

*Prikazi bolesnika/
Case reports*

ODREĐIVANJE LEVAMIZOLA KAO PRIMESE
ULIČNOG KOKAINA/ *Prikaz slučaja*

DETERMINATION OF LEVAMISOLE AS AN
ADULTERANT IN STREET COCAINE

/Case report

Correspondence to:

Dipl. bioh. **Gordana Brajković**
Specijalista toksikološke hemije
Vojnomedicinska akademija,
Centar za kontrolu trovanja,
Beograd
+381-11-3609481
e-mail: gocab@panet.rs

Gordana Brajković, Vesna Kilibarda, Dragana Rančić,
Gordana Tomašević, Nadežda Krstić i Gordana Babić

Vojnomedicinska akademija, Centar za kontrolu trovanja, Beograd

Ključne reči

Levamisol; toksikološko-hemijska analiza;
telo pakovanje; primesa kokaina; tečna
hromatografija; masena i UV
spekrometrija.

Key words

Levamisole; body packer; cocaine adul-
teration; toxicology-chemical analysis;
liquid chromatography; mass and UV
spectrometry.

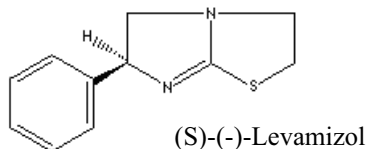
Apstrakt

26-godišnji mladić je dovežen je u Centar za Hitnu pomoć, Vojnomedicinske akademije, sa aerodroma, bez vitalnih funkcija. Bio je „body packer”. Toksikološko-hemijskom analizom uzorka krvi, dokazano je prisustvo visoke koncentracije kokaina, benzoilekgonina i levamisola. Umro je usled predoziranja kokainom, jer je došlo do oštećenja paketa unutar želuca i / ili gastrointestinalnog trakta. Na autopsiji su u telu pronađeni ovalni paketi. Toksikološko-hemijskom analizom paketa, dokazano je prisustvo kokaina i levamisola (primese kokaina). Analiza je urađena tačnom hromatografijom sa PDA detekcijom (HPLC-PDA) i tehnikom tačne hromatografije sa masenom spekrometrijom (LC-MS) gde su podaci prikupljeni u pozitivnom režimu ES+, opseg masa *m/z* 100-500. Droge su izolovane tačno-tačnom ekstrakcijom u hloroformu pri pH 9,0. Razdvajanje je postignuto na koloni Symmetry® C8 sa mobilnom fazom acetonitril : natrijum dihidrogen fosfat 50 mM pH 3,6 i u gradijentu modu i na koloni XTerra® RP18 sa mobilnom fazom: 5 mM amonijumformijat (pH 3,5) : acetonitril sa 0,1% mravljom kiselinom. Metoda je validovana u krvi i linearna je u rasponu 50-2000 ng/mL ($r^2 > 0,99$). Granica detekcije je 25 ng/mL, a limit kvantifikacije je 50 ng/mL.

UVOD

Levamisol pripada klasi sintetičkih imidazotiazol derivata. Levamisol se kao antihelmintik koristi za lečenje nematoda u veterini, a kao imunomodulator u kombinaciji sa drugim oblicima hemoterapije za rak debelog creva, melanoma, raka glave i vrata. Lek je povučen sa američkog i kanadskog tržišta u 2000. i 2003, zbog rizika od ozbiljnih neželjenih efekata. (1)

Usled hiralnosti molekula, postoje dve enantiomerne forme. One se nazivaju S(-)-Levamisol (S)-6-Fenil-2,3,5,6-tetrahidroimidazo[2,1-b][1,3]tiazol (sl 1.) i L(-)-Tetramisol L(-)-2,3,5,6-Tetrahydro-6-phenylimidazo(2,1-b)thiazole. Levamisol je levo-aktivni oblik tetramisola. (2) Dostupni su u obliku hidrohloridnih i fosfatnih soli.



