

UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Chimica

Direttore Prof. Mauro Freccero

Corso di Laurea Magistrale in Chimica

Caratterizzazione di preparazioni a base di Cannabis: sviluppo e convalida di un metodo analitico HPLC-UV

Relatore:
Prof. Daniele Merli

Correlatore:
Prof.ssa Gabriella Roda

Tesi di Laurea Magistrale di:
Alice D'Angelo

Anno Accademico 2025/2026

Indice

Abstract **9**

Sede del lavoro sperimentale **14**

1 Introduzione **15**

1.1 Cannabis sativa . . . 15
1.2 Classificazione botanica e chemotipi . . . 16
1.3 I cannabinoidi . . . 17
1.3.1 Biosintesi dei fitocannabinoidi . . . 18
1.3.2 Principali cannabinoidi . . . 19
1.3.3 Cannabinoidi minori . . . 24
1.3.4 Altri cannabinoidi . . . 30

2 Aspetti farmacologici e normativi **32**

2.1 Aspetti farmacologici dei cannabinoidi . . . 32
2.1.1 Farmacodinamica . . . 32
2.1.2 Farmacocinetica . . . 33
2.2 Inquadramento normativo . . . 33

3 Analisi chimica dei cannabinoidi **37**

3.1 Problematiche analitiche . . . 37
3.2 Tecniche cromatografiche per l'analisi dei cannabinoidi . . . 38
3.2.1 GC-MS . . . 38
3.2.2 HPLC-UV . . . 39
3.2.3 HPLC-MS . . . 40
3.3 Metodi multianalita per la determinazione dei cannabinoidi . . . 41

4 Scopo del lavoro **43**

5 Materiali e metodi **45**

5.1 Vetreria e strumentazione . . . 45
5.2 Solventi e reagenti . . . 45
5.3 Standard e sostanze di riferimento . . . 46
5.4 Apparecchiature . . . 47
5.5 Sviluppo e ottimizzazione del metodo HPLC-UV . . . 48
5.5.1 Condizioni cromatografiche iniziali . . . 48
5.5.2 Prime prove di ottimizzazione . . . 49
5.5.3 Ottimizzazione delle coppie critiche . . . 50
5.5.4 Prove di separazione degli isomeri . . . 51
5.6 Condizioni cromatografiche definitive . . . 52
5.7 Tempi di ritenzione . . . 53
5.8 Caratterizzazione dei cannabinoidi mediante GC-MS . . . 55
5.9 Caratterizzazione dei cannabinoidi mediante HPLC-MS . . . 56

6 Analisi quantitativa dei cannabinoidi **59**
6.1 Preparazione delle soluzioni di calibrazione . . . 59
6.2 Rette di calibrazione . . . 60
6.3 Calcolo mediante Relative Response Factors (RRF) . . . 70
6.4 Calcolo mediante il rapporto delle pendenze . . . 71
6.5 Calcolo mediante LRRFM . . . 73
6.6 Confronto tra i metodi . . . 75

7 Convalida del metodo **78**
7.1 Specificità . . . 78
7.2 Linearità . . . 78
7.3 Accuratezza . . . 79
7.4 Precisione . . . 80
7.4.1 Ripetibilità . . . 81
7.4.2 Precisione intermedia . . . 82
7.5 System Suitability Test . . . 84
7.6 Limite di rivelabilità (LOD) . . . 87
7.7 Limite di quantificazione (LOQ) . . . 88
7.8 Robustezza . . . 88
7.9 Carry-over dell'autocampionatore . . . 90
7.10 Verifica delle diluizioni . . . 90
7.11 Stima dell'incertezza di misura . . . 90

8 Analisi dei campioni reali **93**
8.1 Campioni di Marijuana e Hashish da sequestro e Cannabis Light . . . 93
8.1.1 Campione di Marijuana . . . 93
8.1.2 Campione di Hashish . . . 95
8.1.3 Resina di Cannabis Light . . . 96
8.2 Prodotti alimentari . . . 98
8.2.1 Caramella rossa . . . 99
8.2.2 Caramella gialla . . . 100
8.2.3 Biscotto "Real THC Cookies" . . . 101
8.3 Liquido per sigaretta elettronica . . . 101
8.4 Conferma qualitativa mediante GC-MS . . . 103
8.5 Preparazioni di Cannabis medicinale . . . 103
8.5.1 Resine . . . 104
8.5.2 Oleoliti . . . 106
8.6 Analisi complementari mediante HPLC-MS . . . 107
8.6.1 Confronto tra i risultati HPLC-UV e HPLC-MS . . . 110
8.6.2 Confronto tra resine e oleoliti della stessa varietà . . . 115

9 Conclusioni **117**

A Cromatogrammi HPLC-UV delle prove di ottimizzazione del metodo **119**

B Spettri di massa degli standard **121**

C Cromatogrammi estratti e spettri di massa-massa degli standard **125**

D Cromatogrammi HPLC-UV dei campioni reali **133**

E Cromatogrammi GC-MS dei campioni reali **137**

F Cromatogrammi HPLC-MS dei campioni reali **139**

Elenco delle figure

1 HPLC-UV chromatogram of the 23 cannabinoids separated under the optimised analytical conditions. . . . 10
2 Pianta di Cannabis sativa (a sinistra) e infiorescenze femminili (a destra). . . . 15
3 Rappresentazione schematica delle principali vie biosintetiche dei fitocannabinoidi. . . . 19
4 Struttura Δ^9-THCA . . . 20
5 Struttura Δ^9-THC . . . 20
6 Struttura CBDA . . . 21
7 Struttura CBD . . . 21
8 Struttura Δ^8-THC . . . 22
9 Struttura CBGA . . . 22
10 Struttura CBG . . . 22
11 Struttura CBCA . . . 23
12 Struttura CBC . . . 23
13 Struttura CBNA . . . 23
14 Struttura CBN . . . 24
15 Struttura CBDVA . . . 25
16 Struttura CBDV . . . 25
17 Struttura THCVA . . . 26
18 Struttura THCV . . . 26
19 Struttura CBE . . . 27
20 Struttura CBL . . . 27
21 Struttura CBT . . . 28
22 Struttura CBND . . . 28
23 Struttura CBP . . . 29
24 Struttura DCBF . . . 29
25 Struttura CBQN . . . 30
26 Struttura THD (H4-CBD) . . . 30
27 Struttura ISO-CBD . . . 31
28 Struttura Δ^8-ISO-THC . . . 31
29 Sistema endocannabinoide nella sinapsi neuronale. . . . 32
30 Schema generale di un sistema GC-MS . . . 38
31 Rappresentazione schematica di un sistema HPLC-UV . . . 40
32 Schema generale di un sistema HPLC-MS . . . 41
33 HPLC-UV 1200 Series (Agilent Technologies) . . . 47
34 Cromatogramma HPLC-UV dei 23 cannabinoidi . . . 54
35 GC Hewlett Packard (HP), modello MS-5973 . . . 55
36 Agilent 1290 Infinity II LC accoppiato a SCIEX ZenoTOF 7600 . . . 57
37 Retta CBND . . . 62
38 Retta CBE . . . 62
39 Retta ISO-CBD . . . 62

40 Retta THD . . . 63
41 Retta CBQN . . . 63
42 Retta Δ^8-ISO-THC . . . 63
43 Retta CBP . . . 64
44 Retta CBL . . . 64
45 Retta CBT . . . 64
46 Retta DCBF . . . 65
47 Retta CBDVA . . . 65
48 Retta CBDA . . . 65
49 Retta CBGA . . . 66
50 Retta THCVA . . . 66
51 Retta CBNA . . . 66
52 Retta Δ^9-THCA . . . 67
53 Retta CBCA . . . 67
54 Retta CBDV . . . 67
55 Retta CBG . . . 68
56 Retta CBD . . . 68
57 Retta CBN . . . 68
58 Retta Δ^9-THC . . . 69
59 Retta Δ^8-THC . . . 69
60 Retta CBC . . . 69
61 Campione di Marijuana da strada sequestrata . . . 93
62 Campione di hashish sottoposto ad analisi HPLC-UV. . . . 95
63 Campione di resina di Cannabis Light . . . 97
64 Campione di caramelle gommose rosse "Puffy" . . . 99
65 Campione di caramelle gommose gialle . . . 100
66 Campione di biscotto "Real THC Cookies – Hybrid/Taste High Cookies" . . . 101
67 Sigaretta elettronica contenente una resina traslucida ambrata . . . 102
68 Distribuzione relativa dei segnali dei cannabinoidi rilevati mediante HPLC-MS nelle resine medicinali Bedrocan (a), Bediol (b), Bedrolite (c), Bedica (d) e FM2 (e). Le proporzioni rappresentate derivano dalla risposta strumentale relativa e non corrispondono a concentrazioni percentuali dei singoli cannabinoidi. . . . 109
69 Distribuzione relativa dei segnali dei cannabinoidi rilevati mediante HPLC-MS negli oleoliti Bedrocan (a), Bediol (b), Bedrolite (c), Bedica (d) e FM2 (e). Le proporzioni rappresentate derivano dalla risposta strumentale relativa e non corrispondono a concentrazioni percentuali dei singoli cannabinoidi. . . . 110
70 Cromatogramma del mix CBE-CBDA ottenuto mediante HPLC-UV . . . 119
71 Cromatogramma del mix CBE-CBDA ottenuto mediante HPLC-UV dopo ottimizzazione del metodo . . . 119
72 Cromatogramma del mix THCV-THD ottenuto mediante HPLC-UV . . . 119
73 Cromatogramma del mix THCV-THD ottenuto mediante HPLC-UV dopo ottimizzazione del metodo . . . 119

74 Cromatogramma del mix CBQN-D9-THC ottenuto mediante HPLC-UV 120
75 Cromatogramma del mix CBQN-D9-THC ottenuto mediante HPLC-UV dopo ottimizzazione del metodo 120
76 Cromatogramma del mix D8-ISO-THC D8-THC ottenuto mediante HPLC-UV 120
77 Cromatogramma del mix D8-ISO-THC D8-THC ottenuto mediante HPLC-UV dopo ottimizzazione del metodo 120
78 Spettro di massa del CBDV ottenuto mediante GC-MS 121
79 Spettro di massa del CBT ottenuto mediante GC-MS 121
80 Spettro di massa del THCV ottenuto mediante GC-MS 121
81 Spettro di massa del CBQN ottenuto mediante GC-MS 121
82 Spettro di massa del CBND ottenuto mediante GC-MS 122
83 Spettro di massa del CBL ottenuto mediante GC-MS 122
84 Spettro di massa del CBD ottenuto mediante GC-MS 122
85 Spettro di massa dell'ISO-CBD ottenuto mediante GC-MS 122
86 Spettro di massa del CBC ottenuto mediante GC-MS 123
87 Spettro di massa del Δ^8-ISO-THC ottenuto mediante GC-MS 123
88 Spettro di massa del THD ottenuto mediante GC-MS 123
89 Spettro di massa del Δ^8-THC ottenuto mediante GC-MS 123
90 Spettro di massa del CBE ottenuto mediante GC-MS 124
91 Spettro di massa del Δ^9-THC ottenuto mediante GC-MS 124
92 Spettro di massa del DCBF ottenuto mediante GC-MS 124
93 Spettro di massa del CBG ottenuto mediante GC-MS 124
94 Spettro di massa del CBN ottenuto mediante GC-MS 125
95 Spettro di massa del CBP ottenuto mediante GC-MS 125
96 Cromatogramma estratto (a sinistra) e spettro MS/MS (a destra) del CBDVA ottenuti mediante HPLC-MS 125
97 Cromatogramma estratto (a sinistra) e spettro MS/MS (a destra) del CBND ottenuti mediante HPLC-MS 126
98 Cromatogramma estratto (a sinistra) e spettro MS/MS (a destra) del CBDV ottenuti mediante HPLC-MS 126
99 Cromatogramma estratto (a sinistra) e spettro MS/MS (a destra) del CBE ottenuti mediante HPLC-MS 126
100 Cromatogramma estratto (a sinistra) e spettro MS/MS (a destra) del CBDA ottenuti mediante HPLC-MS 127
101 Cromatogramma estratto (a sinistra) e spettro MS/MS (a destra) del CBGA ottenuti mediante HPLC-MS 127
102 Cromatogramma estratto (a sinistra) e spettro MS/MS (a destra) del CBG ottenuti mediante HPLC-MS 127
103 Cromatogramma estratto (a sinistra) e spettro MS/MS (a destra) del CBD ottenuti mediante HPLC-MS 128
104 Cromatogramma estratto (a sinistra) e spettro MS/MS (a destra) del THCV ottenuti mediante HPLC-MS 128

105 Cromatogramma estratto (a sinistra) e spettro MS/MS (a destra) del THD ottenuti mediante HPLC-MS . . . 128
106 Cromatogramma estratto (a sinistra) e spettro MS/MS (a destra) del THCVA ottenuti mediante HPLC-MS . . . 129
107 Cromatogramma estratto (a sinistra) e spettro MS/MS (a destra) del CBN ottenuti mediante HPLC-MS . . . 129
108 Cromatogramma estratto (a sinistra) e spettro MS/MS (a destra) del CBNA ottenuti mediante HPLC-MS . . . 129
109 Cromatogramma estratto (a sinistra) e spettro MS/MS (a destra) del CBQN ottenuti mediante HPLC-MS . . . 130
110 Cromatogramma estratto (a sinistra) e spettro MS/MS (a destra) del Δ^9-THC ottenuti mediante HPLC-MS . . . 130
111 Cromatogramma estratto (a sinistra) e spettro MS/MS (a destra) del Δ^8-THC ottenuti mediante HPLC-MS . . . 130
112 Cromatogramma estratto (a sinistra) e spettro MS/MS (a destra) del CBP ottenuti mediante HPLC-MS . . . 131
113 Cromatogramma estratto (a sinistra) e spettro MS/MS (a destra) del CBL ottenuti mediante HPLC-MS . . . 131
114 Cromatogramma estratto (a sinistra) e spettro MS/MS (a destra) del CBC ottenuti mediante HPLC-MS . . . 131
115 Cromatogramma estratto (a sinistra) e spettro MS/MS (a destra) del Δ^9-THCA ottenuti mediante HPLC-MS . . . 132
116 Cromatogramma estratto (a sinistra) e spettro MS/MS (a destra) del CBCA ottenuti mediante HPLC-MS . . . 132
117 Cromatogramma estratto (a sinistra) e spettro MS/MS (a destra) del CBT ottenuti mediante HPLC-MS . . . 132
118 Cromatogramma estratto (a sinistra) e spettro MS/MS (a destra) del DCBF ottenuti mediante HPLC-MS . . . 133
119 Cromatogramma del campione di Marijuana da strada ottenuto mediante HPLC-UV . . . 133
120 Cromatogramma del campione di Hashish ottenuto mediante HPLC-UV . . . 133
121 Cromatogramma del campione di resina di Cannabis light ottenuto mediante HPLC-UV . 133
122 Cromatogramma del campione di caramella rossa ottenuto mediante HPLC-UV . . . 134
123 Cromatogramma del campione di caramella gialla ottenuto mediante HPLC-UV . . . 134
124 Cromatogramma del campione di biscotto ottenuto mediante HPLC-UV . . . 134
125 Cromatogramma del campione di liquido per sigaretta elettronica ottenuto mediante HPLC-UV . . . 134
126 Cromatogramma del campione di resina Bedrocan ottenuto mediante HPLC-UV . . . 134
127 Cromatogramma del campione di resina Bediol ottenuto mediante HPLC-UV . . . 135
128 Cromatogramma del campione di resina Bedrolite ottenuto mediante HPLC-UV . . . 135
129 Cromatogramma del campione di resina Bedica ottenuto mediante HPLC-UV . . . 135
130 Cromatogramma del campione di resina FM2 ottenuto mediante HPLC-UV . . . 135
131 Cromatogramma del campione di oleolita Bedrocan ottenuto mediante HPLC-UV . . . 135

132 Cromatogramma del campione di oleolita Bediol ottenuto mediante HPLC-UV 136
133 Cromatogramma del campione di oleolita Bedrolite ottenuto mediante HPLC-UV 136
134 Cromatogramma del campione di oleolita Bedica ottenuto mediante HPLC-UV 136
135 Cromatogramma del campione di oleolita FM2 ottenuto mediante HPLC-UV 136
136 Cromatogramma del campione di Marijuana da strada ottenuto mediante GC-MS 137
137 Cromatogramma del campione di Hashish ottenuto mediante GC-MS 137
138 Cromatogramma del campione di resina di Cannabis light ottenuto mediante GC-MS . . . 137
139 Cromatogramma del campione di caramella rossa ottenuto mediante GC-MS 137
140 Cromatogramma del campione di caramella gialla ottenuto mediante GC-MS 138
141 Cromatogramma del campione di biscotto ottenuto mediante GC-MS 138
142 Cromatogramma del campione di liquido per sigaretta elettronica ottenuto mediante GC-MS138
143 Cromatogramma del campione di resina Bedrocan ottenuto mediante HPLC-MS 139
144 Cromatogramma del campione di resina Bediol ottenuto mediante HPLC-MS 139
145 Cromatogramma del campione di resina Bedrolite ottenuto mediante HPLC-MS 140
146 Cromatogramma del campione di resina Bedica ottenuto mediante HPLC-MS 140
147 Cromatogramma del campione di resina FM2 ottenuto mediante HPLC-MS 141
148 Cromatogramma del campione di oleolita Bedrocan ottenuto mediante HPLC-MS 141
149 Cromatogramma del campione di oleolita Bediol ottenuto mediante HPLC-MS 142
150 Cromatogramma del campione di oleolita Bedrolite ottenuto mediante HPLC-MS 142
151 Cromatogramma del campione di oleolita Bedica ottenuto mediante HPLC-MS 143
152 Cromatogramma del campione di oleolita FM2 ottenuto mediante HPLC-MS 143

Abstract

Characterisation of Cannabis-Based Preparations: Development and Validation of an HPLC-UV Analytical Method

Background and aim of the study

Cannabis sativa is characterised by a complex chemical composition, including cannabinoids, terpenes, flavonoids and other secondary metabolites. Its cannabinoid profile varies according to genetic characteristics, cultivation conditions and the processing and storage of plant material. Although Δ^9-tetrahydrocannabinol (Δ^9-THC) and cannabidiol (CBD) are the most widely investigated constituents, numerous additional cannabinoids contribute to the composition of cannabis-based preparations.

In fresh plant material, cannabinoids mainly occur in their acidic forms. Heating, drying and storage can promote decarboxylation, leading to the corresponding neutral compounds. Further transformations, including oxidation, isomerisation and photodegradation, increase the chemical diversity of the resulting products. Semisynthetic derivatives obtained through chemical modification of natural cannabinoids represent an additional source of complexity.

The term "minor cannabinoids" generally refers to compounds occurring at lower concentrations or receiving less research attention than THC and CBD. However, this designation does not necessarily imply negligible analytical or biological relevance. Several minor cannabinoids exhibit biological activity in experimental models, although their contribution to the effects of medicinal preparations remains insufficiently characterised. Their determination can therefore provide a more comprehensive description of the chemical composition of these products.

This need extends beyond medicinal cannabis. Commercial products, foods, electronic-cigarette liquids and seized materials may contain markedly different cannabinoid profiles, including transformation products and semisynthetic compounds. Their characterisation requires analytical methods capable of investigating a broader range of substances than the principal cannabinoids alone.

The experimental work was conducted at the Chemical-Toxicological Analysis Laboratory (Lab A.C.T.) of the Department of Pharmaceutical Sciences, University of Milan, under the scientific responsibility of Professor Gabriella Roda. The main objective was to develop and validate a multianalyte HPLC-UV method and subsequently assess its applicability to cannabis-based preparations with different matrices and compositions.

The choice of HPLC-UV was consistent with the liquid chromatographic approach with UV detection described in the European Pharmacopoeia monograph Cannabis flower (3028) for the determination of the principal cannabinoids. GC-MS and HPLC-MS were employed as complementary techniques to support qualitative identification and extend the investigation of minor constituents.

Development of the analytical method

The analytical panel comprised 25 cannabinoids, including acidic and neutral compounds, minor constituents and structurally related derivatives. Alongside commercially available standards, ten less common cannabinoids synthesised within Professor Daniele Merli's research group at the University of Pavia were included: CBE, CBT, CBP, CBL, THD, CBQN, CBND, DCBF, ISO-CBD and Δ^8-ISO-THC. These reference substances had previously been characterised by NMR spectroscopy and GC-MS.

The availability of these compounds made it possible to investigate cannabinoids that are not routinely included in conventional analytical determinations. Their inclusion was particularly relevant to the study of minor constituents, transformation products and semisynthetic derivatives potentially present in real samples.

Method development focused on improving chromatographic selectivity. The initial conditions used for routine analysis did not provide adequate separation of the complete panel, particularly for compounds with closely related structures and similar retention behaviour. Progressive optimisation of the mobile phase and gradient improved the separation of several critical pairs.

The final method used a reversed-phase C18 column, a water–acetonitrile gradient modified with formic acid and ammonium formate, and UV detection at 228 nm. The total analytical run lasted 17 minutes. Under these conditions, 23 of the 25 target cannabinoids were chromatographically separated.

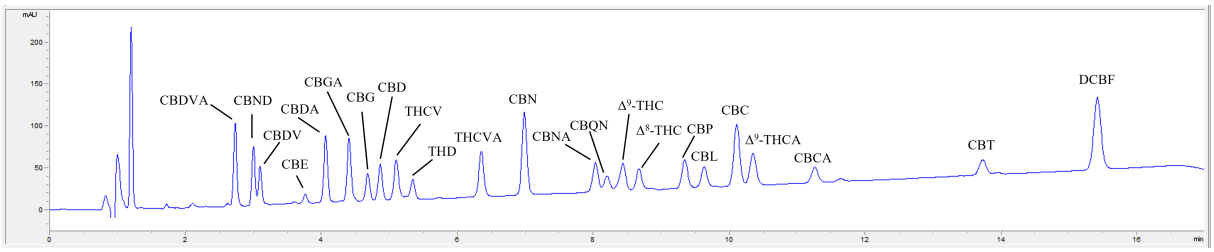


Figura 1: HPLC-UV chromatogram of the 23 cannabinoids separated under the optimised analytical conditions.

The main unresolved difficulties concerned ISO-CBD and Δ^8-ISO-THC, which coeluted with CBD and Δ^8-THC, respectively. Additional investigations using a biphenyl stationary phase improved the separation of the THC isomers under an alternative condition, but did not resolve CBD and ISO-CBD. These alternative conditions were not adopted in the final method.

These results illustrate the challenge of extending a chromatographic method to a large number of structurally similar cannabinoids. The final procedure substantially broadened the analytical panel, while retaining limitations in the selective determination of the unresolved isomers when their corresponding compounds are also present.

Quantitative analysis and method validation

Individual calibration curves were established to account for the different UV responses of the cannabinoids. Calibration covered seven concentration levels between 5 and 100 μg/mL. The validation study involved 24 compounds, organised into three reference mixtures: ten synthesised cannabinoids, seven acidic cannabinoids and seven neutral cannabinoids.

THCV was included during chromatographic development but excluded from quantitative validation because a sufficiently concentrated reference solution was unavailable. Furthermore, validation in separate mixtures did not overcome the selectivity limitations associated with the unresolved isomer pairs.

Three alternative quantification approaches were also investigated using CBD as the reference compound: relative response factors (RRFs), the ratio of calibration slopes and the Linear Relative Response Factor Model (LRRFM). These approaches accounted for differences in instrumental response and allowed the response of each analyte to be expressed as an equivalent CBD response.

Comparison with individual calibration generally produced comparable concentration estimates, although larger deviations were observed for some compounds. Previously characterised RRFs could simplify routine analysis and reduce the consumption of reference standards, provided their stability is verified under the analytical conditions used.

Validation was performed following the framework of ICH Q2(R2). The principal findings are summarised in Table 1.

Tabella 1: Summary of the principal HPLC-UV validation results.

Parameter	**Main findings**
Calibration	Range of 5–100 μg/mL; most coefficients of determination were close to unity, with lower values for some compounds.
Accuracy	Recoveries generally approached 100% at the intermediate and highest levels; larger deviations occurred for some cannabinoids at 10 μg/mL.
Repeatability	Coefficients of variation below 3% for all compounds at the three concentrations investigated.
Intermediate precision	Generally low variability between analytical days; greater variability at the lowest concentration.
LOD and LOQ	Generally 2.5 and 5 μg/mL, respectively; 5 and 10 μg/mL for CBE.
Robustness	Limited effects from small changes in flow and temperature; greater sensitivity to changes in detection wavelength.
Carry-over	No appreciable carry-over under the conditions investigated.

System suitability and measurement uncertainty were also assessed. Overall, the results supported the use of the method for quantitative determination within its demonstrated analytical capabilities. Performance was generally more consistent at intermediate and higher concentrations, whereas low-level results required greater attention to recovery, sensitivity and selectivity.

Application to real samples

After development and validation, the method was applied to approximately 50 samples covering medicinal and non-medicinal preparations. The thesis presents selected examples comprising seized cannabis inflorescences and hashish, a resin marketed as cannabis light, gummy products, a cookie, an electronic-cigarette liquid, and medicinal resins and oils.

The seized inflorescence showed a predominance of cannabinoids belonging to the THC series, particularly Δ^9-THCA. In contrast, the hashish sample was characterised by a predominance of CBD and the presence of tetrahydrocannabidiol (THD), a semisynthetic derivative also known as H4-CBD. This finding highlighted the importance of including chemically modified cannabinoids in the characterisation of materials of uncontrolled origin.

The cannabis-light resin contained several minor cannabinoids alongside CBD, including appreciable amounts of CBE, CBT and CBN. The CBD concentrations reported for this resin and the hashish sample were estimated by extrapolation beyond the calibration range, and therefore require appropriate caution.

The food samples exhibited different profiles, with THC, CBD and, in some cases, additional cannabinoids. The cookie contained both Δ^9-THC and Δ^8-THC. The electronic-cigarette liquid was predominantly CBD-based, but also contained CBE, CBG and several other minor constituents. These findings demonstrated the heterogeneity of the products investigated.

Medicinal preparations from five varieties were examined: Bedrocan, Bediol, Bedrolite, Bedica and FM2. The resin analyses revealed clear differences in the principal cannabinoids and also demonstrated the presence of multiple minor compounds.

Tabella 2: Selected minor cannabinoids quantified in medicinal resins by HPLC-UV. Concentrations are expressed as % w/w.

Analyte	Bedrocan	Bediol	Bedrolite	Bedica	FM2
CBG	2.42	0.54	0.10	2.40	1.13
CBND	<LOQ	0.19	0.19	<LOD	0.27
CBE	<LOD	0.75	0.28	<LOD	1.09
CBT	0.20	0.30	0.21	0.24	0.29

LOD: limit of detection; LOQ: limit of quantification.

CBT was quantified in all five medicinal resins, while CBE and CBND were particularly evident in Bediol, Bedrolite and FM2. These results showed that an analysis restricted to THC and CBD would omit relevant compositional information.

In the medicinal oils, fewer minor cannabinoids were detected by HPLC-UV. Several constituents generated weak or undetectable signals, motivating further investigation by HPLC-MS. GC-MS also supported qualitative identification through comparison with reference spectra, although the thermal conditions of the procedure prevented direct characterisation of the original acidic forms.

Complementary HPLC-MS analysis and conclusions

HPLC-MS was used to investigate the five medicinal resins and five oils and to extend the qualitative characterisation of their cannabinoid profiles. Identification relied on chromatographic behaviour, accurate mass, MS/MS fragmentation and comparison with reference substances.

The results generally agreed with HPLC-UV for the principal cannabinoids. However, HPLC-MS revealed additional minor constituents, particularly in the oils. THCV, THCA, CBCA and CBT were reported in all five oils by HPLC-MS, although they had not been detected by HPLC-UV.

Tabella 3: Number of cannabinoid detections in medicinal oils, calculated from the qualitative comparison reported in the thesis.

Preparation	HPLC-UV	HPLC-MS
Bedrocan	5	16
Bediol	4	13
Bedrolite	5	14
Bedica	4	11
FM2	6	16

Counts indicate qualitative detections, rather than quantitative determinations or an identical degree of identification confidence.

Some assignments required caution. Signals compatible with DCBF showed limited spectral-library agreement in certain cases, while CBT could be confused with other isomers. ISO-CBD could not be independently confirmed because its signal overlapped with CBD. These observations demonstrated that accurate mass alone is insufficient for unequivocal identification of structurally related compounds.

The relative HPLC-MS signal distributions also highlighted the complexity of medicinal preparations. However, these distributions represent instrumental responses and cannot be directly interpreted as concentration percentages. Comparisons between resins and oils revealed broad qualitative agreement, with some differences in minor constituents. Since the preparations did not derive from the same starting samples, these differences could not be attributed exclusively to their preparation.

Overall, the work established an HPLC-UV method capable of extending cannabinoid analysis beyond the principal compounds. Validation demonstrated generally favourable performance, while identifying limitations at low concentrations and for unresolved isomers. Subsequent application to real samples showed that minor cannabinoids can represent a meaningful component of medicinal and non-medicinal products.

Their determination provides a more complete chemical description of preparations than THC and CBD alone. The detection of a semisynthetic cannabinoid further demonstrated the importance of adapting analytical investigations to products containing chemically modified derivatives.

The complementary use of HPLC-UV, GC-MS and HPLC-MS combined quantitative determination, spectral identification and increased sensitivity. Future developments could expand the analytical panel or introduce a complementary screening procedure for emerging cannabinoids, with particular attention to semisynthetic compounds and isomer discrimination. Quantitative HPLC-MS applications would require separate method development and validation.

Sede del lavoro sperimentale

Il lavoro sperimentale descritto nella presente tesi è stato svolto presso il Laboratorio di Analisi Chimico-Tossicologica (Lab A.C.T.) del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università degli Studi di Milano, sotto la responsabilità scientifica della Prof.ssa Gabriella Roda e con la supervisione del Prof. Daniele Merli dell'Università degli Studi di Pavia, relatore della tesi.

Presso il Lab A.C.T. sono state condotte le attività di sviluppo e convalida del metodo HPLC-UV, la preparazione e l'analisi dei campioni reali e le analisi complementari mediante GC-MS. Le analisi mediante HPLC-MS sono state effettuate presso la piattaforma UNITECH OMICs dell'Università degli Studi di Milano.

Gli standard dei dieci cannabinoidi minori ottenuti per sintesi sono stati forniti dal Prof. Daniele Merli e preparati presso l'Università degli Studi di Pavia.

1 Introduzione

1.1 Cannabis sativa

La Cannabis sativa è una specie vegetale appartenente alla famiglia delle Cannabacee, coltivata e utilizzata dall'uomo fin dall'antichità per molteplici finalità, tra cui la produzione di fibre e alimenti e l'impiego a scopo medicinale. La classificazione tassonomica del genere Cannabis è stata a lungo oggetto di discussione anche a causa dell'elevata variabilità morfologica e chimica della pianta e dell'estesa ibridazione avvenuta nel corso del tempo. Nella moderna letteratura scientifica Cannabis sativa rappresenta tuttavia la denominazione comunemente utilizzata per indicare le diverse varietà e cultivar appartenenti al genere Cannabis [1].
Dal punto di vista fitochimico, C. sativa è caratterizzata da una composizione particolarmente complessa. Nella pianta sono state identificate numerose classi di metaboliti secondari, tra cui cannabinoidi, terpeni, flavonoidi, composti fenolici e alcaloidi. Tra questi, i cannabinoidi costituiscono la classe di composti maggiormente caratteristica della specie e comprendono un elevato numero di molecole strutturalmente correlate. La composizione qualitativa e quantitativa dei metaboliti può variare considerevolmente in funzione del patrimonio genetico della pianta, delle condizioni di coltivazione, dello stadio di maturazione e dei processi di raccolta, conservazione e trasformazione del materiale vegetale [2].
Cannabis sativa è generalmente una specie dioica, caratterizzata quindi dalla presenza di individui maschili e femminili distinti, sebbene esistano anche varietà monoiche. Le infiorescenze delle piante femminili rivestono particolare interesse dal punto di vista fitochimico, poiché presentano un'elevata densità di tricomi ghiandolari, strutture secretorie responsabili della produzione e dell'accumulo di numerosi metaboliti secondari, in particolare cannabinoidi e terpeni [3].



Figura 2: Pianta di Cannabis sativa (a sinistra) e infiorescenze femminili (a destra).

I tricomi ghiandolari producono una secrezione resinosa particolarmente ricca di cannabinoidi e terpeni. Nei tessuti vegetali freschi, i fitocannabinoidi sono presenti prevalentemente nelle rispettive forme acide, mentre le corrispondenti forme neutre possono originarsi successivamente attraverso processi di trasformazione, tra cui la decarbossilazione, che verranno approfonditi nei paragrafi successivi. Le infiorescenze femminili rappresentano pertanto una delle porzioni della pianta di maggiore interesse per la caratterizzazione del profilo cannabinoidico e costituiscono una delle principali materie prime utilizzate per la produzione di preparazioni ed estratti di Cannabis [3].

L'elevata diversità dei metaboliti presenti nella pianta, insieme alla presenza di cannabinoidi caratterizzati da strutture chimiche molto simili e da concentrazioni anche notevolmente differenti, rende la caratterizzazione chimica della Cannabis un problema analitico complesso. La determinazione accurata del profilo cannabinoidico assume particolare rilevanza sia per la caratterizzazione di prodotti a uso medicinale sia per l'analisi di preparazioni e matrici di diversa natura contenenti derivati della Cannabis.

1.2 Classificazione botanica e chemotipi

La classificazione tassonomica della Cannabis è stata oggetto di un lungo dibattito e ha subito numerose revisioni nel corso del tempo. La moderna nomenclatura botanica ebbe origine nel 1753, quando Carl Linnaeus descrisse formalmente Cannabis sativa, considerando il genere Cannabis costituito da un'unica specie. Nel 1785 Jean-Baptiste de Lamarck descrisse invece Cannabis indica Lam. sulla base di esemplari provenienti dall'India, evidenziando alcune differenze morfologiche e funzionali rispetto alla specie descritta da Linnaeus. Successivamente, nel 1924, il botanico russo D.E. Janischewsky descrisse Cannabis ruderalis, riferendosi a popolazioni spontanee diffuse nell'Europa orientale e in Asia centrale [1].
Queste osservazioni portarono allo sviluppo di due principali interpretazioni tassonomiche del genere Cannabis: una politipica, secondo la quale C. sativa, C. indica e C. ruderalis rappresenterebbero specie distinte, e una monotipica, che considera invece il genere costituito da un'unica specie caratterizzata da un'elevata variabilità fenotipica e genetica. Lo sviluppo delle moderne tecniche di analisi molecolare e genomica ha fornito nuovi elementi a sostegno di quest'ultima interpretazione. Studi basati sul confronto di sequenze nucleari, mitocondriali e cloroplastiche hanno infatti evidenziato una stretta relazione genetica tra le diverse popolazioni di Cannabis. Le evidenze genomiche più recenti tendono pertanto a supportare l'esistenza di una specie altamente diversificata, Cannabis sativa, all'interno della quale possono essere riconosciuti differenti gruppi, sottospecie, varietà e cultivar [1].
La classificazione esclusivamente botanica risulta tuttavia poco informativa quando l'obiettivo è descrivere la composizione chimica della pianta. La selezione artificiale, l'ibridazione e l'elevata interfertilità tra differenti popolazioni di Cannabis hanno infatti determinato la diffusione di un numero molto elevato di cultivar caratterizzate da profili fitochimici differenti. Per questo motivo, soprattutto in ambito fitochimico, farmacologico e analitico, viene frequentemente utilizzata una classificazione basata sul *chemotipo*, ovvero sul fenotipo chimico della pianta e, in particolare, sul profilo relativo dei principali cannabinoidi [4].
Tradizionalmente vengono distinti cinque principali chemotipi di Cannabis. I chemotipi I, II e III sono definiti principalmente sulla base della predominanza relativa dei cannabinoidi appartenenti alle serie del tetraidrocannabinolo (THC) e del cannabidiolo (CBD), mentre i chemotipi IV e V sono caratterizzati rispettivamente dalla predominanza del cannabigerolo (CBG) e da una produzione estremamente ridotta o non rilevabile di cannabinoidi [4]. La classificazione può essere schematicamente riassunta come riportato in Tabella 4.

Tabella 4: Principali chemotipi di Cannabis sativa sulla base del profilo cannabinoidico prevalente.

Chemotipo	Profilo prevalente	Caratteristica principale
I	THC/CBD > 1.0	Elevato contenuto relativo di THC
II	THC/CBD = 0.5 - 2.0	Contenuti comparabili di THC e CBD
III	THC/CBD < 1.0	Elevato contenuto relativo di CBD
IV	THC e CBD pressoché assenti	Predominanza di CBG
V	Cannabinoidi quasi assenti	Produzione molto ridotta o non rilevabile

Inoltre, grazie alla notevole plasticità genetica della pianta di Cannabis che consente una rapida acclimatazione a diversi ambienti e condizioni di coltivazione e alla sua capacità di incrocio tra tutte le sottospecie e varietà, è importante sottolineare che in futuro potrebbe verificarsi un ulteriore sviluppo di nuove specie [5].

1.3 I cannabinoidi

Il termine "cannabinoidi" comprende un insieme eterogeneo di composti che, in base alla loro origine, possono essere distinti in fitocannabinoidi, endocannabinoidi e cannabinoidi sintetici. I fitocannabinoidi sono composti di origine naturale presenti principalmente nelle piante appartenenti al genere Cannabis, gli endocannabinoidi sono invece mediatori lipidici prodotti endogenamente nell'organismo, mentre i cannabinoidi sintetici comprendono molecole ottenute mediante sintesi chimica e capaci di interagire con il sistema endocannabinoide.

I fitocannabinoidi rappresentano una classe di metaboliti secondari caratterizzata da un'elevata diversità strutturale. Dal punto di vista chimico i cannabinoidi tipici della Cannabis presentano generalmente una struttura terpenofenolica derivante dalla combinazione di una porzione di origine polichetidica e di una componente terpenica. Nella pianta sono stati identificati oltre 120 cannabinoidi differenti, ai quali si aggiungono numerosi composti derivanti da trasformazioni chimiche, degradazione e ossidazione dei principali costituenti [2, 6]. La diversità strutturale osservata è riconducibile, tra gli altri fattori, a variazioni nella struttura del nucleo carbonioso, nel grado di insaturazione e ossidazione e nella natura e lunghezza della catena alchilica laterale [6].

Sulla base delle caratteristiche strutturali, i fitocannabinoidi possono essere suddivisi in diverse famiglie, generalmente denominate a partire dai rispettivi composti rappresentativi. Tra le principali rientrano le serie del cannabigerolo (CBG), cannabicromene (CBC), cannabidiolo (CBD), Δ^9-tetraidrocannabinolo (Δ^9-THC), Δ^8-tetraidrocannabinolo (Δ^8-THC), cannabinolo (CBN), cannabielsoina (CBE), cannabiciclolo (CBL), cannabinodiolo (CBND) e cannabicitrano (CBT) [2, 6]. A queste si aggiungono ulteriori cannabinoidi caratterizzati da strutture meno comuni, alcuni dei quali sono presenti nella pianta solamente in basse concentrazioni o possono derivare dalla trasformazione di altri fitocannabinoidi.

Un'ulteriore fonte di diversità è rappresentata dalla lunghezza della catena alchilica laterale. Accanto ai cannabinoidi appartenenti alle più comuni serie pentiliche sono infatti presenti omologhi caratterizzati da catene laterali più corte o più lunghe. Tra questi, i derivati propilici appartenenti alla serie "varin" comprendono, ad esempio, la cannabidivarina (CBDV), la tetraidrocannabivarina (THCV) e i rispettivi precursori acidi. Inoltre, nella pianta fresca molti dei principali fitocannabinoidi sono presenti prevalente-

mente sotto forma di acidi carbossilici, mentre le corrispondenti forme neutre possono formarsi attraverso processi di decarbossilazione [6]. La biosintesi e le principali trasformazioni dei fitocannabinoidi verranno approfondite nel paragrafo successivo.
L'elevato numero di composti presenti nella Cannabis e la loro marcata similarità strutturale assumono particolare rilevanza dal punto di vista della chimica analitica. Analoghi, omologhi e isomeri possono infatti presentare proprietà chimico-fisiche molto simili, rendendo complessa la loro separazione e identificazione mediante tecniche cromatografiche. Tale problematica risulta particolarmente rilevante quando l'analisi viene estesa oltre i cannabinoidi maggiormente abbondanti, quali THC e CBD, includendo cannabinoidi minoritari presenti a concentrazioni inferiori. Lo sviluppo di metodiche multianalita in grado di separare, identificare e quantificare simultaneamente un numero elevato di cannabinoidi rappresenta pertanto un aspetto di notevole interesse analitico.

1.3.1 Biosintesi dei fitocannabinoidi

La biosintesi dei fitocannabinoidi avviene principalmente nei tricomi ghiandolari della pianta e coinvolge precursori provenienti da due differenti vie metaboliche: la via dei polichetidi e la via del 2-*C*-metil-D-eritritolo-4-fosfato (MEP). Dalla prima deriva l'acido olivetolico (OLA), mentre la seconda porta alla formazione del geranil difosfato (GPP). La condensazione di questi due precursori conduce alla formazione dell'acido cannabigerolico (CBGA), intermedio centrale nella biosintesi dei principali fitocannabinoidi [7, 8].
L'acido olivetolico viene biosintetizzato a partire da esanoil-CoA e tre unità di malonil-CoA attraverso l'azione combinata di una polichetide sintasi di tipo III e dell'enzima olivetolic acid cyclase (OAC). Parallelamente, il GPP viene prodotto attraverso la via MEP. La successiva prenilazione dell'acido olivetolico con GPP, catalizzata da una preniltransferasi aromatica, porta alla formazione del CBGA [7, 8]. Quest'ultimo costituisce un importante punto di ramificazione della via biosintetica dei cannabinoidi.
A partire dal CBGA, specifiche ossidociclasi catalizzano la formazione dei principali cannabinoidi in forma acida. In particolare, la Δ^9-tetraidrocannabinolico acido sintasi (THCAS) catalizza la conversione del CBGA in acido Δ^9-tetraidrocannabinolico (THCA), la cannabidiolo acido sintasi (CBDAS) porta alla formazione dell'acido cannabidiolico (CBDA), mentre la cannabicromene acido sintasi (CBCAS) conduce alla formazione dell'acido cannabicromenico (CBCA) [7, 8]. Il CBGA rappresenta pertanto il precursore comune delle principali serie pentiliche dei fitocannabinoidi.

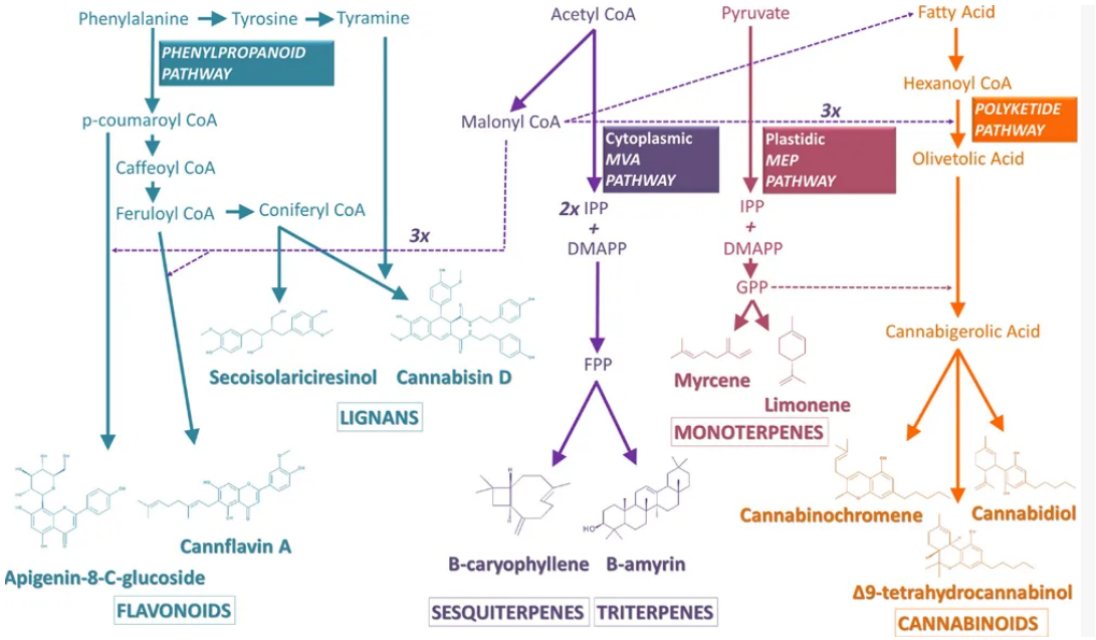


Figura 3: Rappresentazione schematica delle principali vie biosintetiche dei fitocannabinoidi.

Nella pianta fresca i cannabinoidi sono quindi presenti prevalentemente nelle rispettive forme carbossilate. Le corrispondenti forme neutre, quali Δ^9-THC, CBD, CBC e CBG, possono formarsi attraverso la perdita del gruppo carbossilico sotto forma di CO_2. La decarbossilazione è un processo non enzimatico favorito principalmente dall'aumento della temperatura, ma può verificarsi progressivamente anche durante l'essiccamento, la conservazione e l'invecchiamento del materiale vegetale [7, 8]. Questo aspetto riveste particolare importanza dal punto di vista analitico, poiché le condizioni di trattamento e conservazione del campione possono modificare il rapporto tra le forme acide e quelle neutre e, di conseguenza, il profilo cannabinoidico determinato sperimentalmente.

Accanto alla biosintesi dei cannabinoidi caratterizzati da una catena alchilica pentilica, nella Cannabis sativa è presente una via analoga che porta alla formazione dei cosiddetti cannabinoidi della serie "varin", caratterizzati da una catena propilica. In questo caso, il precursore polichetidico è rappresentato dall'acido divarinico anziché dall'acido olivetolico. La sua prenilazione con GPP conduce alla formazione dell'acido cannabigerovarinico (CBGVA), analogo propilico del CBGA. Le medesime classi di cannabinoide sintasi possono quindi utilizzare il CBGVA come substrato, determinando la formazione, tra gli altri, dell'acido cannabidivarinico (CBDVA), dell'acido tetraidrocannabivarinico (THCVA) e dell'acido cannabicromevarinico (CBCVA) [7, 8]. In seguito a decarbossilazione, tali composti danno origine alle rispettive forme neutre, tra cui CBDV e THCV.

1.3.2 Principali cannabinoidi

Tra i numerosi fitocannabinoidi identificati nella Cannabis sativa alcuni composti hanno ricevuto particolare attenzione per la loro abbondanza, rilevanza biologica e importanza analitica. Il profilo cannabinoidico può variare consideravolmente in funzione del chemotipo, della genetica della pianta e delle condizioni di coltivazione e conservazione.

Tra le principali famiglie di fitocannabinoidi vengono generalmente considerate quelle riconducibili al Δ^9-tetraidrocannabinolo (Δ^9-THC), cannabidiolo (CBD), cannabigerolo (CBG), cannabicromene (CBC)

e cannabinolo (CBN) [9, 2].

Acido Δ^9-tetraidrocannabinolico (Δ^9-THCA, $C_{22}H_{30}O_4$)

Il Δ^9-THCA è un fitocannabinoide naturale prodotto dal CBGA attraverso l'azione della THCA sintasi ed è la principale forma in cui il precursore del Δ^9-THC si accumula nella pianta fresca. Il THCA non presenta gli stessi effetti intossicanti del corrispondente cannabinoide neutro. In seguito a decarbossilazione, favorita soprattutto dal calore, viene convertito in Δ^9-THC [7, 10]. La sua determinazione è quindi importante per distinguere il contenuto originario della pianta da quello derivante da successive trasformazioni termiche.

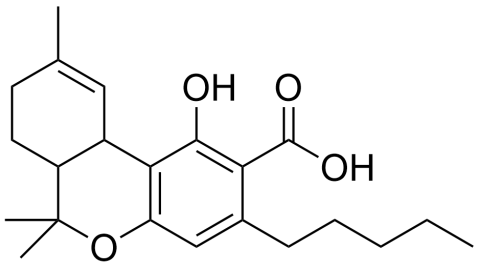


Figura 4: Struttura Δ^9-THCA

Δ^9-tetraidrocannabinolo (Δ^9-THC, $C_{21}H_{30}O_2$)

Il Δ^9-THC rappresenta il principale cannabinoide responsabile degli effetti psicotropi e intossicanti associati alla Cannabis. Si forma principalmente per decarbossilazione del Δ^9-THCA e agisce come agonista parziale dei recettori cannabinoidi, con particolare rilevanza dell'interazione con il recettore CB_1 nel sistema nervoso centrale [7, 6]. Dal punto di vista analitico costituisce uno degli analiti più importanti nella caratterizzazione dei prodotti a base di Cannabis.

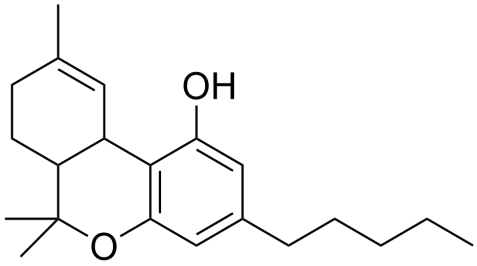


Figura 5: Struttura Δ^9-THC

Acido cannabidiolico (CBDA, $C_{22}H_{30}O_4$)

L'acido cannabidiolico rappresenta il principale precursore acido del cannabidiolo nelle varietà di Cannabis sativa caratterizzate da una prevalenza di CBD. Il CBDA deriva dalla ciclizzazione ossidativa del CBGA catalizzata dalla CBDA-sintasi e si accumula prevalentemente nei tricomi ghiandolari della pianta fresca. In seguito all'esposizione al calore o durante prolungati periodi di conservazione, il gruppo carbossilico può essere eliminato attraverso un processo di decarbossilazione, con formazione di CBD [7, 6]. La presenza contemporanea di CBDA e CBD nei campioni può pertanto fornire informazioni sul grado di trasformazione del materiale vegetale e sulle condizioni alle quali questo è stato sottoposto. A differenza

del CBD, il CBDA è generalmente presente in quantità maggiori nel materiale vegetale non sottoposto a trattamenti termici [2].

