

## Interferenza da acido niflumico/morniflumato nella determinazione dei cannabinoidi su autoanalizzatore ILAB 600

Arcangelo de Gironimo, Vincenzo Musolino\*

Ospedale Principale Marittimo "G. Venticinquè" - Laboratorio Analisi - Servizio di Tossicologia - Taranto

\*Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale - Dipartimento Provinciale di Brindisi

### ABSTRACT

#### Interference from niflumic acid/morniflumate in cannabinoids determination on ILAB 600 automatic analyzer

We describe an experimental investigation showing that some drugs give false positive results when metabolites of cannabinoids are measured in urine samples by an immunochemical method, with the ILAB 600 instrument. The observation of some samples positive to the immunochemical assay but not confirmed by chromatography led us to consider the possibility that this could be due to drug interference in the immunochemical method. By means of GC-mass spectrometry it was shown that niflumic acid and its beta-morphinoethyl ester (Morniflumate) are responsible for false-positive results in the immunochemical assay. This finding was confirmed by the assay of urine samples from subjects free from drug of abuse, but using therapeutic drugs containing niflumic acid/Morniflumate as the active principle.

### RIASSUNTO

Viene descritta una indagine sperimentale che dimostra come alcuni farmaci possano portare a risultati falsamente positivi quando le urine vengono analizzate con metodo immunochimico, su ILAB 600, per la ricerca dei metaboliti urinari dei Cannabinoidi. L'occasionale riscontro di campioni urinari positivi al test di screening non confermati dall'analisi cromatografica, ha portato gli autori ad ipotizzare che tali risultati potessero dipendere dall'uso di farmaci che, direttamente o attraverso loro metaboliti, inducano interferenze (falsi positivi) nell'analisi immunochimica. Indagando su tale ipotesi, attraverso l'analisi cromatografica effettuata in GAS-Massa, si è scoperto che l'acido niflumico e il suo estere beta-morfinoetilico (Morniflumato) sono le sostanze responsabili di alcuni risultati falsamente positivi quando le urine vengono analizzate con il metodo sopra citato. Il risultato è stato confermato dall'analisi di urine di soggetti non dediti all'uso di stupefacenti ma che facevano uso di farmaci contenenti, come principio attivo, acido niflumico/Morniflumato.

### INTRODUZIONE

Il monitoraggio dell'abuso di cannabis viene solitamente effettuato mediante test immunochimici (1-2-3). Tali tecniche non richiedono trattamenti preanalitici (estrazione, idrolisi, concentrazione ecc.), pertanto sono facilmente automatizzabili e permettono l'analisi di un gran numero di campioni in poco tempo. Nel dosaggio delle droghe d'abuso tali test rappresentano il primo livello di analisi. I campioni positivi ai test di screening (test presuntivi) vengono sottoposti ad una ulteriore analisi di tipo cromatografico (4-5-6), che rappresenta il secondo livello di indagine, che chiameremo di verifica.

L'occasionale riscontro di campioni urinari positivi ai test di primo livello e però non confermati dall'analisi cromatografica, ci ha portato ad ipotizzare che tali risultati potessero dipendere dall'uso di farmaci che, direttamente o attraverso loro metaboliti inducano interferenze (falsi positivi) nel test immunochimico. Su tale ipotesi abbiamo voluto indagare, partendo dal controllo critico dei metodi e dei materiali usati nei procedimenti analitici.

### MATERIALI E METODI

Il test immunochimico (EMIT) di screening è stato eseguito su strumento ILAB 600 della ditta Instrumentation Laboratory. I reagenti usati sono prodotti dalla stessa Azienda e sono stati utilizzati attenendosi scrupolosamente alle istruzioni fornite. In ogni seduta analitica sono stati analizzati controlli positivi e negativi ottenendo risultati compresi nei limiti di accettabilità.

