodą LC-APCI-MS po dwóch latach ich przechowywania w stanie zamrożenia.

4. Podsumowanie

Pomimo różnic w budowie chemicznej objętych badaniami związków i bardzo niskich zakresów stężeń, w których mogą występować we krwi, opracowana metoda LC-APCI-MS umożliwia objęcie analizą przesiewową 42 związków określanych mianem „pigulki gwałtu”. Umożliwia ona uzyskanie wyników ilościowych, ale po weryfikacji dodatniego wyniku inną metodą. Metoda ta została z powodzeniem zastosowana do rutynowej analizy prób krwi pobranych od ofiar i sprawców przestępstw, głównie zgwałceń, których dokonanie ułatwiono poprzez zastosowanie środka farmakologicznego.

Podziękowania

Praca naukowa sfinansowana została ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego przeznaczonych na naukę w latach 2007–2010 jako projekt badawczy N N404 2291 33.