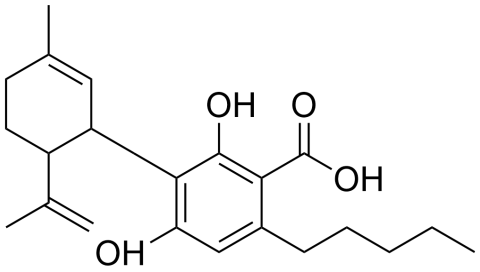


Figura 6: Struttura CBDA

Cannabidiolo (CBD, $C_{21}H_{30}O_2$)

Il cannabidiolo è uno dei principali fitocannabinoidi della Cannabis e deriva prevalentemente dalla decarbossilazione del CBDA. La sua concentrazione varia considerevolmente in funzione della varietà vegetale e può risultare particolarmente elevata nei chemotipi selezionati per la produzione di preparazioni ricche in CBD [7, 6]. Dal punto di vista farmacologico, il CBD non produce gli effetti intossicanti tipicamente associati al Δ^9-THC e presenta una farmacologia complessa, non riconducibile alla sola interazione diretta con i recettori cannabinoidi CB_1 e CB_2. Sono state infatti descritte interazioni con differenti bersagli molecolari e sistemi di segnalazione, alcune delle quali contribuiscono alle proprietà farmacologiche attribuite al composto [6]. Dal punto di vista analitico, il CBD rappresenta uno dei principali cannabinoidi utilizzati per la caratterizzazione delle preparazioni a base di Cannabis ed è frequentemente determinato insieme al CBDA e ai principali cannabinoidi della serie del THC.

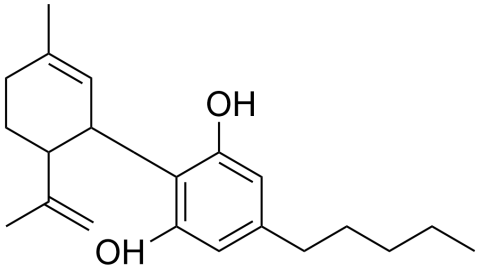


Figura 7: Struttura CBD

Δ^8-tetraidrocannabinolo (Δ^8-THC, $C_{21}H_{30}O_2$)

Il Δ^8-THC è un isomero del Δ^9-THC, dal quale differisce per la posizione del doppio legame nell'anello cicloesenico. Può essere rinvenuto in piccole quantità nella Cannabis, ma può anche formarsi per isomerizzazione del Δ^9-THC o mediante trasformazione chimica del CBD. Presenta attività psicotropa, generalmente descritta come inferiore rispetto a quella del Δ^9-THC [6]. La sua similarità strutturale con altri isomeri del THC rappresenta una rilevante criticità analitica.

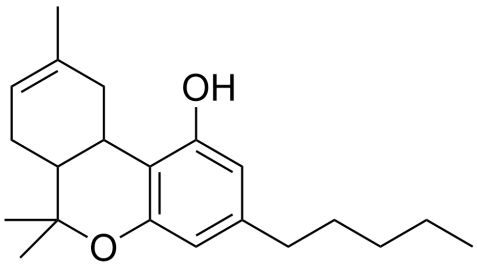


Figura 8: Struttura Δ^8-THC

Acido cannabigerolico (CBGA, $C_{22}H_{32}O_4$)

Il CBGA è un fitocannabinoide naturale e rappresenta uno dei principali precursori biosintetici dei cannabinoidi a catena pentilica. Nella pianta viene formato a partire da acido olivetolico e geranil pirofosfato e costituisce il substrato delle principali ossidociclasi cannabinoidiche, che lo convertono rispettivamente in THCA, CBDA e CBCA [7, 6]. La sua determinazione risulta quindi particolarmente rilevante per lo studio della biosintesi cannabinoidica e per la caratterizzazione di materiali vegetali nei quali la conversione verso i prodotti finali non sia completa.

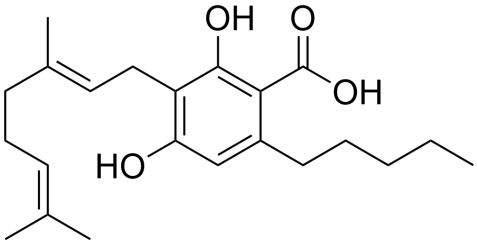


Figura 9: Struttura CBGA

Cannabigerolo (CBG, $C_{21}H_{32}O_2$)

Il CBG rappresenta la forma neutra derivante dalla decarbossilazione del CBGA. È un fitocannabinoide naturale generalmente presente in concentrazioni inferiori rispetto a THC e CBD, poiché gran parte del CBGA viene utilizzata come precursore per la biosintesi degli altri cannabinoidi. Non è considerato un cannabinoide intossicante di tipo THC. La quantità di CBG può variare in funzione del chemotipo e dello stadio di maturazione della pianta [7, 2].

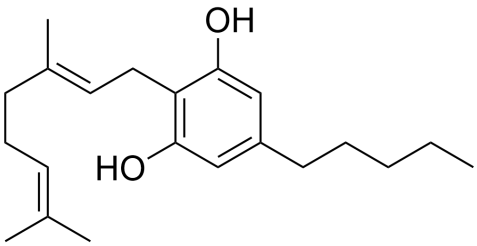


Figura 10: Struttura CBG

Acido cannabicromenico (CBCA, $C_{22}H_{30}O_4$)

Il CBCA è un fitocannabinoide naturale prodotto dal CBGA mediante l'azione della CBCA sintasi e rappresenta il precursore carbossilato del CBC [7, 6]. È stato riportato come particolarmente rappresentato nelle fasi più giovani dello sviluppo della pianta, mentre la sua quantità può diminuire con la maturazione. La decarbossilazione del CBCA porta alla formazione del corrispondente cannabinoide neutro, il CBC.

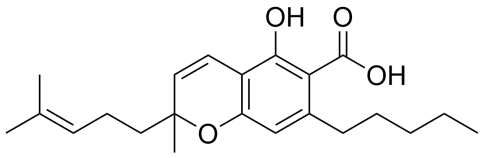


Figura 11: Struttura CBCA

Cannabicromene (CBC, $C_{21}H_{30}O_2$)

Il CBC è un fitocannabinoide naturale derivante dalla decarbossilazione del CBCA. Sebbene generalmente meno abbondante e meno studiato rispetto a THC e CBD, costituisce una delle principali classi strutturali di cannabinoidi della pianta [6, 2]. Non è considerato un cannabinoide intossicante di tipo THC. Il CBC riveste inoltre interesse come possibile precursore di prodotti di trasformazione, tra cui il cannabiciclolo, che può formarsi mediante processi fotochimici.

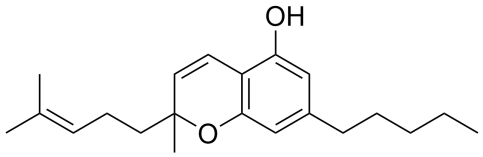


Figura 12: Struttura CBC

Acido cannabinolico (CBNA, $C_{22}H_{26}O_4$)

Il CBNA è la forma carbossilata strutturalmente correlata al CBN ed è stato identificato in campioni di Cannabis. A differenza di CBDA, THCA e CBCA, la sua presenza è associata in larga parte a processi ossidativi che coinvolgono cannabinoidi di tipo THC. La formazione di CBNA a partire da THCA mediante aromatizzazione è stata dimostrata sperimentalmente [11, 10]. Il CBNA può successivamente decarbossilarsi formando CBN e rappresenta quindi un composto di interesse nello studio dell'ossidazione e dell'invecchiamento del materiale vegetale.

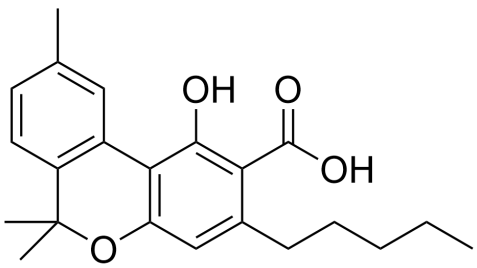


Figura 13: Struttura CBNA

Cannabinolo (CBN, $C_{21}H_{26}O_2$)

Il CBN presenta un'origine differente rispetto ai principali cannabinoidi derivanti direttamente dalle ramificazioni biosintetiche del CBGA. Si forma infatti prevalentemente attraverso processi di ossidazione e aromatizzazione del THC e può quindi aumentare durante l'invecchiamento, l'esposizione all'ossigeno e la conservazione del materiale contenente cannabinoidi [10, 6]. Presenta attività sul sistema cannabinoide, ma con proprietà psicotrope nettamente inferiori rispetto al Δ^9-THC. La sua presenza è pertanto rilevante anche come indicatore delle trasformazioni subite dal campione nel tempo.

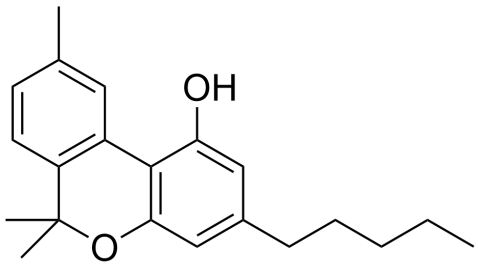


Figura 14: Struttura CBN

La determinazione separata delle forme acide e neutre consente di ottenere informazioni non soltanto sulla presenza dei principali cannabinoidi, ma anche sulle trasformazioni subite dal materiale durante maturazione, essiccamento, riscaldamento e conservazione. Questo aspetto assume particolare importanza nello sviluppo di metodiche multianalita, nelle quali devono essere distinti composti strutturalmente molto simili e, in alcuni casi, caratterizzati dalla medesima formula molecolare. Tali criticità diventano ancora più rilevanti quando l'analisi viene estesa ai cannabinoidi minori e ai prodotti di trasformazione descritti nel paragrafo successivo.

1.3.3 Cannabinoidi minori

La ricerca sui fitocannabinoidi si è concentrata storicamente soprattutto sui composti maggiormente abbondanti e meglio caratterizzati, in particolare Δ^9-THC e CBD. Accanto a questi, Cannabis sativa contiene numerosi cannabinoidi presenti generalmente in concentrazioni inferiori, comunemente indicati come "cannabinoidi minori" o "cannabinoidi rari" [6, 12, 13]. Il termine "minori" fa riferimento principalmente alla loro minore abbondanza e alla più limitata disponibilità di informazioni relative alla loro presenza, attività biologica e comportamento analitico, ma non implica necessariamente una minore rilevanza chimica o farmacologica.

È tuttavia importante distinguere i fitocannabinoidi effettivamente prodotti dalla pianta dai composti strutturalmente correlati che possono originarsi successivamente mediante processi di decarbossilazione, ossidazione, isomerizzazione, ciclizzazione e fotodegradazione. A questi si aggiungono alcuni derivati semisintetici ottenibili mediante trasformazione chimica di fitocannabinoidi naturali, in particolare del CBD [6, 13, 14]. Nel presente lavoro sono state considerate entrambe le categorie, in quanto entrambe risultano rilevanti per la caratterizzazione analitica di campioni reali e per lo studio dei prodotti di trasformazione dei cannabinoidi.

Acido cannabidivarinico (CBDVA, $C_{20}H_{26}O_4$)

Il CBDVA è un fitocannabinoide naturale appartenente alla serie "varin", caratterizzata dalla presenza di una catena laterale propilica anziché pentilica. Costituisce il precursore carbossilato della cannabidivarina (CBDV), alla quale può dare origine per decarbossilazione. La sua presenza è quindi direttamente riconducibile alla biosintesi della pianta e, in particolare, alla via che coinvolge l'acido cannabigerovarinico (CBGVA) [6, 12]. Non sono documentati effetti intossicanti di tipo THC per il CBDVA. Dal punto di vista analitico, la sua determinazione consente di estendere l'analisi alla serie propilica dei cannabinoidi e di distinguere la forma acida dalla corrispondente forma neutra.

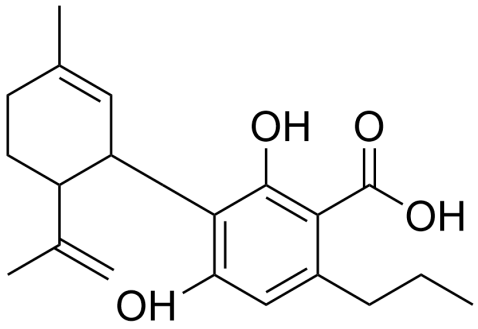


Figura 15: Struttura CBDVA

Cannabidivarina (CBDV, $C_{19}H_{26}O_2$)

Il CBDV è un fitocannabinoide naturale e rappresenta l'omologo propilico del CBD. Si forma principalmente per decarbossilazione del CBDVA e può essere presente in quantità differenti in funzione del chemotipo di Cannabis [6, 12]. Analogamente al CBD, non è considerato un cannabinoide intossicante e non produce i tipici effetti psicotropi associati al Δ^9-THC.

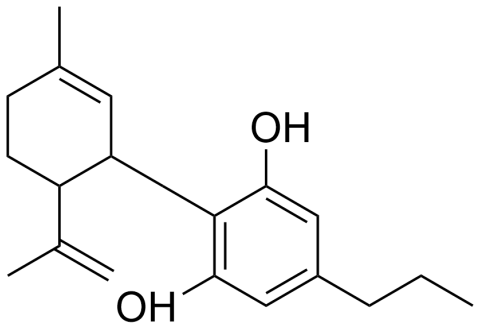


Figura 16: Struttura CBDV

Acido tetraidrocannabivarinico (THCVA, $C_{20}H_{26}O_4$)

Il THCVA è un fitocannabinoide naturale appartenente alla serie propilica e rappresenta il precursore carbossilato del THCV. Analogamente agli altri cannabinoidi acidi, può subire decarbossilazione in seguito a riscaldamento, essiccamento o conservazione, formando la corrispondente specie neutra [6, 12]. La forma acida non è associata agli effetti caratteristici del THC. La determinazione simultanea di THCVA e THCV può quindi fornire informazioni sia sulla biosintesi della pianta sia sulle trasformazioni subite

dal materiale vegetale.

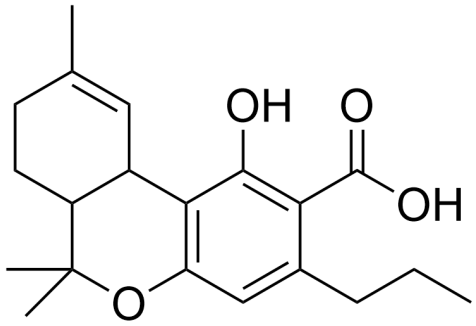


Figura 17: Struttura THCVA

Tetraidrocannabivarina (THCV, $C_{19}H_{26}O_2$)

Il THCV è un fitocannabinoide naturale e costituisce l'omologo propilico del Δ^9-THC. Deriva dalla decarbossilazione del THCVA e può essere presente in quantità variabili nei diversi chemotipi di Cannabis. Dal punto di vista farmacologico presenta un comportamento distinto rispetto al Δ^9-THC e i suoi effetti dipendono dalla dose e dalle condizioni sperimentali. Dal punto di vista normativo, in Italia la tetraidrocannabivarina è stata recentemente inserita nella Tabella I delle sostanze stupefacenti con Decreto del Ministero della Salute del 29 dicembre 2025.

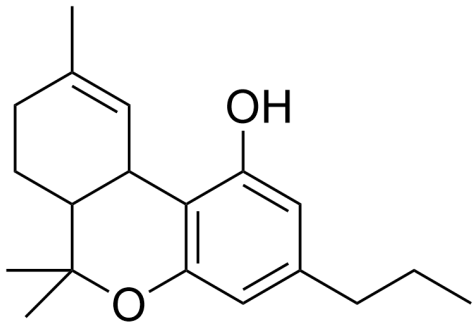


Figura 18: Struttura THCV

Cannabielsoina (CBE, $C_{21}H_{30}O_3$)

La cannabielsoina è stata rilevata in piccole quantità nella Cannabis, ma è particolarmente rilevante come prodotto di trasformazione del CBD. Può infatti originarsi mediante processi ossidativi del CBD ed è stata descritta anche come metabolita del CBD e come prodotto della sua pirolisi [6, 15]. Studi recenti hanno evidenziato un'attività agonista selettiva sul recettore CB_1 in sistemi *in vitro*, ma non sono disponibili evidenze sufficienti per attribuirle effetti psicotropi o intossicanti nell'uomo [15]. Il CBE è quindi rilevante sia come cannabinoide minore presente nei campioni reali sia come possibile indicatore di trasformazioni ossidative o termiche del CBD.

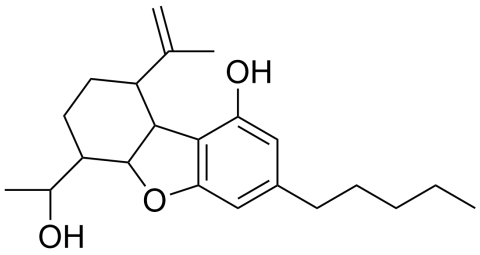


Figura 19: Struttura CBE

Cannabiciclolo (CBL, $C_{21}H_{30}O_2$)

Il CBL è un cannabinoide policiclico strettamente correlato al cannabicromene (CBC). È stato identificato in materiale di Cannabis, ma la sua formazione è associata soprattutto alla ciclizzazione fotochimica del CBC, che può verificarsi durante l'esposizione del campione alla luce; la ciclizzazione può inoltre essere promossa in condizioni acide [6, 13]. Per questo motivo il CBL viene spesso considerato anche un prodotto di trasformazione o invecchiamento del CBC. Non presenta le proprietà narcotiche caratteristiche del THC e mostra una scarsa affinità per i recettori CB_1 e CB_2. La sua ricerca può pertanto fornire informazioni sui processi fotochimici e sulle condizioni di conservazione dei campioni.

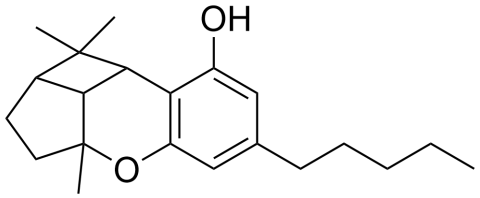


Figura 20: Struttura CBL

Cannabicitrano (CBT, $C_{21}H_{30}O_2$)

Il cannabicitrano è un cannabinoide raro caratterizzato da una struttura tetraciclica contenente un ponte etereo. Il composto è stato isolato da Cannabis e da hashish, confermandone la presenza in campioni naturali [16]. Tuttavia, la successiva dimostrazione che il CBT isolato dai campioni è racemico ha sollevato dubbi sull'esistenza di una biosintesi enzimatica stereoselettiva e suggerisce che possa formarsi, almeno in parte, mediante processi non enzimatici nella pianta o durante la trasformazione degli estratti [17]. Il profilo farmacologico del CBT è ancora scarsamente caratterizzato e non sono disponibili evidenze sufficienti per definirlo un cannabinoide psicotropo. La sua determinazione è pertanto interessante soprattutto per lo studio dei cannabinoidi rari e dei possibili processi di trasformazione del materiale vegetale.

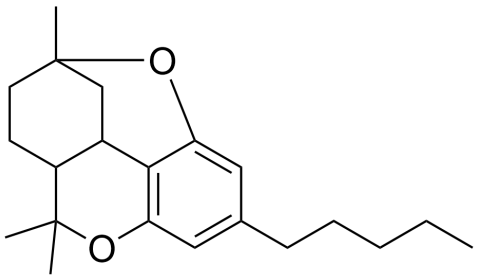


Figura 21: Struttura CBT

Cannabinodiolo (CBND, $C_{21}H_{26}O_2$)

Il CBND è un cannabinoide caratterizzato dall'aromatizzazione della porzione terpenica di strutture di tipo CBD. È stato descritto tra i cannabinoidi rinvenuti nella Cannabis, ma riveste particolare importanza come prodotto di fotodegradazione del cannabinolo (CBN) [6]. Non sono disponibili dati sufficienti per attribuire al CBND effetti psicotropi. La sua presenza può invece risultare utile come indicatore di processi fotochimici e di degradazione avvenuti durante la conservazione del campione.

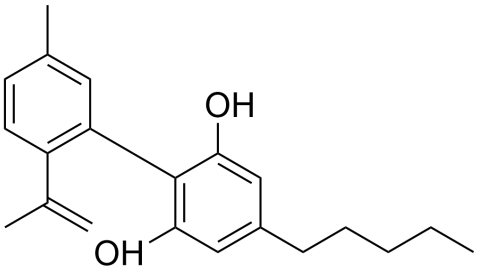


Figura 22: Struttura CBND

Cannabifenantrene (CBP, $C_{21}H_{24}O$)

Il cannabifenantrene è caratterizzato da una struttura fenantrenica fortemente aromatizzata e rappresenta un prodotto di trasformazione avanzata di cannabinoidi di tipo CBN/CBND. In particolare, il CBND formatosi per fotodegradazione del CBN può subire ulteriori trasformazioni fotochimiche portando alla formazione del CBP [18]. Il composto è pertanto di particolare interesse come possibile prodotto di degradazione e invecchiamento, più che come metabolita primario della biosintesi cannabinoidica. Il suo profilo farmacologico è scarsamente studiato e non sono disponibili evidenze che consentano di definirlo psicotropo. Dal punto di vista analitico, la sua ricerca può contribuire alla caratterizzazione delle trasformazioni subite da campioni conservati o esposti alla luce.

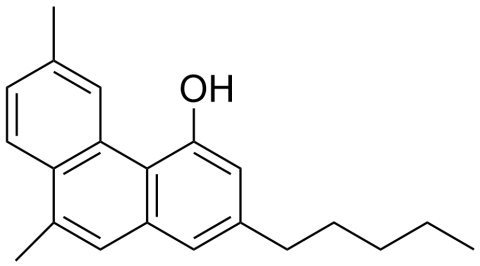


Figura 23: Struttura CBP

Deidrocannabifurano (DCBF, $C_{21}H_{24}O_2$)

Il deidrocannabifurano appartiene alla famiglia dei cannabinoidi di tipo cannabifurano ed è caratterizzato da una struttura fortemente aromatizzata contenente un sistema furanico. DCBF e cannabifurano sono stati isolati da campioni di hashish invecchiati [6]. Tale osservazione suggerisce un possibile collegamento con i processi di trasformazione e invecchiamento della resina; tuttavia, la loro origine non è stata definita in maniera univoca e non può essere esclusa una presenza come fitocostituenti naturali [6]. Non sono disponibili informazioni sufficienti sulla sua eventuale attività psicotropa. La sua determinazione risulta quindi di particolare interesse nella caratterizzazione di resine e materiali di Cannabis sottoposti a conservazione prolungata.

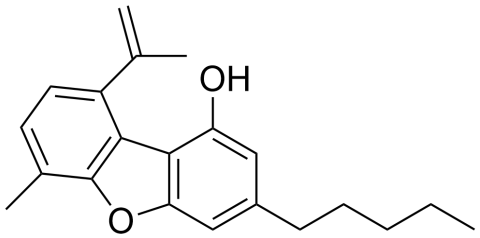


Figura 24: Struttura DCBF

Cannabinochinone (CBQN, $C_{21}H_{28}O_3$)

Il CBQN corrisponde a un cannabinochinone strutturalmente derivato dal CBD. La trasformazione del nucleo resorcinolico del CBD in un sistema idrossichinonico avviene mediante ossidazione e può verificarsi sia in condizioni chimicamente ossidanti sia durante la conservazione prolungata del CBD in presenza di ossigeno [19, 20]. Il CBQN deve pertanto essere considerato principalmente un prodotto di ossidazione del CBD e non un prodotto primario della biosintesi cannabinoidica della pianta. La stessa trasformazione può verificarsi anche metabolicamente. Il composto presenta proprietà biologiche differenti rispetto al CBD, ma non esistono evidenze che lo identifichino come un cannabinoide intossicante di tipo THC. La sua determinazione è particolarmente interessante come possibile indicatore di degradazione ossidativa del CBD e per il controllo di materiali e preparazioni contenenti questo cannabinoide.

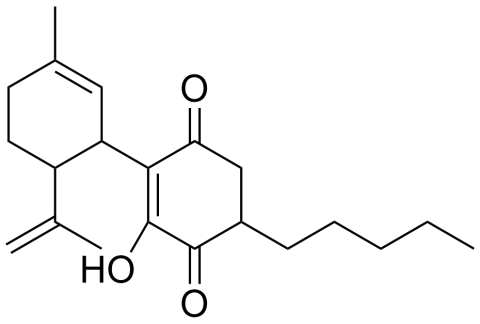


Figura 25: Struttura CBQN

1.3.4 Altri cannabinoidi

Accanto ai fitocannabinoidi naturalmente presenti nella Cannabis, nel presente lavoro sono stati inclusi anche alcuni composti strutturalmente correlati che non rappresentano prodotti principali della biosintesi cannabinoidica della pianta e che possono originarsi dalla trasformazione chimica di fitocannabinoidi, in particolare del CBD.

L'inclusione di tali composti nel metodo risponde all'esigenza di ampliare la capacità di caratterizzazione dei campioni anche nei confronti di cannabinoidi semisintetici e di prodotti di trasformazione. Negli ultimi anni, infatti, la disponibilità commerciale di derivati ottenuti mediante modificazione chimica di fitocannabinoidi naturali è aumentata considerevolmente, rendendo di crescente interesse analitico la possibilità di riconoscerli all'interno di prodotti a base di Cannabis.

Tetraidrocannabidiolo (THD, $C_{21}H_{34}O_2$)

Il tetraidrocannabidiolo, noto anche come H_4-CBD, è il derivato idrogenato del CBD. La saturazione delle due insaturazioni non aromatiche del CBD comporta l'aggiunta complessiva di quattro atomi di idrogeno. A differenza dei fitocannabinoidi precedentemente descritti, il THD è considerato un cannabinoide semisintetico e viene ottenuto mediante idrogenazione del CBD; non è attualmente considerato un normale prodotto della biosintesi di Cannabis [21]. Negli ultimi anni la sua presenza è stata segnalata in prodotti commerciali contenenti cannabinoidi semisintetici. H_4-CBD mostra una debole affinità per il recettore CB_1, ma le evidenze disponibili non consentono ancora di stabilire con certezza se produca effetti psicotropi nell'uomo [21]. L'inclusione del composto nel metodo sviluppato consente pertanto di estendere la ricerca anche a derivati del CBD potenzialmente presenti in prodotti formulati o modificati.

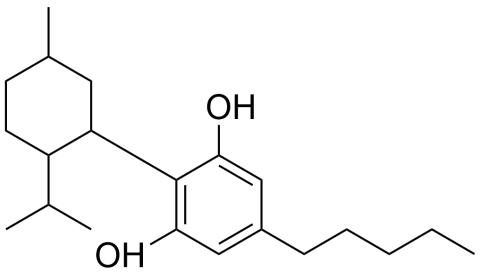


Figura 26: Struttura THD (H4-CBD)

Iso-cannabidiolo (ISO-CBD, $C_{21}H_{30}O_2$)

L'ISO-CBD è un isomero strutturale del CBD e presenta pertanto la stessa formula molecolare, pur dif-

ferendo per la disposizione della porzione terpenica. Non rappresenta uno dei principali prodotti della biosintesi cannabinoidica della pianta ed è di particolare interesse come composto ottenibile attraverso trasformazioni del CBD. La sintesi controllata di isomeri di tipo iso-CBD a partire dal CBD è stata descritta anche per l'ottenimento di standard analitici puri [14]. Non sono disponibili dati farmacologici sufficienti per attribuire a ISO-CBD proprietà psicotrope. Il suo principale interesse nel presente lavoro è analitico, poiché la stessa formula molecolare e l'elevata similarità strutturale con il CBD determinano comportamenti cromatografici molto simili e rendono particolarmente complessa la separazione selettiva dei due composti.

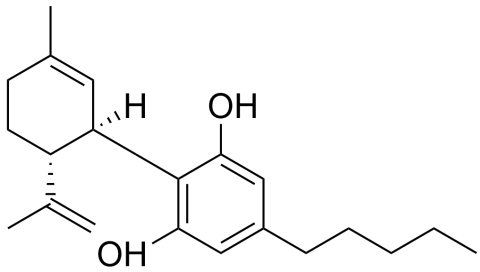


Figura 27: Struttura ISO-CBD

Δ^8-iso-tetraidrocannabinolo (Δ^8-ISO-THC, $C_{21}H_{30}O_2$)

Il Δ^8-ISO-THC è un isomero strutturale del Δ^8-THC. Non rappresenta uno dei principali prodotti delle normali vie biosintetiche della Cannabis, ma può essere ottenuto durante la ciclizzazione acido-catalizzata del CBD, insieme a Δ^8-THC, Δ^9-THC e ad altri prodotti isomerici [14]. La sua formazione è quindi particolarmente rilevante nei prodotti ottenuti mediante conversione chimica del CBD. Sebbene gli iso-THC siano stati descritti come differenti dal Δ^9-THC per attività biologica, i dati specifici relativi agli effetti psicotropi del Δ^8-ISO-THC sono ancora insufficienti per definirne con certezza il potenziale intossicante. Analiticamente rappresenta una criticità significativa per la forte somiglianza strutturale con gli altri isomeri del THC.

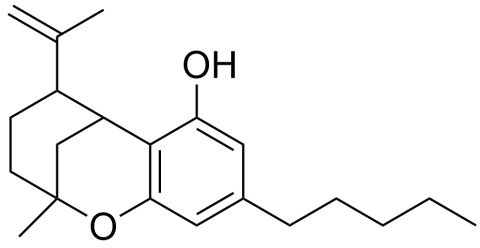


Figura 28: Struttura Δ^8-ISO-THC

2 Aspetti farmacologici e normativi

2.1 Aspetti farmacologici dei cannabinoidi

2.1.1 Farmacodinamica

Gli effetti biologici dei cannabinoidi sono strettamente correlati alla loro interazione con il sistema endocannabinoide, un sistema di segnalazione lipidica coinvolto nella regolazione di numerosi processi fisiologici. I suoi componenti principali comprendono i recettori cannabinoidi CB_1 e CB_2, i ligandi endogeni, tra cui l'anandamide (AEA) e il 2-arachidonoilglicerolo (2-AG), e gli enzimi responsabili della loro biosintesi e degradazione [22]. Il sistema endocannabinoide svolge un ruolo modulatore sia a livello del sistema nervoso centrale sia nei tessuti periferici.

I recettori CB_1 e CB_2 appartengono alla famiglia dei recettori accoppiati a proteine G. I recettori CB_1 sono espressi in modo particolarmente abbondante nel sistema nervoso centrale, soprattutto a livello delle terminazioni presinaptiche, dove la loro attivazione modula il rilascio di diversi neurotrasmettitori. I recettori CB_2 sono invece maggiormente associati alle cellule del sistema immunitario, pur essendo presenti anche in differenti popolazioni cellulari del sistema nervoso centrale [22, 12]. La distribuzione differenziale dei due recettori contribuisce alla varietà degli effetti prodotti dai cannabinoidi nei diversi tessuti.

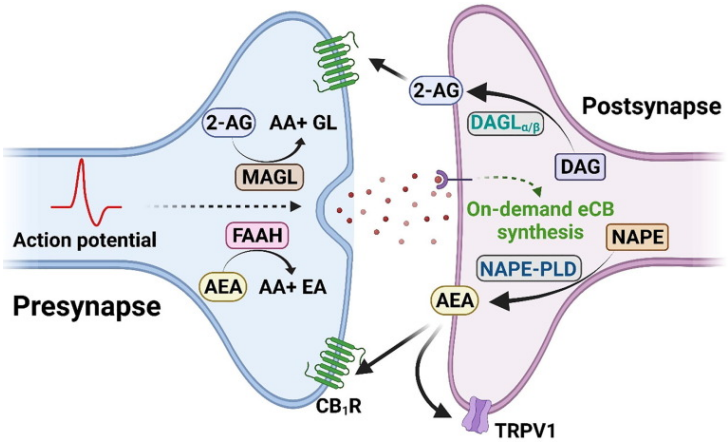


Figura 29: Sistema endocannabinoide nella sinapsi neuronale.

Il Δ^9-tetraidrocannabinolo (Δ^9-THC) agisce principalmente come agonista parziale dei recettori CB_1 e CB_2. L'interazione con CB_1, in particolare nel sistema nervoso centrale, è responsabile di gran parte degli effetti psicotropi associati al composto. L'attivazione di tali recettori può inoltre influenzare processi quali percezione del dolore, appetito, memoria e coordinazione motoria [23]. Il profilo farmacologico del Δ^9-THC non è tuttavia limitato esclusivamente ai recettori cannabinoidi, poiché sono state descritte interazioni anche con ulteriori bersagli molecolari.

Il cannabidiolo (CBD) presenta invece un profilo farmacologico più complesso e differente rispetto al Δ^9-THC. Il CBD non produce gli effetti intossicanti tipicamente associati al THC e mostra una bassa affinità per i siti ortosterici dei recettori CB_1 e CB_2. I suoi effetti biologici sono stati correlati all'interazione con molteplici bersagli molecolari, tra cui recettori serotoninergici, canali della famiglia transient receptor potential (TRP) e altri sistemi di segnalazione [23]. Tale attività multimodale contribuisce alla notevole complessità della farmacologia del CBD.

Anche numerosi cannabinoidi presenti in quantità minori mostrano attività su differenti bersagli biologici. Studi in vitro hanno evidenziato, ad esempio, interazioni di CBG, CBC, CBN, THCV e di altri cannabinoidi con recettori CB_1 e CB_2, canali TRP, recettori attivati dai proliferatori dei perossisomi (PPAR) e altri sistemi recettoriali [12]. Tuttavia, per molti di questi composti le conoscenze farmacologiche rimangono considerevolmente più limitate rispetto a quelle disponibili per THC e CBD e derivano prevalentemente da studi preclinici.

2.1.2 Farmacocinetica

Le caratteristiche farmacocinetiche dei cannabinoidi dipendono in misura rilevante dalla via di somministrazione e dalla formulazione utilizzata. Δ^9-THC e CBD sono molecole fortemente lipofile e, dopo l'assorbimento, si distribuiscono rapidamente nei tessuti maggiormente vascolarizzati e successivamente nei compartimenti ricchi di lipidi [24, 25].
In seguito a somministrazione per via inalatoria, l'assorbimento è rapido e le concentrazioni plasmatiche massime di THC e CBD vengono raggiunte generalmente nell'arco di pochi minuti. La biodisponibilità risulta tuttavia variabile, poiché dipende da fattori quali modalità di inalazione, profondità e durata dell'inspirazione e caratteristiche del dispositivo utilizzato. La somministrazione orale presenta invece un assorbimento più lento e variabile e una biodisponibilità inferiore, anche a causa dell'importante metabolismo di primo passaggio epatico [24, 25].
Il metabolismo del Δ^9-THC avviene prevalentemente a livello epatico attraverso enzimi del citocromo P450, in particolare CYP2C9, CYP2C19 e CYP3A4. Uno dei principali metaboliti di fase I è l'11-idrossi-Δ^9-THC (11-OH-THC), farmacologicamente attivo, successivamente ossidato ad acido 11-nor-9-carbossi-Δ^9-tetraidrocannabinolico (THC-COOH). Quest'ultimo può essere sottoposto a coniugazione, principalmente con acido glucuronico, favorendone l'eliminazione [24, 25].
Anche il CBD viene ampiamente metabolizzato a livello epatico, soprattutto attraverso CYP2C19 e CYP3A4, con formazione di numerosi metaboliti ossidati. A differenza del THC, i metaboliti del CBD sono meno caratterizzati dal punto di vista farmacologico. L'eliminazione dei cannabinoidi e dei rispettivi metaboliti avviene principalmente attraverso le feci e, in misura minore, attraverso le urine [24, 25].
L'elevata lipofilia dei cannabinoidi favorisce inoltre la loro distribuzione nei tessuti adiposi, dai quali possono essere successivamente rilasciati lentamente. Questo fenomeno contribuisce alla persistenza dei cannabinoidi e dei loro metaboliti nell'organismo e alla notevole variabilità dei tempi di eliminazione, soprattutto in seguito a esposizioni ripetute [24, 25].
Nel complesso, le marcate differenze farmacocinetiche associate alla via di somministrazione, al metabolismo e alla distribuzione tissutale contribuiscono alla variabilità dell'intensità e della durata degli effetti dei cannabinoidi.

2.2 Inquadramento normativo

La normativa relativa alla Cannabis sativa e ai prodotti contenenti cannabinoidi è particolarmente articolata, poiché il regime applicabile dipende dalla natura del prodotto, dalla sua composizione e dalla destinazione d'uso. Cannabis a uso medicinale, sostanze stupefacenti, canapa destinata alla filiera industriale, prodotti alimentari e liquidi destinati a dispositivi elettronici ricadono infatti in ambiti normativi

differenti. La determinazione quali-quantitativa dei cannabinoidi assume pertanto un ruolo rilevante anche ai fini della corretta caratterizzazione e classificazione dei campioni.

In Italia, il principale riferimento in materia di sostanze stupefacenti e psicotrope è rappresentato dal Decreto del Presidente della Repubblica 9 ottobre 1990, n. 309. Il testo disciplina la produzione, la detenzione, la cessione e il traffico di sostanze sottoposte a controllo e distingue le condotte penalmente rilevanti da quelle relative alla detenzione per uso esclusivamente personale, soggette a sanzioni di natura amministrativa [26]. La cannabis proveniente dal mercato illecito, comprese marijuana e resine, rientra pertanto nell'ambito della disciplina sulle sostanze stupefacenti.

Un quadro specifico è previsto per la cannabis destinata all'uso medicinale. Il Decreto del Ministero della Salute del 9 novembre 2015 disciplina la produzione nazionale e l'impiego medico della cannabis e definisce, tra gli altri aspetti, le condizioni relative all'allestimento e al controllo delle preparazioni magistrali [27]. Le infiorescenze di grado farmaceutico e le preparazioni da esse ottenute, come gli estratti oleosi, devono essere caratterizzate dal punto di vista quali-quantitativo al fine di garantire il controllo del contenuto dei principali cannabinoidi e la riproducibilità della preparazione [28].

Differente è il quadro relativo alla canapa destinata alla filiera agroindustriale, disciplinata dalla Legge 2 dicembre 2016, n. 242 e successive modificazioni. Tale normativa ha introdotto disposizioni specifiche per la coltivazione di varietà di Cannabis sativa ammesse dalla normativa europea e per determinati impieghi industriali [29]. Il termine commerciale "cannabis light", frequentemente utilizzato per indicare prodotti ottenuti da varietà di canapa caratterizzate da un basso contenuto di THC, non identifica tuttavia una categoria normativa autonoma. A seguito delle modifiche introdotte nel 2025, la disciplina della Legge n. 242/2016 non si applica, salvo specifiche eccezioni previste dalla legge, alle infiorescenze di canapa e ai prodotti che le contengono, nonché agli estratti, alle resine e agli oli da esse derivati, per i quali restano ferme le disposizioni previste dal D.P.R. 309/1990 [30, 29].

Un ulteriore ambito è rappresentato dai prodotti alimentari contenenti ingredienti derivati dalla canapa. A livello europeo, il Regolamento (UE) 2023/915 stabilisce tenori massimi per la somma di Δ^9-THC e Δ^9-THCA, espressa come equivalenti di Δ^9-THC, in specifici alimenti derivati dai semi di canapa. In particolare, il limite è pari a 3.0 mg/kg per i semi di canapa e per alcuni prodotti derivati dai semi e a 7.5 mg/kg per l'olio di semi di canapa [31]. Ai fini del calcolo, il contenuto di THCA viene convertito nel corrispondente equivalente di THC applicando un fattore pari a 0.877. Tale impostazione evidenzia l'importanza della determinazione separata delle forme acide e neutre dei cannabinoidi anche nel settore alimentare.

La situazione risulta differente nel caso di alimenti ai quali siano aggiunti CBD, estratti ricchi in cannabinoidi o altri cannabinoidi isolati. Il Regolamento (UE) 2015/2283 disciplina infatti i cosiddetti *Novel Foods*, ossia alimenti o ingredienti per i quali non sia dimostrato un consumo significativo nell'Unione europea anteriormente al 15 maggio 1997. Nell'ambito di tale disciplina, diversi estratti e preparazioni contenenti CBD sono stati classificati come *Novel Food* e la loro immissione sul mercato alimentare richiede la valutazione prevista dalla normativa europea [32]. La presenza di cannabinoidi in prodotti quali biscotti, caramelle o altri alimenti deve pertanto essere valutata considerando sia la natura dell'ingrediente impiegato sia la concentrazione degli specifici cannabinoidi presenti.

Anche i liquidi destinati alle sigarette elettroniche costituiscono una matrice regolata da disposizioni specifiche. Il Decreto Legislativo 12 gennaio 2016, n. 6, che recepisce la Direttiva 2014/40/UE, disciplina l'immissione sul mercato e l'etichettatura delle sigarette elettroniche e dei contenitori di liquido di ricarica

[33]. Tale disciplina riguarda il prodotto e le relative modalità di commercializzazione, mentre l'eventuale presenza di sostanze sottoposte a controllo, quali il Δ^9-THC, deve essere valutata anche alla luce della normativa sugli stupefacenti.
I principali ambiti normativi pertinenti alle differenti tipologie di campioni contenenti cannabinoidi sono riassunti in Tabella 5.

Tabella 5: Sintesi dei principali ambiti normativi applicabili alle diverse tipologie di prodotti contenenti cannabinoidi considerate nel presente lavoro.

Tipologia di matrice	**Principale riferimento normativo**	**Aspetti di interesse**
Cannabis a uso medicinale	D.P.R. 309/1990; D.M. 9 novembre 2015	Produzione, prescrizione e impiego medico; controllo quali-quantitativo delle preparazioni e titolazione dei cannabinoidi.
Cannabis e resine provenienti dal mercato illecito	D.P.R. 309/1990	Disciplina delle sostanze stupefacenti; identificazione della sostanza e determinazione del contenuto dei principi attivi.
Canapa industriale e cosiddetta "cannabis light"	Legge 242/2016 e successive modificazioni; D.P.R. 309/1990	Disciplina della coltivazione e degli impieghi consentiti della canapa. Per infiorescenze e relativi derivati si applica il quadro normativo vigente introdotto dalle modifiche del 2025.
Alimenti derivati dai semi di canapa	Regolamento (UE) 2023/915	Tenori massimi di Δ^9-THC e Δ^9-THCA, espressi come equivalenti di Δ^9-THC, in specifici prodotti alimentari.
Alimenti contenenti CBD o estratti ricchi in cannabinoidi	Regolamento (UE) 2015/2283	Applicazione della disciplina sui *Novel Foods* per ingredienti privi di una storia significativa di consumo nell'Unione europea antecedente al 15 maggio 1997.
Liquidi per sigarette elettroniche	D.Lgs. 6/2016; eventuale normativa specifica relativa alle sostanze presenti	Disciplina dei prodotti destinati alle sigarette elettroniche; l'eventuale presenza di cannabinoidi sottoposti a controllo deve essere valutata anche secondo la normativa applicabile alla specifica sostanza.

Nel complesso, l'ampia varietà di prodotti contenenti cannabinoidi determina l'applicazione di quadri normativi differenti e rende la sola denominazione commerciale del campione insufficiente a definirne le caratteristiche. La determinazione analitica del profilo cannabinoidico rappresenta quindi uno strumento

fondamentale non soltanto per la caratterizzazione chimica, ma anche per fornire informazioni oggettive sulla composizione di matrici vegetali, medicinali, alimentari e di altra natura.

3 Analisi chimica dei cannabinoidi

3.1 Problematiche analitiche

La determinazione quali-quantitativa dei cannabinoidi rappresenta una problematica analitica complessa, nonostante la disponibilità di numerose tecniche cromatografiche e spettrometriche. Le principali criticità derivano dall'elevato numero di composti potenzialmente presenti, dalla loro somiglianza strutturale, dalla variabilità delle concentrazioni e dalla natura delle matrici analizzate. A questi fattori si aggiungono la stabilità limitata di alcuni cannabinoidi e la possibilità che il profilo originale del campione venga modificato durante le fasi di preparazione, conservazione o analisi [34, 35].

Un primo aspetto critico è rappresentato dalla presenza di numerosi cannabinoidi caratterizzati da proprietà chimico-fisiche simili. Analoghi strutturali e isomeri possono infatti presentare comportamenti cromatografici molto vicini, rendendo difficile ottenere una separazione sufficiente per la loro identificazione e quantificazione individuale. Questa problematica diventa particolarmente rilevante quando il metodo analitico viene esteso a un numero elevato di cannabinoidi, comprendendo non soltanto i composti maggiormente abbondanti ma anche cannabinoidi minori e prodotti strutturalmente correlati. In tali condizioni, la selettività della separazione cromatografica costituisce uno dei principali parametri da ottimizzare.

Un'ulteriore difficoltà è rappresentata dall'ampio intervallo di concentrazioni nel quale i diversi cannabinoidi possono essere presenti all'interno dello stesso campione. THC e CBD possono costituire componenti quantitativamente predominanti, mentre numerosi cannabinoidi minori sono presenti a concentrazioni sensibilmente inferiori. Il metodo analitico deve pertanto essere in grado di determinare simultaneamente composti caratterizzati da abbondanze molto differenti, mantenendo un'adeguata linearità e sensibilità e senza compromettere la corretta quantificazione degli analiti maggioritari.

Particolare attenzione deve inoltre essere rivolta alla stabilità delle forme acide dei cannabinoidi. Come descritto precedentemente, il riscaldamento può favorirne la decarbossilazione con formazione delle corrispondenti specie neutre; condizioni più drastiche possono inoltre determinare ulteriori fenomeni di degradazione. Di conseguenza, temperatura, tempi di preparazione e condizioni di conservazione del campione devono essere adeguatamente controllati al fine di evitare modificazioni del profilo cannabinoidico prima o durante l'analisi [34]. Questo aspetto assume particolare rilevanza quando l'obiettivo è determinare separatamente le forme acide e neutre.

Anche la preparazione del campione rappresenta una fase determinante dell'intero procedimento analitico. La scelta della procedura di estrazione dipende infatti dalla natura della matrice e dalle caratteristiche degli analiti da determinare. Materiale vegetale, resine, estratti oleosi, prodotti alimentari e liquidi per sigarette elettroniche presentano composizioni profondamente differenti e possono richiedere strategie di preparazione specifiche. Una procedura di estrazione non adeguatamente ottimizzata può determinare recuperi incompleti, degradazione degli analiti o coestrazione di componenti della matrice in grado di interferire con la successiva separazione e rivelazione [35].

Le matrici complesse possono inoltre contenere quantità elevate di lipidi, pigmenti, zuccheri, terpeni e altri metaboliti o eccipienti. Tali componenti possono generare segnali interferenti, alterare l'efficienza dell'estrazione o coeluire con gli analiti di interesse. L'entità di queste interferenze varia considerevolmente in funzione della tipologia di campione e della tecnica di rivelazione utilizzata, rendendo necessaria la valutazione dell'applicabilità del metodo alle diverse matrici [35].

Un'ulteriore criticità, particolarmente rilevante nello studio dei cannabinoidi minori, è rappresentata dalla disponibilità limitata di sostanze di riferimento. L'assenza di standard adeguati può rendere difficoltosa la conferma dell'identità di un composto sulla base del solo tempo di ritenzione e impedire una quantificazione accurata. L'utilizzo di tecniche complementari, quali la spettrometria di massa, può in questi casi fornire informazioni aggiuntive utili alla conferma dell'identità degli analiti.
La scelta della tecnica analitica deve quindi tenere conto simultaneamente della natura dei cannabinoidi da determinare, della matrice, dell'obiettivo qualitativo o quantitativo dell'analisi e delle prestazioni richieste in termini di selettività e sensibilità. Le tecniche cromatografiche, in particolare gascromatografia e cromatografia liquida, eventualmente accoppiate a differenti sistemi di rivelazione, rappresentano gli approcci maggiormente utilizzati per la caratterizzazione del profilo cannabinoidico e verranno approfondite nei paragrafi successivi.

3.2 Tecniche cromatografiche per l'analisi dei cannabinoidi

3.2.1 GC-MS

La Gas Cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS) è una tecnica analitica ampiamente impiegata per l'identificazione dei cannabinoidi. La separazione cromatografica degli analiti avviene in fase gassosa in funzione della loro volatilità e delle interazioni con la fase stazionaria della colonna. I composti separati vengono successivamente introdotti nello spettrometro di massa, che consente di ottenere informazioni caratteristiche sulla base del rapporto massa/carica e del pattern di frammentazione [36, 37]. Come mostrato in Figura 30, la tecnica GC-MS combina la separazione cromatografica con la successiva identificazione degli analiti mediante spettrometria di massa.

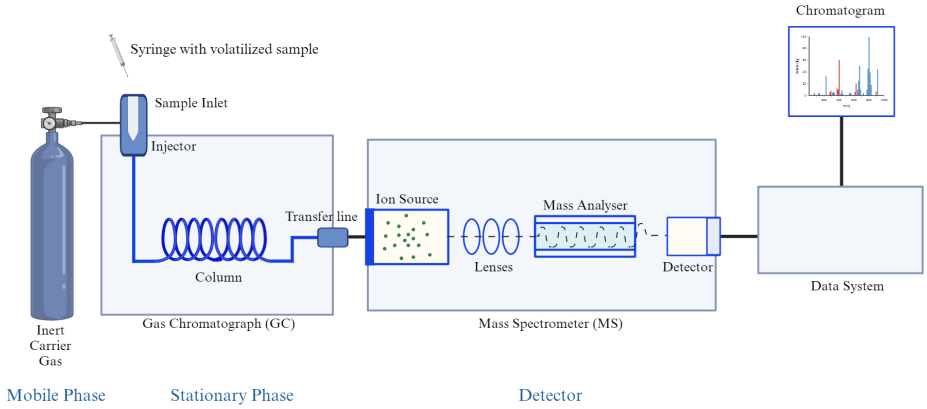


Figura 30: Schema generale di un sistema GC-MS

Uno dei principali limiti della GC-MS nell'analisi dei cannabinoidi è rappresentato dalla termolabilità delle forme acide. Le elevate temperature impiegate durante l'iniezione possono infatti favorire la decarbossilazione di composti quali THCA, CBDA e CBGA, modificando il profilo cannabinoidico originario del campione e rendendo più complessa la determinazione separata delle forme acide e neutre [35]. Per limitare tale fenomeno può essere effettuata una derivatizzazione preventiva degli analiti, che ne aumenta la stabilità termica e la volatilità.
Nonostante tale limitazione, la GC-MS risulta particolarmente utile per l'analisi qualitativa e per la conferma dell'identità dei cannabinoidi. Il confronto degli spettri di massa e dei relativi pattern di frammentazione con quelli ottenuti da sostanze di riferimento o presenti in librerie spettrali consente infatti di ottenere informazioni complementari a quelle fornite dalle tecniche cromatografiche con rivelazione meno selettiva. Per questo motivo la GC-MS può essere impiegata come tecnica di conferma nell'identificazione di cannabinoidi minoritari e di composti strutturalmente correlati.