Le determinazioni cromatografiche in HPLC (Cromatografia Liquida ad Alte Prestazioni) sono state compiute mediante sistema automatico Perkin Elmer in uso presso il Servizio di Tossicologia dell'Ospedale Principale Marittimo "G. Venticinquè" di Taranto. La strumentazione si avvale di un personal computer provvisto del software Turbocrom 4.0 che controlla la pompa quaternaria modello 200, l'autocampionatore AS 200 ed il rivelatore a serie di diodi LC 235C. Il software è in grado di controllare le unità LC collegate, elaborare i dati strumentali ed archiviare metodi, cromatogrammi e bollettini analitici. Può inoltre eseguire la rielaborazione di dati memorizzati, la reintegrazione grafica e la calibrazione multilivello.

L'estrazione in fase solida dei campioni urinari è stata effettuata su colonne Bond Elut Certify II LCR (Varian) da 130 mg. L'analisi HPLC è stata condotta utilizzando la colonna Supelco C18 ABZ plus 250 x 4,6 mm 5  $\mu$ m provvista di precolonna Supelcoguard 2 cm x 4.0 mm 5  $\mu$ m. L'acido  $\Delta^9$  THC COOH utilizzato come standard analitico e il cannabinolo (standard interno) in soluzione metanolica sono stati forniti dalla ditta Salars (Como), e i reattivi, tutti di purezza analitica o di grado HPLC, da J.T. Baker.

Per l'analisi in GC-MS è stato utilizzato un GAS cromatografo Perkin Elmer modello CLARUS 500 in uso presso l'Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale - Dipartimento Provinciale di Brindisi, dotato di rilevatore di massa con sistema di ionizzazione ad impatto elettronico (EI). L'analisi è stata effettuata su colonna capillare J&W DB-5 30 m x 0,32 mm d.i., spessore del film = 0,25  $\mu$ m.

## RISULTATI

Il metodo HPLC utilizzato per le analisi di conferma è stato sviluppato e validato presso il Servizio di Tossicologia

dell'Ospedale Principale Marittimo "G. Ventinque" di Taranto e, fino ad oggi, sono stati analizzati oltre 1000 campioni, risultati tutti liberi da interferenze di sostanze endogene o esogene. L'identificazione del metabolita acido del cannabinolo è operata per mezzo del tempo di ritenzione caratteristico che è confrontato, in ogni seduta analitica, con il tempo di ritenzione di uno standard puro aggiunto ad urine di soggetti non dediti all'uso di cannabinoidi. La figura 1 riporta un cromatogramma di un campione positivo al test di primo livello confermato dall'indagine in HPLC.

Come si può osservare, il tracciato riporta un picco con tempo di ritenzione 10,12 minuti, corrispondente al THC-COOH (112 ng/ml). La figura 2 rappresenta il risultato di un'analisi cromatografica condotta sulle urine di un soggetto non dedito all'uso di droghe (urine drug-free).

L'osservazione di quest'ultimo tracciato mette in evidenza l'assenza di qualsiasi picco con tempo di ritenzione comparabile con il THC-COOH.

Con il metodo descritto sono stati indagati alcuni campioni urinari risultati positivi al test immunochimico condotto su strumento ILAB 600. Il dosaggio qualitativo su tali