Slika 1. Strukturna formula levamizola

Levamisol se brzo apsorbuje iz GIT-a. Nakon oralne doze od 2,5 mg/kg i 5mg/kg maksimalna koncentracija u plazmi postiže se za oko 2 h i u rasponu od 0,7-1,5mg/L. Poluvreme eliminacije je 3-4 h. (2) Levamisol se intenzivno metaboliše kod ljudi, a samo 4,5% se izlučuje nepromenjen. Glavni metaboliti nastaju dehidrogenacijom u imidazolidinom prstenu i aromatičnom hidroksilacijom pri čemu nastaje p-hidroksi levamisol i njegov konjugovani glukuronid čineći 17% od doze. Levamisol se metaboliše u aminoreks i reksamino koji su simpatomimetici. Na receptore deluju posredno preko kateholamina. Aminoreks deluje kao lokomotorni stimulans, slično amfetaminima. U većini zemalja sveta ova je supstanca proglašena ilegalnom drogom i kao takva zabranjena. (4) Istraživanja aminoreksa su rađena na trkačkim konjima jer je primećeno da je upotrebljiv kao doping sredstvo. (5) Metabolit aminorex je identifikovan i u humanom urinu. Prikazano u radu Elisabetta Bertol. (6) Metaboliti se eliminišu sporije od matičnog leka. Levamisol ima poluzivot 16 h. Izlučuje se urinom 70% kao glukuronid.

Uobičajeno je za ulični kokain da mu se dodaju druge supstance koje smanjenju sadržaj droge ili povećavaju njegova stimulativna svojstva. Primese mogu biti šećeri kao što

su glukoza, manitol i laktoza, kofein i analgetici kao što su lidokain, prokain ili benzokain koji imaju analgetička svojstva. Kokain je lokalni anestetik, vazokonstriktor i moćan psihostimulans. Ova osobina dovodi do zloupotrebe droge. Kokain se vezuje za dopaminske transportere. U centralnom nervnom sistemu u sinapsi, povećava koncentracije dopamina i norepinefrina. Rezultat je osećaj euforije.⁽³⁾

Levamisol je identifikovan kao primesa kokainu. Američka Administracija za suzbijanje narkotika *Drug Enforcement Administration (DEA)* navodi da je do oktobra 2010. godine 79% svih zaplenjenih kokaina u SAD sadržavao levamisol.⁽⁶⁾ Po jednoj teoriji smatra se da levamisol povećava efekte kokaina, formirajući visoko-kvalitetan proizvod. Druga teorija je da levamisol ili druge primese se dodaju kao hemijski potpis za praćenje distribucije materijala.⁽⁸⁾ Može biti da se levamisol kao dodatak koristi zbog sličnih osobina rastvorljivosti kao kokain, pa ga je zato teško ukloniti.

Simptomi predoziranja levamisolom, često imitiraju one, kao kod organofosforne toksičnosti. Simptomi mogu da uključuju hipersalivaciju, hiposenzitivnost, razdražljivost, konvulzije, srčane aritmije, depresiju CNS i kolaps. Akutno predoziranje može dovesti do smrti zbog respiratorne insuficijencije.

Mehanizam delovanja levamisola kao antiparazitskog agensa vezano je za agonističku aktivnost acetilholina, delujući na nikotinske receptore u mišićima nematoda. Ova agonistička aktivnost smanjuje kapacitete mužjaka nematoda da kontrolišu svoje reproduktivne mišiće i ograničava njihovu sposobnost za razmnožavanje. Levamisol se koristi kao antitumorski lek u kombinaciji sa fluorouracilom. Efekti levamisola na imuni sistem su složeni. Levamisol može da stimuliše stvaranje antitela na različite antigene, poboljša odgovor T-ćelija podstičući aktivaciju T-ćelija i proliferaciju monocita i makrofaga, potencirajući hemotaksiju, fagocitozu i mobilnost neutrofila.