3.2.2 HPLC-UV

La cromatografia liquida ad alte prestazioni accoppiata a rivelazione ultravioletta (HPLC-UV) rappresenta una delle tecniche maggiormente utilizzate per l'analisi dei cannabinoidi. A differenza della GC-MS, l'analisi avviene a temperature relativamente basse e consente quindi di determinare direttamente sia le forme neutre sia quelle acide. Questa caratteristica rende l'HPLC particolarmente adatta alla caratterizzazione del profilo cannabinoidico di materiali vegetali, estratti e prodotti derivati dalla Cannabis.
La separazione viene generalmente effettuata in fase inversa utilizzando colonne a fase stazionaria C18. Gli analiti vengono separati in funzione delle differenti interazioni con la fase stazionaria e con la fase mobile, la cui composizione può essere mantenuta costante oppure modificata nel corso dell'analisi mediante eluizione in gradiente. L'ottimizzazione della composizione della fase mobile e del programma di eluizione riveste un ruolo fondamentale quando il metodo è destinato alla determinazione simultanea di numerosi cannabinoidi caratterizzati da proprietà strutturali e chimico-fisiche simili [38].
Come mostrato in Figura 31, il campione viene introdotto nel flusso della fase mobile, separato all'interno della colonna cromatografica e successivamente rivelato mediante assorbimento della radiazione UV.
La rivelazione UV sfrutta l'assorbimento della radiazione ultravioletta da parte dei cromofori presenti nella struttura dei cannabinoidi. Le differenti caratteristiche strutturali determinano profili di assorbimento che possono variare tra le diverse classi di composti e, in particolare, tra cannabinoidi acidi e neutri.
La rivelazione UV presenta il vantaggio di essere relativamente semplice, robusta e accessibile e consente di ottenere buone prestazioni quantitative quando gli analiti risultano adeguatamente separati cromatograficamente. Rispetto alla spettrometria di massa, tuttavia, fornisce informazioni strutturali più limitate e la sola risposta UV non è generalmente sufficiente a confermare in maniera univoca l'identità di composti caratterizzati da strutture molto simili. L'affidabilità dell'identificazione dipende quindi in larga misura dalla qualità della separazione cromatografica e dal confronto con sostanze di riferimento analizzate nelle medesime condizioni [35].
Questa limitazione assume particolare importanza nello sviluppo di metodi multianalita estesi ai cannabinoidi minori, nei quali possono essere presenti numerosi isomeri e composti strutturalmente correlati. In tali condizioni, l'ottimizzazione della selettività cromatografica rappresenta un elemento centrale del

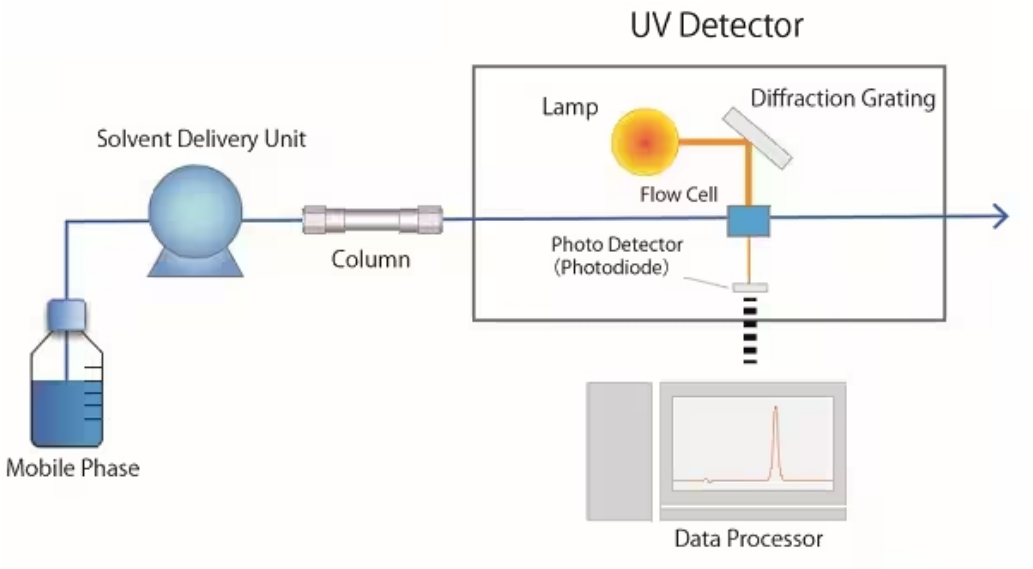


Figura 31: Rappresentazione schematica di un sistema HPLC-UV

metodo, mentre tecniche complementari basate sulla spettrometria di massa possono essere impiegate per ottenere ulteriori informazioni utili alla conferma dell'identità degli analiti.

3.2.3 HPLC-MS

La cromatografia liquida ad alte prestazioni accoppiata alla spettrometria di massa (HPLC-MS) combina la separazione cromatografica degli analiti con la loro successiva identificazione sulla base del rapporto massa/carica (m/z). Nell'analisi dei cannabinoidi, tale approccio consente di ottenere informazioni più selettive rispetto alla sola rivelazione UV e risulta particolarmente utile per la caratterizzazione di composti presenti a basse concentrazioni o caratterizzati da strutture molto simili [39, 35].

Dopo la separazione cromatografica gli analiti vengono trasferiti allo spettrometro di massa attraverso una sorgente di ionizzazione, frequentemente di tipo electrospray (ESI), compatibile con l'analisi in fase liquida. Gli ioni prodotti vengono quindi separati in funzione del loro rapporto m/z. Nei sistemi tandem MS (MS/MS), gli ioni selezionati possono essere ulteriormente frammentati, generando pattern caratteristici che forniscono informazioni aggiuntive utili alla conferma strutturale degli analiti [39]. Come mostrato in Figura 32, l'accoppiamento HPLC-MS integra la separazione cromatografica con la successiva ionizzazione e analisi degli ioni mediante spettrometria di massa.

L'elevata selettività e sensibilità della spettrometria di massa rende l'HPLC-MS particolarmente adatta all'identificazione e alla determinazione di cannabinoidi minori. La tecnica può inoltre essere utilizzata in approcci mirati, finalizzati alla ricerca di analiti noti, oppure in analisi più estese volte alla caratterizzazione del profilo cannabinoidico complessivo [39].

È tuttavia importante sottolineare che la spettrometria di massa non elimina necessariamente la necessità di un'adeguata separazione cromatografica. Composti isomerici possono infatti presentare la stessa massa molecolare e, in alcuni casi, pattern di frammentazione molto simili. Anche nell'analisi HPLC-MS, la qualità della separazione cromatografica e la disponibilità di sostanze di riferimento rimangono quindi elementi fondamentali per ottenere un'identificazione affidabile.

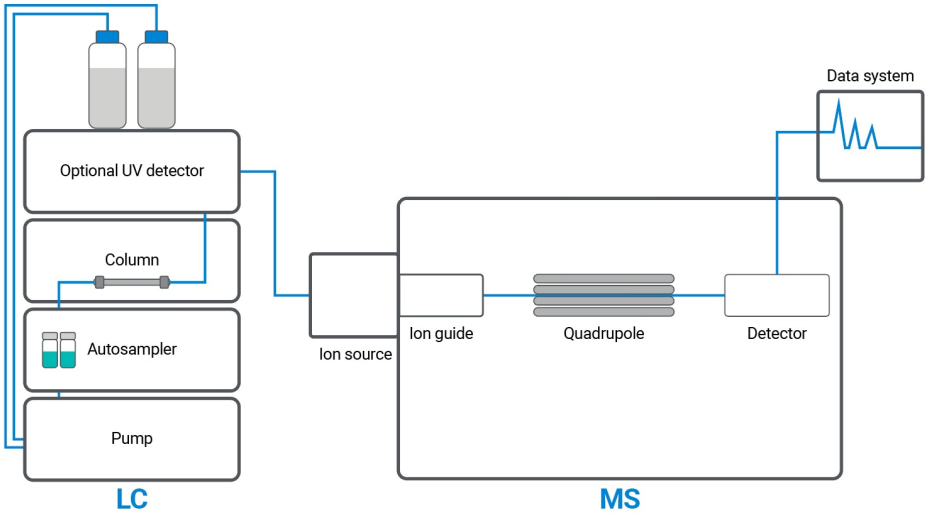


Figura 32: Schema generale di un sistema HPLC-MS

Nel presente contesto, l'HPLC-MS rappresenta pertanto una tecnica complementare particolarmente utile per approfondire e confermare l'identificazione dei cannabinoidi, soprattutto nel caso di composti minoritari o strutturalmente correlati per i quali la sola rivelazione UV può risultare meno specifica.

3.3 Metodi multianalita per la determinazione dei cannabinoidi

L'evoluzione delle metodiche per l'analisi della Cannabis ha progressivamente ampliato il numero di cannabinoidi determinabili simultaneamente. Se la caratterizzazione tradizionale è stata prevalentemente focalizzata sui cannabinoidi maggioritari, la crescente attenzione verso composti minoritari e prodotti strutturalmente correlati ha reso necessario lo sviluppo di metodi multianalita capaci di fornire un profilo cannabinoidico più esteso [38].

Lo sviluppo di un metodo destinato alla separazione simultanea di numerosi cannabinoidi richiede un'attenta ottimizzazione delle condizioni cromatografiche. Parametri quali natura della fase stazionaria, composizione e pH della fase mobile, programma di gradiente, flusso e temperatura possono influenzare significativamente la ritenzione e la risoluzione degli analiti. All'aumentare del numero di composti inclusi nel pannello cresce inoltre la probabilità di osservare coeluizioni, soprattutto nel caso di cannabinoidi caratterizzati da proprietà chimico-fisiche molto simili [40].

Un esempio della complessità associata a questo tipo di sviluppo è riportato da Durante et al., che hanno ottimizzato mediante Design of Experiments un metodo HPLC per la separazione simultanea di 14 cannabinoidi. L'ottimizzazione ha consentito di ottenere la separazione cromatografica di 12 composti, mentre per gli analiti coeluenti è stato necessario ricorrere all'accoppiamento con spettrometria di massa tandem per consentirne la discriminazione [40]. Questo esempio evidenzia come la capacità di separare un numero elevato di cannabinoidi non dipenda esclusivamente dalla sensibilità del sistema di rivelazione, ma soprattutto dalla selettività della separazione cromatografica.

Altri metodi multianalita sono stati sviluppati con sistemi HPLC accoppiati a rivelazione UV o fotodiodo. Elhendawy et al. hanno, ad esempio, sviluppato e convalidato un metodo per la determinazio-

ne simultanea di 15 cannabinoidi in materiale vegetale e prodotti commerciali derivati dalla Cannabis, comprendendo sia cannabinoidi maggiori sia composti meno abbondanti quali CBDVA, CBDV, THCV, THCVA e CBL [41]. Tali lavori mostrano come l'ampliamento del pannello analitico richieda una valutazione specifica della capacità del sistema cromatografico di mantenere un'adeguata risoluzione tra tutti gli analiti considerati.

La disponibilità delle sostanze di riferimento rappresenta un ulteriore elemento determinante nello sviluppo di metodi multianalita. La presenza di standard adeguatamente caratterizzati consente infatti di definire i tempi di ritenzione, valutare le eventuali coeluizioni, costruire le curve di calibrazione e verificare le prestazioni del metodo per ciascun analita. Tale aspetto assume particolare rilevanza nel caso dei cannabinoidi minori, per i quali la disponibilità commerciale degli standard può risultare più limitata.

Lo sviluppo di un metodo multianalita deve quindi trovare un equilibrio tra ampiezza del pannello, risoluzione cromatografica, durata dell'analisi e prestazioni quantitative. Una volta definite le condizioni cromatografiche, l'idoneità del metodo deve essere verificata mediante un processo di convalida, volto a valutarne le prestazioni rispetto allo scopo analitico previsto. I criteri e i parametri adottati nel presente lavoro verranno descritti nella sezione dedicata alla convalida sperimentale.

4 Scopo del lavoro

Il presente lavoro di tesi, svolto presso il Lab A.C.T. dell'Università degli Studi di Milano, ha avuto come obiettivo lo sviluppo e la convalida di un metodo HPLC-UV per la caratterizzazione di preparazioni a base di Cannabis, con particolare attenzione ai cannabinoidi minori.

Durante la prima fase dell'attività di tirocinio, il lavoro si è concentrato sull'analisi di routine mediante HPLC-UV di preparazioni oleose di cannabis medicinale inviate al laboratorio da farmacie per la determinazione quantitativa dei principali cannabinoidi. Questa attività ha consentito di acquisire familiarità con le problematiche analitiche associate alle preparazioni a base di Cannabis, con la strumentazione cromatografica e con le procedure di preparazione e analisi dei campioni. Il laboratorio di Analisi Chimico-Tossicologica è certificato secondo la norma UNI EN ISO 9001:2015, il che ha permesso di operare secondo procedure standardizzate e Procedure Operative Standard (SOP).

A partire da questa esperienza, l'attività sperimentale è stata progressivamente orientata verso una caratterizzazione più estesa del profilo cannabinoidico in preparazioni e materiali a base di Cannabis, con particolare attenzione ai cannabinoidi minori.

Tale approfondimento risulta di particolare interesse soprattutto nel caso delle preparazioni medicinali, nelle quali la somministrazione di Cannabis non corrisponde all'assunzione dei soli THC e CBD, ma di un fitocomplesso costituito da numerosi cannabinoidi e da altri componenti della matrice vegetale. Sebbene i cannabinoidi maggioritari siano quelli maggiormente studiati e comunemente sottoposti a determinazione quantitativa, anche i cannabinoidi presenti in concentrazioni inferiori possono possedere attività biologiche e farmacologiche proprie, la cui rilevanza complessiva nelle preparazioni a base di Cannabis risulta ancora poco caratterizzata. La loro determinazione può pertanto contribuire a una descrizione più completa del campione rispetto alla sola quantificazione di THC e CBD.

L'estensione dell'analisi a un numero elevato di cannabinoidi assume inoltre interesse anche per prodotti non destinati all'uso medicinale. In questo ambito, accanto ai fitocannabinoidi naturalmente presenti nella pianta, possono infatti essere riscontrati prodotti di trasformazione e cannabinoidi ottenuti mediante modificazioni semisintetiche di precursori naturali, la cui crescente diffusione rende utile disporre di metodi analitici capaci di riconoscere anche composti meno comunemente inclusi nelle determinazioni di routine.

L'obiettivo principale del presente lavoro è stato pertanto lo sviluppo e la convalida di un metodo analitico multianalita mediante HPLC-UV in grado di separare, identificare e quantificare un numero elevato di cannabinoidi, andando oltre la determinazione dei soli costituenti maggioritari, quali Δ^9-THC e CBD. Ulteriore obiettivo è stato valutarne l'applicabilità a campioni reali caratterizzati da matrici e composizioni differenti, con particolare interesse per la ricerca e la quantificazione dei cannabinoidi minori.

La scelta di sviluppare il metodo mediante HPLC-UV è stata inoltre effettuata in coerenza con quanto previsto dalla Farmacopea Europea per il controllo delle preparazioni a base di Cannabis. In particolare, la monografia relativa alla Cannabis flower (3028) prevede l'impiego della cromatografia liquida con rivelazione UV per la determinazione dei principali cannabinoidi, tra cui Δ^9-THC, Δ^9-THCA, CBD e CBDA.

L'insieme inizialmente considerato comprendeva 25 cannabinoidi, appartenenti a differenti famiglie strutturali e comprendenti sia forme acide sia neutre. Per 14 analiti erano disponibili standard commerciali, mentre dieci composti meno comuni — CBE, CBT, CBP, CBL, THD, CBQN, CBND, DCBF, ISO-CBD e Δ^8-ISO-THC — erano stati precedentemente sintetizzati nell'ambito dell'attività di ricerca del gruppo

del Prof. Daniele Merli presso l'Università degli Studi di Pavia e caratterizzati mediante spettroscopia NMR e GC-MS [42].
Il THCV è stato incluso tra i composti di interesse, ma non è stato successivamente sottoposto a convalida a causa della temporanea indisponibilità del relativo standard di riferimento alla concentrazione necessaria per la convalida. Il suo recente inserimento tra le sostanze stupefacenti ha infatti comportato un allungamento dei tempi di approvvigionamento, incompatibili con le tempistiche del lavoro sperimentale.
Una prima fase del lavoro è stata dedicata all'ottimizzazione delle condizioni cromatografiche, con l'obiettivo di ottenere la migliore risoluzione possibile tra analiti caratterizzati, in numerosi casi, da elevata similarità strutturale. Il metodo sviluppato ha consentito la completa separazione di 23 cannabinoidi; ISO-CBD e Δ^8-ISO-THC non sono invece risultati risolti dai rispettivi isomeri, CBD e Δ^8-THC.
Successivamente, il metodo HPLC-UV è stato sottoposto a convalida al fine di verificarne l'idoneità alla determinazione quantitativa degli analiti considerati. La convalida è stata condotta su 24 cannabinoidi, suddivisi in tre miscele di riferimento: una costituita dai dieci cannabinoidi minori ottenuti per sintesi, una contenente sette cannabinoidi in forma acida e una comprendente sette cannabinoidi neutri.
Il metodo sviluppato e convalidato è stato quindi applicato a un insieme eterogeneo di campioni reali, con l'obiettivo di valutarne l'applicabilità a matrici caratterizzate da composizione e complessità differenti. Sono stati analizzati campioni di cannabis medicinale, comprendenti preparazioni oleose e resine, ma anche campioni non destinati all'uso medicinale, tra cui prodotti commercializzati come cannabis light, campioni di hashish provenienti dal mercato illecito, prodotti alimentari contenenti THC e/o CBD e un liquido per sigaretta elettronica.
L'applicazione a tali matrici è stata finalizzata non soltanto alla determinazione dei cannabinoidi maggioritari, ma soprattutto alla ricerca e alla quantificazione dei cannabinoidi minori inclusi tra gli analiti considerati, allo scopo di ottenere una caratterizzazione più estesa dei cannabinoidi presenti nelle preparazioni e nei materiali a base di Cannabis. La disponibilità di sostanze di riferimento per composti meno comunemente investigati ha consentito, in particolare, di estendere l'analisi a molecole per le quali le informazioni disponibili nei metodi analitici di routine risultano più limitate.
Parallelamente, la GC-MS e l'HPLC-MS sono state impiegate come tecniche complementari di caratterizzazione e conferma. Tali metodiche sono state utilizzate soprattutto per approfondire l'identificazione dei cannabinoidi meno comuni ottenuti per sintesi e dei segnali di interesse osservati nei campioni reali, fornendo informazioni aggiuntive rispetto alla sola rivelazione UV. Le analisi mediante spettrometria di massa non hanno costituito parte della convalida del metodo HPLC-UV, ma hanno rappresentato uno strumento complementare per aumentare l'affidabilità dell'identificazione degli analiti.

5 Materiali e metodi

5.1 Vetreria e strumentazione

Per la preparazione delle fasi mobili, delle soluzioni standard e dei campioni sono stati utilizzati i seguenti materiali:

- Cilindro graduato in vetro di classe A da 1000 ± 10 mL
- Becher in vetro da 250 mL, 50 mL e 10 mL
- Bottiglie per HPLC-UV in vetro di classe A da 1000 mL
- Sistema di filtrazione sotto vuoto in vetro Pyrex (Colaver), costituito da imbuto in vetro graduato da 300 mL, supporto con disco sinterizzato, membrana filtrante in nylon da 0.45 μm e diametro 47 mm (Supelco), pinza di bloccaggio in alluminio e beuta da vuoto da 1000 mL
- Siringhe monouso da 5 mL
- Provette in plastica da centrifuga con tappo a vite
- Pipette graduate in vetro da 1.00 mL e 5.00 mL
- Micropipetta manuale regolabile da 1 a 20 μL (Gilson)
- Micropipetta manuale regolabile da 20 a 200 μL (Gilson)
- Micropipetta manuale regolabile da 200 a 1000 μL (Gilson)
- Puntali per micropipetta da 0 a 200 μL (Promed)
- Puntali per micropipetta da 200 a 1000 μL (Finntip)
- Dispensette® automatica da 5 mL
- Vial in vetro da 2 mL (Agilent Technologies) con tappo a vite
- Inserti in vetro da 200 μL per vial da 2 mL

5.2 Solventi e reagenti

Per la preparazione delle fasi mobili, delle soluzioni standard e dei campioni sono stati utilizzati solventi e reagenti di grado analitico o idonei all'impiego in cromatografia liquida.

- Acqua, grado HPLC, purezza $\geq$ 99.90% (Carlo Erba)
- Acido formico (CH_2O_2), grado LC-MS, purezza 99% (Honeywell)
- Ammonio formiato (CH_5NO_2), grado HPLC, purezza $\geq$ 99.90% (Fluka Analytical)
- Acetonitrile, grado HPLC, purezza $\geq$ 99.90% (Carlo Erba)
- Metanolo, grado HPLC, purezza $\geq$ 99.90% (Carlo Erba)

Tutti i solventi e i reagenti sono stati utilizzati entro la rispettiva data di scadenza e conservati secondo le indicazioni fornite dal produttore.

5.3 Standard e sostanze di riferimento

Per lo sviluppo e la convalida del metodo HPLC-UV sono state utilizzate complessivamente 25 sostanze di riferimento, comprendenti standard analitici commerciali e cannabinoidi ottenuti per sintesi.
Gli standard commerciali disponibili comprendevano 14 cannabinoidi, sia in forma acida sia neutra:

- Acido cannabidivarinico (CBDVA), 1 mg/mL in metanolo, fiala da 1 mL, Cerilliant
- Cannabidivarina (CBDV), 1 mg/mL in etanolo, fiala da 1 mL, Lipomed
- Acido cannabidiolico (CBDA), 1 mg/mL in acetonitrile, fiala da 1 mL, Restek
- Acido cannabigerolico (CBGA), 1 mg/mL in acetonitrile, fiala da 1 mL, Restek
- Cannabigerolo (CBG), 1 mg/mL in metanolo, fiala da 1 mL, Restek
- Cannabidiolo (CBD), 1 mg/mL in metanolo, fiala da 1 mL, Restek
- Acido tetraidrocannabivarinico (THCVA), 1 mg/mL in acetonitrile, fiala da 1 mL, Restek
- Cannabinolo (CBN), 1 mg/mL in metanolo, fiala da 1 mL, Restek
- Acido cannabinolico (CBNA), 1 mg/mL in acetonitrile, fiala da 1 mL, Restek
- Δ^9-tetraidrocannabinolo (Δ^9-THC), 1 mg/mL in metanolo, fiala da 1 mL, DR Ehrenstorfer
- Δ^8-tetraidrocannabinolo (Δ^8-THC), 1 mg/mL in metanolo, fiala da 1 mL, Cerilliant
- Cannabicromene (CBC), 1 mg/mL in metanolo, fiala da 1 mL, Restek
- Acido tetraidrocannabinolico (THCA), 1 mg/mL in acetonitrile, fiala da 1 mL, Restek
- Acido cannabicromenico (CBCA), 1 mg/mL in acetonitrile, fiala da 1 mL, Cerilliant

Dieci cannabinoidi meno comuni sono stati precedentemente sintetizzati dal Prof. Daniele Merli presso l'Università degli Studi di Pavia e caratterizzati mediante spettroscopia NMR e GC-MS.
I composti utilizzati come sostanze di riferimento erano:

- Cannabielsoina (CBE), 1 mg/mL in etil acetato, fiala da 1 mL
- Cannabicitrano (CBT), 2 mg/mL in metanolo, fiala da 2 mL
- Cannabifenantrene (CBP), 1 mg/mL in metanolo, fiala da 1 mL
- Cannabiciclolo (CBL), 2 mg/mL in metanolo, fiala da 2 mL
- Δ^8-iso-tetraidrocannabinolo (Δ^8-ISO-THC), 1 mg/mL in metanolo, fiala da 1.5 mL
- Tetraidrocannabidiolo (THD), 1 mg/mL in metanolo, fiala da 1.4 mL
- Cannabinodiolo (CBND), 1 mg/mL in metanolo, fiala da 1.1 mL
- Cannabinochinone (CBQN), 1 mg/mL in metanolo, fiala da 1 mL
- Deidrocannabifurano (DCBF), 1 mg/mL in metanolo, fiala da 1 mL

- Iso-cannabidiolo (ISO-CBD), 1 mg/mL in metanolo, fiala da 1.3 mL

Per la tetraidrocannabivarina (THCV) era disponibile una soluzione standard alla concentrazione di 50 μg/mL che è stata utilizzata durante la fase di sviluppo del metodo per determinarne il comportamento cromatografico e valutarne la separazione dagli altri analiti. Non era invece disponibile una soluzione standard concentrata a 1 mg/mL, necessaria per la preparazione delle soluzioni impiegate nella successiva fase di convalida. Per tale motivo, il THCV è stato incluso nello sviluppo cromatografico del metodo ma escluso dalla convalida.
Le soluzioni standard di CBT e CBL, inizialmente disponibili alla concentrazione di 2 mg/mL, sono state diluite con metanolo alla concentrazione di 1 mg/mL.
A partire da tali sostanze di riferimento sono state successivamente preparate le miscele utilizzate per lo sviluppo cromatografico, la calibrazione e la convalida del metodo.

5.4 Apparecchiature

Per la preparazione dei campioni e delle soluzioni sono state utilizzate le seguenti apparecchiature:

- Bilancia analitica Research RC210D (Sartorius), con sensibilità pari a ± 0.01 mg
- Vortex ARGO LAB Mix e, a seconda della disponibilità, vortex RS-VF10 (Phoenix Instruments)
- Bagno a ultrasuoni Starsonic 60 Digit (Liarre)
- Centrifuga XS R-5S (Remi) e, a seconda della disponibilità, centrifuga EBA 20 (Hettich)

Le analisi sono state eseguite mediante un sistema HPLC 1200 Series (Agilent Technologies), dotato di autocampionatore per l'iniezione automatica dei campioni e di rivelatore UV. Il controllo dello strumento, l'acquisizione dei cromatogrammi e l'elaborazione dei dati sono stati effettuati mediante il software ChemStation (Agilent Technologies).



Figura 33: HPLC-UV 1200 Series (Agilent Technologies)

5.5 Sviluppo e ottimizzazione del metodo HPLC-UV

Lo sviluppo del metodo HPLC-UV è stato finalizzato all'ottenimento di una separazione cromatografica adeguata di un insieme esteso di cannabinoidi, comprendente sia i composti comunemente determinati nelle preparazioni a base di Cannabis, sia cannabinoidi minori meno frequentemente inclusi nelle metodiche analitiche di routine.
L'ottimizzazione è stata condotta progressivamente, modificando le condizioni di eluizione e valutandone l'effetto sui tempi di ritenzione e sulla separazione degli analiti maggiormente critici.

5.5.1 Condizioni cromatografiche iniziali

Come punto di partenza sono state utilizzate le condizioni impiegate nelle analisi di routine del laboratorio per la determinazione dei cannabinoidi negli oleoliti di Cannabis.
In una prima fase, sono state preparate delle soluzioni dei cannabinoidi a circa 100 μg/mL (ad eccezione del THCV, come descritto in precedenza) e sono state analizzate singolarmente, al fine di determinarne il tempo di ritenzione nelle condizioni cromatografiche iniziali e valutarne il comportamento durante l'eluizione. Questa fase preliminare ha consentito di attribuire i segnali cromatografici ai singoli composti e di individuare gli analiti caratterizzati da tempi di ritenzione molto ravvicinati, potenzialmente critici per la successiva analisi in miscela.
La fase mobile era costituita da:

- **Fase A**: acqua ultrapura acidificata con H_3PO_4 allo 0.085%
- **fase B**: acetonitrile acidificato con H_3PO_4 allo 0.085%

Il programma di gradiente utilizzato è riportato in Tabella 6.

Tabella 6: Programma di gradiente utilizzato nelle condizioni cromatografiche iniziali

Tempo (min)	% A	% B
0.00	30	70
3.00	30	70
7.00	15	85
7.01	5	95
8.00	5	95
8.01	30	70
10.00	30	70

Le condizioni cromatografiche adottate per l'analisi HPLC-UV sono state le seguenti:

- **Flusso:** 1.6 mL/min
- **Colonna:** RESTEK Raptor ARC-18, 2.7 μm, 150 $\times$ 4.6 mm
- **Tempo di analisi:** 10.00 min
- **Volume di iniezione:** 5.00 μL

- **Temperatura del forno:** 30 °C
- **Temperatura massima:** 35 °C
- **Lunghezza d'onda:** 228 nm
- **Pressione massima:** 300 bar

L'analisi dei cannabinoidi con questo metodo ha evidenziato diverse criticità di separazione relativamente ai cannabinoidi minori. Alcuni analiti presentavano infatti tempi di ritenzione molto ravvicinati, tra cui CBND e CBDVA, ISO-CBD e CBD, THD e THCV, CBQN e Δ^9-THC, nonché diversi composti eluiti nella regione compresa tra Δ^9-THC e CBC.
In particolare, Δ^8-ISO-THC, Δ^8-THC e CBP risultavano concentrati in un intervallo ristretto di tempi di ritenzione, mentre CBL eluiva in prossimità del CBC.
Le condizioni iniziali risultavano pertanto insufficienti per ottenere una separazione soddisfacente dell'intero insieme di analiti e sono state avviate ulteriori prove di ottimizzazione.

5.5.2 Prime prove di ottimizzazione

In una prima fase sono state valutate condizioni di eluizione isocratica, utilizzando rapporti fase acquosa/fase organica pari rispettivamente a 20:80, 30:70 e 35:65, con un flusso della fase mobile di 1.0 mL/min.
Nessuna delle condizioni isocratiche testate ha consentito di risolvere in maniera soddisfacente le principali sovrapposizioni cromatografiche osservate.
È stato quindi nuovamente utilizzato il programma di eluizione del metodo di routine, prolungando la durata complessiva dell'analisi a 20 minuti e riducendo il flusso a 1.0 mL/min. L'aumento del tempo di analisi e la riduzione del flusso avevano lo scopo di favorire una maggiore interazione degli analiti con la fase stazionaria e incrementare la distanza tra i picchi. Anche in queste condizioni, tuttavia, permanevano sovrapposizioni tra diversi cannabinoidi e la separazione complessiva non risultava ancora adeguata.
Considerati i risultati delle prove precedenti, è stato successivamente preso come riferimento un altro metodo sviluppato e convalidato nel laboratorio per la separazione di 16 cannabinoidi (CBDVA, CBDV, CBDA, CBGA, CBG, CBD, THCV, THCVA, CBN, CBNA, Δ^9-THC, Δ^8-THC, CBC, THCA, CBCA, CBL).
Rispetto alle condizioni inizialmente impiegate, il metodo prevedeva una differente composizione delle fasi mobili:

- **Fase A**: soluzione di Acido Formico allo 0.1% e Ammonio Formiato 5 mM in Acqua ultrapura
- **Fase B**: soluzione di Acido Formico allo 0.1% in Acetonitrile

Il programma di gradiente utilizzato è riportato in Tabella 7.

Tabella 7: Programma di gradiente del metodo sviluppato per la determinazione di 16 cannabinoidi

Tempo (min)	% A	% B
0.00	25	75
15.00	15	85
17.00	25	75

Le condizioni cromatografiche adottate per l'analisi HPLC-UV sono state le seguenti:

- **Flusso:** 1.5 mL/min
- **Colonna:** RESTEK Raptor ARC-18, 2.7 μm, 150 $\times$ 4.6 mm
- **Tempo di analisi:** 17.00 min
- **Volume di iniezione:** 5.00 μL
- **Temperatura del forno:** 30 °C
- **Temperatura massima:** 35 °C
- **Lunghezza d'onda:** 228 nm
- **Pressione massima:** 300 bar

L'applicazione di questo metodo all'insieme dei cannabinoidi ha determinato un netto miglioramento della separazione rispetto alle condizioni precedentemente adottate. Permanevano tuttavia alcune sovrapposizioni, in particolare tra CBE e CBDA, THD e THCV, CBQN e Δ^9-THC e tra ISO-CBD e CBD.
Tale metodo è stato pertanto utilizzato come nuova base di partenza per un'ulteriore fase di ottimizzazione mirata.

5.5.3 Ottimizzazione delle coppie critiche

Per provare a separare ulteriormente anche i cannabinoidi che presentavano sovrapposizioni sono state considerate miscele preparate con le coppie CBE/CBDA, THD/THCV, CBQN/Δ^9-THC e ISO-CBD/CBD. L'analisi separata di tali miscele ha consentito di valutare più chiaramente l'effetto delle modifiche del gradiente sulla separazione dei singoli composti e di orientare in maniera più mirata le successive prove. Come prima modifica è stato testato un programma di eluizione della durata di 8 minuti, mantenendo le stesse condizioni cromatografiche del metodo sviluppato per la determinazione dei 16 cannabinoidi. Il programma di gradiente utilizzato è riportato in Tabella 8.

Tabella 8: Programma di gradiente utilizzato nella prova di ottimizzazione delle coppie critiche

Tempo (min)	% A	% B
0.00	30	70
3.00	30	70
3.50	25	75
5.00	25	75
8.00	30	70

Sulla base dei risultati ottenuti, il gradiente è stato ulteriormente modificato introducendo variazioni più graduali della percentuale di fase organica nelle prime fasi dell'analisi. Il flusso è stato mantenuto a 1.5 mL/min e la durata complessiva dell'analisi a 17 minuti.
Il programma di gradiente utilizzato è riportato in Tabella 9.

Tabella 9: Programma di gradiente definitivo

Tempo (min)	% A	% B
0.00	30	70
2.00	28	72
4.00	26	74
15.00	15	85
17.00	25	75

L'introduzione di queste modifiche ha consentito di migliorare sensibilmente la separazione dei cannabinoidi. In particolare, le criticità precedentemente osservate per le coppie CBE/CBDA, THD/THCV e CBQN/Δ^9-THC sono state risolte.
Sono rimaste invece criticità relative alla separazione di composti isomerici, in particolare per le coppie CBD/ISO-CBD e Δ^8-THC/Δ^8-ISO-THC. Per tale motivo, dopo l'ottimizzazione del gradiente sono state effettuate ulteriori prove mediante l'impiego di una colonna cromatografica differente, con l'obiettivo di verificare la possibilità di incrementare ulteriormente la selettività nei confronti degli isomeri.

5.5.4 Prove di separazione degli isomeri

Nonostante l'ottimizzazione del gradiente avesse consentito di risolvere la maggior parte delle sovrapposizioni cromatografiche, permanevano criticità nella separazione di alcune coppie di isomeri. Per tale motivo sono state effettuate ulteriori prove utilizzando una colonna a fase stazionaria bifenilica, scelta con l'obiettivo di modificare la selettività del sistema cromatografico rispetto alla colonna C18 impiegata nelle prove precedenti.
Le prove sono state condotte separatamente su due miscele costituite rispettivamente da CBD e ISO-CBD e da Δ^8-THC e Δ^8-ISO-THC, così da valutare direttamente la capacità della colonna di discriminare le due coppie isomeriche.

In una prima fase sono state testate, con la colonna bifenilica, sia le condizioni del metodo iniziale utilizzato nelle analisi di routine, sia quelle del metodo HPLC-UV successivamente ottimizzato. È stata inoltre effettuata una prova in condizioni isocratiche con rapporto fase acquosa/acetonitrile pari a 30:70 e flusso di 0.4 mL/min. Tali condizioni non hanno consentito di ottenere una separazione soddisfacente delle coppie considerate.
Sono state quindi effettuate ulteriori prove introducendo il metanolo come terza componente della fase mobile, con l'obiettivo di modificare ulteriormente la selettività cromatografica. Tutte le prove sono state condotte in modalità isocratica per una durata di 15 minuti, variando il rapporto tra acqua, acetonitrile e metanolo secondo quanto riportato in Tabella 10.

Tabella 10: Condizioni isocratiche testate con la colonna bifenilica

Prova	**H_2O (%)**	**ACN (%)**	**MeOH (%)**
1	30	65	5
2	30	55	15
3	20	65	15
4	30	45	25
5	30	35	35

L'aumento progressivo della percentuale di metanolo ha consentito di valutare l'effetto della variazione della composizione della fase mobile sulla selettività della colonna bifenilica. Tra le condizioni testate, la prova 5, condotta con 30% di acqua, 35% di acetonitrile e 35% di metanolo, ha fornito il risultato migliore, consentendo la separazione tra Δ^8-THC e Δ^8-ISO-THC.
La coppia CBD/ISO-CBD non è invece risultata separabile in nessuna delle condizioni valutate.
Nel complesso, le prove hanno evidenziato come la modifica della fase stazionaria e della composizione della fase mobile possa migliorare la selettività nei confronti di alcuni isomeri, pur non risultando sufficiente per la separazione di CBD e ISO-CBD. Per il metodo utilizzato nelle successive fasi del lavoro è stata pertanto mantenuta la colonna RESTEK Raptor ARC-18 con il gradiente precedentemente ottimizzato.
I cromatogrammi delle prove di ottimizzazione sono riportati in Appendice A.

5.6 Condizioni cromatografiche definitive

Al termine delle prove di sviluppo e ottimizzazione, sono state selezionate le condizioni cromatografiche definitive del metodo HPLC-UV, ritenute le più idonee a garantire la separazione dell'insieme di cannabinoidi considerato nelle successive fasi di convalida e applicazione ai campioni reali.
La fase mobile era costituita da:

- **Fase A:** soluzione di Acido Formico allo 0.1% e Ammonio Formiato 5 mM in Acqua ultrapura
- **Fase B:** soluzione di Acido Formico allo 0.1% in Acetonitrile

Entrambe le fasi sono state filtrate su membrana da 0.45 μm e degassificate in bagno ad ultrasuoni per 10 minuti prima dell'uso.
Il programma di gradiente utilizzato è riportato in Tabella 11.

Tabella 11: Programma di gradiente utilizzato per le analisi

Tempo (min)	A (%)	B (%)
0.00	30	70
2.00	28	72
4.00	26	74
15.00	15	85
17.00	25	75

Le condizioni cromatografiche adottate per l'analisi HPLC-UV sono state le seguenti:

- **Flusso:** 1.5 mL/min
- **Colonna:** RESTEK Raptor ARC-18, 2.7 μm, 150 $\times$ 4.6 mm
- **Tempo di analisi:** 17.00 min
- **Volume di iniezione:** 5.00 μL
- **Temperatura del forno:** 30 °C
- **Temperatura massima:** 35 °C
- **Lunghezza d'onda:** 228 nm
- **Pressione massima:** 300 bar

5.7 Tempi di ritenzione

Nelle condizioni cromatografiche descritte è stato possibile separare 23 dei 25 cannabinoidi considerati durante lo sviluppo del metodo. I tempi di ritenzione osservati per i composti separati sono riportati in Tabella 12.
Come descritto nel Paragrafo 5.5.4, nelle condizioni cromatografiche definitive adottate per il metodo, ISO-CBD e Δ^8-ISO-THC non sono risultati separabili dai rispettivi isomeri, poiché i loro segnali cromatografici risultavano sovrapposti rispettivamente a quelli del CBD e del Δ^8-THC.
Per tale motivo, a ISO-CBD e Δ^8-ISO-THC non è stato assegnato un tempo di ritenzione individuale e il metodo non ne consente la determinazione selettiva in presenza del rispettivo isomero coeluito. Sebbene l'impiego della colonna bifenilica in condizioni alternative abbia consentito la separazione di Δ^8-THC e Δ^8-ISO-THC, tali condizioni non sono state adottate nel metodo definitivo.

Tabella 12: Tempi di ritenzione dei 23 cannabinoidi separati mediante HPLC-UV.

Analita	Tempo di ritenzione (min)
CBDVA	2.61 ± 0.10
CBND	2.86 ± 0.11
CBDV	2.96 ± 0.10
CBE	3.62 ± 0.10
CBDA	3.91 ± 0.12
CBGA	4.24 ± 0.13
CBG	4.50 ± 0.14
CBD	4.69 ± 0.14
THCV	4.94 ± 0.12
THD	5.15 ± 0.15
THCVA	6.17 ± 0.14
CBN	6.78 ± 0.15
CBNA	7.83 ± 0.19
CBQN	8.02 ± 0.21
Δ^9-THC	8.24 ± 0.24
Δ^8-THC	8.54 ± 0.35
CBP	9.09 ± 0.16
CBL	9.38 ± 0.16
CBC	9.86 ± 0.17
Δ^9-THCA	10.07 ± 0.18
CBCA	10.97 ± 0.20
CBT	13.46 ± 0.19
DCBF	15.09 ± 0.31

In Figura 34 è riportato il cromatogramma HPLC-UV nel quale sono visibili i 23 cannabinoidi separati.

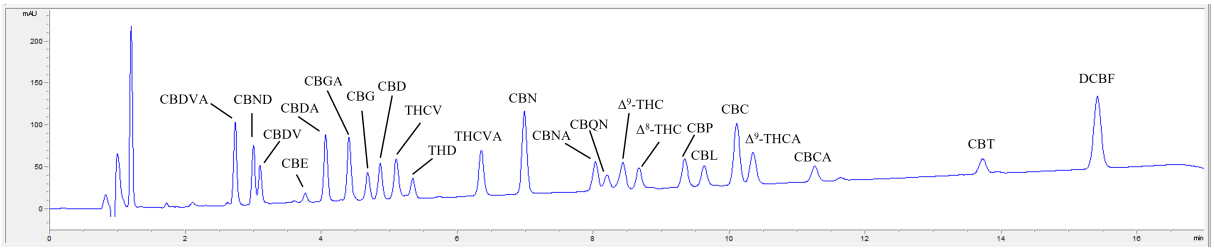


Figura 34: Cromatogramma HPLC-UV dei 23 cannabinoidi

5.8 Caratterizzazione dei cannabinoidi mediante GC-MS

La caratterizzazione degli standard dei cannabinoidi è stata ulteriormente approfondita mediante gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa (GC-MS). L'obiettivo era ottenere, per ciascun composto, informazioni cromatografiche e spettrali di riferimento da utilizzare come supporto alla successiva identificazione qualitativa dei cannabinoidi rilevati mediante HPLC-UV nei campioni reali.
A tale scopo, gli standard sono stati analizzati mediante GC-MS, acquisendo i relativi tempi di ritenzione e spettri di massa, successivamente utilizzati come elementi di confronto per la conferma dell'identità dei composti osservati nei campioni.
Le analisi sono state eseguite mediante un gascromatografo Hewlett Packard (HP), modello MS-5973, equipaggiato con un rivelatore MS SIM/Scan e una colonna capillare Agilent DB-5Q in silice fusa (fase stazionaria costituita da 5% fenil e 95% dimetilpolisilossano), della lunghezza di 30 m, con diametro interno di 0.25 mm e spessore del film di 0.25 μm. L'acquisizione dei dati è stata effettuata in modalità Scan, nell'intervallo di massa compreso tra m/z 40 e 650.



Figura 35: GC Hewlett Packard (HP), modello MS-5973

Le condizioni di analisi adottate sono state:

- Forno: il programma di temperatura prevede una temperatura iniziale di 70 °C, incrementata fino a 180 °C con una rampa di 40 °C/min. Successivamente, la temperatura viene portata a 300 °C con una rampa di 10 °C/min, mantenendo tale temperatura per 10 minuti.
- Temperatura iniettore: 280°C
- Split Mode: splitless
- Temperatura detector: 230°C
- Solvent delay: 2.0 min
- Volume di iniezione: 1 μL
- Gas Carrier: Elio (He) a flusso costante di 1.3 mL/min con una pressione di 12.10 psi

I cannabinoidi in forma acida non sono stati considerati in questa fase, in quanto le condizioni termiche proprie dell'analisi gascromatografica possono determinarne la decarbossilazione, impedendone la caratterizzazione diretta nella forma originaria. I cannabinoidi caratterizzati sono stati: CBDV, CBT, THCV,

CBQN, CBND, CBL, CBD, ISO-CBD, CBC, Δ^8-ISO-THC, THD, Δ^8-THC, CBE, Δ^9-THC, DCBF, CBG, CBN e CBP. L'analisi individuale ha consentito di associare a ciascuna sostanza di riferimento il relativo tempo di ritenzione e le principali caratteristiche dello spettro di massa.
Per ciascun composto sono stati considerati il tempo di ritenzione e i principali ioni osservati nello spettro di massa. I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 13.

Tabella 13: Tempi di ritenzione e principali ioni caratteristici dei cannabinoidi analizzati mediante GC-MS

Analita	**Tempo di ritenzione (min)**	**Ioni caratteristici** (m/z)
CBDV	9.852	203, 218, 286
CBT	10.451	231, 271, 314
THCV	10.667	203, 243, 271, 286
CBQN	10.764	313, 247, 328
CBND	11.086	295, 310
CBL	11.134	231, 174, 314
CBD	11.506	231, 246, 314
ISO-CBD	11.506	231, 246, 314
CBC	11.566	231, 174, 314
Δ^8-ISO-THC	11.625	231, 314
THD	11.865	193, 233, 262, 318
Δ^8-THC	12.105	231, 258, 314
CBE	12.105	205, 247, 330, 148
Δ^9-THC	12.297	299, 231, 243, 258, 271, 314
DCBF	12.512	252, 308, 265
CBG	12.716	193, 231, 247, 316
CBN	12.800	295, 238, 296
CBP	15.182	236, 292, 192

5.9 Caratterizzazione dei cannabinoidi mediante HPLC-MS

Al fine di integrare le informazioni ottenute mediante HPLC-UV e di approfondire la caratterizzazione dei cannabinoidi considerati, sono state effettuate analisi mediante cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa ad alta risoluzione (HPLC-MS).
L'impiego della spettrometria di massa, caratterizzata da maggiore sensibilità e selettività rispetto alla rivelazione UV, aveva l'obiettivo di fornire un supporto aggiuntivo all'identificazione dei cannabinoidi e di consentire la ricerca di composti, in particolare cannabinoidi minori, potenzialmente presenti nei campioni a basse concentrazioni.
A tale scopo, le sostanze di riferimento sono state analizzate preliminarmente mediante HPLC-MS, in modo da acquisire per ciascun analita informazioni cromatografiche e spettrali caratteristiche e costruire un database di riferimento da utilizzare nella successiva analisi qualitativa dei campioni reali.
L'impiego della spettrometria di massa aveva lo scopo di supportare l'identificazione dei cannabinoidi rilevati mediante HPLC-UV e di approfondire la ricerca dei cannabinoidi minori utilizzando uno strumento

più sensibile. L'analisi HPLC-MS non è stata pertanto utilizzata ai fini della convalida quantitativa del metodo sviluppato.

Le analisi sono state effettuate mediante un sistema Agilent 1290 Infinity II LC accoppiato a uno spettrometro di massa SCIEX ZenoTOF 7600, dotato di sorgente di ionizzazione elettrospray (ESI). La separazione cromatografica è stata eseguita utilizzando una colonna Kinetex® EVO C18 (100 × 2.1 mm, 1.7 μm).

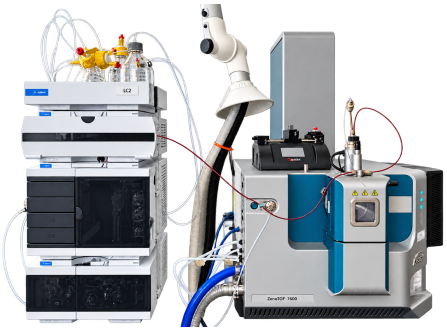


Figura 36: Agilent 1290 Infinity II LC accoppiato a SCIEX ZenoTOF 7600

La fase mobile era costituita da acqua contenente lo 0.1% di acido formico (fase A) e acetonitrile contenente lo 0.1% di acido formico (fase B). Il flusso è stato mantenuto a 400 μL/min, la temperatura della colonna a 40 °C e quella dell'autocampionatore a 10 °C. Il volume di iniezione era pari a 5 μL.

L'acquisizione degli spettri di massa è stata effettuata in modalità di ionizzazione positiva, nell'intervallo m/z 50–1000, utilizzando una modalità di acquisizione IDA®. L'energia di collisione è stata impostata a 35, con collision energy spread pari a 15.

L'elaborazione dei dati è stata effettuata mediante il software SCIEX OS 3.3.1, con il supporto di LibraryView 1.6 e Formula Finder per l'interpretazione degli spettri e l'identificazione dei composti.

In una prima fase sono state analizzate le sostanze di riferimento relative ai 25 cannabinoidi considerati durante lo sviluppo del metodo. Per 22 composti erano disponibili soluzioni standard individuali, mentre CBDVA, CBDA e THCVA erano disponibili esclusivamente all'interno di una miscela contenente complessivamente sette cannabinoidi acidi.

L'analisi delle sostanze di riferimento aveva lo scopo di acquisire, per ciascun analita, informazioni caratteristiche relative al comportamento cromatografico e allo spettro di massa. I dati ottenuti sono stati utilizzati per costruire un database di riferimento, successivamente impiegato come supporto per l'identificazione qualitativa dei cannabinoidi nei campioni reali.

Le sostanze di riferimento sottoposte ad analisi HPLC-MS sono riportate in Tabella 14.