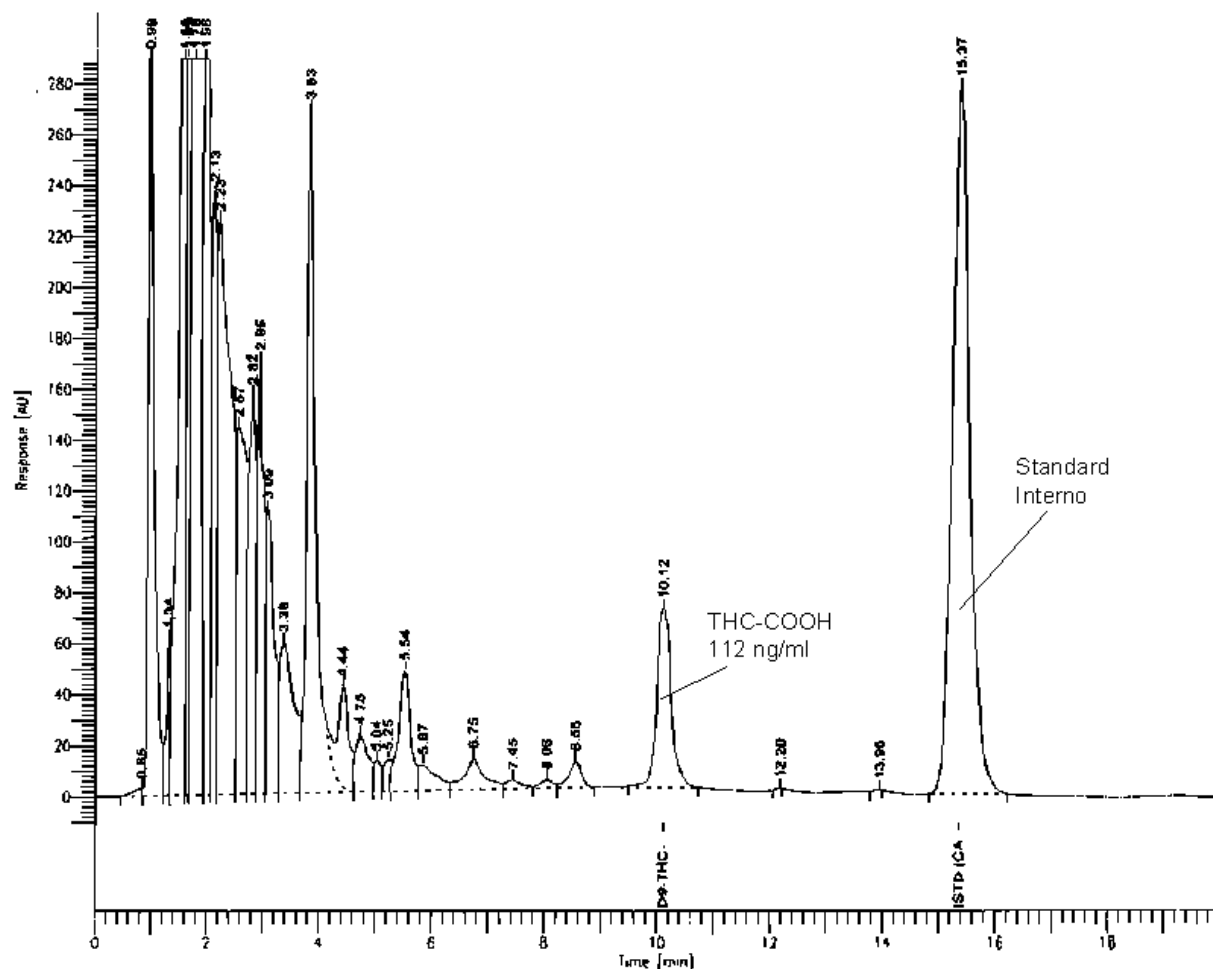