Deluje na centralni i periferni nervni sistem i inhibitorno na holinesteraze. Neželjeni efekti terapijskih doza levamisola uključuju mučninu, proliv, dermatitis, umor, povraćanje, artralgiu, infekcije, leukopeniju,⁽¹¹⁾ retko agranulocitozu - (akutna neutropenija), koja može dovesti u do oslabljenog imunog sistema, uključujući infekcije, visoku temperaturu, drhtavicu, otečene žlezde i bolne rane i rane koje se ne leče. Ako se ne leči, stanje može dovesti do smrti.^(9,10,11)

Prikaz slučaja

M. M. (26) dovežen je sa aerodroma u Centar za Hitnu pomoć VMA u teškom stanju, bez znakova vitalnih funkcija. Uzet je uzorak krvi na toksikološki skrining sa sumnjom na opijate. Toksikološko-hemijskom analizom dokazano je prisustvo kokaina, benzoilekgonina i levamisola. Ubrzo po prijemu, mladić je preminuo zbog prekomerne doze kokaina. Urađena je obdukcija i u njegovom gastrointestinalnom traktu nađene su kapsule - paketići. Mladić je bio narkokurir „mula”, koji je u svom telu prenosio kokain. Uzorak paketića sa beličastim, praškastim sadržajem sa Instituta za patologiju i sudsku medicinu poslat je u OTH sa zahtevom da se izvrši toksikološko-hemijska analiza.

Unutrašnji obdukcioni nalaz pokazuje da su svi organi mnogokrvi, a patohistološke promene su ustanovljene na mozgu i srcu. Na mozgu je uočljiv edem, kao i edem pluća.

Toksikološko hemijskom analizom ustanovljeno je prisustvo kokaina u toksičnim koncentracijama. Na osnovu obdukcionog nalaza, mikroskopskog pregleda isečaka organa, toksikološko-hemijske analize, podataka iz medicinske dokumentacije i podataka o okolnostima slučaja, smrt je nasilna i nastupila je usled zloupotrebe narkotika (kokaina).

MATERIJAL I METODE

Uzorak krvi pacijenta, dostavljen je iz Urgentne ambulante, a uzorak paketića dostavljen je od Instituta za patologiju i sudsku medicinu. Hloroform, amonijak, acetonitril i metanol (HPLC čistoće) nabavljeni su od firme Merck, Darmstadt, Nemačka, a standard levamisol- hidrobromid od Sigma-Aldrich. Reagensi mobilne faze: natrijum dihidrogen fosfat koji su korišćeni za analizu dobijeni su od *Sigma-Aldrich*, p.a. Korišćeni su sledeći standardi i referentni materijali: (-)tetramizol hidrohlorid $\geq 99\%$ GC; Lot: 088K0753V; Pcode 1001000094; benzoilekgonin tetrahidrat D745; Batch No 02-D-23; kokain baza D826; Batch No 03-D-06; Liquichek, *Urine Toxicology Control, A human urine drugs of abuse control United States, Bio-Rad Laboratories, level S2-low opiate, lot 73650*; Liquichek, *Urine Toxicology Control A human urine drugs of abuse control United States, Bio-Rad Laboratories, level S3-, lot 67110*.

Levamisol je određen tehnikom tačne hromatografije u sprezi sa PDA detektorom i bibliotekom UV spektara. Hromatografski uslovi za HPLC-PDA: Mobilna faza: acetonitril : natrijum dihidrogen fosfat 50 mM pH 3,6 doteran sa H_3PO_4 (20%). Mobilna faza je filtrirana i degazirana preko membranskog filtra; kolona *Symmetry® C8 4,6x250 mm Waters* sa predkolonom *Sentry Guard Symmetry® C18*, temperatura kolone: 30°C, brzina protoka mobilne faze: 1-1,5 mL/min gradijent: PDA detektor: $\lambda = 215,0$ nm; retenciono vreme za levamisol: $R_t = 7,25$.

Određivanje levamisola vršeno je i tačnom hromatografijom sa maseno-spektrometrijskim detektorom LC-MS. Hromatografski uslovi za LC-MS: Tačno-maseni hromatograf *Waters Alliance 2695, Mass Lynx*, kolona *XTerra® RP18 3,5 μ m 2,1 mm x 150mm*, temperatura kolone 20°C. Mobilna faza: Komponenta A: 5 mM amonijum formijat pH 3,5 doteran sa mravljom kiselinom. Komponenta B: acetonitril sa 0,1% mravljom kiselinom. Autosampler: temperatura 20°C, dužina analize 26 min. Temperatura izvora 125°C, temperatura desolvatacije 430°C; Protok gasa: desolvacioni 400L/h, konusni 50L/h.