Tabella 14: Sostanze di riferimento utilizzate per la caratterizzazione mediante HPLC-MS

Composto	**Sigla**	**Conc. (μg/mL)**	**Solvente**
Cannabielsoina	CBE	100	Metanolo
Cannabicitrano	CBT	100	Metanolo
Cannabifenantrene	CBP	80	Metanolo
Cannabiciclolo	CBL	100	Metanolo
Δ^8-iso-Tetraidrocannabinolo	Δ^8-ISO-THC	90	Metanolo
Tetraidrocannabidiolo	THD	130	Metanolo
Cannabinodiolo	CBND	110	Metanolo
Cannabinochinone	CBQN	110	Metanolo
Deidrocannabifurano	DCBF	105	Metanolo
Iso-Cannabidiolo	ISO-CBD	130	Metanolo
Cannabidivarina	CBDV	100	Etanolo
Acido cannabigerolico	CBGA	100	Acetonitrile
Cannabigerolo	CBG	100	Metanolo
Cannabidiolo	CBD	100	Metanolo
Tetraidrocannabivarina	THCV	50	Metanolo
Cannabinolo	CBN	100	Metanolo
Acido cannabinolico	CBNA	100	Acetonitrile
Δ^9-Tetraidrocannabinolo	Δ^9-THC	100	Metanolo
Δ^8-Tetraidrocannabinolo	Δ^8-THC	100	Metanolo
Cannabicromene	CBC	100	Metanolo
Acido tetraidrocannabinolico	THCA	100	Acetonitrile
Acido cannabicromenico	CBCA	100	Acetonitrile
Mix cannabinoidi acidi[a]	–	10	Metanolo

[a] Miscela contenente CBCA, CBNA, THCA, CBGA, CBDVA, CBDA e THCVA.

6 Analisi quantitativa dei cannabinoidi

L'analisi quantitativa di un analita viene generalmente effettuata attraverso una retta di calibrazione costruita utilizzando una sostanza di riferimento del composto di interesse. Tale approccio consente di tenere conto della diversa risposta strumentale dei singoli analiti e rappresenta la strategia più diretta per la loro determinazione quantitativa.
Nel caso di un metodo multianalita esteso a un numero elevato di cannabinoidi e tenendo conto che in alcuni casi si tratta di sostanze stupefacenti, tuttavia, la disponibilità di standard di riferimento per ciascun composto può rappresentare un limite, soprattutto per i cannabinoidi minori e meno comunemente analizzati. La possibilità di ricondurre la risposta di analiti differenti a quella di un unico composto di riferimento potrebbe pertanto rappresentare un approccio alternativo nei casi in cui non siano disponibili gli standard specifici di tutti i cannabinoidi di interesse.
Nel presente lavoro sono state inizialmente costruite le rette di calibrazione individuali per tutti i cannabinoidi. I risultati ottenuti mediante tali rette sono stati considerati come riferimento per valutare successivamente approcci alternativi di quantificazione basati sull'impiego del cannabidiolo (CBD) come composto di riferimento.
A tale scopo sono stati considerati quattro approcci:

- Calcolo mediante rette di calibrazione
- Calcolo mediante *Relative Response Factors* (RRF)
- Metodo del rapporto delle pendenze
- *Linear Relative Response Factor Model* (LRRFM)

I tre approcci alternativi alla calibrazione individuale mediante retta di regressione consentono di calcolare la risposta strumentale equivalente che ciascun cannabinoide avrebbe se fosse analizzato come CBD alla concentrazione di interesse. Tale parametro, indicato come Response as CBD, rappresenta quindi l'area di picco teorica normalizzata rispetto alla risposta del CBD e può essere successivamente inserito nell'equazione della retta di calibrazione del CBD. In questo modo è possibile ottenere una stima della concentrazione di un determinato cannabinoide analizzato, anche in assenza di uno standard certificato specifico per ogni singolo analita.
Per valutare la validità e l'equivalenza degli approcci proposti, i risultati quantitativi ottenuti mediante l'utilizzo della retta di calibrazione costruita con il rispettivo standard di riferimento di ciascun cannabinoide sono stati confrontati con quelli ottenuti applicando i tre metodi basati sull'impiego del CBD come riferimento. A tal fine, è stato necessario preliminarmente costruire una retta di calibrazione per ciascun cannabinoide, incluso il CBD, e determinare i relativi Relative Response Factors (RRFs), ovvero i fattori di risposta degli analiti rispetto al CBD.

6.1 Preparazione delle soluzioni di calibrazione

Per l'analisi quantitativa sono state preparate tre miscele di standard, ottenute a partire da soluzioni singole dei cannabinoidi alla concentrazione iniziale di 1 mg/mL:

- **Mix 10:** CBE, CBT, CBP, CBL, THD, CBQN, CBND, DCBF, ISO-CBD e Δ^8-ISO-THC. Per ciascun cannabinoide sono stati prelevati 100 μL della relativa soluzione standard a 1 mg/mL, ottenendo un volume finale di 1 mL. La soluzione madre conteneva ciascun analita alla concentrazione di 100 μg/mL.
- **Mix 7 acidi:** CBDVA, CBDA, CBGA, THCVA, CBNA, THCA e CBCA. Per ciascun cannabinoide sono stati prelevati 100 μL della relativa soluzione standard a 1 mg/mL e sono stati quindi aggiunti 300 μL di metanolo fino a un volume finale di 1 mL. La soluzione madre conteneva ciascun analita alla concentrazione di 100 μg/mL.
- **Mix 7 neutri:** CBDV, CBG, CBD, CBN, Δ^9-THC, Δ^8-THC e CBC. Per ciascun cannabinoide sono stati prelevati 100 μL della relativa soluzione standard a 1 mg/mL e sono stati quindi aggiunti 300 μL di metanolo fino a un volume finale di 1 mL. La soluzione madre conteneva ciascun analita alla concentrazione di 100 μg/mL.

A partire dalle soluzioni madri dei tre mix, ciascuna contenente i singoli analiti alla concentrazione di 100 μg/mL, sono stati preparati sette livelli di calibrazione compresi tra 5 e 100 μg/mL. Le modalità di preparazione sono riportate in Tabella 15.

Tabella 15: Preparazione dei livelli di calibrazione a partire dalle soluzioni madre a 100 μg/mL

Concentrazione (μg/mL)	**Volume soluzione madre (μL)**	**Volume MeOH (μL)**
5	20	380
10	20	180
20	20	80
40	40	60
60	60	40
80	80	20
100	100	0

6.2 Rette di calibrazione

Le rette di calibrazione sono state costruite impiegando sette soluzioni standard di lavoro (SSL), corrispondenti ai livelli di concentrazione di 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 μg/mL. Per il CBE sono stati utilizzati sei livelli di calibrazione, compresi tra 10 e 100 μg/mL. Il livello a 5 μg/mL è stato escluso a causa del debole assorbimento del composto alla lunghezza d'onda di 228 nm, che non consentiva una quantificazione affidabile a tale concentrazione.
Per ciascun analita, l'area del picco cromatografico è stata correlata alla concentrazione presente in ciascuna SSL mediante regressione lineare.
La relazione tra area del picco e concentrazione dell'analita è descritta dall'equazione:

$$y = mx + q$$

dove:

- y = area del picco dell'analita
- m = coefficiente angolare della retta
- x = concentrazione dell'analita (μg/mL)
- q = intercetta della retta con l'asse delle ordinate

Le equazioni delle rette di calibrazione ottenute e i relativi coefficienti di determinazione (R^2) sono riportati in Tabella 16.

Tabella 16: Equazioni delle rette di calibrazione e relativi coefficienti di determinazione (R^2) dei cannabinoidi analizzati

Analita	**Equazione della retta**	R^2
CBND	$y = 9.2881x - 1.2651$	0.9994
CBE	$y = 1.4573x - 0.12794$	0.9991
ISO-CBD	$y = 5.9827x - 0.6360$	0.9996
THD	$y = 2.7652x - 10.5778$	0.9948
CBQN	$y = 8.5538x - 32.2627$	0.9799
Δ^8-ISO-THC	$y = 6.9935x + 22.9801$	0.9911
CBP	$y = 11.0671x - 13.1484$	0.9974
CBL	$y = 5.2546x - 14.4566$	0.9883
CBT	$y = 5.6691x - 11.2247$	0.9913
DCBF	$y = 17.9014x - 6.5080$	0.9997
CBDVA	$y = 11.6577x - 11.3553$	0.9998
CBDA	$y = 12.4877x - 12.6739$	0.9999
CBGA	$y = 12.8862x - 13.0802$	0.9997
THCVA	$y = 11.4552x - 12.9135$	0.9991
CBNA	$y = 9.1915x - 15.9894$	0.9988
Δ^9-THCA	$y = 12.4135x - 15.1799$	0.9999
CBCA	$y = 5.6728x - 8.2031$	0.9986
CBDV	$y = 7.6733x + 2.0000$	0.9990
CBG	$y = 6.6782x - 2.9208$	0.9998
CBD	$y = 2.8050x - 0.5950$	0.9996
CBN	$y = 15.6314x - 6.1294$	0.9998
Δ^9-THC	$y = 5.4523x - 3.1119$	0.9998
Δ^8-THC	$y = 6.2842x - 4.3753$	0.9996
CBC	$y = 16.2013x - 2.2280$	0.9996

Nelle Figure 37–60 sono riportate le curve di calibrazione ottenute rispettivamente per il Mix 10, il Mix 7 acidi e il Mix 7 neutri.

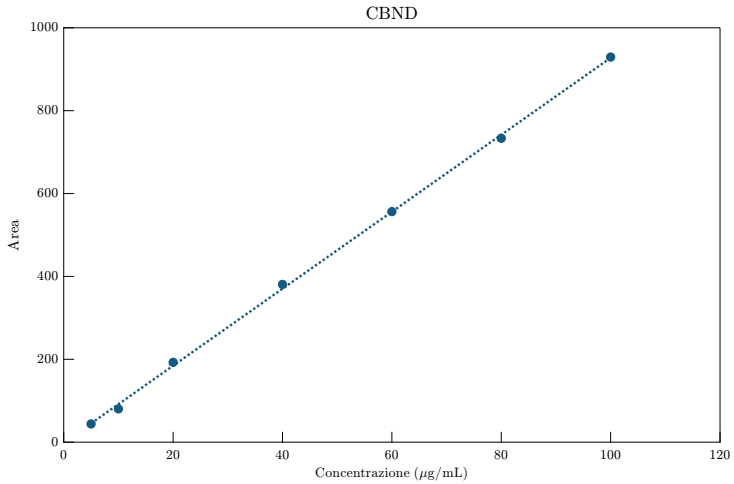


Figura 37: Retta CBND

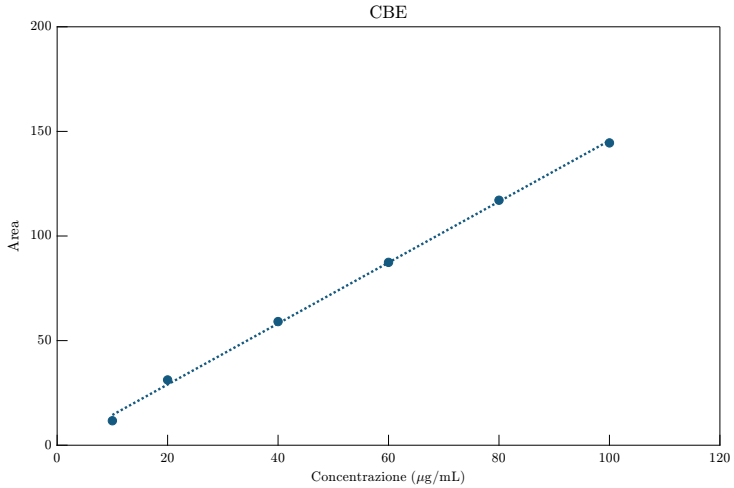


Figura 38: Retta CBE

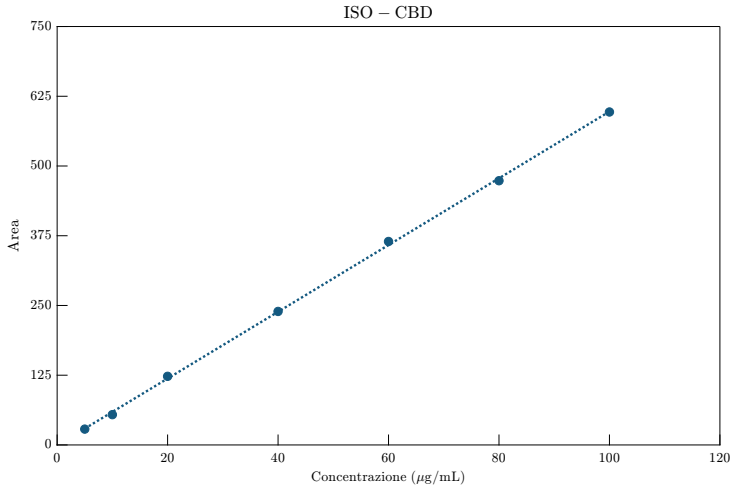


Figura 39: Retta ISO-CBD

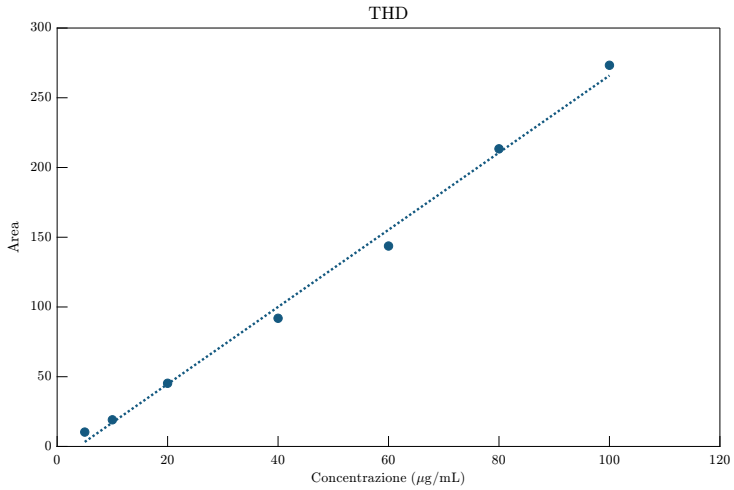


Figura 40: Retta THD

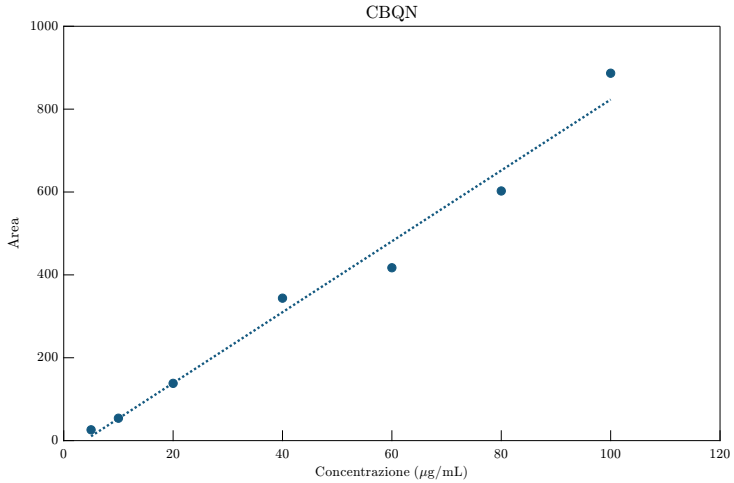


Figura 41: Retta CBQN

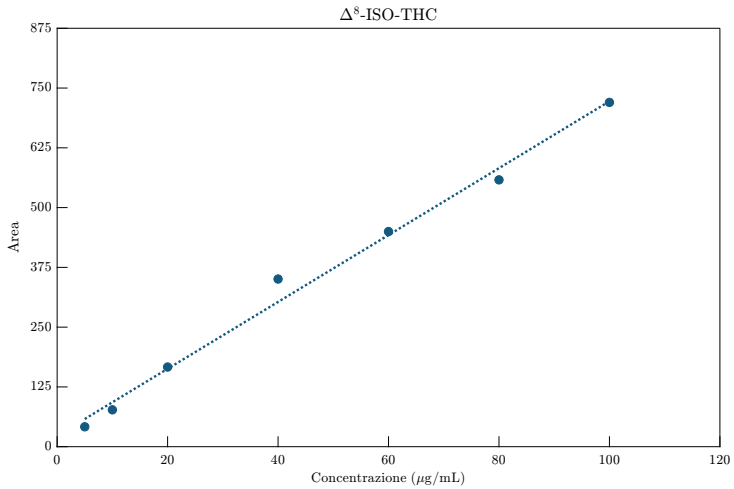


Figura 42: Retta Δ^8-ISO-THC

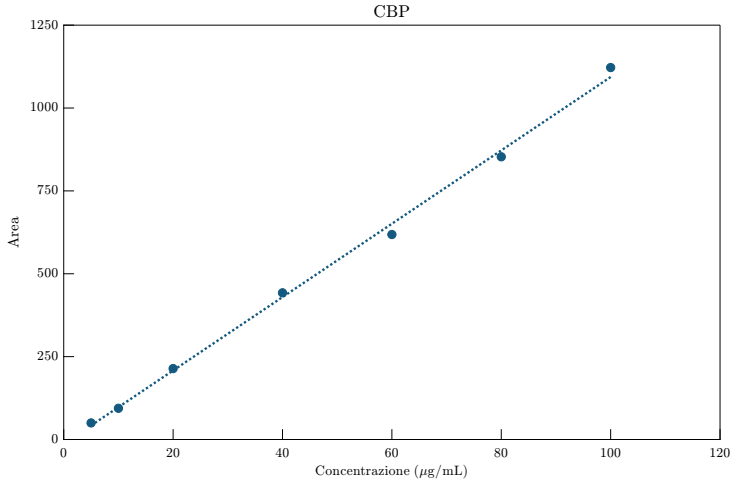


Figura 43: Retta CBP

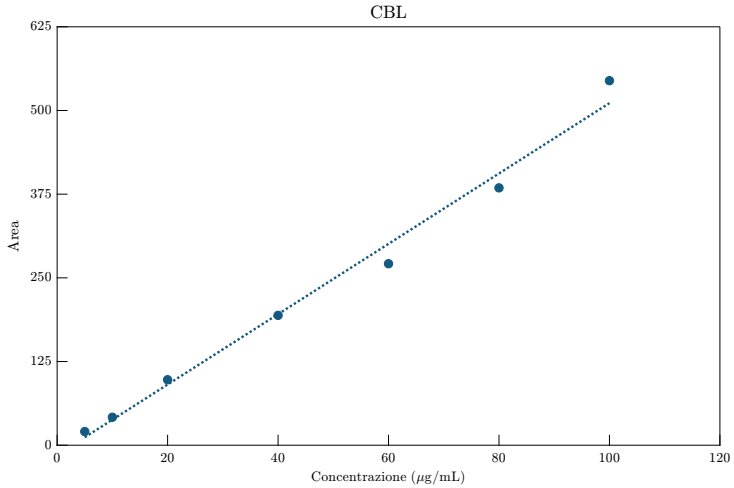


Figura 44: Retta CBL

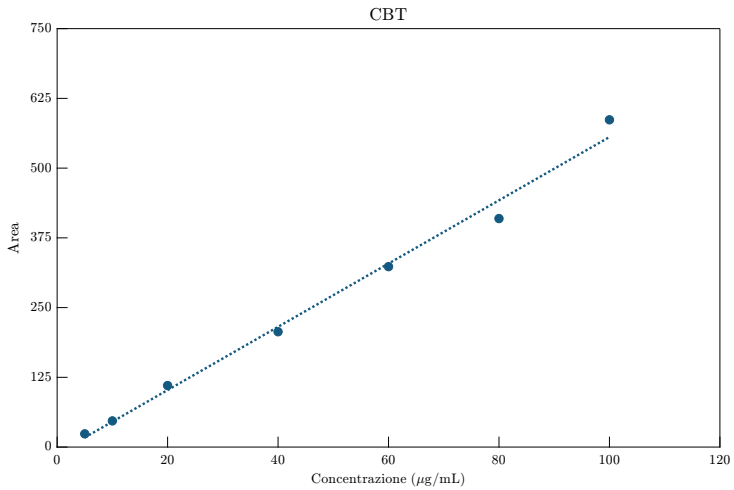


Figura 45: Retta CBT

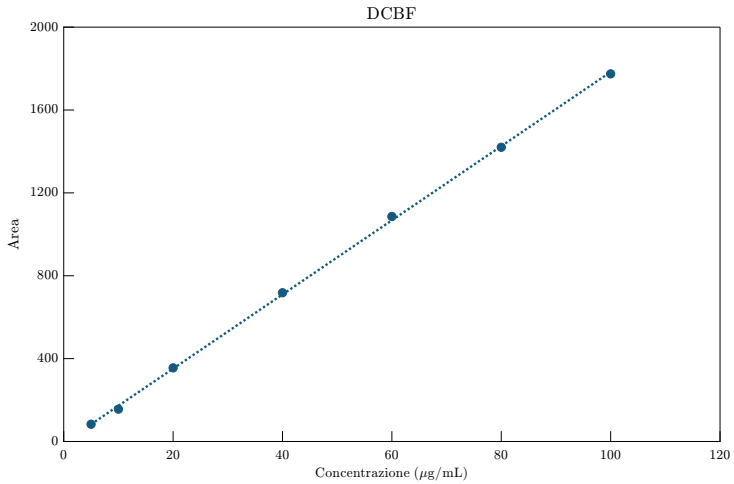


Figura 46: Retta DCBF

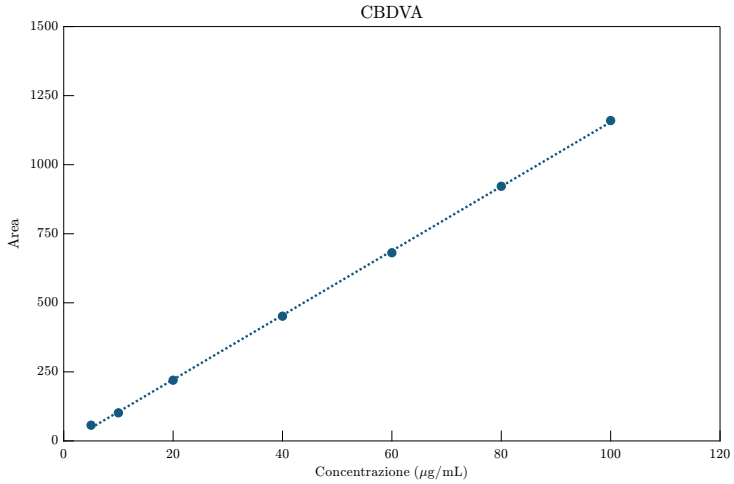


Figura 47: Retta CBDVA

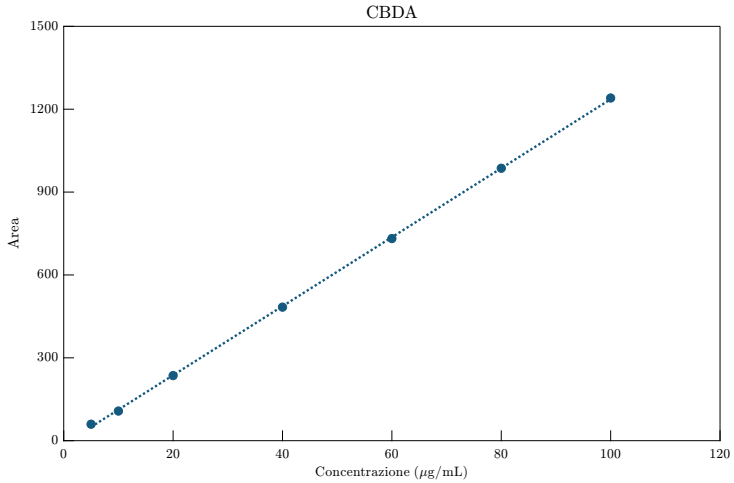


Figura 48: Retta CBDA

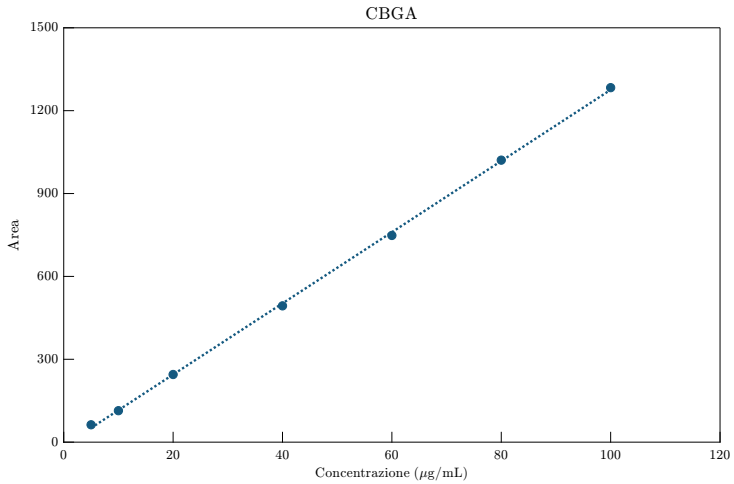


Figura 49: Retta CBGA

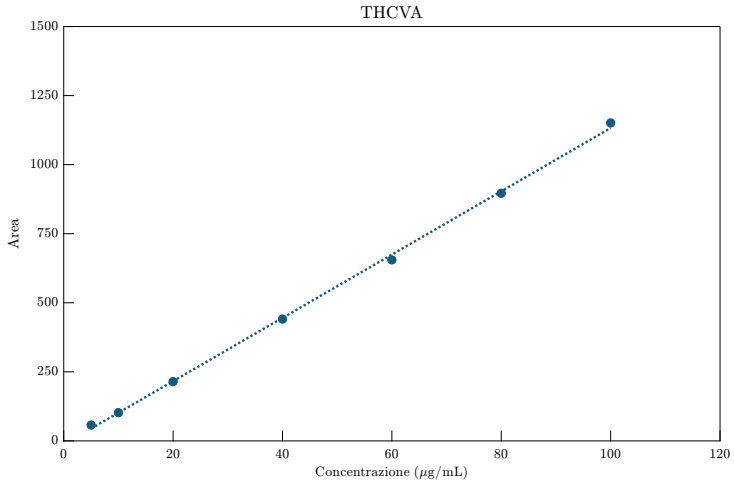


Figura 50: Retta THCVA

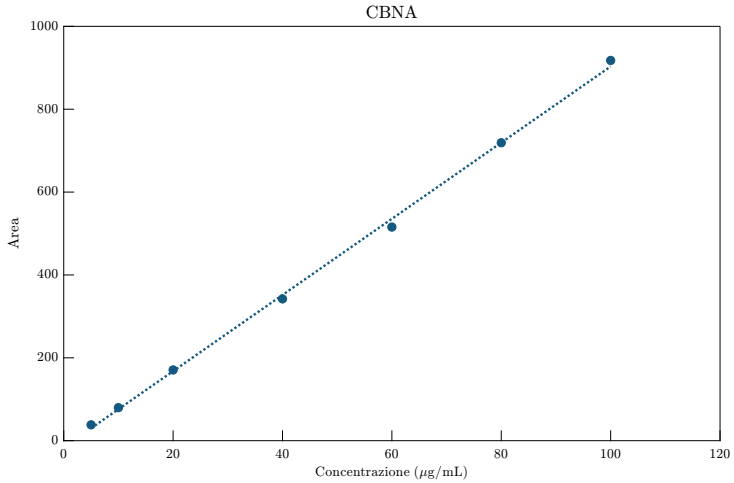


Figura 51: Retta CBNA

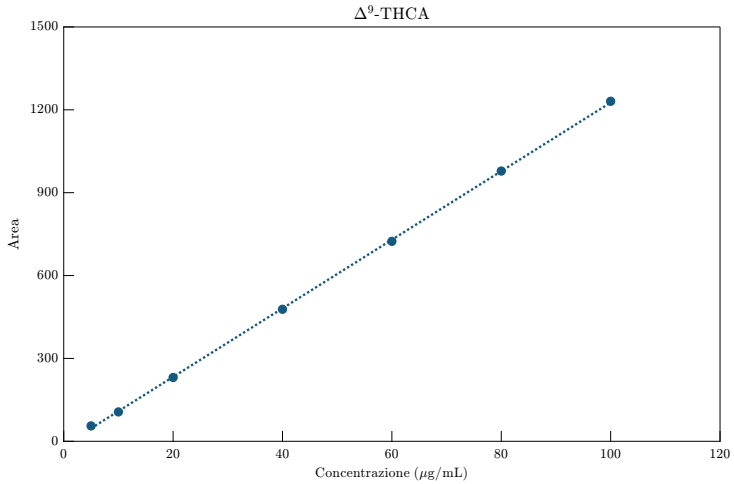


Figura 52: Retta Δ^9-THCA

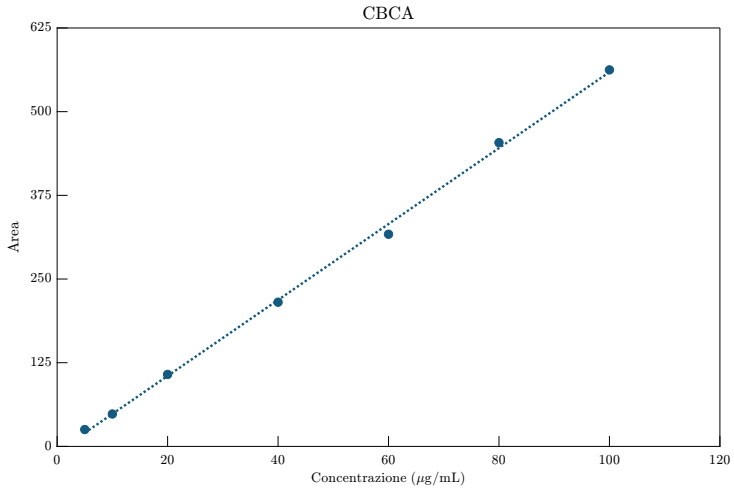


Figura 53: Retta CBCA

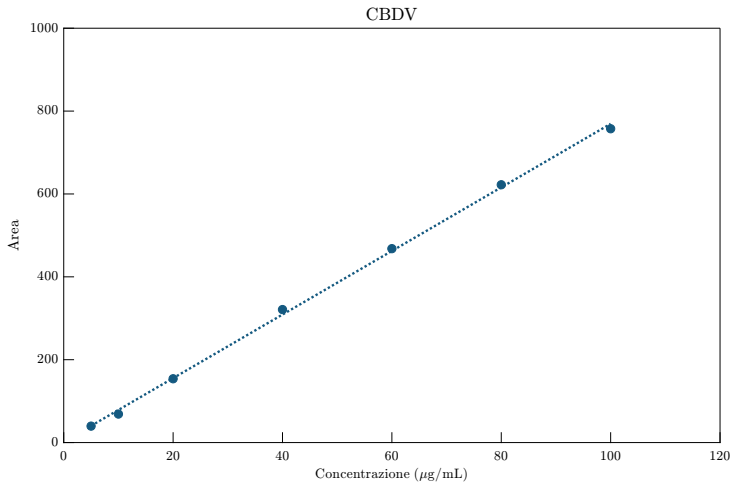


Figura 54: Retta CBDV

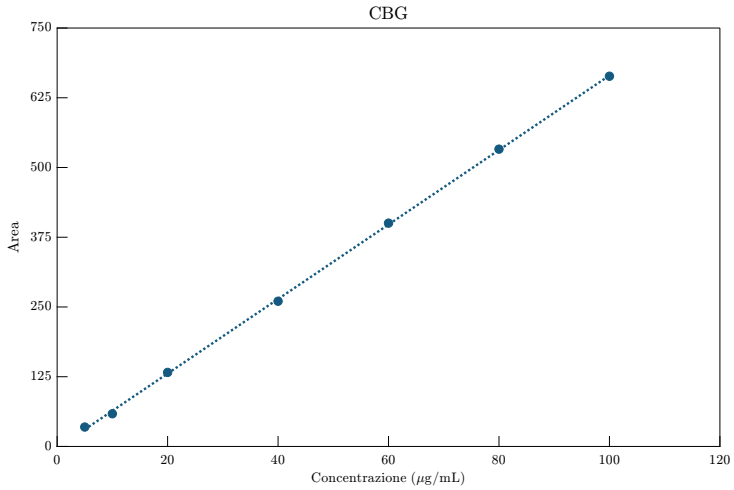


Figura 55: Retta CBG

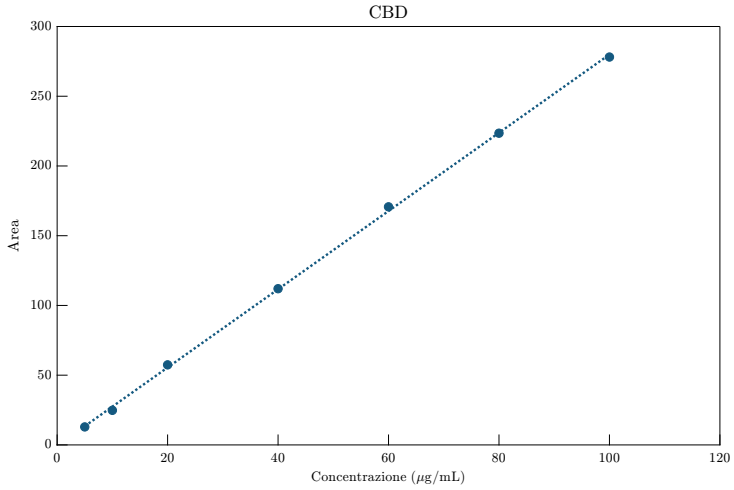


Figura 56: Retta CBD

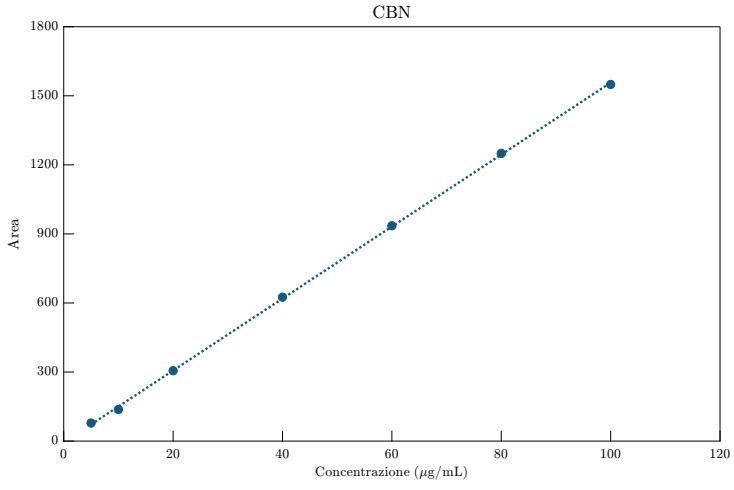


Figura 57: Retta CBN

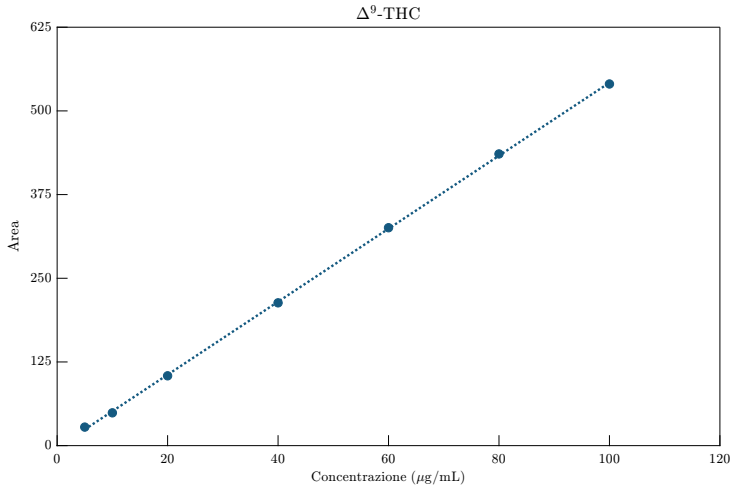


Figura 58: Retta Δ^9-THC

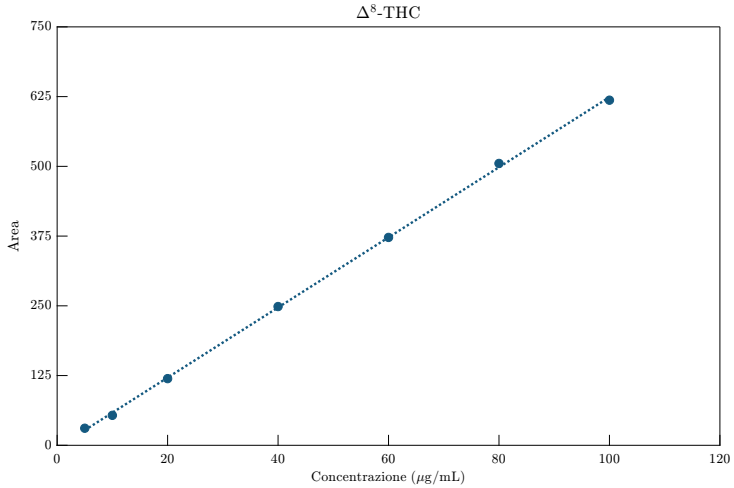


Figura 59: Retta Δ^8-THC

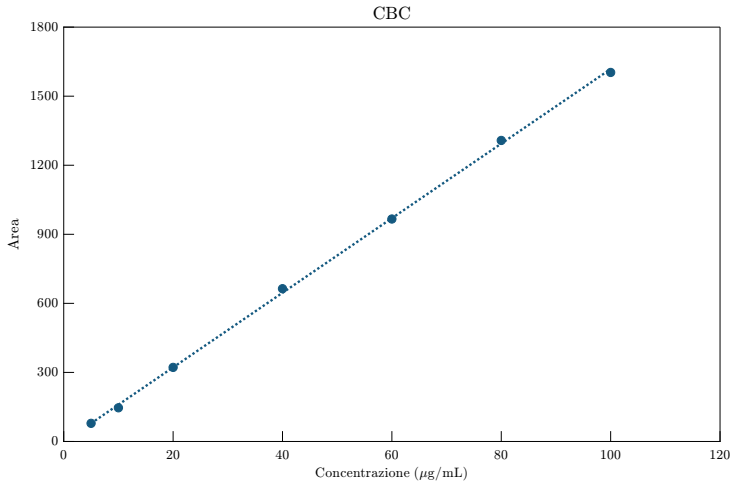


Figura 60: Retta CBC

6.3 Calcolo mediante Relative Response Factors (RRF)

Il primo approccio alternativo valutato per la determinazione quantitativa dei cannabinoidi è stato basato sul calcolo dei *Relative Response Factors* (RRF), utilizzando il CBD come composto di riferimento.
L'RRF di ciascun analita è stato definito come il rapporto tra l'area del relativo picco cromatografico e quella del picco del CBD, analizzati alla stessa concentrazione:

$$RRF_i = \frac{AUC_i}{AUC_{\text{CBD}}}$$

dove *AUC* (*Area Under the Curve*) rappresenta l'area del picco cromatografico, i indica il cannabinoide considerato e CBD il composto utilizzato come riferimento.
Per la determinazione degli RRF sono state utilizzate soluzioni dei cannabinoidi a due livelli di concentrazione, pari a 20 e 80 μg/mL, ciascuno preparato e analizzato in triplicato. Per ogni analita e per ciascun livello di concentrazione è stato calcolato il valore medio dell'RRF ottenuto nelle tre determinazioni.
I valori medi degli RRF ottenuti ai due livelli di concentrazione sono riportati in Tabella 17. Per ciascun livello, il valore indicato corrisponde alla media delle tre determinazioni effettuate.

Tabella 17: Valori medi dei *Relative Response Factors* (RRF) dei cannabinoidi rispetto al CBD, determinati a 20 e 80 μg/mL

Composto	**RRF 20 μg/mL**	**RRF 80 μg/mL**
CBE	0.53	0.57
CBT	1.86	1.98
CBP	3.74	3.94
CBL	1.66	1.77
THD	0.83	0.96
CBQN	2.59	2.85
CBND	3.20	3.37
DCBF	6.14	6.49
ISO-CBD	2.08	2.17
Δ^8-ISO-THC	2.37	2.31
CBDVA	3.91	4.16
CBDA	4.16	4.45
CBGA	4.32	4.60
THCVA	3.75	3.98
CBNA	2.95	3.24
Δ^9-THCA	4.05	4.42
CBCA	1.88	2.04
CBDV	2.80	2.83
CBG	2.34	2.39

CBD	1.00	1.00
CBN	5.50	5.65
Δ^9-THC	1.92	1.98
Δ^8-THC	2.16	2.27
CBC	5.82	5.98

Il confronto tra i valori medi ottenuti a 20 e 80 μg/mL ha consentito di valutare la stabilità del fattore di risposta relativo al variare della concentrazione e, conseguentemente, l'eventuale possibilità di utilizzare il CBD come composto di riferimento per la stima quantitativa degli altri cannabinoidi.
Come descritto nel paragrafo precedente, l'utilizzo degli RRF consente di ricondurre la risposta strumentale dei diversi cannabinoidi a quella del CBD, impiegato come composto di riferimento. A tal fine, per ciascun analita è stata calcolata la risposta equivalente come CBD (*Response as CBD*) mediante la seguente relazione:

$$Response\ as\ CBD_i = \frac{AUC_i}{RRF_i}$$

dove AUC_i rappresenta l'area del picco cromatografico dell'analita e RRF_i il relativo fattore di risposta rispetto al CBD.
Il valore di *Response as CBD* così ottenuto rappresenta quindi l'area teorica che il CBD fornirebbe, alla medesima concentrazione dell'analita, tenendo conto della diversa risposta dei due composti alla rivelazione UV.
Tale valore viene successivamente inserito nell'equazione della retta di calibrazione del CBD:

$$y = mx + q$$

consentendo di ricavare la concentrazione teorica dell'analita mediante:

$$x = \frac{Response\ as\ CBD - q_{\mathrm{CBD}}}{m_{\mathrm{CBD}}}$$

dove m_{CBD} e q_{CBD} rappresentano rispettivamente il coefficiente angolare e l'intercetta della retta di calibrazione del CBD.

6.4 Calcolo mediante il rapporto delle pendenze

Il metodo impiegato è analogo a quello descritto nel paragrafo precedente; in questo caso, tuttavia, il fattore di correzione viene ricavato direttamente dal rapporto tra il coefficiente angolare della retta di calibrazione del singolo cannabinoide e quello della retta di calibrazione del CBD, utilizzato come composto di riferimento.
Considerando la retta di calibrazione di un generico cannabinoide i:

$$y_i = m_i x + q_i$$

e la retta di calibrazione del CBD:

$$y_{\text{CBD}} = m_{\text{CBD}}x + q_{\text{CBD}}$$

il rapporto delle pendenze viene calcolato secondo la relazione:

$$RP_i = \frac{m_i}{m_{\text{CBD}}}$$

dove m_i rappresenta il coefficiente angolare della retta di calibrazione del cannabinoide considerato e m_{CBD} il coefficiente angolare della retta di calibrazione del CBD.
I rapporti delle pendenze ottenuti utilizzando il CBD come composto di riferimento sono riportati in Tabella 18. Per il CBD, utilizzato come riferimento, il rapporto delle pendenze è per definizione pari a 1.

Tabella 18: Rapporti tra le pendenze delle rette di calibrazione dei cannabinoidi e quella del CBD

Analita	m_i/m_{CBD}
CBE	0.52
CBT	2.02
CBP	3.95
CBL	1.87
THD	0.99
CBQN	3.05
CBND	3.31
DCBF	6.38
ISO-CBD	2.13
Δ^8-ISO-THC	2.49
CBDVA	4.16
CBDA	4.45
CBGA	4.59
THCVA	4.08
CBNA	3.28
Δ^9-THCA	4.43
CBCA	2.02
CBDV	2.74
CBG	2.38
CBD	1.00
CBN	5.57
Δ^9-THC	1.94
Δ^8-THC	2.24
CBC	5.78

Il valore di *Response as CBD* viene quindi inserito nell'equazione della retta di calibrazione del CBD per ricavare la concentrazione teorica dell'analita.

6.5 Calcolo mediante LRRFM

Il terzo approccio valutato per la stima della concentrazione dei cannabinoidi è rappresentato dal *Linear Relative Response Factor Model* (LRRFM). Questo metodo consente di mettere direttamente in relazione la risposta cromatografica di ciascun cannabinoide con quella del CBD, utilizzato come composto di riferimento.

Per ciascun analita viene costruita una retta di regressione riportando sull'asse delle ordinate le aree dei picchi del cannabinoide e sull'asse delle ascisse le corrispondenti aree dei picchi del CBD, ottenute agli stessi livelli di concentrazione.

L'applicazione del modello richiede pertanto che le rette di calibrazione dell'analita e del composto di riferimento siano costituite dallo stesso numero di punti sperimentali e che ciascuna coppia di valori corrisponda alla medesima concentrazione. Nel presente lavoro, le curve di calibrazione sono state costruite utilizzando sette livelli di concentrazione: 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 μg/mL.

La relazione tra la risposta del generico cannabinoide i e quella del CBD può essere descritta mediante la seguente equazione:

$$A_i = a_{\mathrm{LRRFM}} A_{\mathrm{CBD}} + b_{\mathrm{LRRFM}}$$

dove A_i rappresenta l'area del picco cromatografico del cannabinoide considerato, A_{CBD} l'area del picco del CBD alla medesima concentrazione, a_{LRRFM} il coefficiente angolare della retta e b_{LRRFM} la relativa intercetta.

Il coefficiente angolare ottenuto mediante il modello LRRFM descrive quindi la risposta relativa del cannabinoide rispetto al CBD considerando contemporaneamente tutti i livelli della curva di calibrazione. Tale parametro può essere confrontato con gli RRF determinati in precedenza: mentre l'RRF è ottenuto dal rapporto diretto tra le aree dei due composti a specifici livelli di concentrazione, il coefficiente angolare del modello LRRFM deriva dalla regressione delle rispettive risposte lungo l'intero intervallo di calibrazione. In condizioni di risposta lineare, i due parametri risultano pertanto strettamente correlati.

L'equazione del modello può essere espressa anche in termini di risposta equivalente del CBD:

$$\mathit{Response}_i = a_{\mathrm{LRRFM}} \cdot \mathit{Response\ as\ CBD} + b_{\mathrm{LRRFM}}$$

da cui è possibile ricavare:

$$\mathit{Response\ as\ CBD} = \frac{\mathit{Response}_i - b_{\mathrm{LRRFM}}}{a_{\mathrm{LRRFM}}}$$

La *Response as CBD* rappresenta quindi la risposta del CBD corrispondente alla risposta sperimentale osservata per il cannabinoide considerato, sulla base della relazione definita dal modello LRRFM.

Il valore così ottenuto viene infine inserito nell'equazione della curva di calibrazione del CBD:

$$y = m_{\mathrm{CBD}} x + q_{\mathrm{CBD}}$$

permettendo di ricavare la concentrazione teorica del cannabinoide:

$$x = \frac{Response\ as\ CBD - q_{\mathrm{CBD}}}{m_{\mathrm{CBD}}}$$

dove m_{CBD} e q_{CBD} rappresentano rispettivamente il coefficiente angolare e l'intercetta della curva di calibrazione del CBD.

Per ciascun cannabinoide è stata quindi costruita una retta LRRFM correlando le aree dei picchi ottenute ai sette livelli di concentrazione con le corrispondenti aree del CBD. Le regressioni sono state calcolate utilizzando i livelli di 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 μg/mL.

Le equazioni delle rette così ottenute, insieme ai relativi coefficienti di determinazione (R^2), sono riportate in Tabella 19.

Tabella 19: Equazioni delle rette ottenute mediante il modello LRRFM e relativi coefficienti di determinazione (R^2)

Analita	**Equazione LRRFM**	R^2
CBE	$y = 0.5202x + 0.0454$	0.9996
CBT	$y = 2.0194x - 9.8113$	0.9900
CBP	$y = 3.9421x - 10.3703$	0.9961
CBL	$y = 1.8703x - 12.9640$	0.9854
THD	$y = 0.9845x - 9.8240$	0.9925
CBQN	$y = 3.0438x - 29.7250$	0.9765
CBND	$y = 3.3109x + 0.7590$	0.9996
DCBF	$y = 6.3817x - 2.6675$	0.9999
ISO-CBD	$y = 2.1328x + 0.6466$	0.9999
Δ^8-ISO-THC	$y = 2.4941x + 24.3594$	0.9922
CBDVA	$y = 4.1540x - 8.6242$	0.9992
CBDA	$y = 4.4500x - 9.7783$	0.9993
CBGA	$y = 4.5915x - 10.0215$	0.9989
THCVA	$y = 4.0808x - 10.0881$	0.9979
CBNA	$y = 3.2741x - 13.6873$	0.9975
Δ^9-THCA	$y = 4.4234x - 12.2807$	0.9993
CBCA	$y = 2.0208x - 6.7972$	0.9974
CBDV	$y = 2.7356x + 3.6256$	0.9994
CBG	$y = 2.3803x - 1.4394$	0.9997
CBN	$y = 5.5716x - 2.6627$	0.9998
Δ^9-THC	$y = 1.9432x - 1.8797$	0.9996
Δ^8-THC	$y = 2.2398x - 2.9682$	0.9995
CBC	$y = 5.7746x + 1.3696$	0.9995

Si osserva come i coefficienti angolari delle rette ottenute mediante il modello LRRFM risultino strettamente confrontabili con i valori calcolati mediante il rapporto delle pendenze. Tale risultato è atteso, poiché entrambi i parametri descrivono la risposta relativa del singolo cannabinoide rispetto al CBD nell'intervallo di calibrazione considerato. In particolare, il rapporto delle pendenze è ottenuto dal rapporto tra i coefficienti angolari delle rispettive curve di calibrazione, mentre nel modello LRRFM il coefficiente angolare deriva dalla regressione diretta tra le aree del cannabinoide e quelle del CBD registrate agli stessi livelli di concentrazione.
I coefficienti angolari delle rette LRRFM risultano inoltre generalmente confrontabili con i *Relative Response Factors* determinati a 20 e 80 μg/mL. Anche gli RRF esprimono infatti la risposta relativa dell'analita rispetto al CBD, ma vengono calcolati dal rapporto diretto tra le aree dei due composti a specifici livelli di concentrazione. Il modello LRRFM, al contrario, considera simultaneamente tutti i livelli della curva di calibrazione. In presenza di una relazione lineare tra le risposte strumentali, i diversi approcci forniscono pertanto valori tra loro confrontabili.