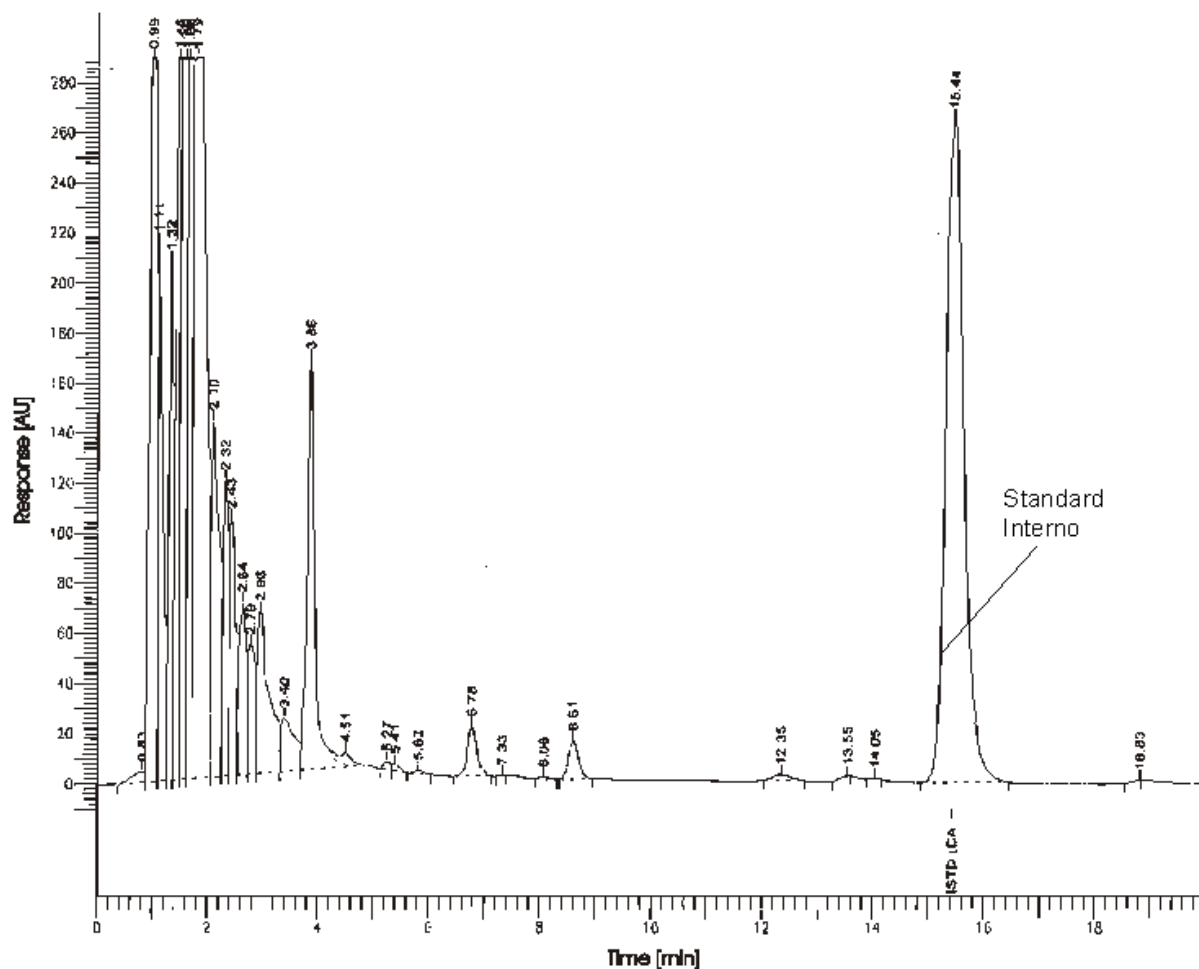