Protok mobilne faze: 0,2 mL/min, gradijent; Napon na kapilari 4 kV. Maseni spektrometrijski detektor je optimiziran i podešen na pozitivan mod ES+, opseg masa od 100-500, *scan time* 1. retenciono vreme za levamisol: $R_t = 9,77$.

Uzorak seruma, u zapremini 2 ml zaalkalisan je sa NH_4OH (pH 9,0) i ekstrahovan sa tri puta većom zapreminom hloroforma. Posle ekstrakcije, suvi ostatak rekonstituisan je u mobilnoj fazi i analiziran HPLC-PDA-MS metodom. Određivanje koncentracije vršeno je poređenjem površine pikova analiziranih jedinjenja sa odgovarajućim

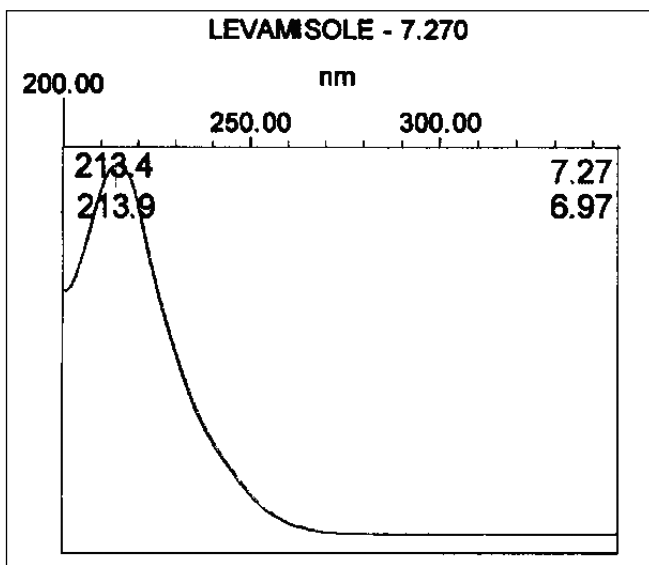
pikovima plazme opterećenih standardnim rastvorima poznate koncentracije.

Uzorak praškaste supstance dostavljenog paketića rastvoren je u metanolu 1mg/mL, razblažen 1000 puta i analiziran HPLC-PDA-MS metodom.

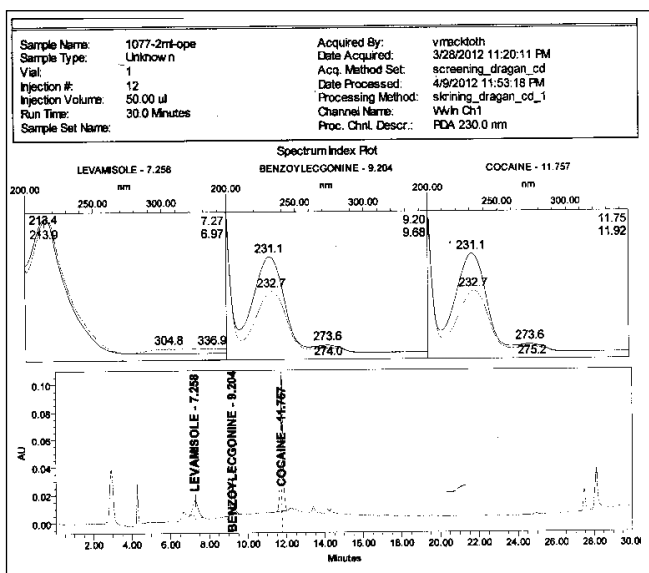
Izolovanje levamizola može se raditi i na *Oasis*® HLB kertridžima metodom čvrsto-fazne ekstrakcije u neutralnoj sredini. Prinos ekstrakcije je visok od 85-102%, a priprema brza i jednostavna, što je od velikog značaja u urgentnoj toksikologiji.

REZULTATI

Uvedene su metode HPLC/PDA-MS za dokazivanje i određivanje levamizola u biološkom materijalu. Na slici 2 prikazan je UV spektar standarda levamizola koji se poklapa sa UV spektrom iz biblioteke spektara.