6.6 Confronto tra i metodi

I tre approcci valutati consentono di ricondurre la risposta strumentale dei singoli cannabinoidi a quella del CBD, utilizzato come composto di riferimento, ma differiscono per il modo in cui viene determinato il fattore di risposta relativo.
Il metodo basato sugli RRF utilizza il rapporto diretto tra le aree cromatografiche dell'analita e del CBD a specifici livelli di concentrazione. Il metodo del rapporto delle pendenze considera invece il rapporto tra i coefficienti angolari delle rispettive curve di calibrazione, utilizzando quindi l'informazione derivante dall'intero intervallo di concentrazione. Infine, il modello LRRFM mette direttamente in relazione le aree del cannabinoide e quelle del CBD mediante una regressione lineare costruita sui corrispondenti livelli di calibrazione.
I valori ottenuti mediante il rapporto delle pendenze e i coefficienti angolari delle rette LRRFM sono risultati, come atteso, molto simili. Tale concordanza deriva dal fatto che entrambi gli approcci descrivono la relazione tra le risposte dell'analita e del CBD lungo lo stesso intervallo di calibrazione. Anche gli RRF hanno mostrato valori generalmente confrontabili, sebbene in questo caso il fattore di risposta sia determinato a specifici livelli di concentrazione e risulti quindi maggiormente influenzato dalla variabilità sperimentale associata ai singoli punti.
Al fine di confrontare i differenti approcci quantitativi considerati, è stata selezionata una soluzione standard alla concentrazione di 40 μg/mL. A partire dalle rispettive aree, la concentrazione di ciascun analita è stata ricalcolata mediante la retta di calibrazione individuale e mediante i tre approcci basati sull'impiego del CBD come sostanza di riferimento: fattore di risposta relativo (RRF), rapporto tra le pendenze delle rette di calibrazione e modello LRRFM (*Linear Relative Response Factor Model*). I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 20.

Tabella 20: Confronto delle concentrazioni calcolate mediante i differenti metodi quantitativi per una soluzione standard di 40 μg/mL.

Analita	**Retta**	**RRF**	**Rapporto pendenze**	**LRRFM**
			Concentrazione (μg/mL)	
CBDVA	39.71	40.11	38.95	39.71
CBND	41.12	41.57	41.20	41.12
CBDV	41.57	40.87	42.05	41.57
CBE	40.64	38.51	40.77	40.68
CBDA	39.73	40.23	38.93	39.73
CBGA	39.30	39.64	38.50	39.30
CBG	39.41	39.46	39.19	39.41
ISO-CBD	40.10	40.39	40.21	40.10
THD	37.06	36.79	33.45	37.05
THCVA	39.63	40.89	38.71	39.62
CBN	40.39	40.21	40.21	40.39
CBNA	38.97	39.60	37.44	38.96
CBQN	43.96	45.29	40.40	43.96
Δ^9-THC	39.69	39.22	39.33	39.69
Δ^8-THC	40.27	40.23	39.79	40.27
Δ^8-ISO-THC	46.85	53.68	50.34	46.85
CBP	41.17	41.30	40.20	41.17
CBL	39.67	40.55	37.13	39.66
CBC	41.10	40.30	41.18	41.10
Δ^9-THCA	39.73	40.43	38.72	39.73
CBCA	39.42	39.39	38.18	39.41
CBT	38.44	38.60	36.67	38.44
DCBF	40.47	40.75	40.32	40.47

In generale i differenti metodi hanno fornito concentrazioni tra loro confrontabili e generalmente prossime a 40 μg/mL. Una buona concordanza è stata osservata per la maggior parte degli analiti, indicando come la risposta del CBD possa essere utilizzata come riferimento per ottenere una stima della concentrazione anche in assenza dello standard specifico.

Tra i metodi valutati, quello basato sui *Relative Response Factors* risulta operativamente più semplice e immediato. Una volta determinato l'RRF per ciascun analita, infatti, la concentrazione può essere stimata utilizzando la sola curva di calibrazione del CBD, impiegato come composto di riferimento, senza la necessità di costruire una curva di calibrazione dedicata per ogni cannabinoide a ogni sessione analitica o di applicare ulteriori modelli di regressione.

L'impiego di RRF precedentemente caratterizzati può quindi ridurre il numero di standard necessari nelle analisi di routine, i tempi richiesti per la preparazione delle soluzioni di calibrazione e l'elaborazione dei dati. Tale approccio può risultare particolarmente vantaggioso per la determinazione di cannabinoidi minori, per i quali la disponibilità di standard analitici può essere più limitata. La sua applicazione

richiede tuttavia che il fattore di risposta relativo sia stato preventivamente determinato e che la sua stabilità nelle condizioni analitiche adottate sia stata adeguatamente verificata.

7 Convalida del metodo

Il metodo analitico sviluppato per la determinazione quantitativa dei cannabinoidi mediante HPLC-UV è stato convalidato in conformità alle linee guida ICH Q2(R2), al fine di verificarne l'idoneità all'impiego previsto.
La convalida è stata condotta valutando i principali parametri prestazionali del metodo, comprendenti specificità, linearità, accuratezza, precisione, robustezza, limite di rivelabilità (*Limit of Detection*, LOD) e limite di quantificazione (*Limit of Quantitation*, LOQ).
La procedura di convalida ha riguardato 24 cannabinoidi. Come descritto nel paragrafo 5.3, il THCV non è stato sottoposto a convalida.

7.1 Specificità

La specificità è la capacità di un metodo analitico di distinguere e determinare gli analiti di interesse in presenza di altre sostanze potenzialmente interferenti.
Per la valutazione della specificità sono state analizzate le seguenti soluzioni:

- Mix 10 (CBE, CBT, CBP, CBL, THD, CBQN, CBND, DCBF, ISO-CBD e Δ^8-ISO-THC)
- Mix 7 acidi (CBDVA, CBDA, CBGA, THCVA, CBNA, THCA e CBCA)
- Mix 7 neutri (CBDV, CBG, CBD, CBN, Δ^9-THC, Δ^8-THC e CBC)
- Solvente (metanolo)
- Fase mobile (acetonitrile + acqua)

Le soluzioni Mix 10, Mix 7 acidi e Mix 7 neutri sono state preparate come descritto nel paragrafo 6.1. La soluzione di fase mobile è stata preparata miscelando 700 μL di acetonitrile acidificato con acido formico allo 0.1% e 300 μL di soluzione di acqua, ammonio formiato 5 mM e acido formico allo 0.1%. La soluzione di solvente è stata preparata trasferendo in un vial del metanolo poiché è stato il solvente utilizzato per tutte le diluizioni.
Prima dell'analisi, ciascuna soluzione è stata brevemente agitata mediante vortex e successivamente analizzata nelle condizioni HPLC-UV precedentemente descritte.
Nelle miscele analizzate non sono state osservate interferenze attribuibili al solvente e alla fase mobile. Permangono tuttavia le limitazioni di selettività descritte per le coppie CBD/ISO-CBD e Δ^8-THC/Δ^8-ISO-THC, che non possono essere determinate separatamente mediante HPLC-UV quando presenti contemporaneamente.

7.2 Linearità

La linearità rappresenta la capacità di un metodo analitico di fornire, entro un determinato intervallo di concentrazione, una risposta strumentale proporzionale alla concentrazione dell'analita.
Per il metodo sviluppato, l'intervallo di linearità è stato fissato tra 5 e 100 μg/mL, ad eccezione del CBE, per il quale è stato adottato un intervallo di 10–100 μg/mL a causa del debole assorbimento a 228 nm. All'interno di tale intervallo sono stati considerati sette livelli di concentrazione: 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 μg/mL.

La linearità è stata valutata per ciascun cannabinoide mediante regressione lineare dell'area del picco cromatografico in funzione della concentrazione dell'analita. Le equazioni delle rette di calibrazione e i relativi coefficienti di determinazione (R^2) sono riportati nel paragrafo 6.2. Il metodo ha mostrato una buona linearità per tutti gli analiti considerati.

7.3 Accuratezza

L'accuratezza esprime il grado di concordanza tra il valore ottenuto sperimentalmente mediante il metodo analitico e il corrispondente valore teorico di riferimento.
L'accuratezza è stata valutata mediante il recupero percentuale (*Recovery*, %), calcolato secondo la seguente relazione:

$$\text{Recovery}\,(\%) = \frac{C_{\text{reale}}}{C_{\text{teorica}}} \times 100$$

dove:

- C_{reale} rappresenta la concentrazione dell'analita ottenuta mediante interpolazione sulla relativa retta di calibrazione
- C_{teorica} rappresenta la concentrazione dell'analita nella soluzione standard di lavoro (SSL).

L'accuratezza del metodo è stata valutata mediante l'analisi di soluzioni standard di lavoro per ciascun cannabinoide, preparate a tre livelli di concentrazione, pari a 10, 40 e 80 μg/mL. Per ciascun livello sono state effettuate tre determinazioni indipendenti.
I risultati ottenuti per la valutazione dell'accuratezza sono riportati nelle Tabelle 21–23.

Tabella 21: Risultati delle analisi di accuratezza per i 10 cannabinoidi

Analita	**10 μg/mL**	**40 μg/mL**	**80 μg/mL**
	Recovery (%)	**Recovery (%)**	**Recovery (%)**
CBND	99.30	100.65	101.45
CBE	99.79	101.99	100.57
ISO-CBD	95.72	100.86	98.56
THD	126.01	102.35	97.95
CBQN	130.93	102.59	103.52
Δ^8-ISO-THC	101.31	103.89	100.84
CBP	105.01	100.50	100.47
CBL	117.59	97.80	99.85
CBT	105.00	103.03	99.12
DCBF	100.91	101.77	101.43

Tabella 22: Risultati delle analisi di accuratezza per i 7 cannabinoidi acidi

Analita	**10 μg/mL**	**40 μg/mL**	**80 μg/mL**
	Recovery (%)	**Recovery (%)**	**Recovery (%)**
CBDVA	101.81	101.95	99.93
CBDA	102.13	102.46	99.51
CBGA	102.96	102.44	99.48
THCVA	103.14	101.01	98.21
CBNA	112.16	105.67	102.40
Δ^9-THCA	103.82	101.35	100.53
CBCA	106.30	99.94	100.00

Tabella 23: Risultati delle analisi di accuratezza per i 7 cannabinoidi neutri

Analita	**10 μg/mL**	**40 μg/mL**	**80 μg/mL**
	Recovery (%)	**Recovery (%)**	**Recovery (%)**
CBDV	86.19	97.96	99.27
CBG	90.87	97.16	101.93
CBD	90.42	99.05	102.94
CBN	92.12	100.48	99.90
Δ^9-THC	106.70	111.00	102.44
Δ^8-THC	94.49	102.40	100.03
CBC	90.44	98.15	100.03

Per la maggior parte dei cannabinoidi i valori di recupero sono risultati prossimi al 100%, soprattutto alle concentrazioni di 40 e 80 μg/mL. Gli scostamenti più evidenti sono stati osservati principalmente a 10 μg/mL, in particolare per THD, CBQN e CBL.

7.4 Precisione

La precisione esprime il grado di concordanza tra una serie di risultati ottenuti mediante misurazioni ripetute dello stesso campione in condizioni definite. Un metodo analitico preciso è pertanto caratterizzato da una ridotta dispersione dei risultati e da una bassa variabilità tra le determinazioni replicate.
La precisione è stata valutata secondo quanto previsto dalle linee guida ICH Q2(R2), considerando due differenti livelli: la ripetibilità e la precisione intermedia.

La ripetibilità descrive la precisione ottenuta nelle medesime condizioni operative e in un breve intervallo di tempo, mentre la precisione intermedia valuta la variabilità del metodo in seguito a variazioni introdotte all'interno dello stesso laboratorio, ad esempio in giorni differenti o da parte di operatori diversi.

7.4.1 Ripetibilità

La ripetibilità esprime il grado di concordanza tra risultati ottenuti mediante analisi replicate eseguite nelle stesse condizioni operative, ovvero dallo stesso operatore, nello stesso laboratorio, nella stessa giornata, utilizzando lo stesso strumento e nelle medesime condizioni analitiche. Viene infatti anche chiamata precisione *intra-day*.

Per la valutazione della ripetibilità sono state analizzate, per ciascun cannabinoide, soluzioni standard di lavoro (SSL), suddivise in tre livelli di concentrazione: 10, 40 e 80 μg/mL. Per ciascun livello sono state preparate e analizzate sei repliche.

Le concentrazioni sono state ricalcolate mediante le rispettive rette di calibrazione e, per ciascun livello, sono stati determinati il valore medio, la deviazione standard e il coefficiente di variazione percentuale (CV%).

I risultati ottenuti sono riportati nelle Tabelle 24–26.

Tabella 24: Risultati delle analisi di ripetibilità dei 10 cannabinoidi

Analita	**10 μg/mL**		**40 μg/mL**		**80 μg/mL**	
	Media ± DS	**CV (%)**	**Media ± DS**	**CV (%)**	**Media ± DS**	**CV (%)**
CBND	9.94 ± 0.17	1.75	40.34 ± 0.22	0.54	81.21 ± 0.51	0.62
CBE	9.81 ± 0.21	2.15	40.59 ± 0.39	0.96	79.76 ± 0.97	1.21
ISO-CBD	9.68 ± 0.19	2.00	40.22 ± 0.27	0.66	79.50 ± 1.19	1.49
THD	12.61 ± 0.28	2.20	40.72 ± 0.38	0.92	79.70 ± 1.73	2.18
CBQN	13.09 ± 0.06	0.42	40.94 ± 0.31	0.76	82.30 ± 1.14	1.38
Δ^8-ISO-THC	10.19 ± 0.13	1.24	41.77 ± 0.38	0.90	80.62 ± 0.75	0.93
CBP	10.56 ± 0.13	1.23	40.26 ± 0.18	0.46	80.31 ± 0.89	1.11
CBL	11.84 ± 0.13	1.06	39.42 ± 0.36	0.92	80.12 ± 0.42	0.53
CBT	10.71 ± 0.27	2.56	40.86 ± 0.78	1.90	80.01 ± 1.40	1.75
DCBF	10.20 ± 0.21	2.04	40.75 ± 0.44	1.08	81.32 ± 1.01	1.25

Tabella 25: Risultati delle analisi di ripetibilità dei 7 cannabinoidi acidi

Analita	10 μg/mL		40 μg/mL		80 μg/mL	
	Media ± DS	CV (%)	Media ± DS	CV (%)	Media ± DS	CV (%)
CBDVA	10.22 ± 0.18	1.72	40.86 ± 0.17	0.41	79.89 ± 0.21	0.26
CBDA	10.19 ± 0.13	1.24	40.78 ± 0.33	0.82	79.51 ± 0.32	0.40
CBGA	10.25 ± 0.15	1.42	40.94 ± 0.20	0.49	79.69 ± 0.45	0.57
THCVA	10.31 ± 0.16	1.59	40.59 ± 0.33	0.82	78.83 ± 0.53	0.67
CBNA	11.16 ± 0.18	1.64	42.26 ± 0.32	0.75	82.07 ± 0.43	0.53
Δ^9-THCA	10.50 ± 0.19	1.82	40.68 ± 0.32	0.80	80.47 ± 0.48	0.60
CBCA	10.60 ± 0.15	1.42	40.16 ± 0.34	0.84	80.42 ± 0.64	0.80

Tabella 26: Risultati delle analisi di ripetibilità dei 7 cannabinoidi neutri

Analita	10 μg/mL		40 μg/mL		80 μg/mL	
	Media ± DS	CV (%)	Media ± DS	CV (%)	Media ± DS	CV (%)
CBDV	8.56 ± 0.12	1.41	39.15 ± 0.21	0.55	79.55 ± 0.28	0.35
CBG	9.16 ± 0.17	1.81	39.02 ± 0.59	1.52	81.27 ± 0.55	0.67
CBD	9.14 ± 0.22	2.36	39.61 ± 0.29	0.73	82.62 ± 0.31	0.38
CBN	9.22 ± 0.13	1.45	39.96 ± 0.27	0.67	80.10 ± 0.35	0.43
Δ^9-THC	10.60 ± 0.13	1.20	44.13 ± 0.81	1.84	82.12 ± 0.63	0.76
Δ^8-THC	9.52 ± 0.21	2.21	40.75 ± 0.41	1.00	79.85 ± 0.68	0.85
CBC	9.02 ± 0.13	1.46	39.23 ± 0.08	0.20	80.05 ± 0.37	0.46

La ripetibilità del metodo è risultata soddisfacente. I valori di CV% ottenuti sono risultati contenuti e inferiori al 3% per tutti gli analiti e a tutti i livelli di concentrazione considerati.
Considerando come criterio di accettabilità un CV% non superiore al 5%, tutti i risultati ottenuti rientrano nei limiti stabiliti. La maggior parte dei valori relativamente più elevati è stata osservata al livello di concentrazione più basso, mentre alle concentrazioni di 40 e 80 μg/mL la variabilità è risultata generalmente inferiore. I risultati ottenuti indicano pertanto una buona ripetibilità del metodo nelle condizioni considerate.

7.4.2 Precisione intermedia

La precisione intermedia, indicata anche come precisione *inter-day*, valuta la variabilità del metodo analitico in presenza di variazioni che possono verificarsi all'interno dello stesso laboratorio, quali l'esecuzione delle analisi in giorni differenti, il coinvolgimento di operatori diversi o l'impiego di differenti condizioni operative.
La precisione intermedia è stata valutata effettuando le analisi in tre giornate differenti nell'arco di tre settimane. In ciascuna giornata sono state preparate e analizzate, per ciascun cannabinoide, soluzioni

standard di lavoro (SSL) a tre livelli di concentrazione pari a 10, 40 e 80 μg/mL. Per ciascun livello sono state preparate e analizzate tre repliche.

Le concentrazioni sono state ricalcolate mediante le rispettive rette di calibrazione e, per ciascun livello, sono stati determinati il valore medio, la deviazione standard e il coefficiente di variazione percentuale (CV%).

I risultati ottenuti per la valutazione della precisione intermedia sono riportati nelle Tabelle 27–29.

Tabella 27: Risultati delle analisi di precisione intermedia per i 10 cannabinoidi

Analita	**10 μg/mL**		**40 μg/mL**		**80 μg/mL**	
	Media ± DS	**CV (%)**	**Media ± DS**	**CV (%)**	**Media ± DS**	**CV (%)**
CBND	9.85 ± 0.16	1.62	40.34 ± 0.35	0.86	81.57 ± 0.44	0.54
CBE	10.07 ± 0.21	2.13	40.96 ± 0.39	0.95	80.26 ± 0.55	0.69
ISO-CBD	9.77 ± 0.17	1.75	40.28 ± 0.39	0.96	79.38 ± 0.94	1.18
THD	12.67 ± 0.27	2.15	40.54 ± 0.31	0.77	81.02 ± 1.05	1.30
CBQN	13.40 ± 0.26	1.94	40.79 ± 0.26	0.63	82.49 ± 0.79	0.96
Δ^8-ISO-THC	9.93 ± 0.34	3.45	41.75 ± 0.38	0.91	79.22 ± 1.79	2.26
CBP	10.54 ± 0.19	1.84	40.22 ± 0.25	0.63	80.14 ± 0.85	1.06
CBL	11.80 ± 0.18	1.51	39.56 ± 0.56	1.40	80.74 ± 0.94	1.16
CBT	10.39 ± 0.14	1.30	41.05 ± 0.45	1.10	79.20 ± 0.59	0.75
DCBF	9.84 ± 0.40	4.05	40.93 ± 0.35	0.85	81.38 ± 0.77	0.95

Tabella 28: Risultati delle analisi di precisione intermedia per i 7 cannabinoidi acidi

Analita	**10 μg/mL**		**40 μg/mL**		**80 μg/mL**	
	Media ± DS	**CV (%)**	**Media ± DS**	**CV (%)**	**Media ± DS**	**CV (%)**
CBDVA	10.15 ± 0.18	1.75	40.98 ± 0.29	0.70	80.42 ± 0.49	0.61
CBDA	10.10 ± 0.17	1.65	40.76 ± 0.22	0.54	79.41 ± 0.31	0.39
CBGA	10.12 ± 0.14	1.38	40.92 ± 0.13	0.32	80.21 ± 0.57	0.71
THCVA	10.16 ± 0.19	1.85	40.68 ± 0.28	0.69	78.97 ± 0.49	0.62
CBNA	11.04 ± 0.17	1.56	41.67 ± 0.52	1.26	82.57 ± 0.56	0.68
Δ^9-THCA	10.51 ± 0.16	1.56	40.60 ± 0.31	0.77	80.71 ± 0.55	0.69
CBCA	10.60 ± 0.12	1.11	40.49 ± 0.36	0.89	80.91 ± 0.46	0.57

Tabella 29: Risultati delle analisi di precisione intermedia per i 7 cannabinoidi neutri

Analita	10 μg/mL		40 μg/mL		80 μg/mL	
	Media ± DS	**CV (%)**	**Media ± DS**	**CV (%)**	**Media ± DS**	**CV (%)**
CBDV	8.74 ± 0.22	2.52	39.21 ± 0.23	0.59	79.08 ± 0.26	0.33
CBG	9.27 ± 0.16	1.70	39.02 ± 0.46	1.19	80.78 ± 0.47	0.58
CBD	8.95 ± 0.25	2.76	39.59 ± 0.42	1.07	82.52 ± 0.95	1.15
CBN	9.39 ± 0.18	1.93	39.78 ± 0.19	0.48	80.03 ± 0.32	0.39
Δ^9-THC	10.58 ± 0.36	3.36	44.81 ± 0.72	1.60	82.30 ± 0.88	1.07
Δ^8-THC	9.71 ± 0.51	5.27	41.05 ± 1.03	2.51	78.10 ± 0.74	0.95
CBC	9.05 ± 0.23	2.56	39.54 ± 0.33	0.84	80.01 ± 0.51	0.63

La precisione intermedia del metodo è risultata soddisfacente. Per la maggior parte degli analiti e dei livelli di concentrazione considerati, i valori di CV% sono risultati inferiori al 3%.
Considerando come preferibili valori di CV inferiori al 3% e come accettabili valori prossimi al 5%, i risultati ottenuti indicano una buona precisione *inter-day* del metodo, con una maggiore variabilità osservata al livello di concentrazione più basso.

7.5 System Suitability Test

Il *System Suitability Test* (SST) è stato eseguito al fine di verificare l'idoneità del sistema cromatografico e la capacità delle condizioni analitiche adottate di fornire risultati riproducibili prima dell'esecuzione delle analisi.
La prova è stata condotta mediante sei iniezioni consecutive della stessa soluzione standard di lavoro (SSL), preparata alla concentrazione di 40 μg/mL. Per ciascun analita sono stati valutati il *tailing factor* (S), il numero di piatti teorici (N) e la riproducibilità delle risposte ottenute.
Il *tailing factor* rappresenta un parametro utilizzato per valutare la simmetria del picco cromatografico ed è stato calcolato secondo la seguente relazione:

$$S = \frac{W_{0.05}}{2 \cdot A_{0.05}}$$

dove $W_{0.05}$ rappresenta la larghezza del picco misurata al 5% della sua altezza e $A_{0.05}$ la larghezza a metà del picco misurata al 5% della sua altezza.
L'efficienza della colonna cromatografica è stata valutata mediante il numero di piatti teorici (N), calcolato secondo la relazione:

$$N = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_h} \right)^2$$

dove t_R rappresenta il tempo di ritenzione dell'analita e W_h la larghezza del picco misurata a metà della sua altezza.
Infine, la riproducibilità delle sei iniezioni consecutive è stata valutata mediante il coefficiente di variazione percentuale (CV%).
I risultati del *System Suitability Test* sono riportati nelle Tabelle 30–34.
Per ciascun analita sono riportati i valori di *tailing factor* e numero di piatti teorici (N) ottenuti nelle sei reiniezioni consecutive e la concentrazione media ricalcolata con il relativo CV%.

Tabella 30: Valori di *tailing factor* e numero di piatti teorici (N) ottenuti nelle sei reiniezioni del mix dei 10 cannabinoidi

Analita	Parametro	I	II	III	IV	V	VI
CBND	Tailing factor	0.93	0.91	0.92	1.02	0.81	1.08
	N	17664	14958	15402	15455	15562	15217
CBE	Tailing factor	1.03	0.96	1.04	1.08	1.06	1.09
	N	23257	21988	21548	21665	21695	22287
ISO-CBD	Tailing factor	0.97	0.95	1.02	0.93	0.95	0.88
	N	30816	27222	27898	28073	28249	28366
THD	Tailing factor	1.02	0.95	0.94	0.95	1.02	0.88
	N	34468	32101	32162	32345	32529	33453
CBQN	Tailing factor	1.05	1.08	1.11	1.09	1.14	1.09
	N	42034	42228	42280	41376	41578	40653
Δ^8-ISO-THC	Tailing factor	2.12	2.07	2.22	2.38	2.01	2.13
	N	16647	15729	15391	15082	14646	14527
CBP	Tailing factor	0.98	0.98	1.04	1.04	0.90	0.93
	N	56554	56483	56604	55836	56194	55322
CBL	Tailing factor	1.00	0.98	0.97	1.01	0.89	0.95
	N	59297	57045	59648	57400	58993	59175
CBT	Tailing factor	1.05	1.08	1.09	1.02	0.97	1.13
	N	79091	76806	78636	75633	74386	77752
DCBF	Tailing factor	0.99	0.99	0.93	1.04	0.93	1.00
	N	90074	88293	88577	88918	89203	89431

Tabella 31: Riproducibilità delle concentrazioni ricalcolate nelle sei reiniezioni del mix dei 10 cannabinoidi

Analita	Conc. media $\pm$ DS (μg/mL)	CV (%)
CBND	40.30 ± 0.25	0.62
CBE	38.98 ± 0.64	1.65
ISO-CBD	40.19 ± 0.23	0.58
THD	40.94 ± 0.74	1.81
CBQN	39.82 ± 0.20	0.49
Δ^8-ISO-THC	40.85 ± 0.35	0.85
CBP	40.15 ± 0.32	0.79
CBL	40.13 ± 0.37	0.92
CBT	40.75 ± 0.64	1.57
DCBF	40.73 ± 0.14	0.33

Tabella 32: Valori di *tailing factor* e numero di piatti teorici (N) ottenuti nelle sei reiniezioni del mix dei 7 cannabinoidi acidi

Analita	Parametro	I	II	III	IV	V	VI
CBDVA	Tailing factor	0.81	0.81	0.90	1.05	0.77	0.93
	N	15295	13043	13407	12743	13094	13094
CBDA	Tailing factor	0.99	0.99	0.96	0.86	0.82	0.96
	N	24282	22105	22105	21617	21617	21674
CBGA	Tailing factor	0.99	0.89	0.98	0.99	0.84	0.92
	N	26913	23841	23841	23388	23957	24074
THCVA	Tailing factor	0.99	0.86	0.87	0.94	0.91	0.98
	N	36159	35811	34933	35165	35990	35223
CBNA	Tailing factor	1.02	1.06	1.01	0.88	0.93	0.87
	N	45699	44464	44523	44874	44698	44933
Δ^9-THCA	Tailing factor	1.07	0.88	1.04	0.90	1.06	0.92
	N	58277	58848	58907	57812	57638	57928
CBCA	Tailing factor	0.89	0.93	1.00	0.94	0.87	0.89
	N	63794	64439	62975	63384	64798	65098

Tabella 33: Riproducibilità delle concentrazioni ricalcolate nelle sei reiniezioni del mix dei 7 cannabinoidi acidi

Analita	Conc. media $\pm$ DS (μg/mL)	CV (%)
CBDVA	41.50 ± 0.36	0.86
CBDA	40.79 ± 0.20	0.49
CBGA	41.16 ± 0.09	0.22
THCVA	40.60 ± 0.19	0.46
CBNA	41.41 ± 0.18	0.44
Δ^9-THCA	40.31 ± 0.18	0.44
CBCA	40.38 ± 0.23	0.57

Tabella 34: Valori di *tailing factor* e numero di piatti teorici (N) ottenuti nelle sei reiniezioni del mix dei 7 cannabinoidi neutri

Analita	Parametro	I	II	III	IV	V	VI
CBDV	Tailing factor	1.02	0.97	0.86	0.81	0.83	0.92
	N	15593	15701	15810	15865	15455	15919
CBG	Tailing factor	0.99	0.87	1.12	1.12	0.95	1.00
	N	24622	24270	24548	25075	24659	24715
CBD	Tailing factor	1.05	0.91	1.04	1.04	0.87	0.95
	N	27385	26910	27205	27264	27323	27383
CBN	Tailing factor	0.91	0.85	0.85	0.93	0.95	0.95
	N	41197	39314	40815	40876	39967	40026
Δ^9-THC	Tailing factor	1.08	1.01	1.01	0.89	1.03	0.98
	N	49108	48479	49841	49141	49262	48517
Δ^8-THC	Tailing factor	0.89	0.88	0.88	0.80	0.93	0.90
	N	47117	46254	47801	47915	46980	47036
CBC	Tailing factor	0.88	0.91	1.01	0.88	1.04	0.95
	N	59369	57996	58594	60352	58894	58954

Tabella 35: Riproducibilità delle concentrazioni ricalcolate nelle sei reiniezioni del mix dei 7 cannabinoidi neutri

Analita	Conc. media ± DS (μg/mL)	CV (%)
CBDV	39.51 ± 0.06	0.16
CBG	38.69 ± 0.21	0.54
CBD	39.83 ± 0.26	0.66
CBN	39.49 ± 0.09	0.23
Δ^9-THC	44.73 ± 0.28	0.63
Δ^8-THC	31.44 ± 0.34	1.08
CBC	40.12 ± 0.07	0.17

7.6 Limite di rivelabilità (LOD)

Il limite di rivelabilità (*Limit of Detection*, LOD) rappresenta la più bassa concentrazione di analita che può essere rilevata mediante un metodo analitico, pur non essendo necessariamente determinabile quantitativamente con accuratezza e precisione adeguate. Il LOD corrisponde quindi alla minima concentrazione in grado di produrre un segnale distinguibile dal rumore di fondo.
Il limite di rivelabilità può essere espresso mediante la relazione:

$$LOD = \frac{3.3\,\sigma}{S}$$

dove σ rappresenta la deviazione standard della risposta e S la pendenza della curva di calibrazione.
In questo caso il LOD è stato determinato sperimentalmente mediante il rapporto segnale/rumore (*Signal-to-Noise*, S/N), considerando come criterio un valore di S/N pari a circa 3.
A tale scopo, è stata utilizzata una soluzione standard di lavoro (SSL) alla concentrazione di 5 μg/mL, corrispondente al livello più basso della curva di calibrazione, successivamente diluita con metanolo fino al raggiungimento di concentrazioni compatibili con il criterio S/N adottato. Le soluzioni sono state analizzate in triplicato e, per ciascun analita, sono stati valutati i valori di S/N ottenuti.
Sulla base dei risultati sperimentali, il LOD è stato determinato pari a 2.5 μg/mL per tutti i cannabinoidi, ad eccezione del CBE per cui è stato determinato pari a 5 μg/mL. I valori ottenuti indicano una sensibilità del metodo idonea alla rilevazione dei cannabinoidi a basse concentrazioni, aspetto particolarmente rilevante per la ricerca dei cannabinoidi minori nei campioni reali.

7.7 Limite di quantificazione (LOQ)

Il limite di quantificazione (*Limit of Quantification*, LOQ) rappresenta la più bassa concentrazione di analita che può essere determinata quantitativamente mediante il metodo con un livello adeguato di accuratezza e precisione.
Il LOQ può essere espresso mediante la relazione:

$$LOQ = \frac{10\,\sigma}{S}$$

dove σ rappresenta la deviazione standard della risposta e S la pendenza della curva di calibrazione.
Anche il LOQ è stato determinato sperimentalmente mediante il rapporto segnale/rumore (*Signal-to-Noise*, S/N), considerando come criterio un valore di S/N pari a circa 10. Analogamente a quanto descritto per il LOD, il rapporto S/N è stato valutato confrontando il segnale ottenuto da soluzioni contenenti basse concentrazioni note dell'analita con il rumore di fondo.
Le analisi sono state eseguite in triplicato e, per ciascun analita, sono stati valutati i valori di S/N ottenuti.
Sulla base dei risultati sperimentali, il LOQ è stato determinato pari a 5 μg/mL per tutti i cannabinoidi, ad eccezione del CBE per cui è stato determinato pari a 10 μg/mL.
Tale concentrazione coincide con il livello più basso della curva di calibrazione e rappresenta pertanto il limite inferiore dell'intervallo quantitativo adottato per il metodo.

7.8 Robustezza

La robustezza rappresenta la capacità di un metodo analitico di mantenere prestazioni adeguate in presenza di piccole variazioni intenzionali delle condizioni operative. La sua valutazione consente quindi di verificare l'affidabilità del metodo rispetto a variazioni che possono verificarsi durante la normale attività analitica.
La robustezza è stata valutata introducendo variazioni controllate della lunghezza d'onda, del flusso della fase mobile, della temperatura della colonna e del volume di iniezione. Le prove sono state eseguite analizzando la stessa soluzione standard di lavoro (SSL), preparata alla concentrazione di 40 μg/mL.
Le condizioni sperimentali valutate sono state le seguenti:

- **Analisi A**: condizioni cromatografiche del metodo senza alcuna modifica, utilizzate come riferimento (λ = 228 nm, flusso = 1.50 mL/min, temperatura = 30 °C, volume di iniezione = 5 μL);
- **Analisi B**: lunghezza d'onda diminuita a 226 nm
- **Analisi C**: lunghezza d'onda aumentata a 230 nm
- **Analisi D**: flusso della fase mobile diminuito a 1.45 mL/min
- **Analisi E**: flusso della fase mobile aumentato a 1.55 mL/min
- **Analisi F**: temperatura del forno diminuita a 28 °C
- **Analisi G**: temperatura del forno aumentata a 32 °C
- **Analisi H**: volume di iniezione diminuito a 4 μL
- **Analisi I**: volume di iniezione aumentato a 6 μL

I risultati ottenuti nelle diverse condizioni sono stati confrontati con quelli dell'Analisi A, utilizzata come riferimento, al fine di valutare l'influenza delle variazioni introdotte sulle prestazioni del metodo.

- **Analisi B**: la diminuzione della lunghezza d'onda a 226 nm ha determinato, nel complesso, un moderato aumento della risposta strumentale. Le variazioni delle aree rispetto all'analisi di riferimento sono risultate generalmente contenute, con un incremento medio di circa il 5%.
- **Analisi C**: aumentando la lunghezza d'onda a 230 nm è stata osservata una maggiore variabilità della risposta tra i diversi cannabinoidi. Per la maggior parte degli analiti si è verificata una diminuzione dell'area, sebbene alcuni composti abbiano mostrato un comportamento differente. La lunghezza d'onda rappresenta pertanto un parametro da mantenere accuratamente controllato.
- **Analisi D**: la diminuzione del flusso a 1.45 mL/min non ha determinato variazioni rilevanti delle aree dei picchi, risultate comprese entro circa $\pm$2% rispetto alle condizioni di riferimento. Come atteso, è stato osservato un lieve aumento dei tempi di ritenzione.
- **Analisi E**: l'aumento del flusso a 1.55 mL/min ha prodotto variazioni delle aree analogamente contenute, accompagnate da una lieve diminuzione dei tempi di ritenzione. La variazione del flusso entro l'intervallo considerato non ha quindi modificato in maniera significativa la risposta cromatografica.
- **Analisi F**: la diminuzione della temperatura del forno a 28 °C ha determinato variazioni limitate delle aree, generalmente inferiori al 5% rispetto all'analisi di riferimento.
- **Analisi G**: anche l'aumento della temperatura del forno a 32 °C ha prodotto variazioni contenute delle aree dei picchi, inferiori al 5% per tutti gli analiti considerati, indicando una ridotta influenza di piccole variazioni della temperatura sulla risposta del metodo.
- **Analisi H**: la diminuzione del volume di iniezione da 5 a 4 μL ha comportato, come atteso, una diminuzione delle aree dei picchi, mediamente pari a circa il 19%, coerente con la minore quantità di analita introdotta nel sistema.

- **Analisi I**: l'aumento del volume di iniezione da 5 a 6 μL ha determinato un corrispondente aumento delle aree, mediamente pari a circa il 19%. Tale comportamento risulta coerente con l'aumento della quantità di analita iniettata.

Nel complesso, il metodo ha mostrato una buona robustezza nei confronti delle piccole variazioni introdotte nel flusso della fase mobile e nella temperatura della colonna. Le variazioni della lunghezza d'onda hanno influenzato in misura maggiore la risposta di alcuni analiti, evidenziando l'importanza di mantenere controllato tale parametro. Le modifiche del volume di iniezione hanno invece prodotto variazioni delle aree proporzionali alla quantità di soluzione iniettata, come prevedibile sulla base del principio della rivelazione quantitativa.

7.9 Carry-over dell'autocampionatore

Il *carry-over* dell'autocampionatore rappresenta la possibile contaminazione di un'analisi da parte del campione precedentemente iniettato, dovuta alla permanenza di residui dell'analita nel sistema di iniezione. Come criterio di accettazione è stato considerato che il segnale eventualmente presente nel bianco non dovesse superare il 20% del segnale corrispondente al LOQ dell'analita.
La valutazione è stata effettuata mediante tre iniezioni consecutive di una soluzione standard alla concentrazione di 100 μg/mL, seguite dall'analisi di tre bianchi costituiti da metanolo. Nei cromatogrammi dei bianchi è stata verificata l'eventuale presenza di segnali in corrispondenza dei tempi di ritenzione dei cannabinoidi.
Nessuno dei bianchi analizzati ha mostrato segnali significativi in corrispondenza dei tempi di ritenzione degli analiti. Nelle condizioni sperimentali adottate non sono stati pertanto evidenziati fenomeni apprezzabili di *carry-over* dell'autocampionatore.

7.10 Verifica delle diluizioni

La verifica delle operazioni di diluizione è stata effettuata utilizzando i dati ottenuti nell'ambito della prova di accuratezza.
A tale scopo sono state considerate le soluzioni standard di lavoro preparate ai livelli di 10, 40 e 80 μg/mL. Per ciascun livello, la concentrazione determinata sperimentalmente mediante la relativa retta di calibrazione è stata confrontata con la concentrazione teorica prevista.
I risultati, riportati nelle Tabelle 21–23, hanno mostrato per la maggior parte dei cannabinoidi valori di recupero prossimi al 100%, indicando che le operazioni di diluizione adottate non introducono, nel complesso, errori rilevanti nella preparazione delle soluzioni standard. Gli scostamenti osservati per alcuni analiti sono stati discussi nel paragrafo relativo all'accuratezza.

7.11 Stima dell'incertezza di misura

L'incertezza di misura rappresenta un parametro associato al risultato analitico che fornisce un'indicazione della dispersione dei valori che possono essere ragionevolmente attribuiti alla grandezza misurata.
L'incertezza associata alla determinazione quantitativa dei cannabinoidi è stata stimata utilizzando i dati ottenuti nello studio di precisione intermedia. A tale scopo sono state considerate le nove determinazioni effettuate, in tre giornate differenti, ai livelli di concentrazione di 10, 40 e 80 μg/mL.

Per ciascun analita e per ciascun livello di concentrazione, l'incertezza estesa (U) è stata stimata a partire dal coefficiente di variazione percentuale secondo la relazione:

$$U = k \times \frac{CV}{100} \times \bar{C}$$

dove:

- k rappresenta il fattore di copertura, assunto pari a 2, corrispondente approssimativamente a un livello di confidenza del 95%
- CV rappresenta il coefficiente di variazione percentuale
- $\bar{C}$ rappresenta la concentrazione media determinata sperimentalmente, espressa in μg/mL.

L'incertezza relativa estesa può inoltre essere espressa in forma percentuale come:

$$U_{\text{rel}}(\%) = k \times CV(\%)$$

Tale approccio consente di ottenere una stima dell'incertezza associata alla variabilità del metodo in condizioni di precisione intermedia, comprendendo quindi le variazioni osservate tra differenti giornate di analisi. I valori di incertezza estesa sono stati calcolati a partire dai risultati ottenuti nello studio di precisione intermedia. Per ciascun analita e per ciascun livello di concentrazione, il risultato è espresso come concentrazione media $\pm U$, dove U rappresenta l'incertezza estesa calcolata con un fattore di copertura $k = 2$. È inoltre riportata l'incertezza relativa estesa (U_{rel}), espressa in percentuale.

Tabella 36: Stima dell'incertezza di misura per i 10 cannabinoidi

Analita	**10 μg/mL**		**40 μg/mL**		**80 μg/mL**	
	$\bar{C} \pm U$ **(μg/mL)**	U_{rel} **(%)**	$\bar{C} \pm U$ **(μg/mL)**	U_{rel} **(%)**	$\bar{C} \pm U$ **(μg/mL)**	U_{rel} **(%)**
CBND	9.85 ± 0.32	3.24	40.34 ± 0.69	1.72	81.57 ± 0.88	1.08
CBE	10.07 ± 0.43	4.26	40.96 ± 0.78	1.90	80.26 ± 1.11	1.38
ISO-CBD	9.77 ± 0.34	3.50	40.28 ± 0.77	1.92	79.38 ± 1.87	2.36
THD	12.67 ± 0.54	4.30	40.54 ± 0.62	1.54	81.02 ± 2.11	2.60
CBQN	13.40 ± 0.52	3.88	40.79 ± 0.51	1.26	82.49 ± 1.58	1.92
Δ^8-ISO-THC	9.93 ± 0.69	6.90	41.75 ± 0.76	1.82	79.22 ± 3.58	4.52
CBP	10.54 ± 0.39	3.68	40.22 ± 0.51	1.26	80.14 ± 1.70	2.12
CBL	11.80 ± 0.36	3.02	39.56 ± 1.11	2.80	80.74 ± 1.87	2.32
CBT	10.39 ± 0.27	2.60	41.05 ± 0.90	2.20	79.20 ± 1.19	1.50
DCBF	9.84 ± 0.80	8.10	40.93 ± 0.70	1.70	81.38 ± 1.55	1.90

Tabella 37: Stima dell'incertezza di misura per i 7 cannabinoidi acidi

Analita	**10 μg/mL**		**40 μg/mL**		**80 μg/mL**	
	$\bar{C} \pm U$ **(μg/mL)**	U_{rel} **(%)**	$\bar{C} \pm U$ **(μg/mL)**	U_{rel} **(%)**	$\bar{C} \pm U$ **(μg/mL)**	U_{rel} **(%)**
CBDVA	10.15 ± 0.36	3.50	40.98 ± 0.57	1.40	80.42 ± 0.98	1.22
CBDA	10.10 ± 0.33	3.30	40.76 ± 0.44	1.08	79.41 ± 0.62	0.78
CBGA	10.12 ± 0.28	2.76	40.92 ± 0.26	0.64	80.21 ± 1.14	1.42
THCVA	10.16 ± 0.38	3.70	40.68 ± 0.56	1.38	78.97 ± 0.98	1.24
CBNA	11.04 ± 0.34	3.12	41.67 ± 1.05	2.52	82.57 ± 1.12	1.36
Δ^9-THCA	10.51 ± 0.33	3.12	40.60 ± 0.63	1.54	80.71 ± 1.11	1.38
CBCA	10.60 ± 0.24	2.22	40.49 ± 0.72	1.78	80.91 ± 0.92	1.14

Tabella 38: Stima dell'incertezza di misura per i 7 cannabinoidi neutri

Analita	**10 μg/mL**		**40 μg/mL**		**80 μg/mL**	
	$\bar{C} \pm U$ **(μg/mL)**	U_{rel} **(%)**	$\bar{C} \pm U$ **(μg/mL)**	U_{rel} **(%)**	$\bar{C} \pm U$ **(μg/mL)**	U_{rel} **(%)**
CBDV	8.74 ± 0.44	5.04	39.21 ± 0.46	1.18	79.08 ± 0.52	0.66
CBG	9.27 ± 0.32	3.40	39.02 ± 0.93	2.38	80.78 ± 0.94	1.16
CBD	8.95 ± 0.49	5.52	39.59 ± 0.85	2.14	82.52 ± 1.90	2.30
CBN	9.39 ± 0.36	3.86	39.78 ± 0.38	0.96	80.03 ± 0.62	0.78
Δ^9-THC	10.58 ± 0.71	6.72	44.81 ± 1.43	3.20	82.30 ± 1.76	2.14
Δ^8-THC	9.71 ± 1.00	10.30	41.05 ± 2.05	5.00	78.10 ± 1.46	1.88
CBC	9.05 ± 0.46	5.12	39.54 ± 0.66	1.68	80.01 ± 1.01	1.26

Le incertezze relative estese sono risultate contenute, soprattutto ai livelli di 40 e 80 μg/mL. Una maggiore incertezza è stata osservata al livello di 10 μg/mL, coerentemente con la maggiore variabilità riscontrata nella prova di precisione intermedia. Il valore più elevato è stato ottenuto per il Δ^8-THC a 10 μg/mL ($U_{\text{rel}} = 10.30\%$), seguito dal DCBF ($U_{\text{rel}} = 8.10\%$). Per la maggior parte degli altri analiti, l'incertezza relativa diminuisce all'aumentare della concentrazione, evidenziando una maggiore affidabilità della misura ai livelli intermedi e superiori dell'intervallo considerato.

8 Analisi dei campioni reali

Dopo lo sviluppo e la convalida del metodo HPLC-UV, la procedura analitica è stata applicata a differenti campioni reali contenenti cannabinoidi, selezionati in modo da comprendere matrici di diversa natura e caratterizzate da concentrazioni molto differenti degli analiti di interesse.
Sono stati analizzati circa 50 campioni tra preparazioni di Cannabis proveniente da sequestri (infiorescenze e hashish) o Cannabis light, prodotti alimentari a base di Cannabis, liquido per sigaretta elettronica e oleoliti e resine di Cannabis medicinale.
Di seguito sono riportati i risultati dei campioni più significativi.
L'applicazione del metodo a matrici differenti ha consentito di valutarne l'utilizzo non soltanto per la determinazione dei cannabinoidi maggiormente abbondanti, ma anche per la ricerca dei cannabinoidi minori.

8.1 Campioni di Marijuana e Hashish da sequestro e Cannabis Light

8.1.1 Campione di Marijuana

È stato inoltre analizzato un campione di Marijuana da strada sequestrato costituito da infiorescenze di Cannabis. Il campione è stato incluso con l'obiettivo di applicare il metodo a matrici differenti.
Un'immagine del campione analizzato è riportata in Figura 61.



Figura 61: Campione di Marijuana da strada sequestrata

Per la preparazione del campione sono stati pesati 50 mg di infiorescenza, ai quali sono stati aggiunti 5 mL di metanolo. La miscela è stata sottoposta ad agitazione mediante vortex per tre cicli da 1 minuto, intervallati da 1 minuto di pausa, e successivamente centrifugata a 4000 giri/min per 5 minuti.

Il surnatante ottenuto è stato quindi filtrato mediante filtro da 0.45 μm, trasferito in un vial e sottoposto ad analisi mediante il metodo HPLC-UV sviluppato.
Sulla base dei risultati ottenuti dalla prima analisi, è stata successivamente preparata una diluizione 1:50 dell'estratto, prelevando 20 μL di surnatante e aggiungendo 980 μL di metanolo, al fine di consentire la quantificazione dei cannabinoidi presenti a concentrazioni maggiori. La soluzione diluita è stata quindi trasferita in un vial e sottoposta ad analisi mediante HPLC-UV.
Il cromatogramma dell'analisi HPLC-UV del campione di Marijuana da strada è riportato in Appendice D in Figura 119.
L'analisi ha evidenziato la presenza di numerosi cannabinoidi, comprendenti sia i composti maggiormente rappresentati sia diverse specie presenti in quantità inferiori. I cannabinoidi rilevati sono riportati nella Tabella 39.

Tabella 39: Cannabinoidi determinati mediante HPLC-UV nel campione di Marijuana da strada sequestrata

Cannabinoide	**Concentrazione (% p/p)**
CBDVA	<LOD
CBND	<LOD
CBDV	<LOD
CBE	<LOD
CBDA	0.11
CBGA	<LOD
CBG	0.67
CBD	0.33
THCV	<LOD
THD	<LOD
THCVA	<LOD
CBN	0.20
CBNA	0.28
CBQN	<LOD
Δ^9-THC	5.53
Δ^8-THC	<LOD
CBP	<LOD
CBL	<LOD
CBC	<LOD
Δ^9-THCA	17.73
CBCA	0.13
CBT	<LOD
DCBF	<LOD

<LOD: inferiore al limite di rilevabilità.

Il campione di Marijuana da strada ha mostrato una netta predominanza del Δ^9-THC, in particolare

della forma acida (Δ^9-THCA), accompagnata dalla presenza di alcuni cannabinoidi minori. Tra questi sono stati rilevati CBDA, CBG, CBD, CBN, CBNA e CBCA con concentrazioni generalmente inferiori rispetto a quella del Δ^9-THC/Δ^9-THCA.

8.1.2 Campione di Hashish

È stato inoltre selezionato un campione di hashish sequestrato, risultato di particolare interesse in quanto le analisi hanno evidenziato la presenza del cannabinoide semisintetico THD.
Un'immagine del campione analizzato è riportata in Figura 62.



Figura 62: Campione di hashish sottoposto ad analisi HPLC-UV.

Per la preparazione del campione sono stati pesati 50 mg di hashish, ai quali sono stati aggiunti 5 mL di metanolo. La miscela è stata sottoposta ad agitazione mediante vortex per tre cicli da 1 minuto, intervallati da 1 minuto di pausa, e successivamente centrifugata a 4000 giri/min per 5 minuti. Il surnatante ottenuto è stato quindi filtrato mediante filtro da 0.45 μm, trasferito in un vial e sottoposto ad analisi mediante il metodo HPLC-UV sviluppato.
Sulla base dei risultati ottenuti dalla prima analisi, è stata successivamente preparata una diluizione 1:50 dell'estratto, prelevando 20 μL di surnatante e aggiungendo 980 μL di metanolo, al fine di consentire la quantificazione dei cannabinoidi presenti a concentrazioni maggiori. La soluzione diluita è stata quindi trasferita in un vial e sottoposta ad analisi mediante HPLC-UV.
Il cromatogramma dell'analisi HPLC-UV del campione di Hashish è riportato in Appendice D in Figura 120.

L'analisi ha evidenziato la presenza di numerosi cannabinoidi, comprendenti sia i composti maggiormente rappresentati sia diverse specie presenti in quantità inferiori. I cannabinoidi rilevati sono riportati nella Tabella 40.