Figura 1  
Conferma in HPLC di un risultato positivo al test immunochimico.



**Figura 2**  
Cromatogramma di un estratto urinario non contenete droghe.

campioni ha dato esito positivo (valore soglia 50 ng/ml). I campioni in esame sono stati sottoposti ad analisi cromatografica per la ricerca dell'acido 11nor  $\Delta^9$  THC COOH, maggior metabolita urinario dei cannabinoidi

I cromatogrammi di questo esame non hanno mostrato la presenza di picchi cromatografici con tempo di eluizione compatibile con l'acido  $\Delta^9$  THC COOH. Pertanto, i risultati dei test di primo livello di questi campioni dovevano essere considerati "falsamente" positivi. La figura 3 riporta il risultato cromatografico ottenuto dall'analisi di uno di questi campioni.

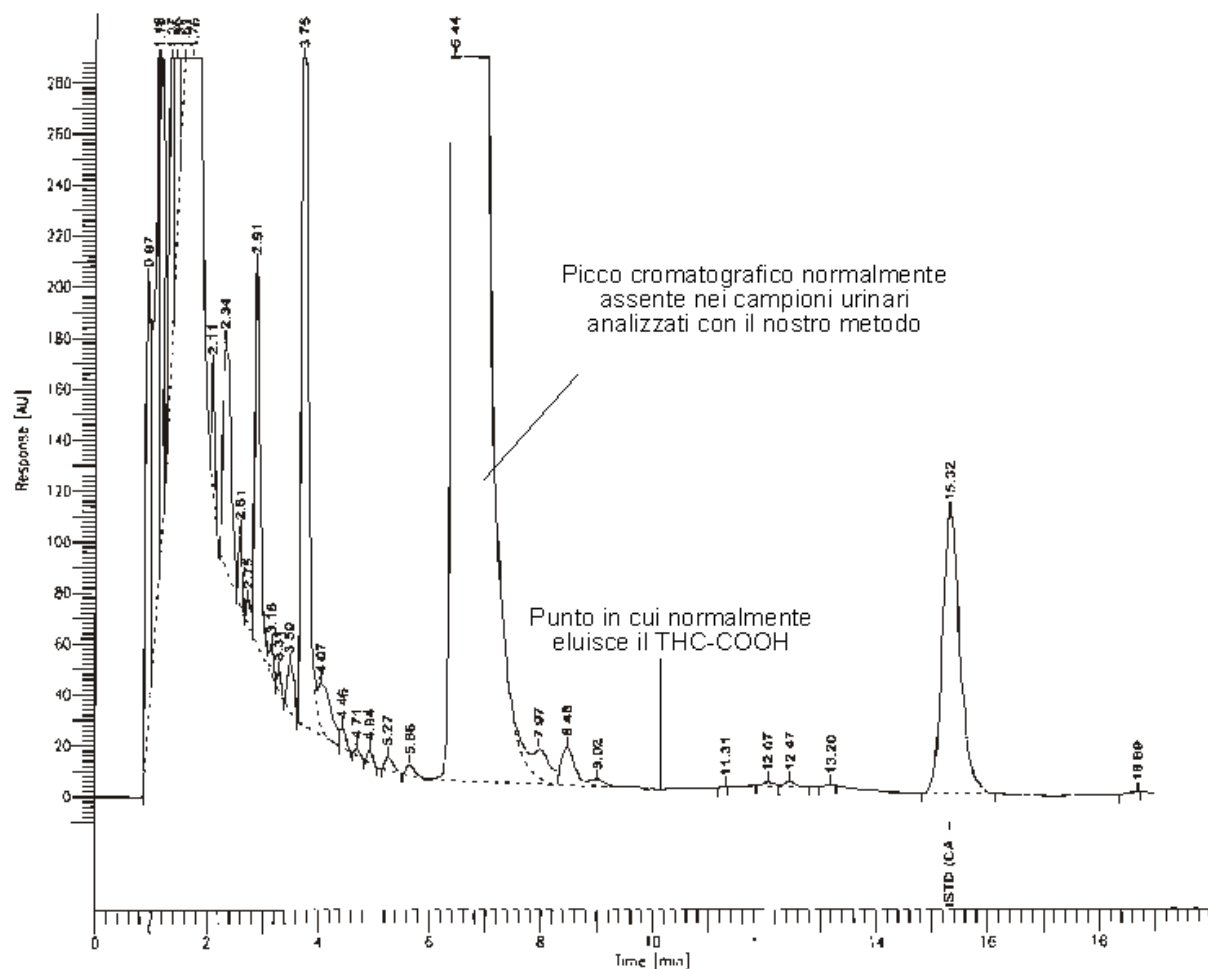
Osservando la figura, è possibile notare la presenza di un picco significativo con tempo di ritenzione pari a 6.44 min, che potrebbe rappresentare la sostanza interferente. La frazione cromatografica dello stesso campione compresa tra 5,5 e 7,5 minuti è stata raccolta con un raccogliatore di frazioni e sottoposta ad ulteriore indagine mediante gas-cromatografo dotato di detector di massa. C'è stato un unico picco, e l'identificazione della sostanza a lui corrispondente è stata operata in TIC al tempo di ritenzione di 9.38 min. Si è scoperto che si trattava dell'acido niflumico. Per confermare tale risultato, in una successiva

indagine è stata raccolta l'urina di un soggetto non dedito all'uso di cannabinoidi ma in trattamento terapeutico con NIFLAM® (cps da 250 mg di acido niflumico).