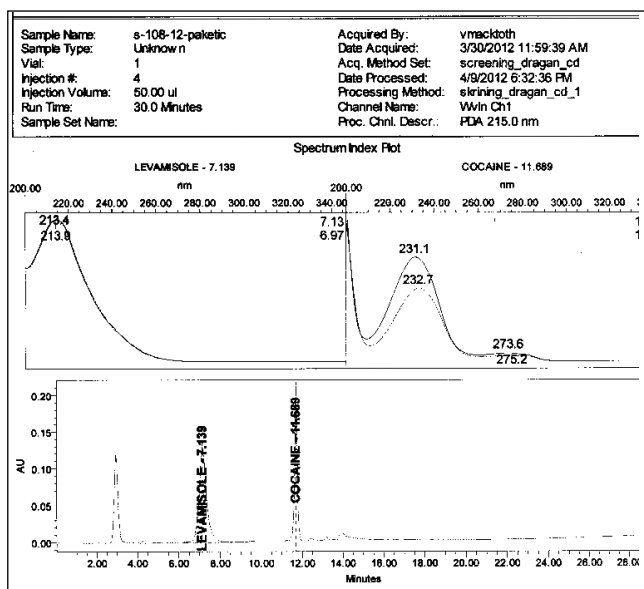


Slika 2. UV spektar standarda levamizola



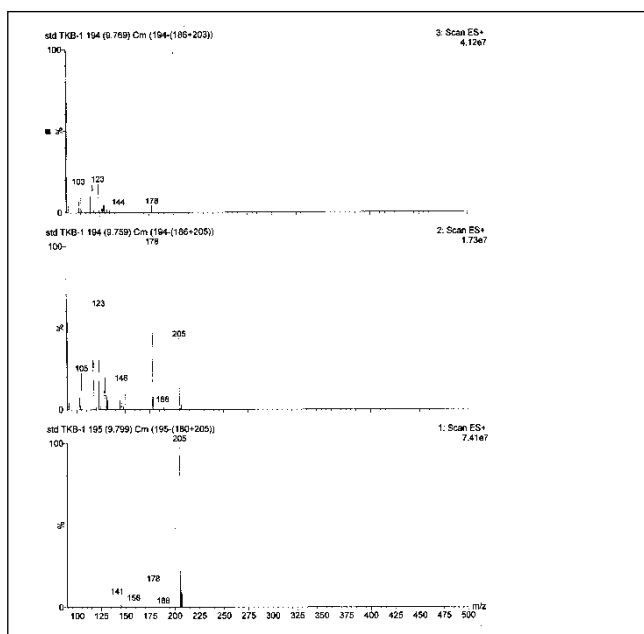
Slika 3. Hromatogram i UV spektri levamizola, benzoilekgonina, kokaina u uzorku krvi

Na slici 3. prikazan je hromatogram i UV spektri levamizola, benzoilekgonina i kokaina u uzorku krvi. Slika 4. prikazuje hromatogram i UV spektre levamizola i kokain iz uzorka paketića izvađenog iz creva „body packer”.



Slika 4. Hromatogram i UV spektri levamizola i kokaina iz uzorka paketića

Na slikama 5-6 prikazani su hromatogrami i MS spektri levamizola u standardu nakon hromatografisanja na LC-MS-u selektovani na jone 205, 178, 123 na voltazama 30mV, 40mV i 50 mV .