Tabella 40: Cannabinoidi determinati mediante HPLC-UV nel campione di Hashish

Cannabinoide	Concentrazione (% p/p)
CBDVA	0.08
CBND	<LOD
CBDV	0.11
CBE	0.75
CBDA	4.85
CBGA	0.13
CBG	0.16
CBD	62.51 *
THCV	<LOD
THD	18.89
THCVA	<LOD
CBN	0.08
CBNA	<LOD
CBQN	<LOD
Δ^9-THC	0.13
Δ^8-THC	<LOD
CBP	<LOD
CBL	<LOD
CBC	<LOD
Δ^9-THCA	<LOQ
CBCA	<LOD
CBT	0.11
DCBF	<LOD

<LOD: inferiore al limite di rilevabilità; <LOQ: inferiore al limite di quantificazione; *Valore stimato mediante estrapolazione dalla retta di calibrazione.

Il campione di Hashish ha mostrato una netta predominanza del CBD, accompagnata dalla presenza di diversi cannabinoidi minori, tra cui CBDVA, CBDV, CBE, CBGA, CBG, CBN e CBT. Di particolare interesse è risultata inoltre l'identificazione del THD, cannabinoide semisintetico la cui presenza evidenzia l'importanza di disporre di metodi analitici in grado di riconoscere non solo i cannabinoidi naturalmente presenti nella Cannabis, ma anche composti ottenuti mediante modificazioni chimiche o trasformazioni di cannabinoidi naturali. L'identificazione di tali sostanze assume particolare rilevanza nella caratterizzazione di campioni di origine non controllata, nei quali la composizione può risultare più complessa e variabile.

8.1.3 Resina di Cannabis Light

Tra i campioni reali è stata inclusa anche una resina di Cannabis Light. Tale matrice è stata selezionata per valutare l'applicabilità del metodo a un prodotto caratterizzato da una diversa distribuzione dei

principali cannabinoidi rispetto alle altre preparazioni.
Un'immagine del campione analizzato è riportata in Figura 63.

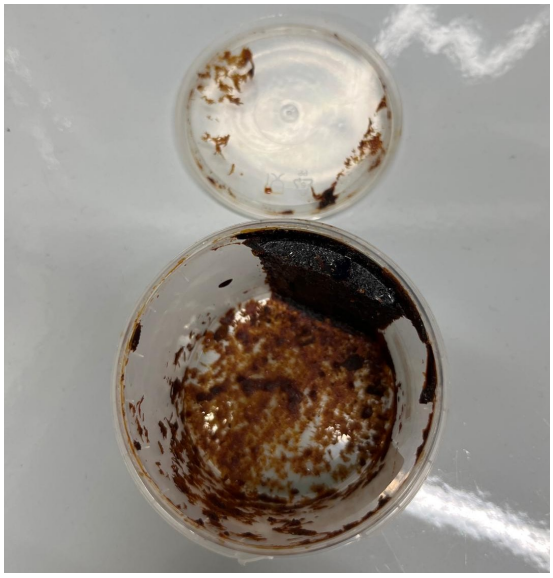


Figura 63: Campione di resina di Cannabis Light

Per la preparazione del campione sono stati pesati 50 mg di resina e addizionati a 5 mL di metanolo, ottenendo un estratto alla concentrazione di 10 mg/mL. L'estratto è stato sottoposto ad agitazione mediante vortex per tre cicli da 1 minuto, intervallati da 1 minuto di pausa, e successivamente centrifugato. Dal surnatante è stato quindi prelevato 1 mL, trasferito in un vial e direttamente sottoposto ad analisi mediante HPLC-UV.
Sulla base dei risultati ottenuti dalla prima analisi, è stata successivamente preparata una diluizione 1:5 dell'estratto, prelevando 200 μL di surnatante e aggiungendo 800 μL di metanolo, al fine di consentire la quantificazione dei cannabinoidi presenti a concentrazioni maggiori. Nel caso del CBD, tuttavia, anche a seguito della diluizione 1:5 la risposta è risultata al di fuori dell'intervallo della retta di calibrazione; la relativa concentrazione è stata pertanto stimata mediante estrapolazione della curva di calibrazione.
Il cromatogramma dell'analisi HPLC-UV del campione di resina di Cannabis Light è riportato in Appendice D in Figura 121.
L'analisi ha evidenziato la presenza di numerosi cannabinoidi, comprendenti sia i composti maggiormente rappresentati sia diverse specie presenti in quantità inferiori. I cannabinoidi rilevati sono riportati nella Tabella 41.

Tabella 41: Cannabinoidi determinati mediante HPLC-UV nella resina di Cannabis light

Cannabinoide	Concentrazione (% p/p)
CBDVA	0.18
CBND	0.36
CBDV	0.57
CBE	3.73
CBDA	<LOD
CBGA	<LOD
CBG	0.92
CBD	70.63 *
THCV	<LOD
THD	<LOD
THCVA	<LOD
CBN	2.37
CBNA	0.61
CBQN	<LOD
Δ^9-THC	1.14
Δ^8-THC	<LOD
CBP	<LOD
CBL	0.40
CBC	0.81
Δ^9-THCA	<LOD
CBCA	<LOD
CBT	3.37
DCBF	<LOD

<LOD: inferiore al limite di rilevabilità; *Valore stimato mediante estrapolazione dalla retta di calibrazione.

La resina di Cannabis Light ha mostrato una netta predominanza del CBD, accompagnata dalla presenza di numerosi cannabinoidi minori. Tra questi sono stati rilevati CBDVA, CBND, CBDV, CBE, CBG, CBN, CBNA, CBL, CBC e CBT, con concentrazioni generalmente inferiori rispetto a quella del CBD.

8.2 Prodotti alimentari

Sono stati analizzati tre prodotti alimentari contenenti derivati della Cannabis, nello specifico due campioni di caramelle e un campione di biscotto. L'analisi è stata condotta mediante il metodo HPLC-UV sviluppato, con l'obiettivo di valutare la presenza dei principali cannabinoidi e di ricercare eventuali cannabinoidi minori nelle matrici alimentari.

8.2.1 Caramella rossa

Il campione era costituito da una bustina di plastica di marca "Puffy" contenente quattro caramelle gommose di colore rosso. Ciascuna caramella presentava una massa media di circa 9.3 g, con valori compresi tra 9.1 g e 9.5 g. Secondo quanto riportato sulla confezione, il contenuto originario era costituito da dieci caramelle.
Un'immagine del campione analizzato è riportata in Figura 64.



Figura 64: Campione di caramelle gommose rosse "Puffy"

Per la preparazione del campione sono stati pesati 125 mg di caramella, successivamente sciolti mediante riscaldamento su piastra riscaldante. Al campione sono stati quindi aggiunti 2 mL di metanolo e la miscela è stata sottoposta ad agitazione mediante vortex, centrifugazione a 4000 giri/min per 5 minuti e successiva filtrazione a 0.45 μm.
A partire dall'estratto così ottenuto è stata preparata una diluizione 1:2, prelevando 50 μL di estratto e aggiungendo 50 μL di metanolo. La soluzione diluita è stata quindi trasferita in un vial e sottoposta ad analisi mediante HPLC-UV.
Il cromatogramma dell'analisi HPLC-UV del campione di caramella rossa è riportato in Appendice D in Figura 122.
I cannabinoidi rilevati sono riportati nella Tabella 42.

Tabella 42: Cannabinoidi rilevati mediante HPLC-UV nella caramella rossa

Cannabinoide	Concentrazione (mg/g)
CBD	2.5
CBN	<LOQ
Δ^9-THC	1.0
Δ^9-THCA	<LOQ

<LOQ: inferiore al limite di quantificazione.

Nella caramella rossa sono stati rilevati prevalentemente CBD e Δ^9-THC, presenti rispettivamente in quantità pari a circa 2.5 mg/g e 1.0 mg/g. Sono stati inoltre rilevati CBN e Δ^9-THCA, presenti in

concentrazioni inferiori al limite di quantificazione. Gli altri cannabinoidi inclusi nel metodo non sono stati rilevati.

8.2.2 Caramella gialla

Il campione era costituito da due caramelle gommose di colore giallo, con masse rispettivamente pari a 3.9261 g e 4.3361 g.
Un'immagine del campione analizzato è riportata in Figura 65.



Figura 65: Campione di caramelle gommose gialle

Per la preparazione del campione sono stati pesati 125 mg di caramella, successivamente sciolti mediante riscaldamento su piastra riscaldante. Al campione è stato quindi aggiunto 1 mL di metanolo e la miscela è stata sottoposta ad agitazione mediante vortex, centrifugazione a 4000 giri/min per 5 minuti e successiva filtrazione a 0.45 μm.
A partire dall'estratto così ottenuto è stata preparata una diluizione 1:2, prelevando 50 μL di estratto e aggiungendo 50 μL di metanolo. La soluzione diluita è stata quindi trasferita in un vial e sottoposta ad analisi mediante HPLC-UV.
Il cromatogramma dell'analisi HPLC-UV del campione di caramella gialla è riportato in Appendice D in Figura 123.
I cannabinoidi rilevati sono riportati nella Tabella 43.

Tabella 43: Cannabinoidi rilevati mediante HPLC-UV nella caramella gialla

Cannabinoide	Concentrazione (mg/g)
CBD	0.1
CBN	<LOQ
Δ^9-THC	2.2
Δ^9-THCA	0.2

<LOQ: inferiore al limite di quantificazione.

Nella caramella gialla sono stati rilevati prevalentemente CBD, Δ^9-THC e Δ^9-THCA presenti rispettivamente in quantità pari a circa 0.1 mg/g, 2.2 mg/g e 0.2 mg/g. È stato inoltre rilevato il CBN, presente

in concentrazione inferiore al limite di quantificazione. Gli altri cannabinoidi inclusi nel metodo non sono stati rilevati.

8.2.3 Biscotto "Real THC Cookies"

Il campione era costituito da un biscotto di marca "Real THC Cookies – Hybrid/Taste High Cookies", distribuito da Weed Shop Company, contenuto in una confezione di cartone e avente una massa pari a 18.36 g. Secondo quanto riportato sulla confezione, il contenuto originario era costituito da cinque biscotti, per una massa totale dichiarata di 100 g.
Un'immagine del campione analizzato è riportata in Figura 66.



Figura 66: Campione di biscotto "Real THC Cookies – Hybrid/Taste High Cookies"

Per la preparazione del campione sono stati pesati 53.7 mg di biscotto, ai quali è stato aggiunto 1 mL di metanolo. La miscela è stata sottoposta ad agitazione mediante vortex per tre cicli da 1 minuto, intervallati da 1 minuto di pausa, e successivamente centrifugata a 4000 giri/min per 5 minuti. Il surnatante ottenuto è stato quindi trasferito in un vial e sottoposto ad analisi mediante il metodo HPLC-UV.
Il cromatogramma dell'analisi HPLC-UV del campione di biscotto "Real THC Cookies – Hybrid/Taste High Cookies" è riportato in Appendice D in Figura 124.
I cannabinoidi rilevati sono riportati nella Tabella 44.

Tabella 44: Cannabinoidi rilevati mediante HPLC-UV nel biscotto "Real THC Cookies – Hybrid/Taste High Cookies"

Cannabinoide	Concentrazione (mg/g)
Δ^9-THC	0.3
Δ^8-THC	0.3

L'analisi HPLC-UV ha evidenziato la presenza di Δ^9-THC e Δ^8-THC, determinati entrambi a concentrazioni pari a 0.3 mg/g. Gli altri cannabinoidi ricercati non sono stati rilevati.

8.3 Liquido per sigaretta elettronica

È stato infine analizzato un liquido destinato a sigaretta elettronica, contenente una componente resinosa a base di cannabinoidi. Tale campione è stato selezionato come esempio di matrice liquida destinata all'inalazione e caratterizzata da una formulazione differente rispetto alle altre tipologie di campione

considerate. Il campione era costituito da una sigaretta elettronica non ricaricabile, dotata di un serbatoio contenente 0.67 g di una resina traslucida di colore ambrato, caratterizzata da un intenso odore di Cannabis.
Un'immagine del campione analizzato è riportata in Figura 67.

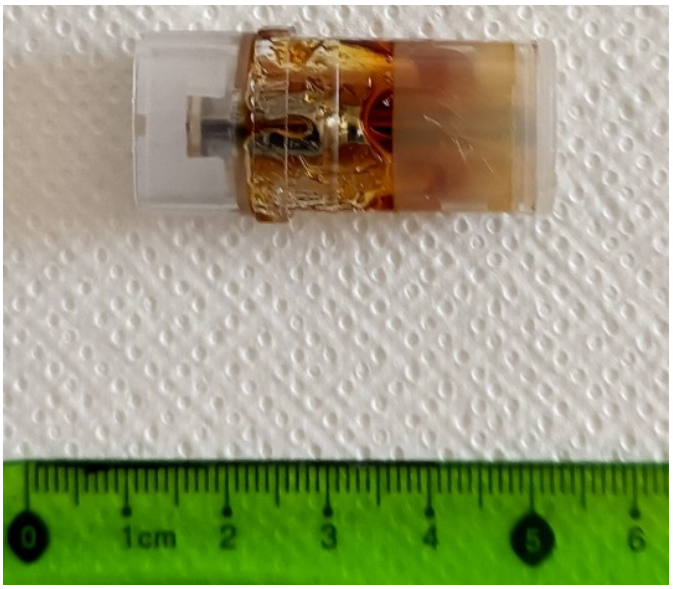


Figura 67: Sigaretta elettronica contenente una resina traslucida ambrata

Per l'analisi sono stati prelevati 100 μL del contenuto del serbatoio e diluiti con 900 μL di metanolo, ottenendo una diluizione 1:10 del campione. La soluzione così preparata è stata successivamente analizzata mediante il metodo HPLC-UV.
Sulla base dei risultati ottenuti dalla prima analisi, è stata successivamente preparata una diluizione 1:20 dell'estratto, prelevando 50 μL della soluzione 1:10 e aggiungendo 950 μL di metanolo, ottenendo così una diluizione complessiva pari a 1:200 rispetto alla soluzione iniziale.
Il cromatogramma dell'analisi HPLC-UV del campione di liquido per sigaretta elettronica è riportato in Appendice D in Figura 125.
I cannabinoidi rilevati sono riportati nella Tabella 45.

Tabella 45: Cannabinoidi rilevati mediante HPLC-UV nel contenuto della sigaretta elettronica.

Cannabinoide	Concentrazione (mg/mL)
CBDVA	0.10
CBE	2.38
CBDA	<LOQ
CBGA	<LOQ
CBG	1.43
CBD	13.72
CBN	0.37
CBNA	0.08
CBC	0.32
CBT	0.46

<LOQ: inferiore al limite di quantificazione.

Il CBD è risultato il cannabinoide nettamente predominante nel campione, seguito da CBE e CBG. Sono stati inoltre quantificati, a concentrazioni inferiori, CBT, CBN, CBC, CBDVA e CBNA. Segnali attribuibili a CBDA e CBGA sono stati osservati a livelli inferiori al limite di quantificazione.
Nel complesso, il contenuto della sigaretta elettronica ha mostrato una presenza relativamente articolata di cannabinoidi, comprendente diversi composti minori oltre al CBD predominante.

8.4 Conferma qualitativa mediante GC-MS

A completamento delle analisi effettuate mediante HPLC-UV, i campioni reali sono stati sottoposti anche ad analisi GC-MS con finalità qualitativa.
La caratterizzazione preliminare delle sostanze di riferimento aveva consentito di associare ai diversi cannabinoidi il relativo tempo di ritenzione e le principali caratteristiche dello spettro di massa; tali informazioni sono state successivamente utilizzate come riferimento per l'interpretazione dei cromatogrammi ottenuti dai campioni reali.
L'analisi GC-MS ha quindi fornito un'ulteriore conferma qualitativa dell'identità dei cannabinoidi rilevati mediante HPLC-UV, basata sul confronto del comportamento cromatografico e degli spettri di massa con quelli ottenuti dagli standard di riferimento. Le analisi non sono state utilizzate a fini quantitativi.
I cromatogrammi GC-MS relativi ai campioni reali analizzati sono riportati in Appendice E.

8.5 Preparazioni di Cannabis medicinale

Tra i campioni analizzati sono state considerate cinque varietà di Cannabis medicinale: Bedrocan, Bediol, Bedrolite, Bedica e FM2.
Le cannabis da cui sono state preparate le resine e gli oleoliti sono cannabis decarbossilate. Le varietà considerate presentano caratteristiche differenti per quanto riguarda il contenuto relativo dei principali cannabinoidi e comprendono preparazioni prevalentemente THC-dominanti, CBD-dominanti e preparazioni caratterizzate dalla presenza significativa di entrambi i composti.

Bedrocan

Bedrocan è una varietà di Cannabis medicinale caratterizzata da un elevato contenuto di THC e da una quantità molto ridotta di CBD. È pertanto considerata una preparazione prevalentemente THC-dominante.

Bediol

Bediol presenta quantità significative sia di THC sia di CBD ed è quindi caratterizzata da una distribuzione più equilibrata dei due principali cannabinoidi rispetto alle varietà THC-dominanti.

Bedrolite

Bedrolite è una varietà prevalentemente CBD-dominante, caratterizzata da un contenuto molto basso di THC e da una maggiore presenza di CBD.

Bedica

Bedica è una preparazione prevalentemente THC-dominante, caratterizzata da un contenuto elevato di THC e da quantità ridotte di CBD.

FM2

FM2 è una preparazione di Cannabis medicinale prodotta presso lo Stabilimento Chimico Farmaceutico Militare di Firenze. È caratterizzata dalla presenza significativa sia di THC sia di CBD e presenta pertanto una distribuzione dei due principali cannabinoidi differente rispetto alle preparazioni fortemente THC- o CBD-dominanti.

Per ciascuna delle cinque varietà sono stati analizzati due differenti tipi di preparazione: una resina e un oleolita, per un totale di dieci campioni di Cannabis medicinale.

8.5.1 Resine

Sono state analizzate cinque resine ottenute dalle varietà di Cannabis medicinale Bedrocan, Bediol, Bedrolite, Bedica e FM2, precedentemente descritte. La scelta di considerare preparazioni derivanti da varietà caratterizzate da differenti rapporti tra THC e CBD ha consentito di applicare il metodo a campioni con distribuzioni dei cannabinoidi tra loro molto diverse.

Per la preparazione dei campioni sono stati pesati 50 mg di ciascuna resina e addizionati a 5 mL di metanolo, ottenendo un estratto corrispondente a 10 mg/mL di campione. Gli estratti sono stati successivamente diluiti, quando necessario, con metanolo prima dell'analisi HPLC-UV.

Poiché i cannabinoidi maggioritari e quelli presenti in quantità minori possono differire notevolmente in termini di concentrazione all'interno dello stesso campione, l'impiego di un'unica diluizione non risultava sempre adeguato alla determinazione di tutti gli analiti. Le diluizioni sono state pertanto selezionate in funzione dell'intensità dei segnali cromatografici, con l'obiettivo di ricondurre, ove possibile, le concentrazioni degli analiti all'interno dell'intervallo di calibrazione del metodo, compreso tra 5 e 100 μg/mL. Gli estratti meno diluiti sono risultati particolarmente utili per la ricerca dei cannabinoidi presenti in quantità ridotte, mentre diluizioni maggiori sono state necessarie per la quantificazione dei cannabinoidi predominanti.

I cromatogrammi delle analisi effettuate in HPLC-UV sono riportati in Appendice D.

I risultati ottenuti mediante HPLC-UV per le cinque resine sono riportati nella Tabella 46. Oltre ai cannabinoidi maggiormente rappresentati nelle differenti varietà, l'analisi è stata rivolta alla ricerca dei cannabinoidi minori compresi nel metodo, al fine di valutare la capacità della procedura sviluppata di fornire una caratterizzazione più estesa dei campioni rispetto alla sola determinazione di THC e CBD.

Tabella 46: Cannabinoidi determinati mediante HPLC-UV nelle cinque resine di Cannabis medicinale. I risultati quantitativi sono espressi come percentuale in peso (% p/p) rispetto al peso della resina

Cannabinoide	Bedrocan	Bediol	Bedrolite	Bedica	FM2
CBDVA	<LOD	<LOD	0.21	<LOD	<LOD
CBND	<LOQ	0.19	0.19	<LOD	0.27
CBDV	<LOQ	0.15	0.47	<LOQ	0.17
CBE	<LOD	0.75	0.28	<LOD	1.09
CBDA	0.08	1.29	9.42	0.21	0.58
CBGA	1.34	0.15	<LOQ	1.56	0.14
CBG	2.42	0.54	0.10	2.40	1.13
CBD	0.27	67.02	30.37	0.72	64.97
THCV	q.	q.	q.	q.	q.
THD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
THCVA	0.10	<LOQ	0.14	0.07	<LOQ
CBN	0.64	0.65	<LOQ	0.33	0.78
CBNA	0.08	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD
CBQN	n.q.	0.10	0.10	0.10	0.10
Δ^9-THC	57.90	20.64	n.q.	48.74	17.02
Δ^8-THC	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
CBP	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
CBL	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
CBC	0.55	1.44	1.10	0.68	1.26
Δ^9-THCA	2.13	<LOQ	0.09	3.41	<LOD
CBCA	0.21	0.11	0.64	0.33	<LOD
CBT	0.20	0.30	0.21	0.24	0.29
DCBF	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD

<LOD: inferiore al limite di rilevabilità; <LOQ: inferiore al limite di quantificazione; q.: rilevato qualitativamente ma non quantificato.

I risultati evidenziano differenze marcate tra le cinque resine, coerenti con le caratteristiche delle varietà di Cannabis medicinale di origine.

Nelle resine Bedrocan e Bedica il Δ^9-THC rappresenta il cannabinoide nettamente predominante, con concentrazioni rispettivamente pari al 57.90% e al 48.74% p/p. Quantità rilevanti di Δ^9-THC sono state determinate anche in Bediol (20.64% p/p) e FM2 (17.02% p/p). Nel campione Bedrolite il composto è stato rilevato, ma non è stato quantificato poiché non è stata ottenuta una risposta compresa nell'intervallo di calibrazione validato.

Una distribuzione differente è stata osservata per il CBD. Le concentrazioni più elevate sono state determinate nelle resine Bediol e FM2, rispettivamente pari al 67.02% e al 64.97% p/p. In Bedrolite il composto è stato quantificato al 30.37% p/p, mentre quantità molto inferiori sono state osservate in Bedrocan (0.27% p/p) e Bedica (0.72% p/p).

Anche le forme acide dei principali cannabinoidi hanno mostrato una distribuzione eterogenea. Il CBDA è risultato particolarmente rappresentato nella resina Bedrolite, con una concentrazione pari al 9.42% p/p, mentre valori inferiori sono stati determinati in Bediol (1.29%), FM2 (0.58%), Bedica (0.21%) e Bedrocan (0.08%).

Il Δ^9-THCA ha invece raggiunto le concentrazioni più elevate nelle resine Bedica e Bedrocan, rispettivamente pari al 3.41% e al 2.13% p/p. In Bedrolite è stato quantificato allo 0.09% p/p, mentre in Bediol è stato rilevato a un livello inferiore al LOQ e in FM2 non è stato rilevato.
Il CBGA è stato quantificato principalmente in Bedrocan e Bedica (rispettivamente 1.34% p/p e 1.56% p/p), mentre concentrazioni inferiori sono state osservate in Bediol (0.15%) e FM2 (0.14%). La contemporanea presenza delle forme acide e neutre evidenzia come le resine contengano, in misura variabile, sia cannabinoidi decarbossilati sia i rispettivi precursori carbossilati.
L'estensione dell'analisi ai cannabinoidi minori ha evidenziato ulteriori differenze tra le cinque resine. Il CBND è stato quantificato in Bediol, Bedrolite e FM2, con concentrazioni comprese tra lo 0.19% e lo 0.27% p/p, mentre in Bedrocan è stato rilevato a un livello inferiore al LOQ e in Bedica non è stato rilevato.
Il CBE è stato quantificato nelle resine Bediol, Bedrolite e FM2, rispettivamente allo 0.75%, 0.28% e 1.09 % p/p.
Il CBQN è risultato quantificabile nelle resine Bediol, Bedrolite, Bedica e FM2, con concentrazioni molto simili, pari a circa lo 0.10% p/p. Nel campione Bedrocan non è stato invece possibile effettuare una determinazione selettiva affidabile del composto.
Particolarmente interessante è risultata la presenza del CBT, quantificato in tutte e cinque le resine. Le concentrazioni sono risultate comprese tra lo 0.20% p/p di Bedrocan e lo 0.30% p/p di Bediol, con valori intermedi pari allo 0.21% in Bedrolite, allo 0.24% in Bedica e allo 0.29% in FM2. La rilevazione del CBT in tutte le varietà analizzate evidenzia l'utilità dell'estensione del metodo a cannabinoidi minori normalmente non compresi nelle determinazioni di routine limitate a THC e CBD.
Il CBN è stato rilevato in tutti i campioni, risultando quantificabile in Bedrocan, Bediol, Bedica e FM2, con concentrazioni comprese tra lo 0.33% e lo 0.78% p/p. I valori più elevati sono stati osservati in FM2 (0.78%), Bediol (0.65%) e Bedrocan (0.64%). La presenza di CBN è compatibile con i processi di ossidazione e trasformazione del THC che possono verificarsi durante la lavorazione e la conservazione del materiale, sebbene il solo dato quantitativo non consenta di ricostruire le condizioni di conservazione dei singoli campioni.
THD, Δ^8-THC, CBP e CBL non sono stati rilevati in nessuna delle cinque resine. Il THCV è stato invece rilevato qualitativamente in tutte le resine, ma non è stato sottoposto a determinazione quantitativa poiché non era disponibile una curva di calibrazione validata per tale composto.
In generale i risultati mostrano come l'applicazione del metodo sviluppato consenta di distinguere chiaramente resine caratterizzate dalla predominanza di THC o CBD e, contemporaneamente, di evidenziare la presenza di numerosi cannabinoidi minori.

8.5.2 Oleoliti

Sono stati analizzati cinque oleoliti ottenuti dalle medesime varietà di Cannabis medicinale considerate per le resine: Bedrocan, Bediol, Bedrolite, Bedica e FM2.
Per la preparazione dei campioni sono stati pesati 50 mg di oleolita e addizionati a 5 mL di metanolo, ottenendo una soluzione corrispondente a 10 mg/mL di campione. Le soluzioni così preparate sono state analizzate mediante il metodo HPLC-UV sviluppato.
L'analisi cromatografica ha consentito di evidenziare principalmente i cannabinoidi maggiormente rappresentati nelle differenti preparazioni. In particolare, negli oleoliti ottenuti dalle varietà THC-dominanti,

quali Bedrocan e Bedica, il segnale predominante era attribuibile al Δ^9-THC, mentre negli oleoliti Bediol e Bedrolite risultava particolarmente evidente la presenza di CBD. Nel campione FM2 sono stati osservati entrambi i principali cannabinoidi, coerentemente con le caratteristiche della varietà di origine.
Accanto a THC e CBD sono stati osservati, a seconda del campione, segnali attribuibili ad alcuni cannabinoidi quali CBDA, CBG, CBN e CBC. Tuttavia, per diversi di questi composti la risposta risultava prossima o inferiore al limite di quantificazione del metodo. Più in generale, la maggior parte dei cannabinoidi minori inclusi nel metodo non ha prodotto segnali cromatografici sufficientemente intensi da consentirne una determinazione affidabile.
Questo comportamento è risultato particolarmente evidente nel confronto con le resine, nelle quali era stato possibile rilevare e, in diversi casi, quantificare un numero maggiore di cannabinoidi.
Al fine di approfondire questo risultato e verificare se la mancata rilevazione fosse riconducibile a una reale assenza dei cannabinoidi minori negli oleoliti oppure, più verosimilmente, alla loro presenza a concentrazioni inferiori rispetto a quelle osservate nelle resine e quindi non sufficienti a generare segnali UV rilevabili nelle condizioni analitiche adottate, i campioni sono stati successivamente sottoposti ad analisi complementare mediante HPLC-MS.
L'impiego della spettrometria di massa, caratterizzata da una maggiore sensibilità, ha consentito di indagare qualitativamente la presenza di cannabinoidi minori non evidenziabili mediante HPLC-UV e di verificare se l'assenza di segnale in UV fosse effettivamente associata all'assenza del composto oppure a concentrazioni inferiori alla sensibilità del metodo.
Tali risultati sono riportati nel Paragrafo 8.6.

8.6 Analisi complementari mediante HPLC-MS

Come descritto nel Paragrafo 5.9, l'analisi HPLC-MS è stata utilizzata come tecnica complementare per approfondire la caratterizzazione qualitativa dei campioni reali e, in particolare, per ricercare cannabinoidi minori non facilmente evidenziabili mediante HPLC-UV.
Le analisi HPLC-MS sono state effettuate su 10 campioni reali, comprendenti 5 resine ottenute dalle varietà Bedrocan, Bediol, Bedrolite, Bedica e FM2 e 5 preparazioni oleose ottenute dalle medesime varietà, come riportato in Tabella 47.
Tra questi, il THCV è stato rilevato in tutti i campioni analizzati, con valori di errore di massa generalmente inferiori a 5 ppm e una buona corrispondenza degli spettri MS/MS con il riferimento. Anche per il CBQN sono stati osservati segnali compatibili con il composto in numerosi campioni, generalmente caratterizzati da elevata accuratezza di massa e buoni valori di *Formula Finder Score*.
Particolarmente interessante è risultata la distribuzione del CBE, rilevata esclusivamente nei campioni delle varietà Bediol, Bedrolite e FM2, sia nelle resine sia nei corrispondenti oleoliti. Tale distribuzione risulta coerente con la relazione biosintetica del CBE con il CBD, poiché le tre varietà sono caratterizzate da una componente di CBD rilevante.
Per alcuni cannabinoidi l'interpretazione ha invece richiesto maggiore cautela. Nel caso del CBND e del DCBF, l'accuratezza di massa e il *Formula Finder Score* risultavano compatibili con gli analiti attesi, mentre il *Library Hit Score* era in alcuni casi più basso. In particolare, per il DCBF la corrispondenza spettrale è risultata inferiore al 50%, per cui i segnali osservati sono stati considerati compatibili con il composto, senza attribuire loro lo stesso livello di confidenza ottenuto per altri cannabinoidi.

Tabella 47: Campioni reali sottoposti ad analisi HPLC-MS.

Codice	Varietà	Matrice
R1	Bedrocan	Resina
R2	Bediol	Resina
R3	Bedrolite	Resina
R4	Bedica	Resina
R5	FM2	Resina
O1	Bedrocan	Oleolita
O2	Bediol	Oleolita
O3	Bedrolite	Oleolita
O4	Bedica	Oleolita
O5	FM2	Oleolita

Particolare attenzione è stata inoltre posta ai cannabinoidi isomerici. Per il CBT, pur essendo stato osservato un segnale alla massa attesa, in alcuni campioni il confronto con la libreria ha restituito come migliore corrispondenza altri isomeri aventi la stessa formula molecolare. Una criticità analoga è stata riscontrata per ISO-CBD, il cui segnale nei campioni reali risultava sovrapponibile a quello del CBD e veniva attribuito dalla libreria prevalentemente a quest'ultimo. I dati HPLC-MS non hanno pertanto consentito di dimostrare in modo indipendente la presenza di ISO-CBD.

Tra le forme acide, CBGA, CBDVA, THCVA e CBNA sono stati osservati con frequenza e livelli di confidenza differenti a seconda del campione. In alcuni casi l'identificazione è risultata supportata da un'elevata accuratezza di massa e da una buona corrispondenza MS/MS, mentre nei segnali meno intensi l'attribuzione è stata effettuata con maggiore cautela.

Al contrario, nelle condizioni analitiche adottate non sono stati rilevati segnali attribuibili a THD, CBP, CBL, Δ^8-ISO-THC e Δ^8-THC.

In generale, l'impiego dell'HPLC-MS ha consentito di approfondire il profilo delle resine e degli oleoliti analizzati e di ottenere informazioni aggiuntive per numerosi cannabinoidi minori. I risultati hanno mostrato come l'accuratezza di massa rappresenti un importante elemento di supporto all'identificazione, ma anche come, soprattutto nel caso di composti isomerici o di segnali a bassa intensità, sia necessario integrare tale informazione con gli spettri MS/MS e con gli altri parametri qualitativi disponibili. L'HPLC-MS ha quindi rappresentato un approccio complementare al metodo HPLC-UV, particolarmente utile per approfondire segnali non chiaramente evidenziabili mediante rivelazione UV.

Per visualizzare la distribuzione dei cannabinoidi rilevati mediante HPLC-MS nelle cinque resine medicinali, le percentuali relative sono state riportate in grafici a torta (Figura 68).

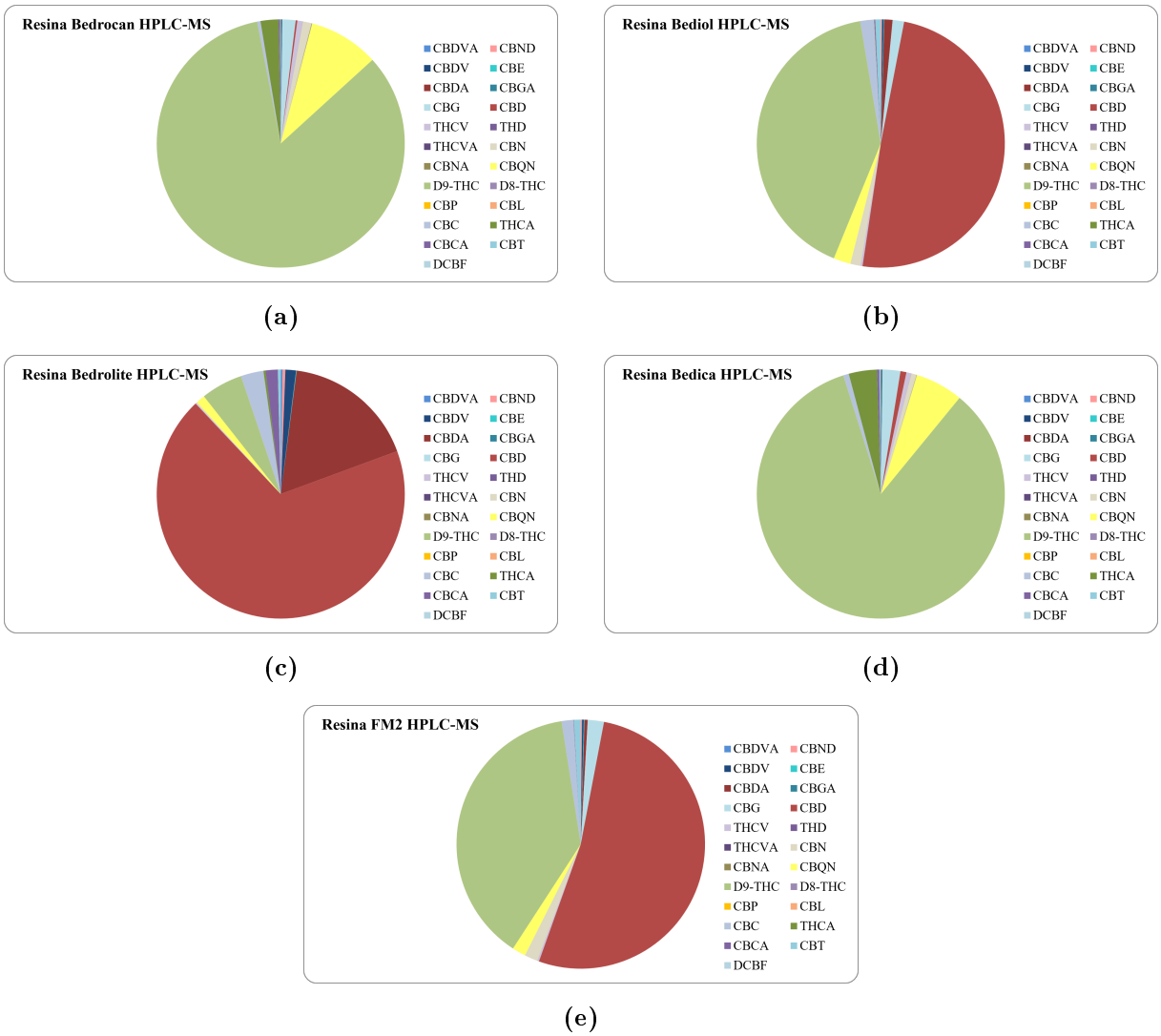


Figura 68: Distribuzione relativa dei segnali dei cannabinoidi rilevati mediante HPLC-MS nelle resine medicinali Bedrocan (a), Bediol (b), Bedrolite (c), Bedica (d) e FM2 (e). Le proporzioni rappresentate derivano dalla risposta strumentale relativa e non corrispondono a concentrazioni percentuali dei singoli cannabinoidi.

Per visualizzare la distribuzione dei cannabinoidi rilevati mediante HPLC-MS nei cinque oleoliti, le percentuali relative sono state riportate in grafici a torta (Figura 69).

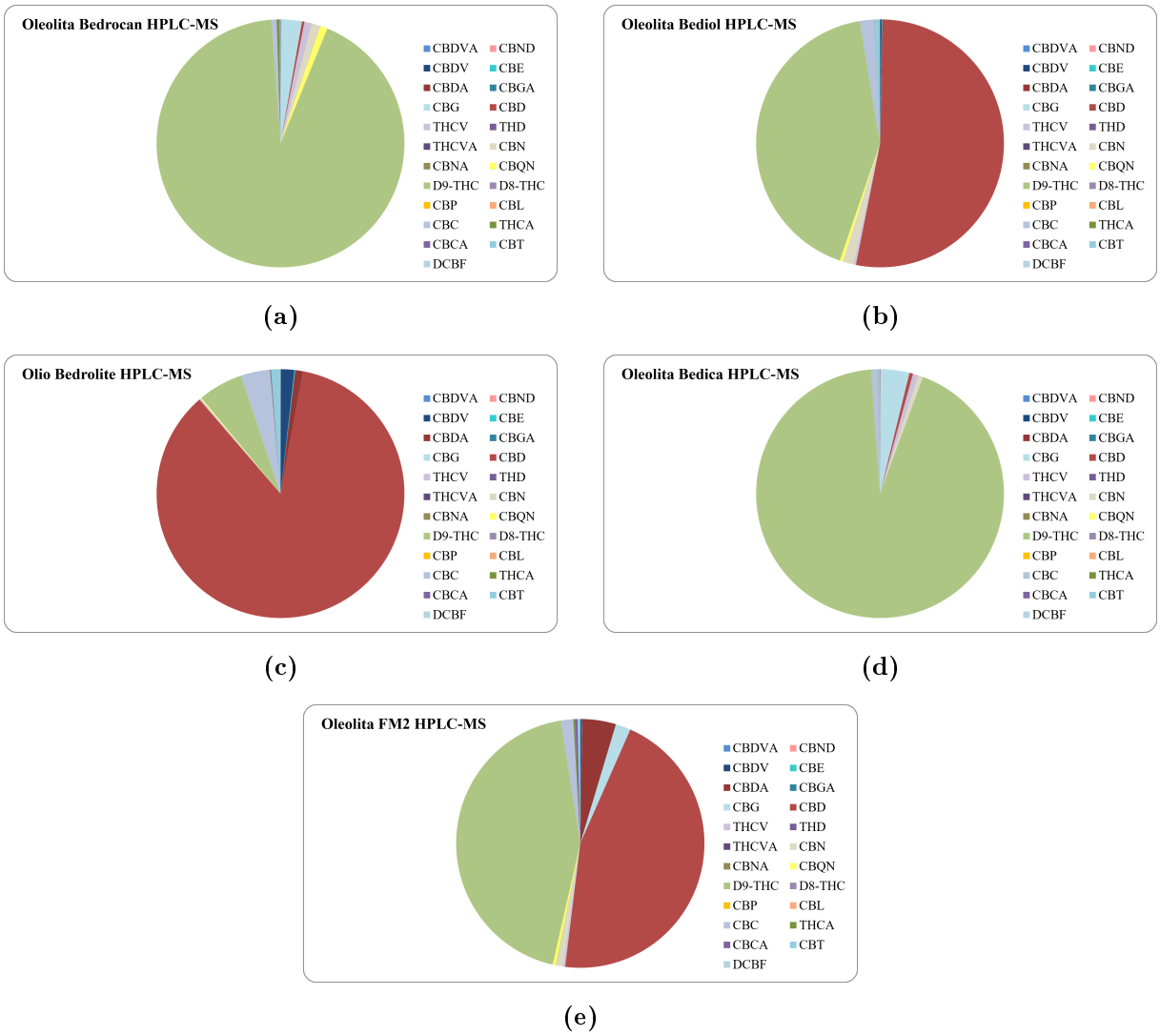


Figura 69: Distribuzione relativa dei segnali dei cannabinoidi rilevati mediante HPLC-MS negli oleoliti Bedrocan (a), Bediol (b), Bedrolite (c), Bedica (d) e FM2 (e). Le proporzioni rappresentate derivano dalla risposta strumentale relativa e non corrispondono a concentrazioni percentuali dei singoli cannabinoidi.

Anche nel caso degli oleoliti si osserva un andamento analogo a quello riscontrato nelle resine: accanto ai cannabinoidi maggiormente rappresentati, sono infatti presenti numerosi cannabinoidi minori. Sebbene i segnali relativi ai composti principali risultino predominanti, la presenza di un ampio numero di specie minoritarie evidenzia la complessità del profilo cannabinoidico di queste preparazioni.

8.6.1 Confronto tra i risultati HPLC-UV e HPLC-MS

I risultati ottenuti mediante HPLC-MS sono stati confrontati con quelli precedentemente acquisiti mediante HPLC-UV sugli stessi campioni di resina e olio, con l'obiettivo di valutare la concordanza dei profili e di approfondire la presenza di analiti scarsamente evidenti o non rilevabili mediante rivelazione UV.

Resine

I risultati ottenuti mediante le due tecniche hanno mostrato una buona concordanza per i principali can-

nabinoidi presenti nei campioni. Nelle resine a prevalenza di Δ^9-THC, quali Bedrocan e Bedica, entrambe le tecniche hanno evidenziato il Δ^9-THC come componente maggioritario, accompagnato dalle relative forme acide e da cannabinoidi presenti in quantità inferiori. Analogamente, nei campioni caratterizzati da un maggiore contenuto di CBD, quali Bediol, Bedrolite e FM2, entrambe le tecniche hanno evidenziato la predominanza del CBD e/o del CBDA, associata alla presenza di numerosi cannabinoidi minori.
In Tabella 48 sono riportati, per ciascuna resina, i cannabinoidi rilevati o non rilevati mediante HPLC-UV e HPLC-MS.

Tabella 48: Confronto qualitativo dei cannabinoidi rilevati nei campioni di resina mediante HPLC-UV e HPLC-MS.

	Bedrocan		Bediol		Bedrolite		Bedica		FM2	
Analita	**UV**	**MS**	**UV**	**MS**	**UV**	**MS**	**UV**	**MS**	**UV**	**MS**
CBDVA	–	–	–	–	+	+	–	–	–	–
CBND	+	+	+	+	+	+	–	–	+	+
CBDV	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CBE	–	–	+	+	+	+	–	–	+	+
CBDA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CBGA	+	+	+	–	+	–	+	+	+	–
CBG	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+
CBD	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
THCV	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
THD	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
THCVA	+	+	+	–	+	–	+	+	+	+
CBN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CBNA	+	+	–	–	–	–	+	+	–	–
CBQN	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Δ^9-THC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Δ^8-THC	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
CBP	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
CBL	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
CBC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
THCA	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+
CBCA	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+
CBT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DCBF	–	–	+	+	–	–	–	–	–	+

+: rilevato –: non rilevato

L'analisi HPLC-MS ha tuttavia fornito informazioni complementari per alcuni analiti. Un caso particolarmente evidente è rappresentato dal CBQN nella resina Bedrocan: il composto non aveva fornito un segnale apprezzabile mediante HPLC-UV, mentre nell'analisi HPLC-MS è stato osservato un segnale attribuibile a tale composto. Questo risultato è attribuibile alla maggiore sensibilità dell'HPLC-MS.

Un comportamento analogo è stato osservato nella resina FM2, per la quale mediante HPLC-MS sono stati rilevati picchi attribuibili a THCA, CBCA e DCBF, non evidenziati dall'analisi HPLC-UV. Anche in questi casi la spettrometria di massa ha consentito di ottenere informazioni aggiuntive sulla presenza di questi cannabinoidi minori.
La maggiore concordanza tra le due tecniche è stata osservata per la resina Bedica, per la quale gli analiti rilevati mediante HPLC-UV sono risultati sostanzialmente sovrapponibili a quelli osservati mediante HPLC-MS. Anche per Bediol e Bedrolite il profilo generale è risultato coerente, pur con alcune differenze relative soprattutto ai cannabinoidi presenti a livelli minori.

Oleoliti

Il confronto è stato successivamente esteso ai cinque oleoliti ottenuti dalle medesime varietà considerate per le resine. In Tabella 49 sono riportati, per ciascun campione, i cannabinoidi rilevati o non rilevati mediante le due tecniche, al fine di evidenziarne concordanze e differenze qualitative.

Tabella 49: Confronto qualitativo dei cannabinoidi rilevati nei campioni di olio mediante HPLC-UV e HPLC-MS.

	Bedrocan		Bediol		Bedrolite		Bedica		FM2	
Analita	**UV**	**MS**	**UV**	**MS**	**UV**	**MS**	**UV**	**MS**	**UV**	**MS**
CBDVA	–	–	–	–	–	+	–	–	–	+
CBND	–	+	–	–	–	+	–	–	–	–
CBDV	–	+	–	+	+	+	–	+	–	+
CBE	–	–	–	+	–	+	–	–	–	+
CBDA	–	+	–	+	+	+	–	+	+	+
CBGA	+	+	–	–	–	–	–	–	–	+
CBG	+	+	–	–	–	–	+	+	+	+
CBD	–	+	+	+	+	+	–	+	+	+
THCV	–	+	–	+	–	+	–	+	–	+
THD	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
THCVA	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–
CBN	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+
CBNA	–	+	–	–	–	–	–	–	–	+
CBQN	–	+	–	+	–	+	–	–	–	+
Δ^9-THC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Δ^8-THC	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
CBP	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
CBL	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
CBC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
THCA	–	+	–	+	–	+	–	+	–	+
CBCA	–	+	–	+	–	+	–	+	–	+
CBT	–	+	–	+	–	+	–	+	–	+
DCBF	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–

+: rilevato –: non rilevato

Il confronto tra i risultati ottenuti dalle analisi effettuate in HPLC-UV e HPLC-MS nei cinque oleoliti ha mostrato una buona concordanza per gli analiti rilevati: tutti i cannabinoidi evidenziati mediante HPLC-UV sono infatti risultati rilevabili anche mediante HPLC-MS. La spettrometria di massa ha tuttavia consentito di ampliare considerevolmente il numero di cannabinoidi osservati, evidenziando diversi

composti minori non rilevati mediante HPLC-UV.
In particolare, THCV, THCA, CBCA e CBT sono stati rilevati mediante HPLC-MS in tutti gli oleoliti, pur non risultando evidenziabili mediante HPLC-UV. Anche CBDV e CBDA sono stati osservati mediante spettrometria di massa in campioni nei quali non erano stati rilevati mediante UV. Ulteriori differenze hanno riguardato cannabinoidi meno comuni, quali CBQN, CBE e CBND, mentre un segnale compatibile con DCBF è stato osservato esclusivamente nell'oleolita ottenuto dalla varietà Bediol.
In generale, il confronto tra HPLC-UV e HPLC-MS ha evidenziato il carattere complementare delle due tecniche. L'HPLC-UV ha rappresentato il metodo principale per la separazione e la determinazione quantitativa dei cannabinoidi, mentre l'HPLC-MS ha consentito di approfondire qualitativamente la presenza di alcuni analiti, in particolare di cannabinoidi minori non chiaramente evidenziabili mediante rivelazione UV. Tale contributo è risultato particolarmente evidente negli oleoliti, nei quali l'analisi mediante spettrometria di massa ha permesso di rilevare un numero maggiore di composti rispetto all'HPLC-UV.

8.6.2 Confronto tra resine e oleoliti della stessa varietà

I risultati ottenuti mediante HPLC-MS sono stati utilizzati anche per confrontare le resine e gli oleoliti appartenenti alla stessa varietà, al fine di valutare eventuali differenze negli analiti rilevati nelle due matrici. Poiché le resine e gli oleoliti confrontati non derivavano dal medesimo campione di partenza, le differenze osservate non possono essere attribuite esclusivamente alla preparazione dell'oleolita, ma possono riflettere anche la variabilità tra campioni appartenenti alla stessa varietà.
Le principali differenze qualitative osservate sono riassunte in Tabella 50, nella quale sono riportati esclusivamente i cannabinoidi rilevati in una delle due matrici e non nell'altra.

Tabella 50: Differenze qualitative tra resine e oleoliti della stessa varietà rilevate mediante HPLC-MS.

Varietà	Rilevati solo nella resina	Rilevati solo nell'olio
Bedrocan	–	–
Bediol	CBND, CBG	–
Bedrolite	–	–
Bedica	CBGA, THCVA, CBNA, CBQN	–
FM2	CBND, THCVA, DCBF	CBDVA, CBGA, CBNA

–: nessuna differenza qualitativa rilevata tra le due matrici.

Nel complesso, è stata osservata una buona concordanza tra i cannabinoidi rilevati nelle resine e nei corrispondenti oleoliti. Per Bedrocan e Bedrolite non sono emerse differenze qualitative, mentre per Bediol le differenze hanno riguardato esclusivamente CBND e CBG, rilevati nella resina ma non nell'oleolita. Differenze più evidenti sono state osservate per Bedica e, soprattutto, per FM2, nel quale alcuni cannabinoidi sono stati rilevati esclusivamente nella resina e altri esclusivamente nell'oleolita.
Considerando anche le aree dei segnali HPLC-MS, in alcune varietà, in particolare Bedrocan, Bediol e Bedrolite, è stata osservata negli oleoliti una tendenza verso una maggiore risposta delle forme neutre, quali CBD e Δ^9-THC, accompagnata da una minore risposta delle corrispondenti forme acide CBDA e

THCA. Tale andamento risulta compatibile con una parziale conversione delle forme acide nelle rispettive forme neutre.