Il campione urinario raccolto a 12 ore dall'assunzione del farmaco (prima minzione del mattino) è stato analizzato mediante test EMIT su ILAB 600 per la ricerca dei metaboliti urinari dei cannabinoidi. L'analisi ha dato esito francamente positivo. La successiva indagine cromatografica ha escluso la presenza all'acido  $\Delta^9$  THC COOH (falso positivo al test di primo livello). Risultati analoghi sono stati ottenuti con FLOMAX® (cps da 700 mg di morniflumato).

## DISCUSSIONE

Osservando il tracciato cromatografico di uno dei campioni risultato positivo al test di I livello ma non confermato dall'indagine di II livello (figura 3), è possibile notare la presenza di un rilevante picco (non compatibile con il  $\Delta^9$  THC COOH) normalmente non presente nei campioni urinari. La costante presenza di tale picco in campioni positivi allo screening ma non confermati dall'indagine



**Figura 3**  
Cromatogramma dell'estratto di un campione urinario positivo al test immunochimico non confermato dall'analisi HPLC.

cromatografica ci ha portato ad ipotizzare che tale picco potesse rappresentare la sostanza interferente.

L'indagine cromatografica condotta in gas-massa (fig. 4) sulla frazione raccolta ci ha permesso di identificare la sostanza interferente come acido niflumico.

Il risultato è stato confermato dall'analisi di urine di soggetti non dediti all'uso di stupefacenti ma che facevano uso di farmaci contenenti, come principio attivo, acido niflumico.

## CONCLUSIONI

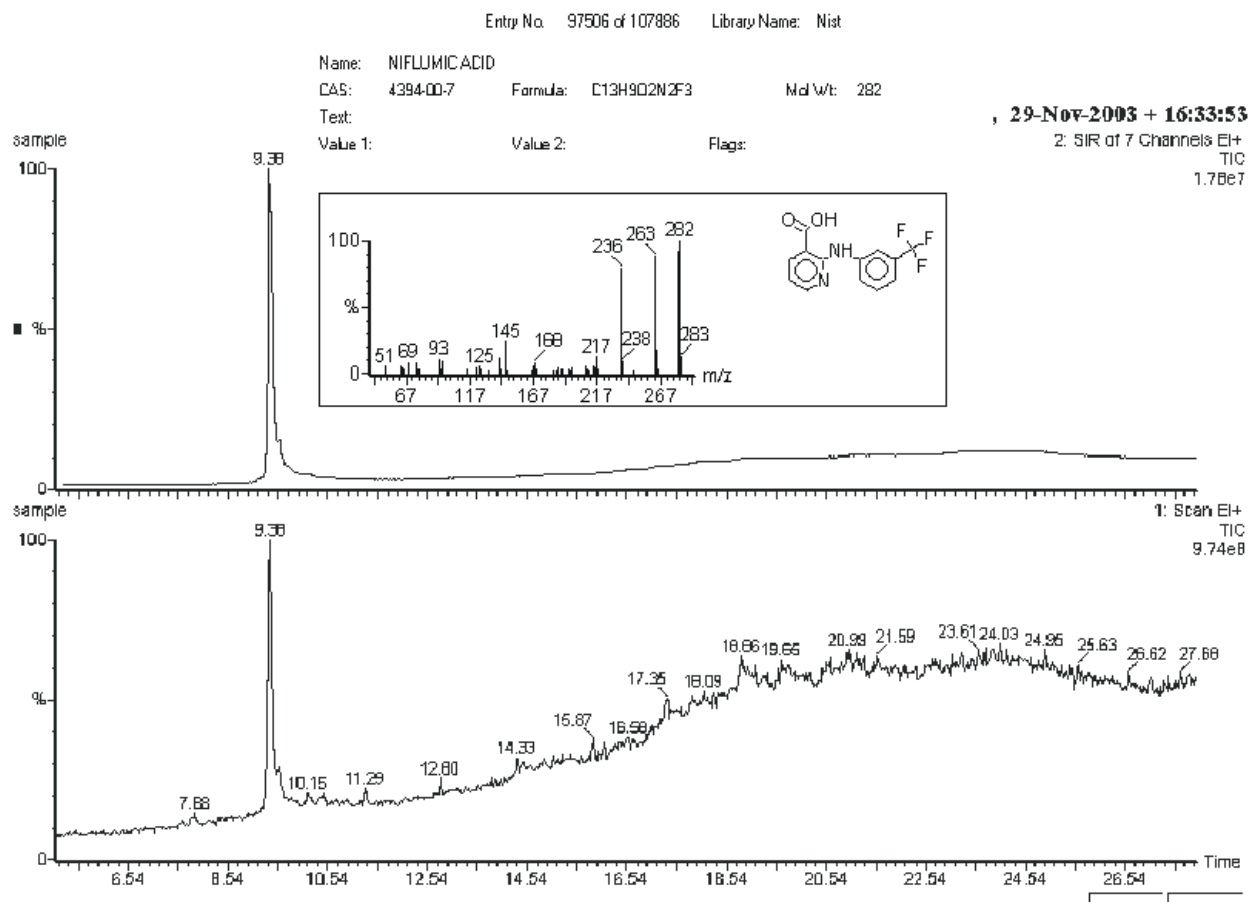
L'acido niflumico e il suo estere beta morfolinoetilico (morniflumato) sono derivati dell'acido nicotinico. Tali sostanze appartengono alla categoria degli antiinfiammatori non steroidei (FANS) e, come tali, vengono utilizzati in diverse condizioni flogistiche. I farmaci più noti che contengono acido niflumico/morniflumato, distribuiti in Italia, sono: Flomax®, Morniflu® e Niflam®. Si tratta di preparati usati in larga diffusione anche in pediatria.