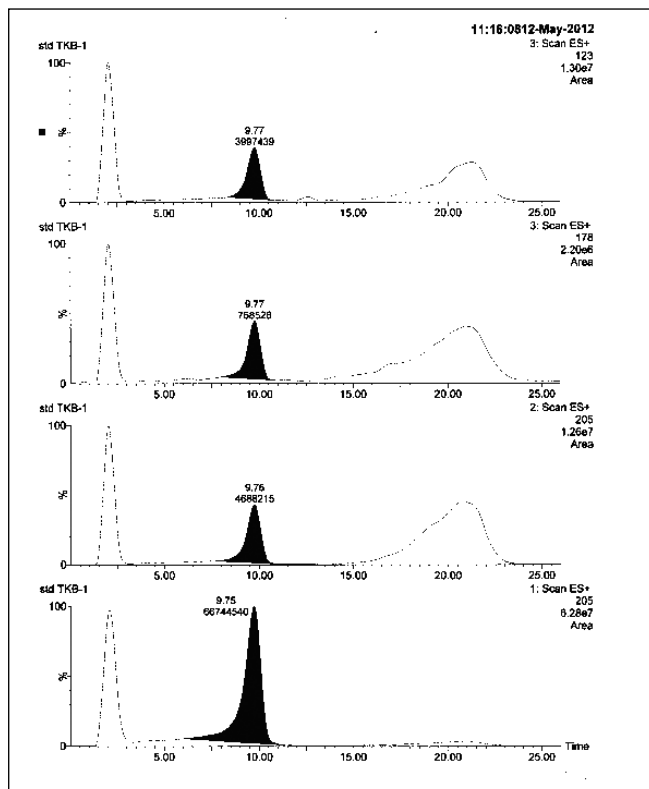


Slika 5. Maseni spektar levamizola u standardu

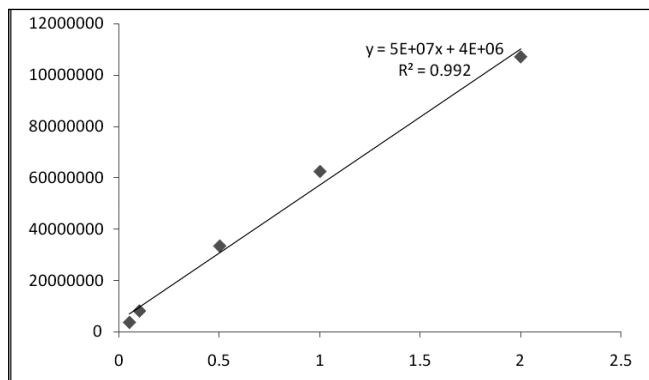
Metoda za levamizol na LC-MS-u je validovana i linearna u rasponu 50-2000 ng/mL ($r^2 > 0,99$). Granica detekcije je 25 ng/mL, a limit kvantifikacije je 50 ng/mL sa prinosom od 76,0 – 95,0%.

Kalibraciona kriva za levamizol je konstruisana metodom najmanjih kvadrata, sa srednjim vrednostima površine pikova za svaku koncentraciju, korišćenjem programa Excel 5. Istim programom su izračunati koeficijenti korelacije (r) i jednačina prave $y = a \pm bx$.

Na slici 7. prikazana je kalibraciona kriva levamizola na LC-MS-u.



Slika 6. Hromatogram levamisola u standardu na LC-MS-u



Slika 7. Kalibraciona kriva i regresiona jednačina za opterećeni serum standardnim rastvorima levamisola na LC-MS-u

Primenom HPLC-PDA-MS metode, izvršena je analiza uzoraka krvi i utvrđeno prisustvo levamisola 1572 ng/mL, benzoilekgonina 3114 ng/mL (glavnog metabolita kokaina) i kokaina 5193 ng/mL u toksičnim koncentracijama.

U dostavljenom uzorku paketića izvađenog iz GIT preminulog takođe je dokazano prisustvo levamisola i kokaina.

DISKUSIJA

Trgovina drogom, upotrebom gastrointestinalnog trakta je priznat međunarodni problem, posebno zbog teškoća njegovog otkrivanja. Ovaj način krijumčarenja može imati ozbiljne medicinske komplikacije, kao što je u prikazanom slučaju *body packer*.

Sveobuhvatnim skriningom krvi korišćenjem tečne hromatografije sa UV detekcijom i masenom spektrometrijom, dokazano je prisustvo kokaina, njegovog metabolita benzoilekgonina i levamisola (primesa kokainu), ko-opojnih sredstava. Koncentracije u krvi levamisola (1572 ng/mL), benzoilekgonina (3114 ng/mL) i kokaina (5193 ng/mL) imale su toksičnu vrednost. Opasno trovanje i smrt nastupili su zbog sekundarnog curenja droge iz paketa u gastrointestinalni trakt. Toksičnost kokaina i levamisola dominantno se ispoljava na kardiopulmonalni i nervni sistem.