9 Conclusioni

Il presente lavoro ha avuto come obiettivo lo sviluppo di un metodo analitico HPLC-UV multianalita per la caratterizzazione di preparazioni a base di Cannabis, con particolare attenzione all'estensione delle analisi oltre i cannabinoidi maggiormente considerati nelle determinazioni di routine. La fase di sviluppo e ottimizzazione ha permesso di ottenere una buona separazione cromatografica di un numero elevato di cannabinoidi appartenenti a classi strutturali differenti, comprendendo sia forme acide sia neutre e diversi cannabinoidi minori. Le principali difficoltà sono state riscontrate per alcuni composti caratterizzati da elevata similarità strutturale, a conferma della complessità associata allo sviluppo di metodi multianalita estesi a molecole tra loro strettamente correlate.

La successiva convalida ha consentito di verificare l'idoneità del metodo alla determinazione quantitativa dei cannabinoidi considerati. I risultati ottenuti in termini di specificità, linearità, accuratezza, precisione, sensibilità e robustezza sono risultati soddisfacenti e hanno mostrato una buona affidabilità del metodo nelle condizioni analitiche adottate. Le maggiori criticità sono state osservate, come prevedibile, alle concentrazioni più basse, mentre alle concentrazioni intermedie e superiori il comportamento del metodo è risultato generalmente più stabile. La convalida ha quindi confermato la possibilità di utilizzare il metodo sviluppato per la determinazione simultanea di un ampio insieme di cannabinoidi, mantenendo al tempo stesso la necessaria attenzione ai limiti associati agli analiti presenti a livelli molto ridotti.

Una volta sviluppato e convalidato, il metodo è stato applicato a campioni reali di diversa natura, comprendenti preparazioni di Cannabis medicinale e matrici non destinate all'uso medicinale. L'analisi di campioni caratterizzati da composizioni molto differenti ha permesso di evidenziare l'importanza di una caratterizzazione del profilo dei cannabinoidi che non sia limitata esclusivamente ai componenti maggioritari. In particolare, uno degli aspetti di maggiore interesse emersi dal lavoro riguarda la presenza di numerosi cannabinoidi minori, osservati in diverse tipologie di campione e, in alcuni casi, presenti in quantità tutt'altro che trascurabili.

Tale risultato assume particolare rilevanza per le preparazioni di Cannabis medicinale. La determinazione dei soli THC e CBD consente certamente di descrivere le caratteristiche principali della preparazione, ma non restituisce necessariamente un quadro completo della sua composizione. L'estensione dell'analisi ai cannabinoidi minori permette invece di ottenere un profilo chimico più approfondito, evidenziando differenze tra preparazioni che potrebbero non emergere considerando esclusivamente i cannabinoidi predominanti. La loro presenza nelle resine medicinali analizzate mostra quindi come questi composti, sebbene definiti "minori", possano rappresentare una componente significativa del profilo delle preparazioni a base di Cannabis e meritino di essere considerati nell'ambito di una caratterizzazione analitica più completa.

La ricerca dei cannabinoidi minori risulta tuttavia importante anche al di fuori dell'ambito medicinale. Nei prodotti commerciali, nei campioni provenienti da sequestri e, più in generale, nelle matrici di origine non controllata, la composizione può risultare estremamente variabile e comprendere sostanze non necessariamente riconducibili al normale profilo fitochimico della pianta. In questo contesto assume particolare interesse il riscontro di cannabinoidi semisintetici, che evidenzia come l'analisi dei prodotti contenenti derivati della Cannabis debba tenere conto anche di composti ottenuti mediante trasformazioni chimiche dei cannabinoidi naturali.

La presenza di queste sostanze rappresenta un aspetto particolarmente rilevante in prospettiva futura,

poiché il panorama dei cannabinoidi disponibili può evolvere rapidamente con la comparsa di nuovi derivati e prodotti di trasformazione. Un possibile sviluppo del presente lavoro potrebbe pertanto consistere nell'ampliamento del metodo a un numero ancora maggiore di analiti, includendo ulteriori cannabinoidi minori e semisintetici. In alternativa, potrebbe risultare utile affiancare al metodo quantitativo sviluppato una procedura complementare maggiormente orientata allo screening e all'identificazione di cannabinoidi emergenti, in grado di adattarsi più facilmente alla comparsa di nuove sostanze.

L'applicazione del metodo ai campioni reali ha inoltre evidenziato come la sola HPLC-UV, pur rappresentando una tecnica particolarmente adatta alla determinazione quantitativa e alla possibilità di analizzare direttamente sia le forme acide sia quelle neutre, non possa fornire da sola tutte le informazioni necessarie per una caratterizzazione completa. Questo aspetto diventa particolarmente importante quando gli analiti sono presenti a basse concentrazioni oppure quando devono essere distinti composti strutturalmente molto simili. I risultati ottenuti confermano quindi l'importanza di integrare tecniche analitiche differenti, sfruttandone le caratteristiche complementari.

La GC-MS ha fornito un importante supporto all'identificazione qualitativa dei cannabinoidi attraverso il confronto dei tempi di ritenzione e degli spettri di massa con quelli ottenuti dagli standard di riferimento. Tale tecnica presenta tuttavia una limitazione significativa nell'analisi delle forme acide, che possono andare incontro a decarbossilazione a causa delle elevate temperature proprie dell'analisi gascromatografica. L'HPLC-MS, al contrario, ha consentito di mantenere l'analisi in fase liquida e di aumentare notevolmente la sensibilità e la selettività rispetto alla sola rivelazione UV, permettendo di approfondire la ricerca di cannabinoidi minori non chiaramente evidenziabili mediante HPLC-UV e di ottenere ulteriori informazioni a supporto della loro identificazione.

Anche la spettrometria di massa presenta tuttavia alcune criticità. Nel caso di composti isomerici, la sola massa esatta può non essere sufficiente per un'identificazione univoca e deve essere integrata con le informazioni derivanti dalla separazione cromatografica e dalla frammentazione MS/MS. Inoltre, un impiego dell'HPLC-MS a fini quantitativi richiederebbe lo sviluppo e la convalida di un metodo specifico e la disponibilità di adeguati standard di riferimento, aspetto che può risultare particolarmente complesso proprio nel caso dei cannabinoidi meno comuni o di nuova comparsa.

Nel complesso, il lavoro svolto evidenzia quindi come la caratterizzazione dei prodotti a base di Cannabis possa beneficiare di un approccio analitico più ampio rispetto alla sola determinazione di THC e CBD. L'inclusione dei cannabinoidi minori consente di descrivere in maniera più completa il profilo delle preparazioni, mentre la ricerca di cannabinoidi semisintetici permette di affrontare la crescente complessità dei prodotti disponibili. Allo stesso tempo, l'integrazione di HPLC-UV, GC-MS e HPLC-MS consente di combinare capacità quantitativa, informazioni strutturali e maggiore sensibilità, offrendo una strategia complessivamente più efficace per la caratterizzazione dei cannabinoidi. In questa prospettiva, l'ampliamento continuo del numero di analiti considerati e l'impiego complementare di tecniche differenti rappresentano due elementi centrali per lo sviluppo futuro di metodiche analitiche sempre più complete e adattabili all'evoluzione di questo settore.

Appendice Figure

A Cromatogrammi HPLC-UV delle prove di ottimizzazione del metodo

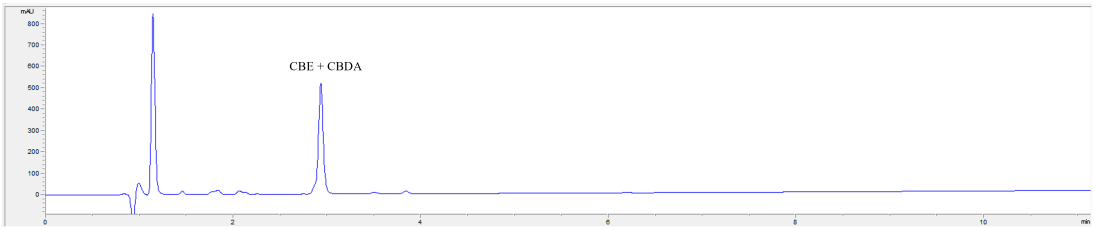


Figura 70: Cromatogramma del mix CBE-CBDA ottenuto mediante HPLC-UV

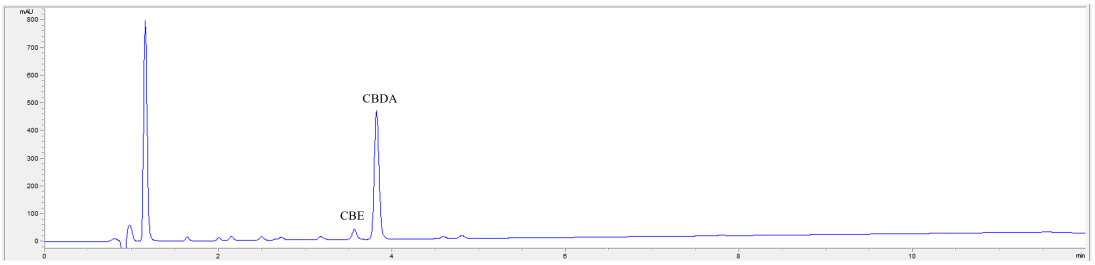


Figura 71: Cromatogramma del mix CBE-CBDA ottenuto mediante HPLC-UV dopo ottimizzazione del metodo

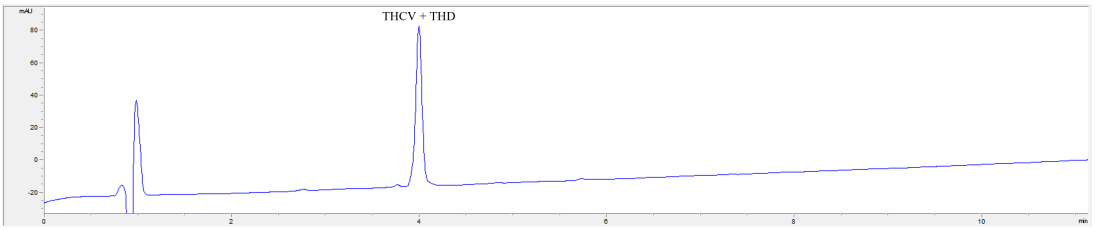


Figura 72: Cromatogramma del mix THCV-THD ottenuto mediante HPLC-UV

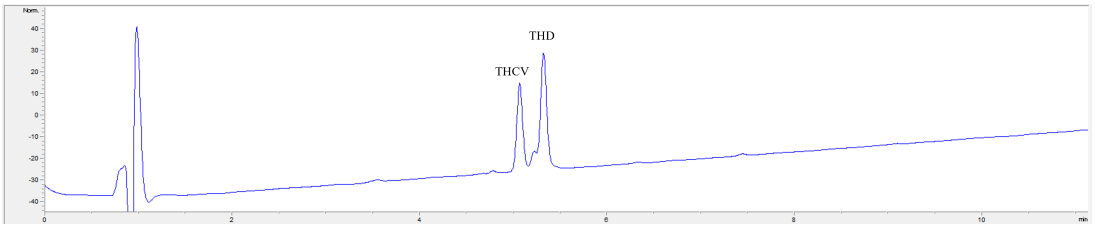


Figura 73: Cromatogramma del mix THCV-THD ottenuto mediante HPLC-UV dopo ottimizzazione del metodo

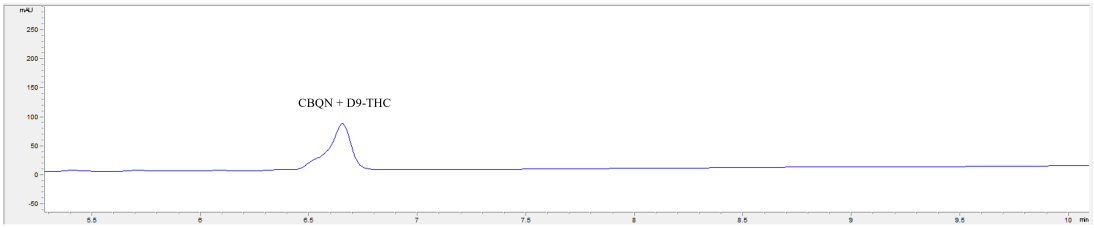


Figura 74: Cromatogramma del mix CBQN-D9-THC ottenuto mediante HPLC-UV

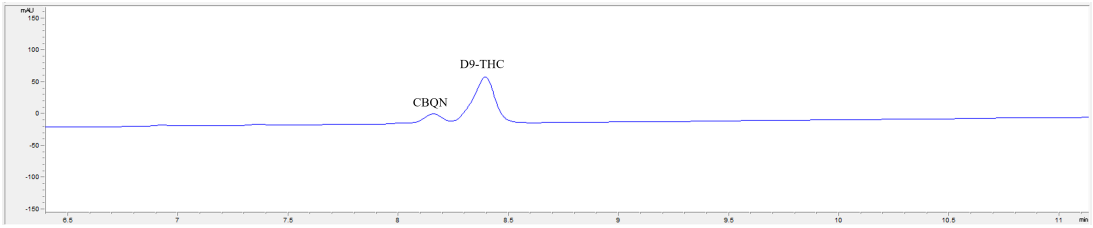


Figura 75: Cromatogramma del mix CBQN-D9-THC ottenuto mediante HPLC-UV dopo ottimizzazione del metodo

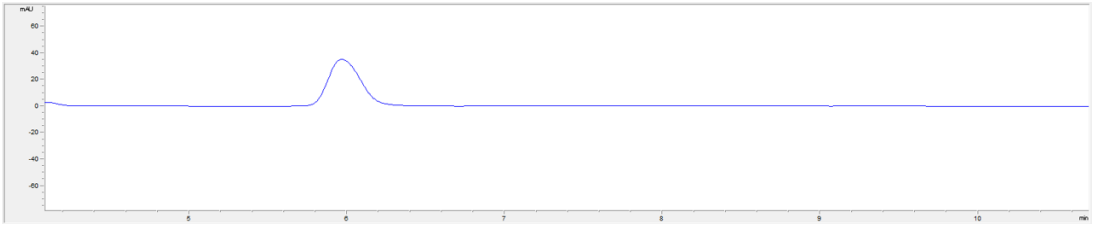


Figura 76: Cromatogramma del mix D8-ISO-THC D8-THC ottenuto mediante HPLC-UV

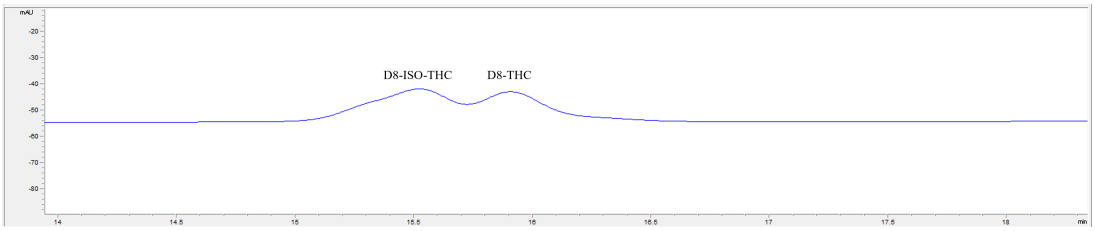


Figura 77: Cromatogramma del mix D8-ISO-THC D8-THC ottenuto mediante HPLC-UV dopo ottimizzazione del metodo

B Spettri di massa degli standard

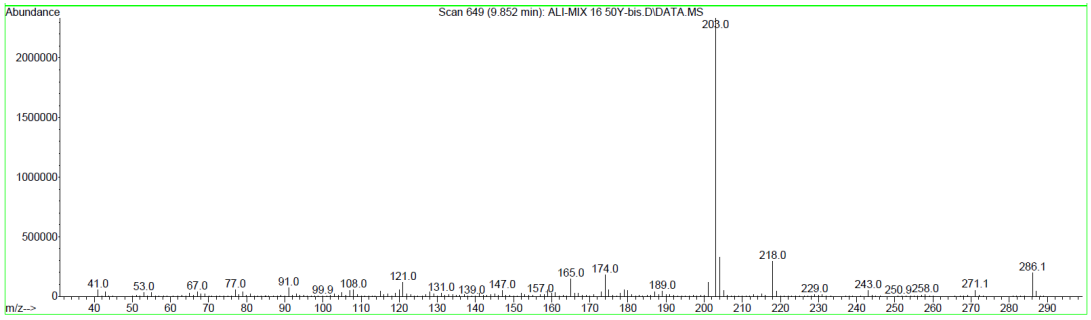


Figura 78: Spettro di massa del CBDV ottenuto mediante GC-MS

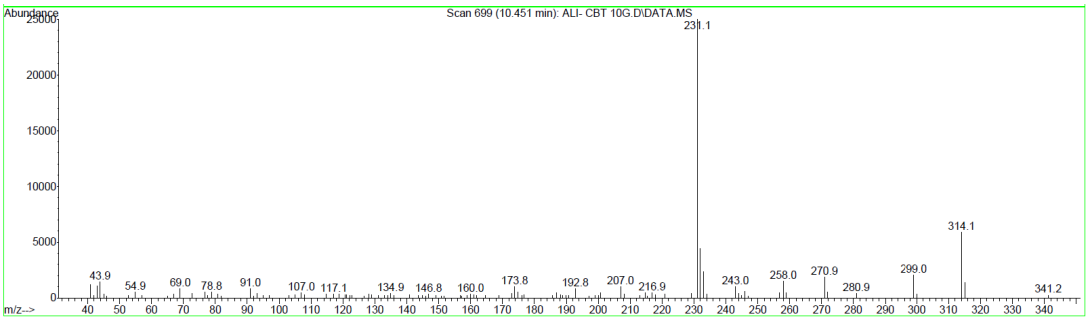


Figura 79: Spettro di massa del CBT ottenuto mediante GC-MS

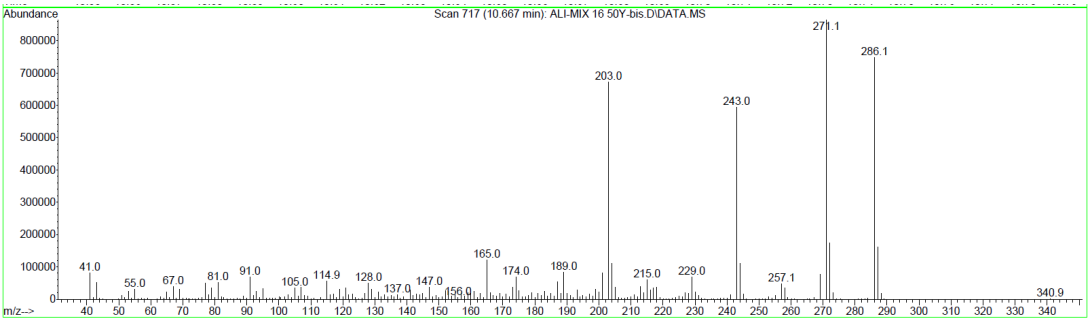


Figura 80: Spettro di massa del THCV ottenuto mediante GC-MS

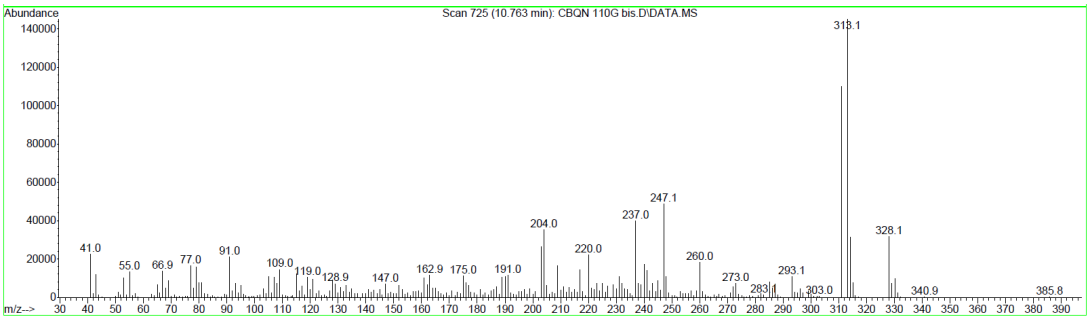


Figura 81: Spettro di massa del CBQN ottenuto mediante GC-MS

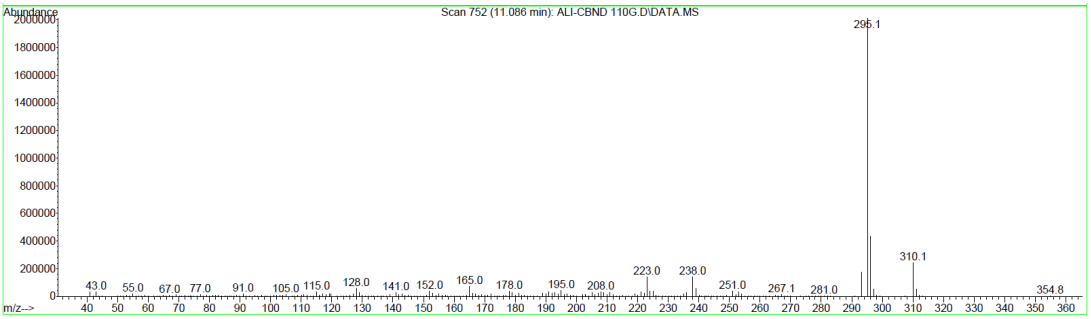


Figura 82: Spettro di massa del CBND ottenuto mediante GC-MS

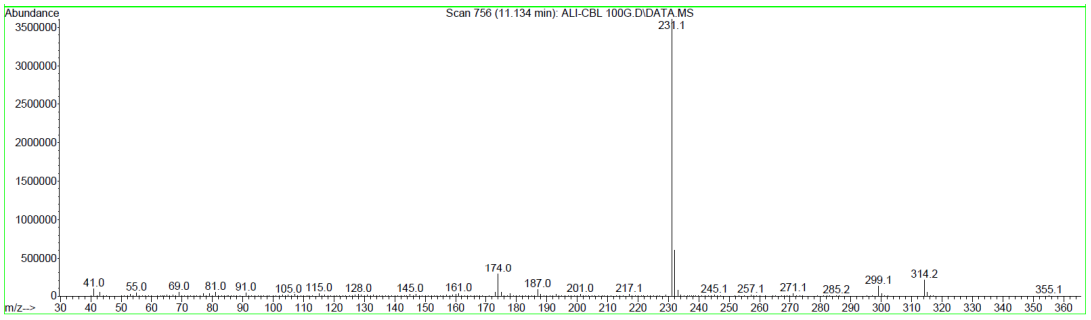


Figura 83: Spettro di massa del CBL ottenuto mediante GC-MS

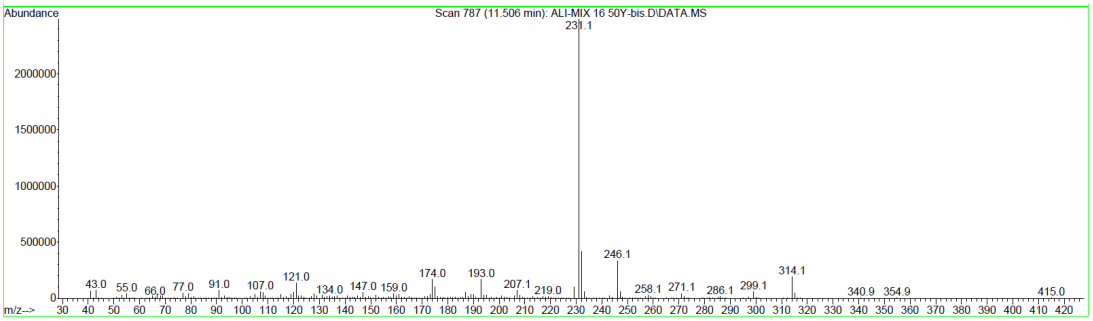


Figura 84: Spettro di massa del CBD ottenuto mediante GC-MS

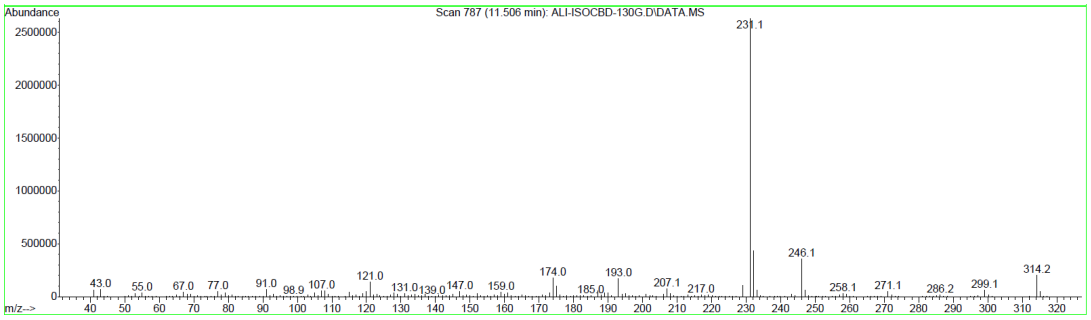


Figura 85: Spettro di massa dell'ISO-CBD ottenuto mediante GC-MS

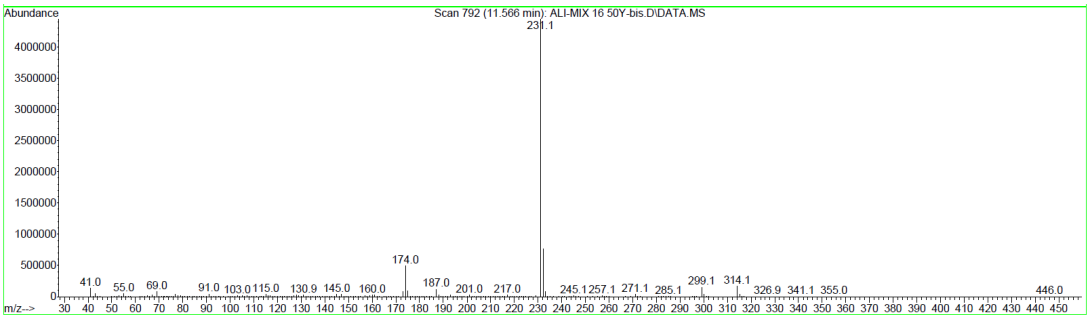


Figura 86: Spettro di massa del CBC ottenuto mediante GC-MS

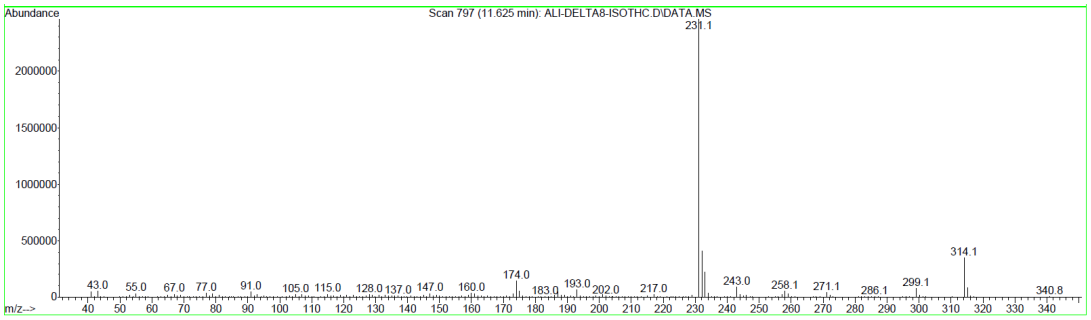


Figura 87: Spettro di massa del Δ^8-ISO-THC ottenuto mediante GC-MS

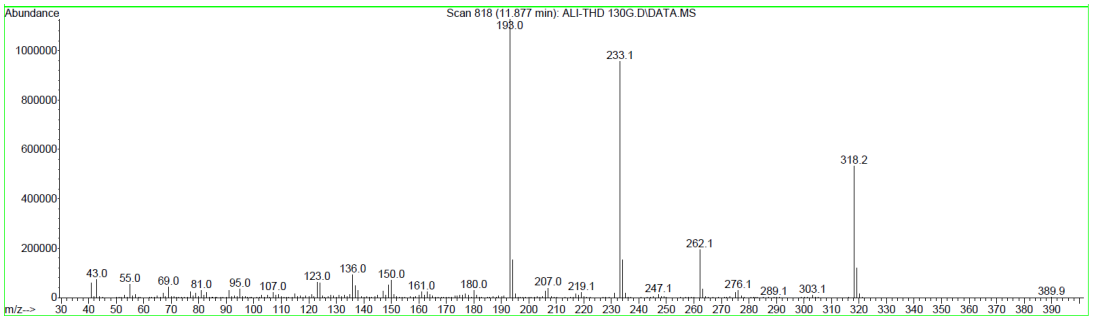


Figura 88: Spettro di massa del THD ottenuto mediante GC-MS

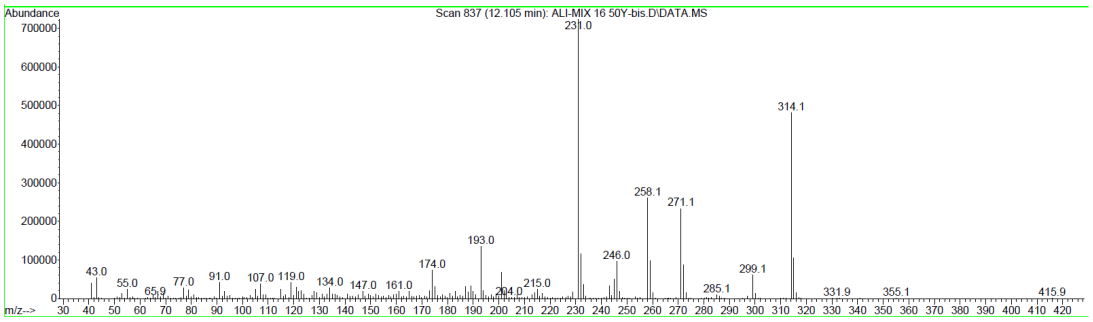


Figura 89: Spettro di massa del Δ^8-THC ottenuto mediante GC-MS

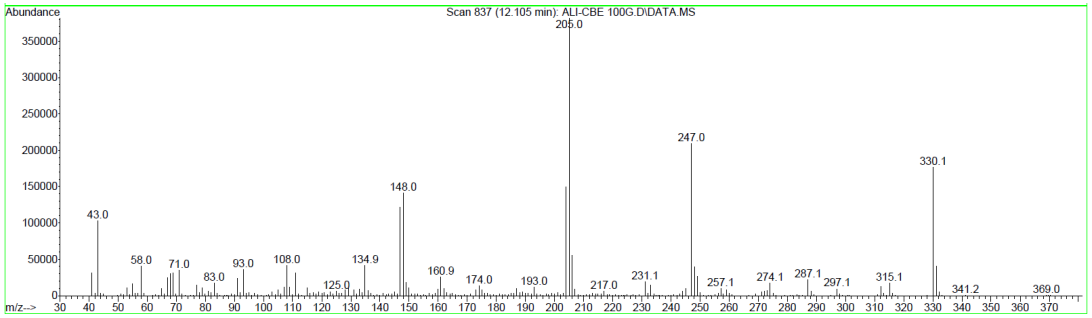


Figura 90: Spettro di massa del CBE ottenuto mediante GC-MS

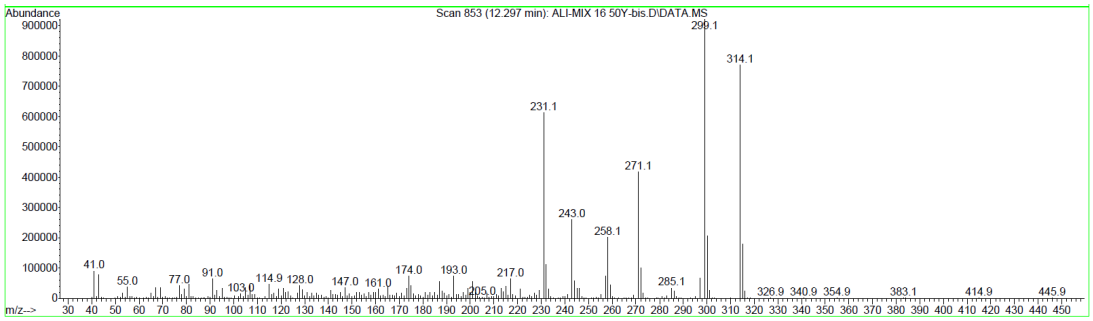


Figura 91: Spettro di massa del Δ^9-THC ottenuto mediante GC-MS

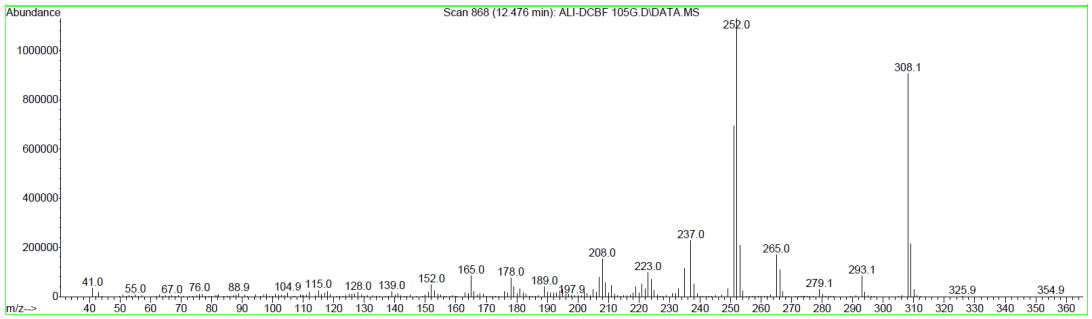


Figura 92: Spettro di massa del DCBF ottenuto mediante GC-MS

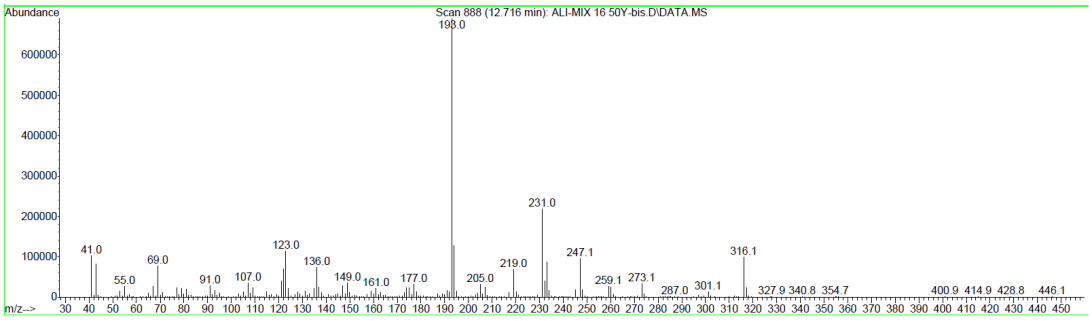


Figura 93: Spettro di massa del CBG ottenuto mediante GC-MS

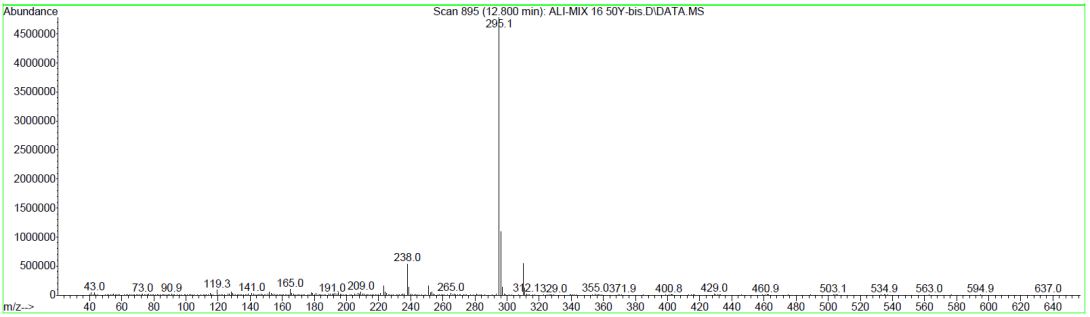


Figura 94: Spettro di massa del CBN ottenuto mediante GC-MS

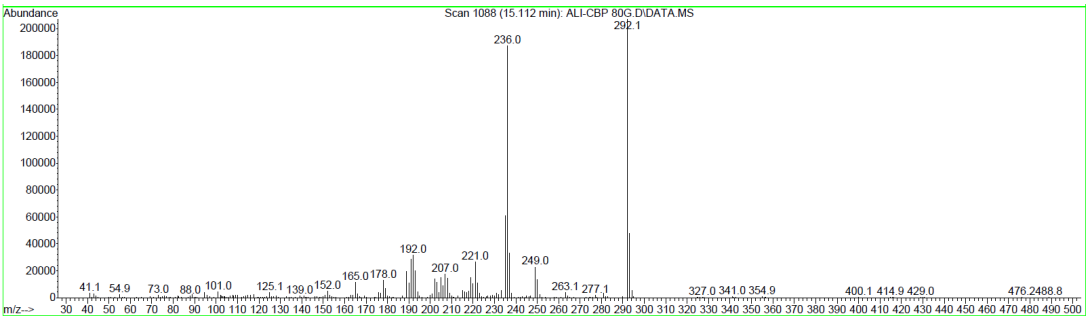


Figura 95: Spettro di massa del CBP ottenuto mediante GC-MS

C Cromatogrammi estratti e spettri di massa-massa degli standard

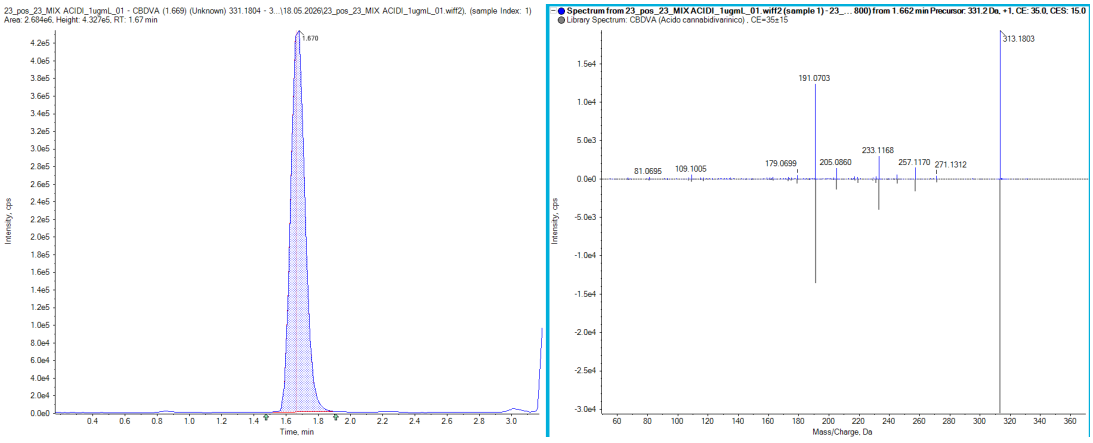


Figura 96: Cromatogramma estratto (a sinistra) e spettro MS/MS (a destra) del CBDVA ottenuti mediante HPLC-MS

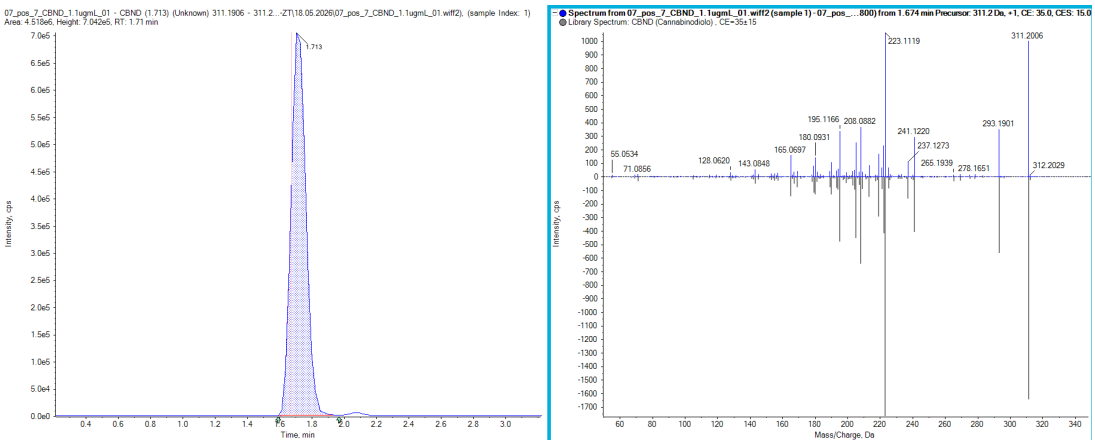


Figura 97: Cromatogramma estratto (a sinistra) e spettro MS/MS (a destra) del CBND ottenuti mediante HPLC-MS

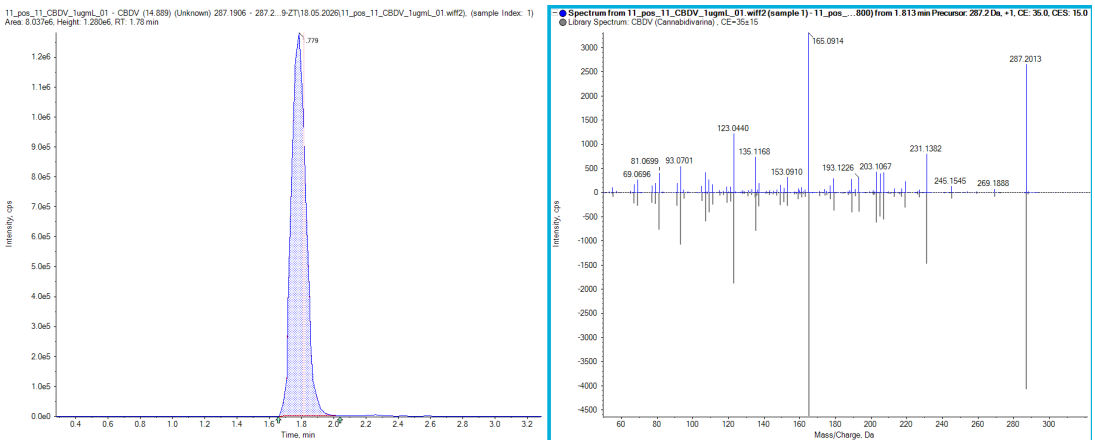


Figura 98: Cromatogramma estratto (a sinistra) e spettro MS/MS (a destra) del CBDV ottenuti mediante HPLC-MS

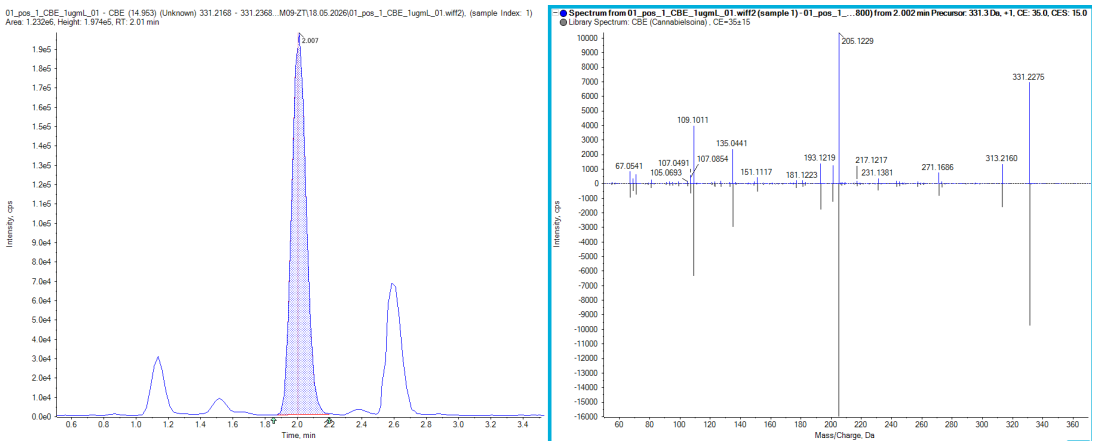


Figura 99: Cromatogramma estratto (a sinistra) e spettro MS/MS (a destra) del CBE ottenuti mediante HPLC-MS

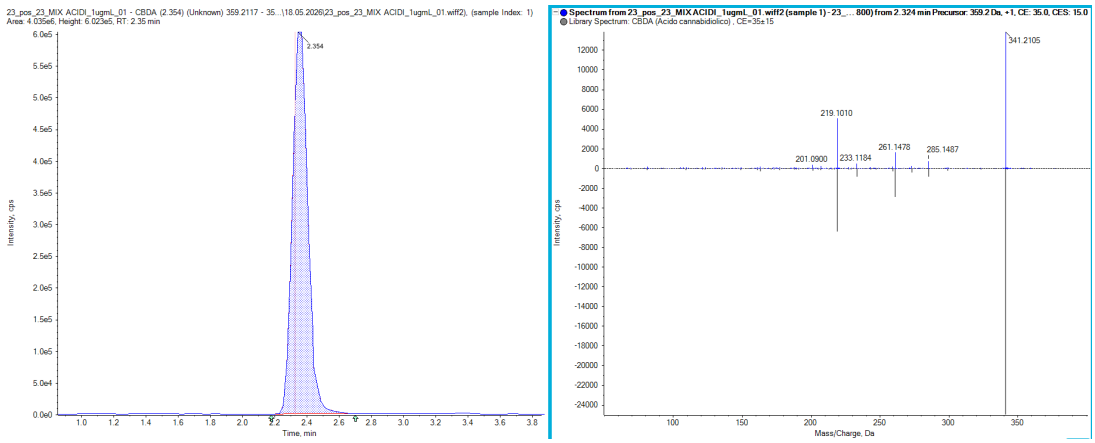


Figura 100: Cromatogramma estratto (a sinistra) e spettro MS/MS (a destra) del CBDA ottenuti mediante HPLC-MS

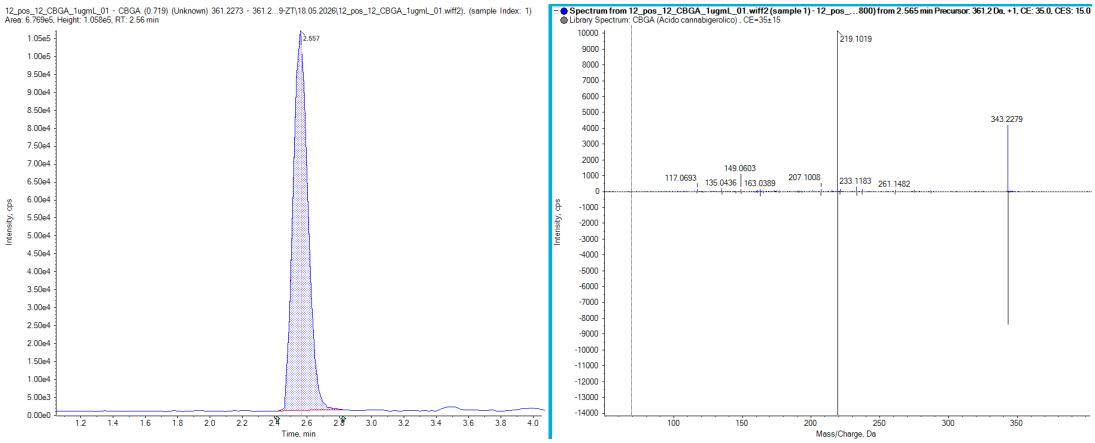


Figura 101: Cromatogramma estratto (a sinistra) e spettro MS/MS (a destra) del CBGA ottenuti mediante HPLC-MS

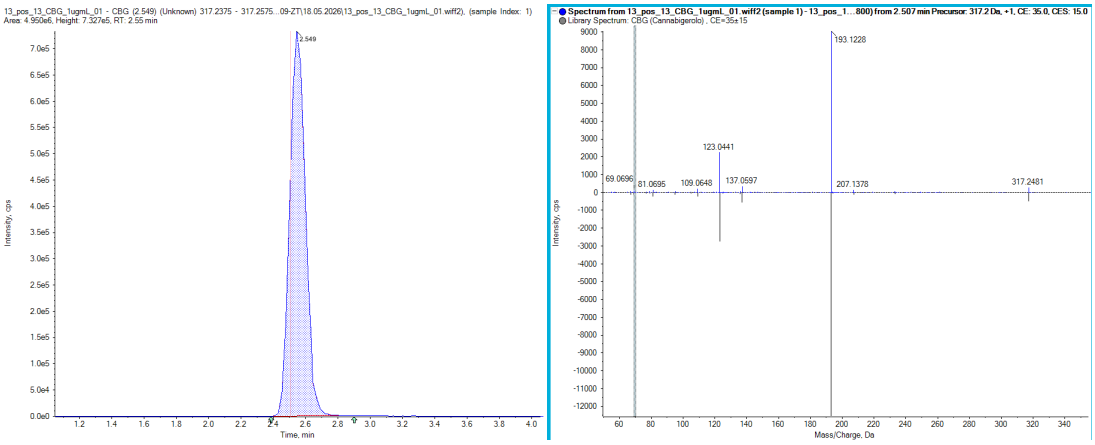


Figura 102: Cromatogramma estratto (a sinistra) e spettro MS/MS (a destra) del CBG ottenuti mediante HPLC-MS

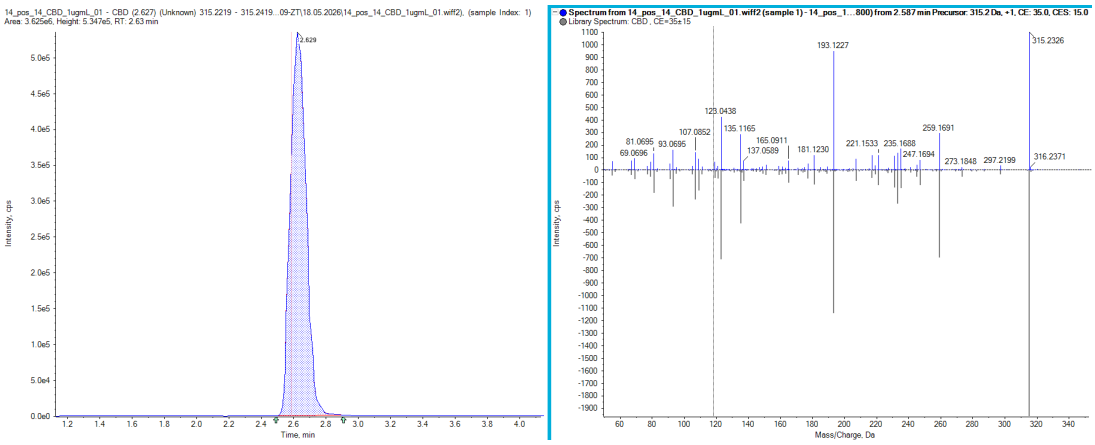


Figura 103: Cromatogramma estratto (a sinistra) e spettro MS/MS (a destra) del CBD ottenuti mediante HPLC-MS