Secondo il nostro studio l'uso di tali farmaci può portare

a risultati falsamente positivi quando le urine sottoposte al test di screening per i cannabinoidi vengono analizzate con il metodo sopra citato. Ancora una volta le nostre osservazioni attestano l'indispensabilità dell'analisi cromatografica per confermare la presenza di droghe, o di loro metaboliti, nei campioni positivi al test di screening.

## BIBLIOGRAFIA

1. De Laurentis MJ, McNeil K, Mann AJ, Clark S, Greenwood HM. An EMIT Assay for Cannabinoid Metabolites in Urine. N.I.D.A. Reserch Monograph Series 1982;42:69-84.
2. Painter C, Evans HJ, Greenwood DJ, Fain W. Urine Cannabinoid Monitoring. Clinical Casebook 1989;27:29-33.
3. Jones AB, ElSohly HN, Arafat ES, ElSohly MA. Analysis of the major metabolite of delta 9-tetrahydrocannabinol in urine. A comparison of five methods. Journal of Analytical toxicology 1984; 8(6):249-51.
4. Bianchi V, Mazza L, Macchi C, Donzelli C. Acido 11-Nor-9-Tetraidrocannabinol-9-Carbossilico: nuovo metodo in cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) per confermare nelle urine l'uso di derivati della cannabis. Giornale Italiano Chimica Clinica 1995; 20(4):227-232.

**Figura 4**

Risultato dell'analisi Gas-Massa sulla frazione raccolta dall'HPLC.

5. Pellegrino S, Petrarulo M, Pollano M, Rodolico S, Tedeschi P. Valutazione di metodi immunochimici di screening per i cannabinoidi urinari con l'ausilio di una procedura cromatografica di conferma. *Giornale Italiano Chimica Clinica* 1995; 20(1):39-46.
6. Ferrara SD, Tedeschi L, Frison G, Castagna F. Solid-Phase Extraction and HPLC-UV Confirmation of Drugs of Abuse in Urine. *Journal of Analytical Toxicology*; 1992; 16:217-222.