Primena tehnike tečne hromatografije sa PDA i MS detekcijom je od velikog značaja u urgentnim i sudsko-medicinskim analizama. Metoda je validovana i linearna u rasponu od 50-2000 ng/mL ($r^2 > 0,99$). Granica detekcije je 25 ng/mL, a limit kvantifikacije je 50 ng/mL sa prinosom od 76,0 – 95,0 %.

U radovima su prikazane čvrsto-fazne, kao i tečno-tečne pripreme uzoraka bioloških materijala i uzoraka hrane na levamisol uz istovremeno prisustvo drugih lekova i opijata. Primene su tehnike: HPLC sa UV detekcijom, sa masenom spektrometrijom, gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom. Savremene metode kao što je metoda UPLC sa tandem masenom spektrometrijom ili LC-ESI-MS/MS pokazuju izrazitu osetljivost, preciznost, linearnost, skraćanje vremena analize i zanemarljiv uticaj rastvarača kao i uticaj bazne linije seruma.^(12,13,14,15,16,17,18,19)

ZAKLJUČAK

Prikazali smo slučaj smrti mladića usled predoziranja kokainom i levamisolom. On je bio *body packer* i prenosio je u svom GIT paketiće sa sadržajem kokaina.

Određivanje koncentracije levamisola u uzorcima je značajno u toksikologiji zbog mogućih trovanja, brojnih neželjenih efekata, a kao česta primesa uličnom kokainu, u sprovođenju forezničke istrage smrti zbog narkomanije. Ovaj metod je razvijen i da bi se odredila učestalost levamisola u uzorcima pacijenata pozitivnih na kokain. Postupak pripreme je jednostavan a detekcija na HPLC-MS-PDA je precizna i specifična kojom se mogu pratiti terapijske i toksične koncentracije.

Abstract

26-year-old man was taken to the Emergency Department at the Military Medical Academy, from the airport, without the vital functions. He was „body packer”. Toxicology-chemical analysis of blood, proved the presence of drugs high concentrations cocaine, benzoylecgonine and levamisole. He's death is due to overdoses secondary to rupture of packets within the stomach and/or gastrointestinal tract. At autopsy identical oval shaped packages were retrieved from his body. Toxicological chemical analysis package, demonstrated the presence of cocaine and levamisole, as a cocaine adulterant, which was determined by liquid chromatography coupled with diode-array detection (DAD) and confirmed technique of liquid chromatography with mass spectrometry (LC-MS), where data are collected either in full-scan ES+ mode at m/z 100-500. Drugs were isolated using a liquid-liquid extraction with chloroform at pH 9.0. Separation was achieved on the Symmetry® C8 column with mobile phase acetonitrile:dihydrogen sodium phosphate 50 mM pH 3.6 in the gradient mode, and XTerra® RP18 column with a mobile phase: 5 mM ammonium formate (pH 3.5) : acetonitrile with 0.1% formic acid. The method is validated blood and linear in the range of 50-2000 ng/mL ($r^2 > 0.99$). Limit of detection was 25 ng/mL and limit of quantification was 50 ng/mL.

LITERATURA

1. Wolford A, McDonald TS, Eng H, Hansel S, Chen Y, Bauman J, Sharma R, Kalgutkar AS Immune-mediated agranulocytosis caused by the cocaine adulterant levamisole: a case for reactive metabolite(s) involvement Drug Metab Dispos. 2012 Jun;40(6):1067-75. Epub 2012 Mar 5.
2. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. 3 Edition, London, Pharmaceutical press 1168, 1614
3. Clarke's Analytical Forensic Toxicology. Edited by Jickells, Sue; Negrusz, Adam; London, Pharmaceutical press 2008; Drugs of Abuse 48-49
4. A Chang, J Osterloh and J Thomas: Levamisole: A Dangerous New Cocaine Adulterant Clinical Pharmacology & Therapeutics 88, 408-411 (September 2010) doi:10.1038/clpt.2010.156
5. E.N.M. Hoa, D.K.K. Leunga, G.N.W. Leunga T.S.M. Wana, A.S.Y. Wonga, C.H.F. Wonga, L.R. Somab J.A. Rudyc C. Uboh, c, R. Samsd Aminorex and rexamino as metabolites of levamisole in the horse. Analytica Chimica Acta Volume 638, Issue 1, 6 April 2009, Pages 58-68.
6. E. Bertol, F. Mari, M. Grazia Di Milia, L. Politi, S. Furlanetto, S. B. Karch: Determination of aminorex in human urine samples by GC-MS after use of levamisole; J. of Pharmaceutical and Biomedical Analy. Volume 55, Issue 5, 15 July 2011, 1186-1189.
7. Buchanan JA, Oyer RJ, Patel NR, Jacquet GA, Bornikova L, Thienelt C, Shriver DA, Shockley LW, Wilson ML, Hurlbut KM, Lavonas EJ: A confirmed case of agranulocytosis after use of cocaine contaminated with levamisole; J Med Toxicol. 2010 Jun;6(2):160-4.
8. Fucci N. "Unusual adulterants in cocaine seized on Italian clandestine market." Forensic Sci Int. Oct 25, 2007;172(2-3):85-224.
9. Larocque A, Hoffman RS Levamisole in cocaine: Clin Toxicol (Phila). 2012 Apr;50(4):231-41.
10. Gross RL, Brucker J, Bahce-Altuntas A, Abadi MA, Lipoff J, Kotlyar D, Barland P, Putterman C. A novel cutaneous vasculitis syndrome induced by levamisole-contaminated cocaine. Clin Rheumatol. 2011 Oct;30(10):1385-92. Epub 2011 Jun 25.
11. Editors. Physicians' Desk Reference. Medical Economics Company. 1998.
12. K. L. Lynch, S S. Dominy, J. Graf, and A H. Kral: Detection of Levamisole Exposure in Cocaine Users by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry; J. of Analyt. Toxicology; 2010;35(3); 176-178.
13. Levamisole, Physicians' Desk Reference. 51st ed. Montvale, NJ: Thomson PDR; 1340, 1997.
14. Ho EN, Leung DK, Leung GN, Wan TS, Wong AS, Wong CH, Soma LR, Rudy JA, Uboh C, Sams R. Aminorex and rexamino as metabolites of levamisole in the horse. Anal Chim Acta. 2009 Apr 6;638(1):58-68.
15. Whelan M, Kinsella B, Furey A, Moloney M, Cantwell H, Lehotay SJ, Danaher M Determination of anthelmintic drug residues in milk using ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with rapid polarity switching; J Chromatogr A. 2010 Jul 2;1217(27):4612-22.
16. Garrido Frenich A, Aguilera-Luiz Mdel M, Martinez Vidal JL, Romero-González R. Comparison of several extraction techniques for multiclass analysis of veterinary drugs in eggs using ultra-high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Anal Chim Acta. 2010 Feb 28;661(2):150-60. Epub 2009 Dec 21
17. Dowling G, Regan L. A new mixed mode solid phase extraction strategy for opioids, cocaine, amphetamines and adulterants in human blood with hybrid liquid chromatography tandem mass spectrometry detection J Pharm Biomed Anal. 2011 Apr 5;54(5):1136-45. Epub 2010 Dec 8.
18. Casale JF, Colley VL, Legatt DF Determination of phenyltetrahydroimidazothiazole enantiomers (Levamisole/Dexamisole) in illicit cocaine seizures and in the urine of cocaine abusers via chiral capillary gas chromatography-flame-ionization detection: clinical and forensic perspectives. J Anal Toxicol. 2012 Mar;36(2):130-5.
19. Trehy ML, Brown DJ, Woodruff JT, Westerberger BJ, Nychis WG, Reuter N, Schier JG, Vagi SJ, Hwang RJ. Determination of levamisole in urine by gas chromatography-mass spectrometry J Anal Toxicol. 2011 Oct;35(8):545-50.

■ Rad je primljen 21.11.2012. Prihvaćen 28.11.2012.