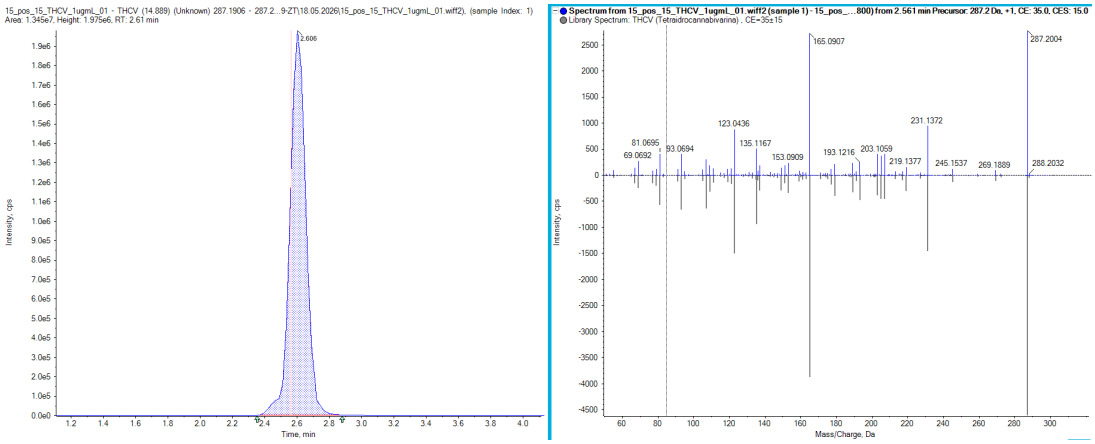


Figura 104: Cromatogramma estratto (a sinistra) e spettro MS/MS (a destra) del THCV ottenuti mediante HPLC-MS

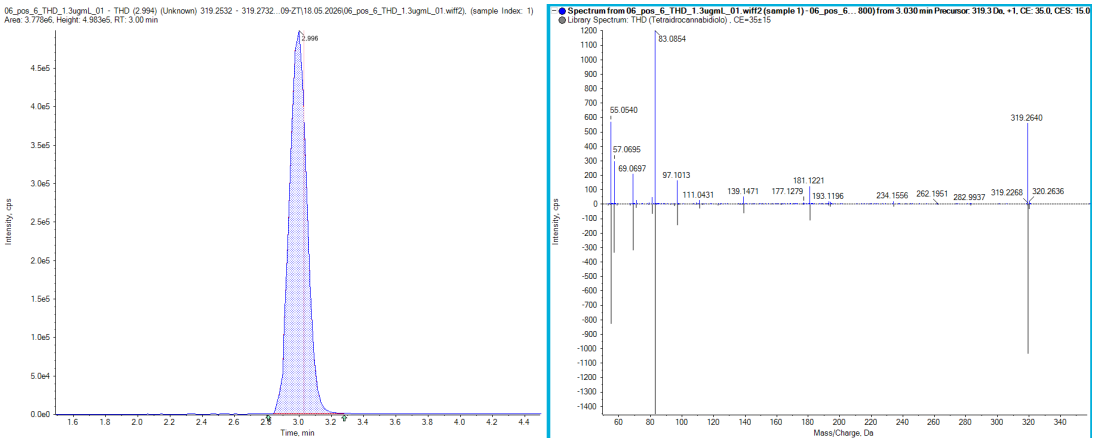


Figura 105: Cromatogramma estratto (a sinistra) e spettro MS/MS (a destra) del THD ottenuti mediante HPLC-MS

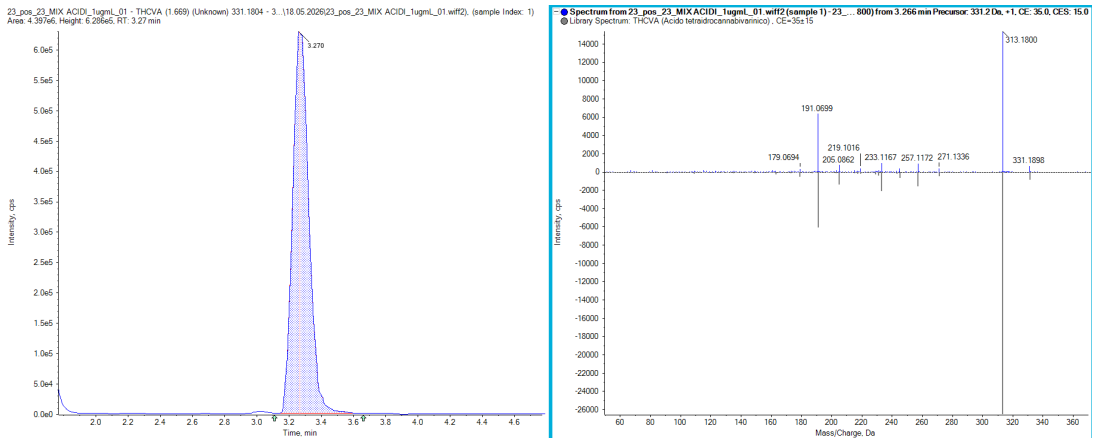


Figura 106: Cromatogramma estratto (a sinistra) e spettro MS/MS (a destra) del THCVA ottenuti mediante HPLC-MS

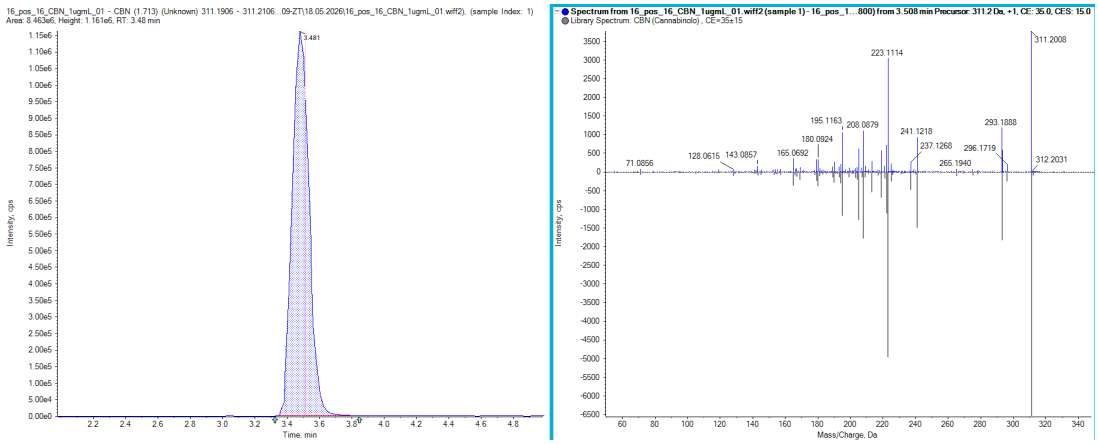


Figura 107: Cromatogramma estratto (a sinistra) e spettro MS/MS (a destra) del CBN ottenuti mediante HPLC-MS

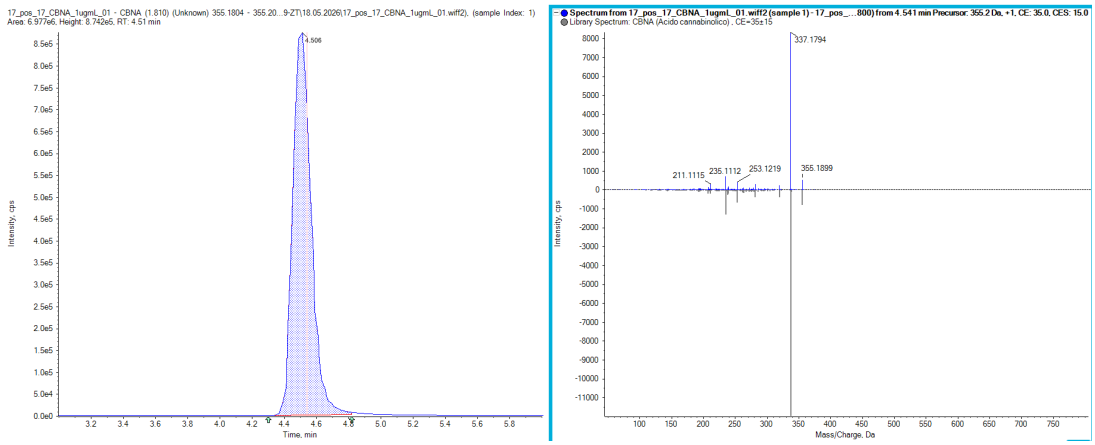


Figura 108: Cromatogramma estratto (a sinistra) e spettro MS/MS (a destra) del CBNA ottenuti mediante HPLC-MS

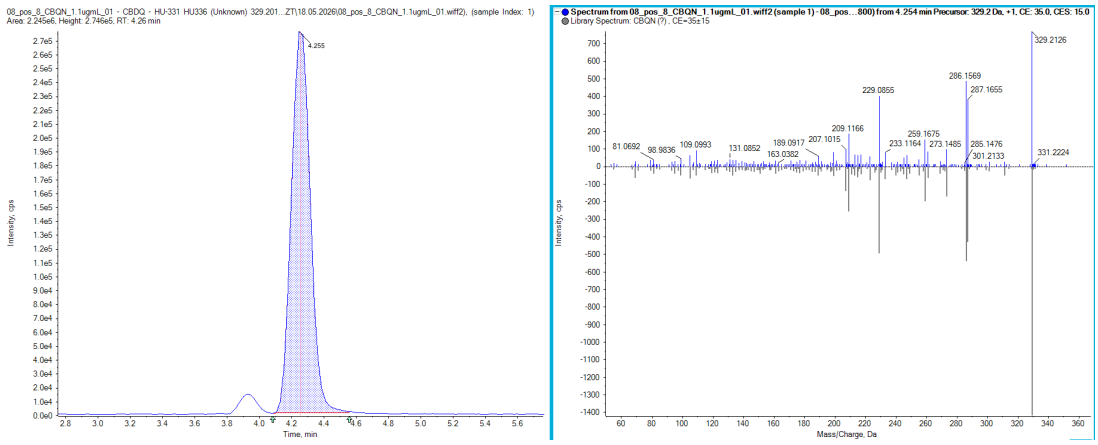


Figura 109: Cromatogramma estratto (a sinistra) e spettro MS/MS (a destra) del CBQN ottenuti mediante HPLC-MS

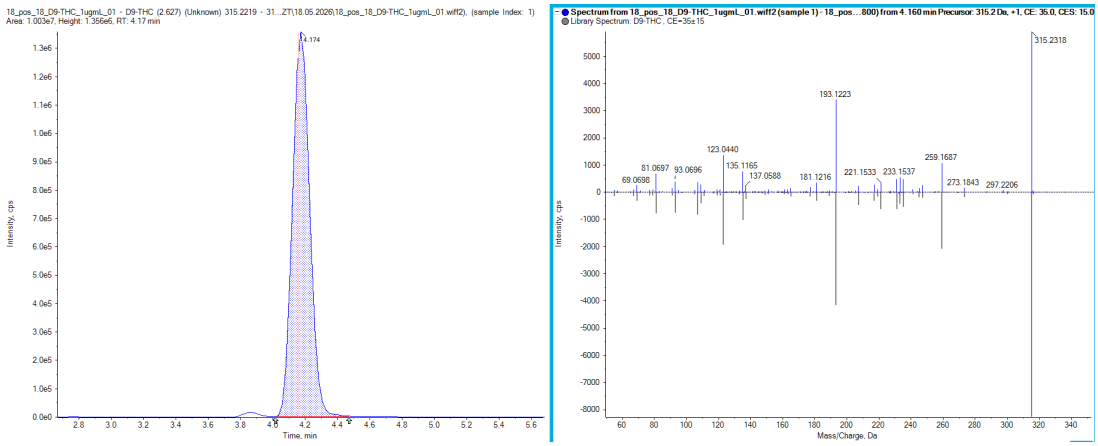


Figura 110: Cromatogramma estratto (a sinistra) e spettro MS/MS (a destra) del Δ^9-THC ottenuti mediante HPLC-MS

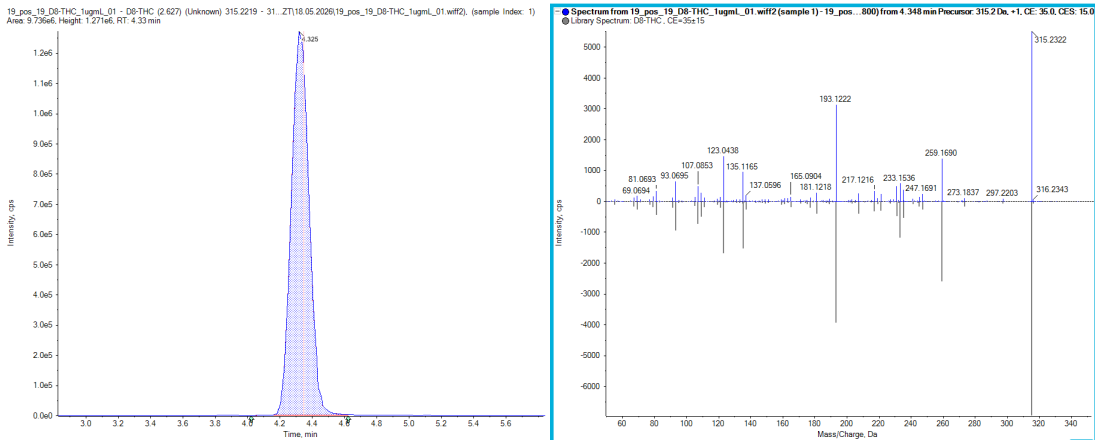


Figura 111: Cromatogramma estratto (a sinistra) e spettro MS/MS (a destra) del Δ^8-THC ottenuti mediante HPLC-MS

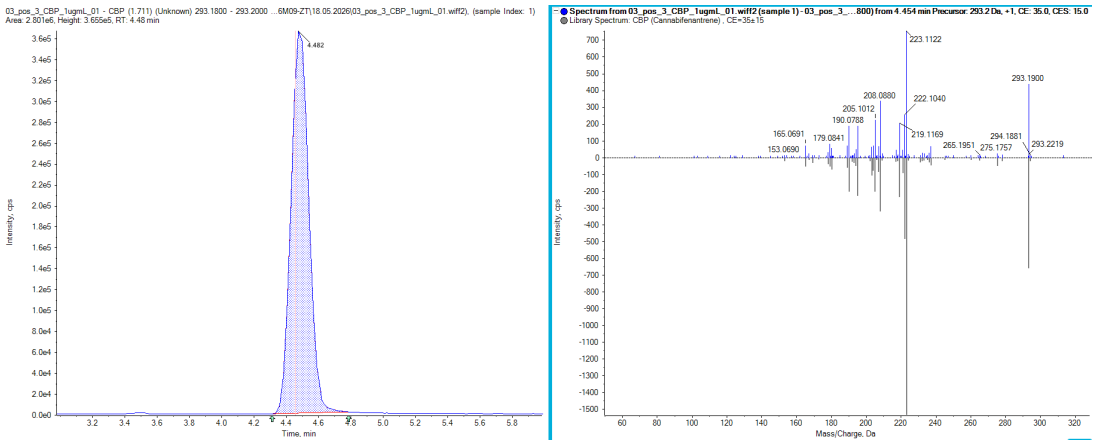


Figura 112: Cromatogramma estratto (a sinistra) e spettro MS/MS (a destra) del CBP ottenuti mediante HPLC-MS

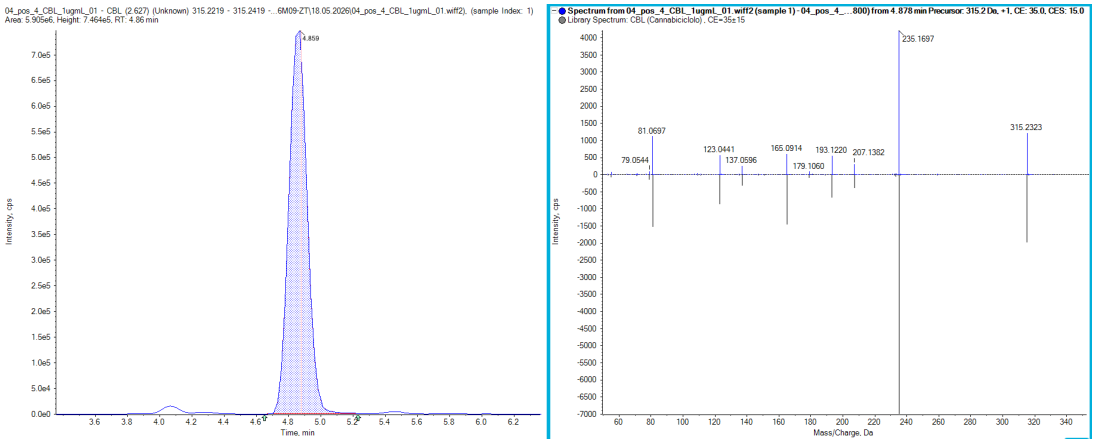


Figura 113: Cromatogramma estratto (a sinistra) e spettro MS/MS (a destra) del CBL ottenuti mediante HPLC-MS

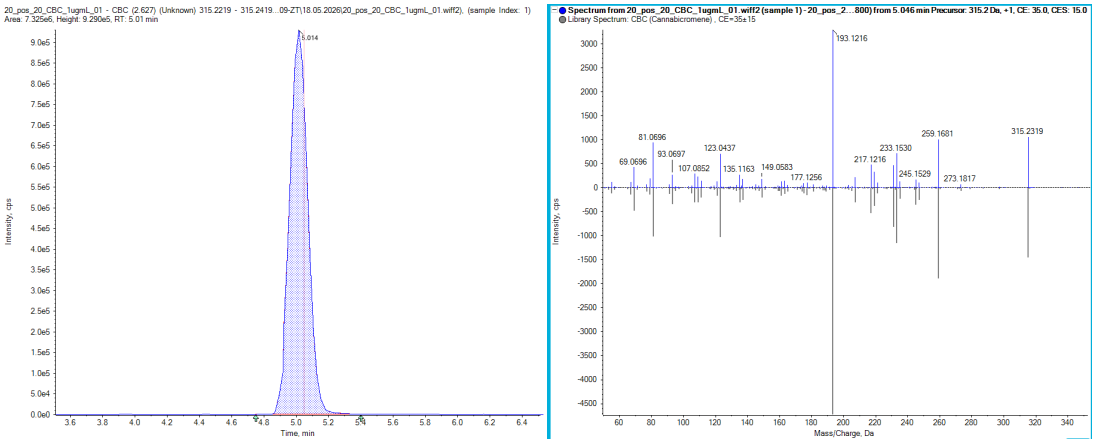


Figura 114: Cromatogramma estratto (a sinistra) e spettro MS/MS (a destra) del CBC ottenuti mediante HPLC-MS

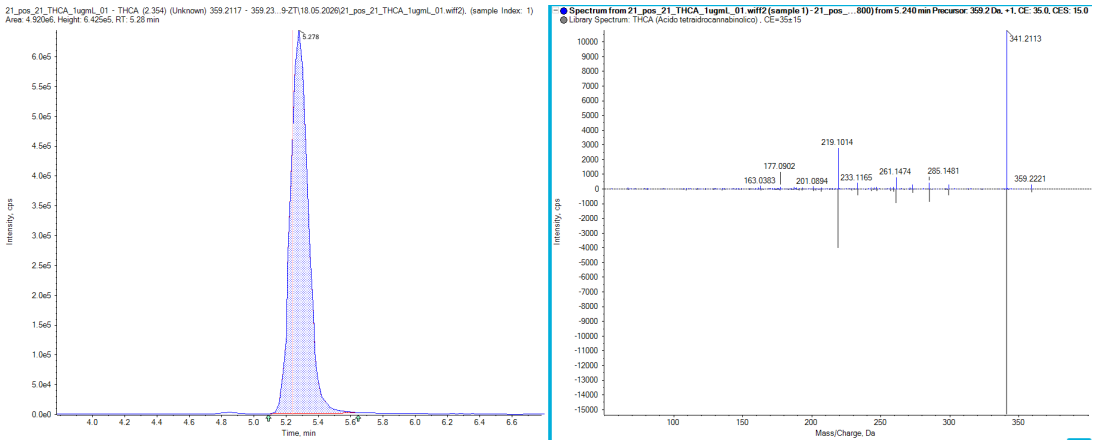


Figura 115: Cromatogramma estratto (a sinistra) e spettro MS/MS (a destra) del Δ^9-THCA ottenuti mediante HPLC-MS

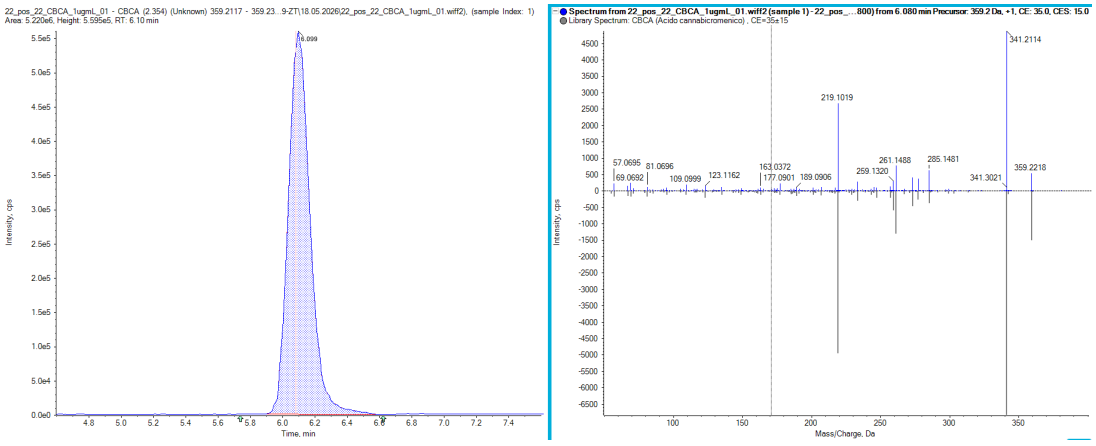


Figura 116: Cromatogramma estratto (a sinistra) e spettro MS/MS (a destra) del CBCA ottenuti mediante HPLC-MS

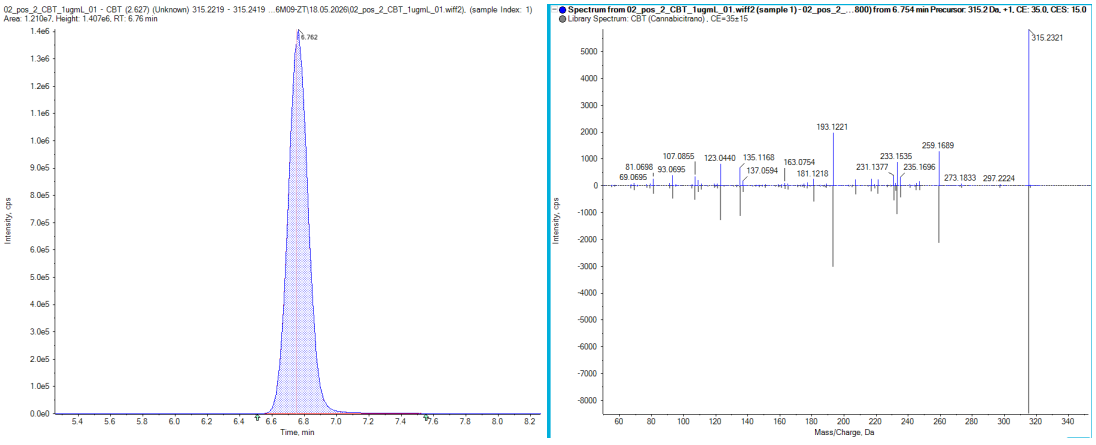


Figura 117: Cromatogramma estratto (a sinistra) e spettro MS/MS (a destra) del CBT ottenuti mediante HPLC-MS

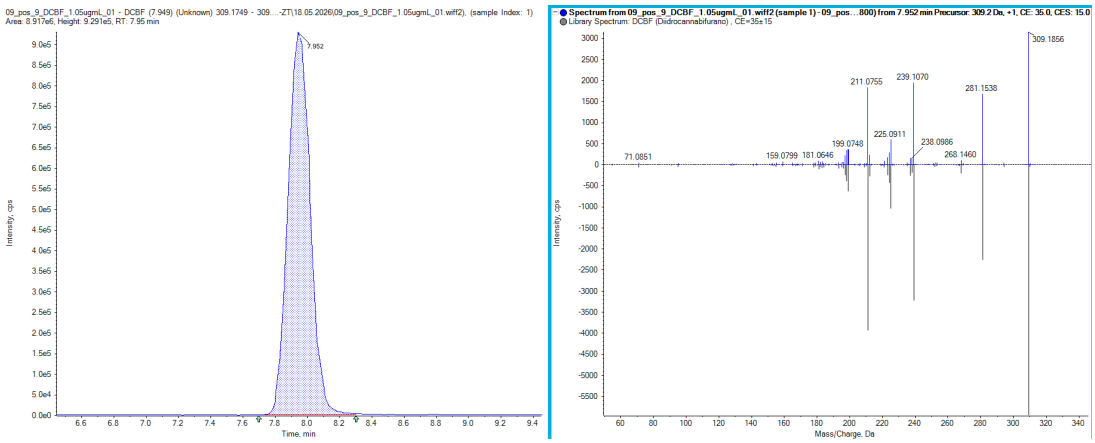


Figura 118: Cromatogramma estratto (a sinistra) e spettro MS/MS (a destra) del DCBF ottenuti mediante HPLC-MS

D Cromatogrammi HPLC-UV dei campioni reali

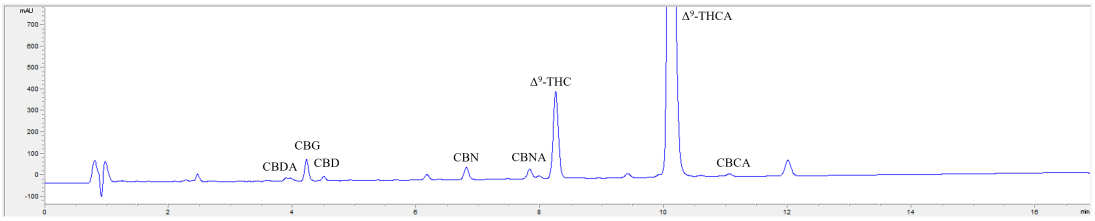


Figura 119: Cromatogramma del campione di Marijuana da strada ottenuto mediante HPLC-UV

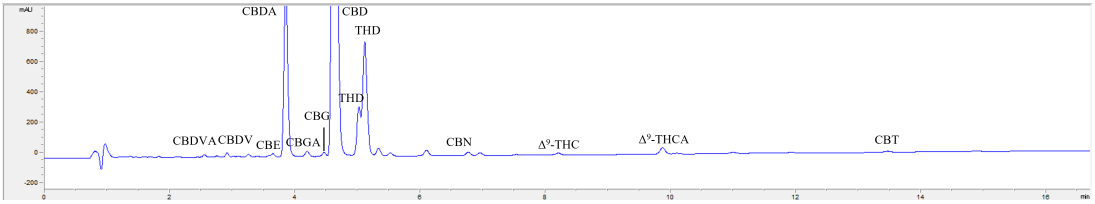


Figura 120: Cromatogramma del campione di Hashish ottenuto mediante HPLC-UV

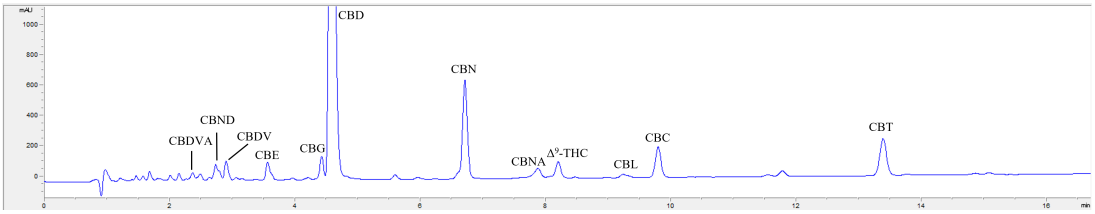


Figura 121: Cromatogramma del campione di resina di Cannabis light ottenuto mediante HPLC-UV

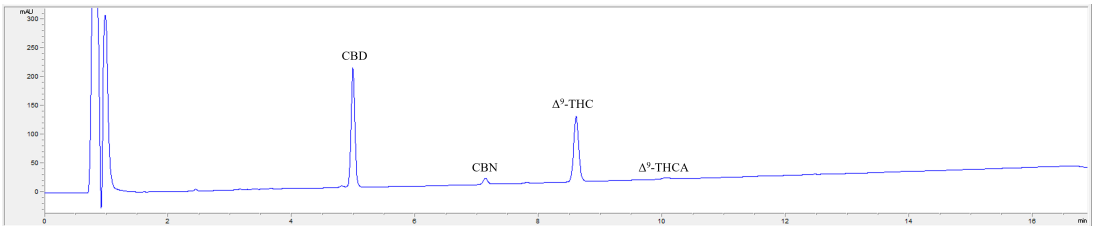


Figura 122: Cromatogramma del campione di caramella rossa ottenuto mediante HPLC-UV

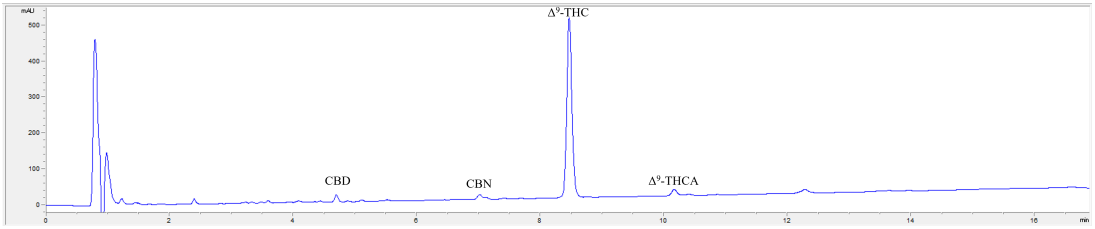


Figura 123: Cromatogramma del campione di caramella gialla ottenuto mediante HPLC-UV

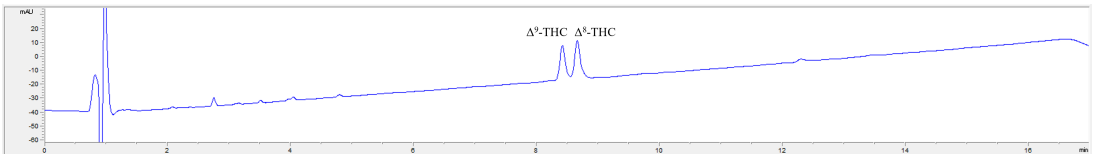


Figura 124: Cromatogramma del campione di biscotto ottenuto mediante HPLC-UV

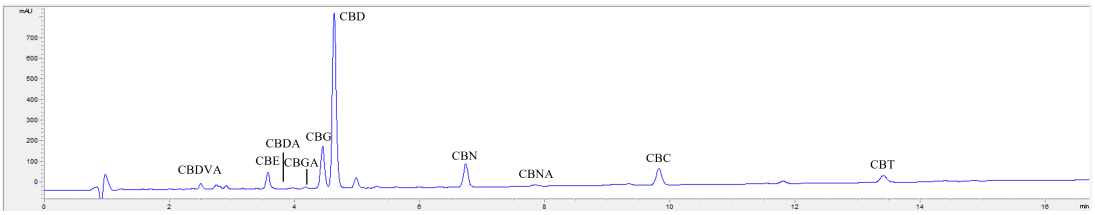


Figura 125: Cromatogramma del campione di liquido per sigaretta elettronica ottenuto mediante HPLC-UV

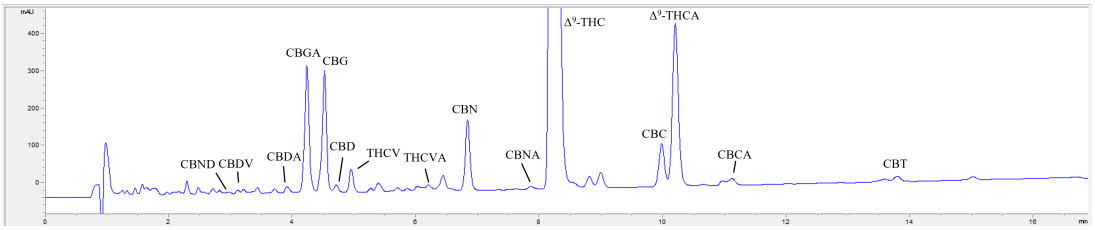


Figura 126: Cromatogramma del campione di resina Bedrocan ottenuto mediante HPLC-UV

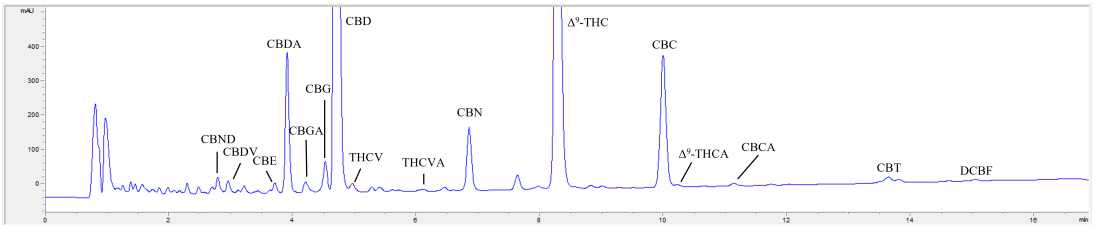


Figura 127: Cromatogramma del campione di resina Bediol ottenuto mediante HPLC-UV

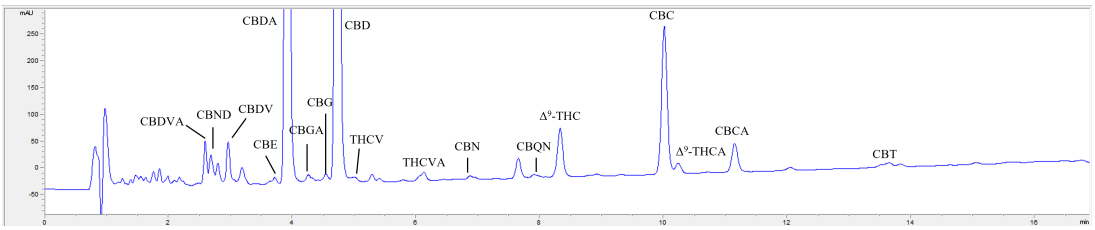


Figura 128: Cromatogramma del campione di resina Bedrolite ottenuto mediante HPLC-UV

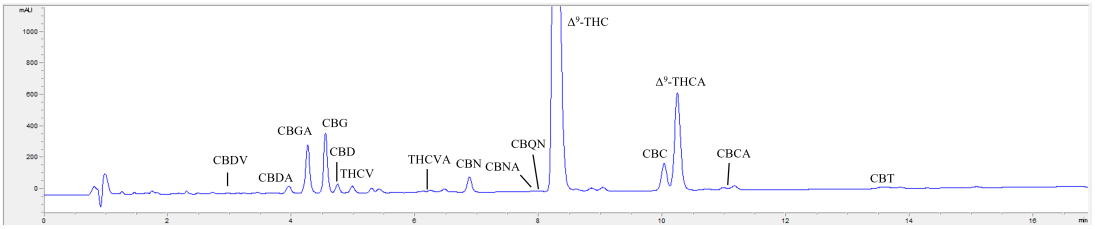


Figura 129: Cromatogramma del campione di resina Bedica ottenuto mediante HPLC-UV

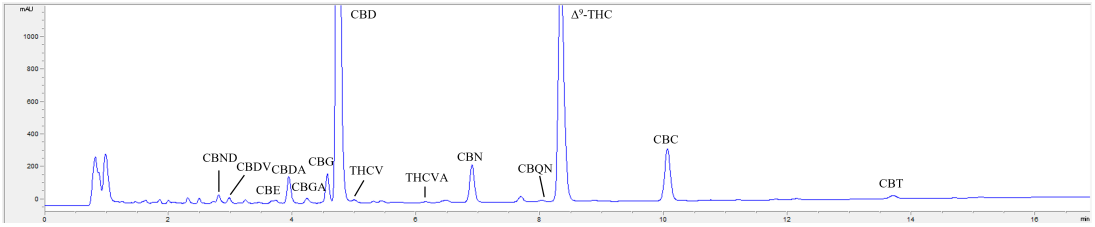


Figura 130: Cromatogramma del campione di resina FM2 ottenuto mediante HPLC-UV

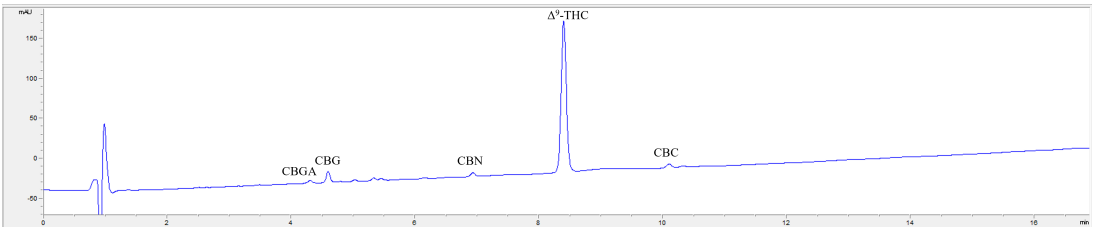


Figura 131: Cromatogramma del campione di oleolita Bedrocan ottenuto mediante HPLC-UV

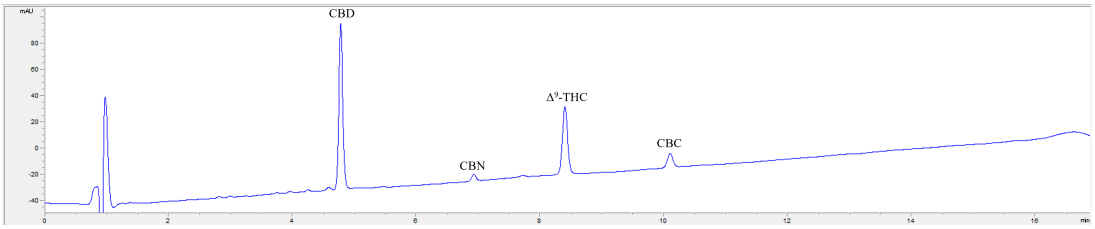


Figura 132: Cromatogramma del campione di oleolita Bediol ottenuto mediante HPLC-UV

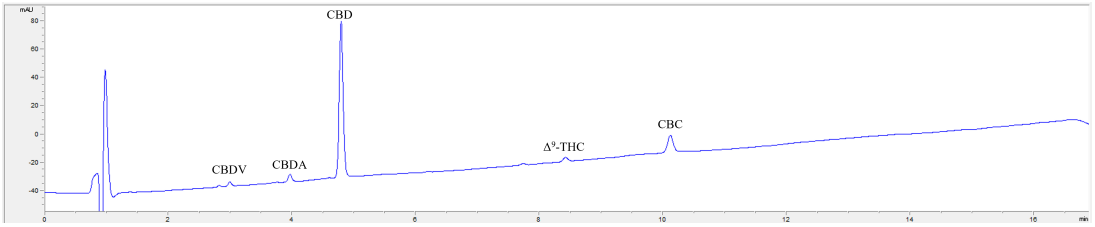


Figura 133: Cromatogramma del campione di oleolita Bedrolite ottenuto mediante HPLC-UV

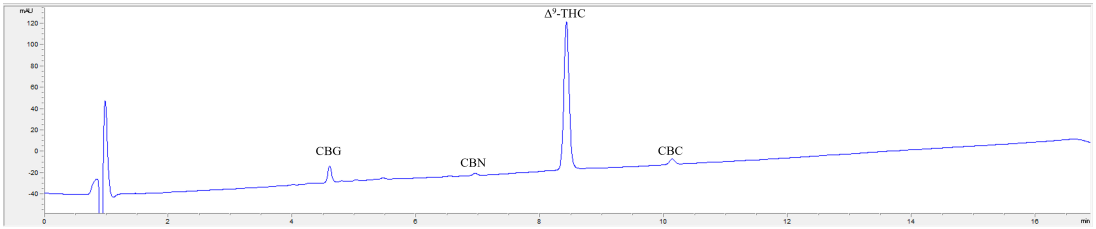


Figura 134: Cromatogramma del campione di oleolita Bedica ottenuto mediante HPLC-UV

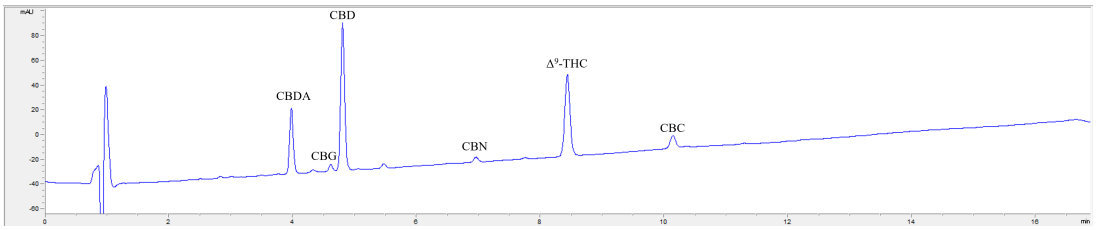


Figura 135: Cromatogramma del campione di oleolita FM2 ottenuto mediante HPLC-UV

E Cromatogrammi GC-MS dei campioni reali

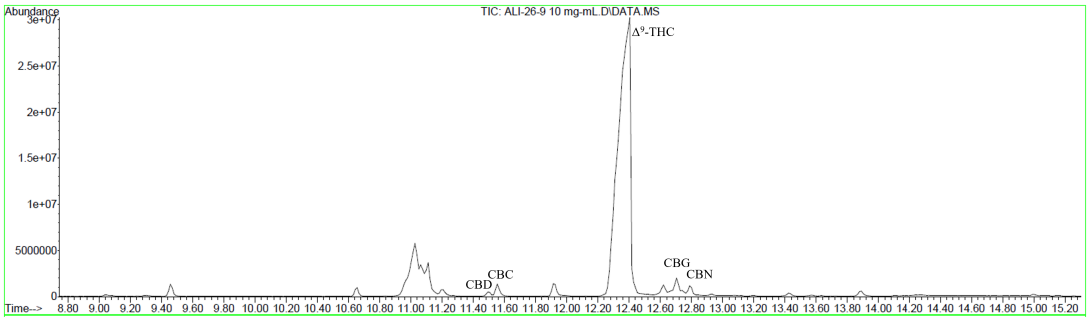


Figura 136: Cromatogramma del campione di Marijuana da strada ottenuto mediante GC-MS

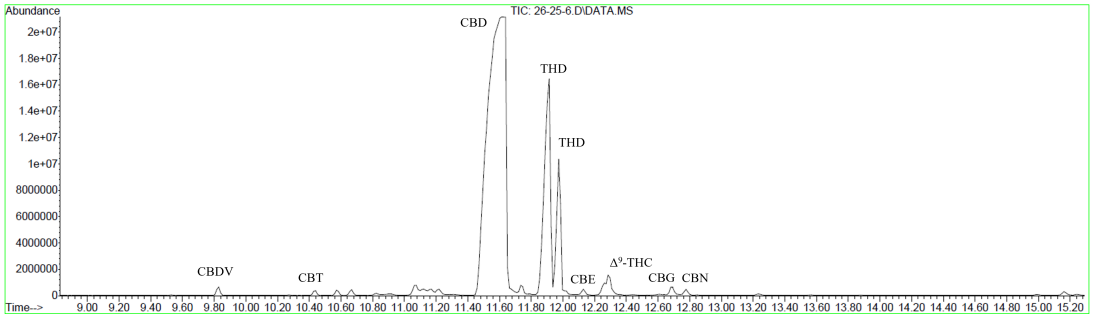


Figura 137: Cromatogramma del campione di Hashish ottenuto mediante GC-MS

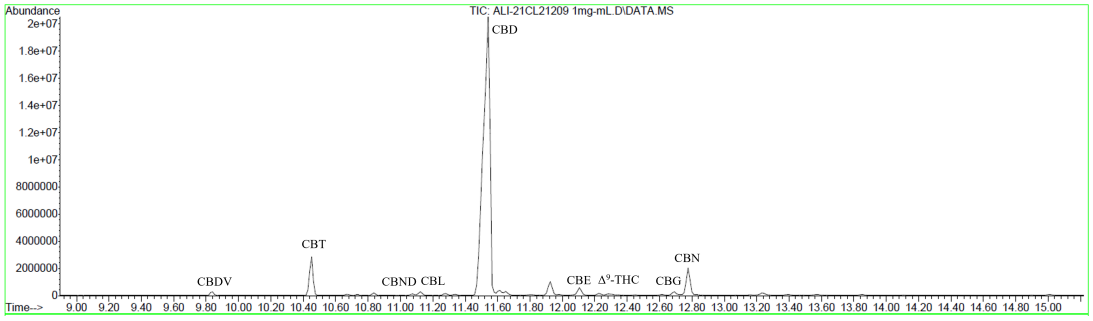


Figura 138: Cromatogramma del campione di resina di Cannabis light ottenuto mediante GC-MS

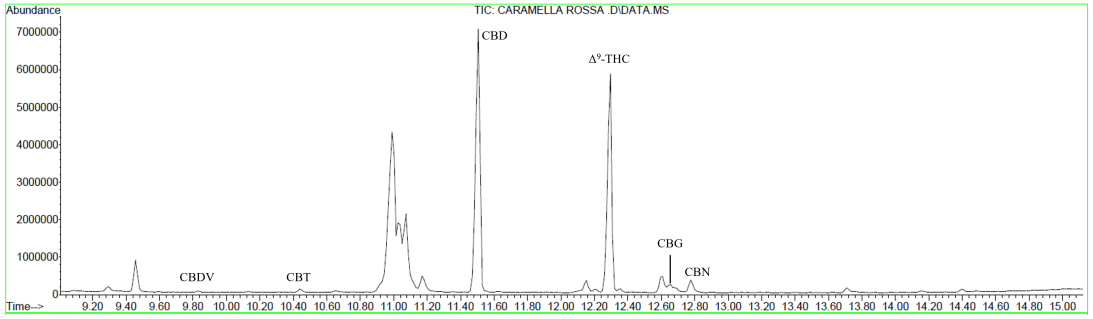


Figura 139: Cromatogramma del campione di caramella rossa ottenuto mediante GC-MS

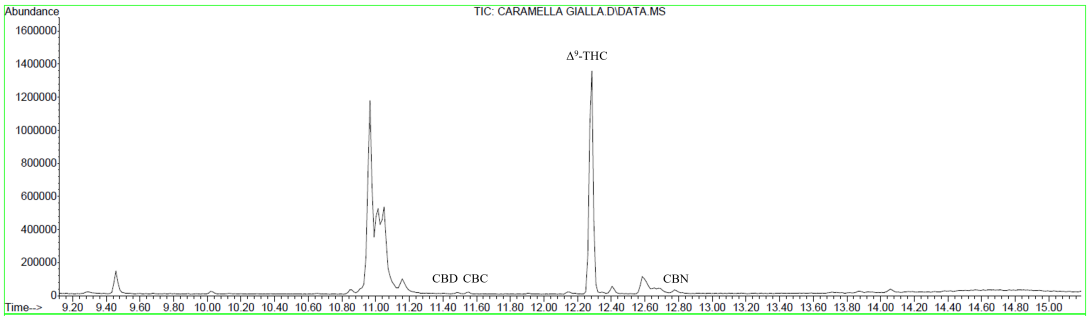


Figura 140: Cromatogramma del campione di caramella gialla ottenuto mediante GC-MS

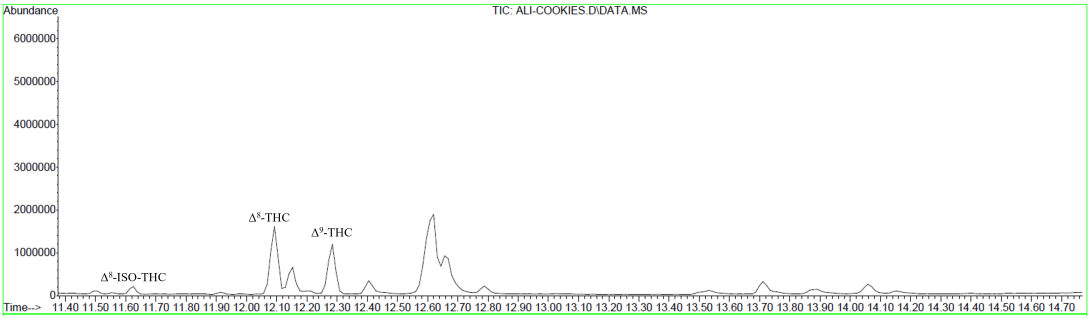


Figura 141: Cromatogramma del campione di biscotto ottenuto mediante GC-MS

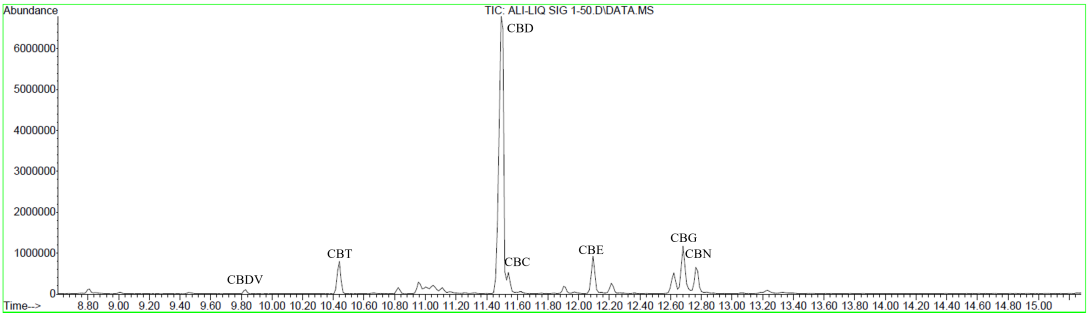


Figura 142: Cromatogramma del campione di liquido per sigaretta elettronica ottenuto mediante GC-MS

F Cromatogrammi HPLC-MS dei campioni reali

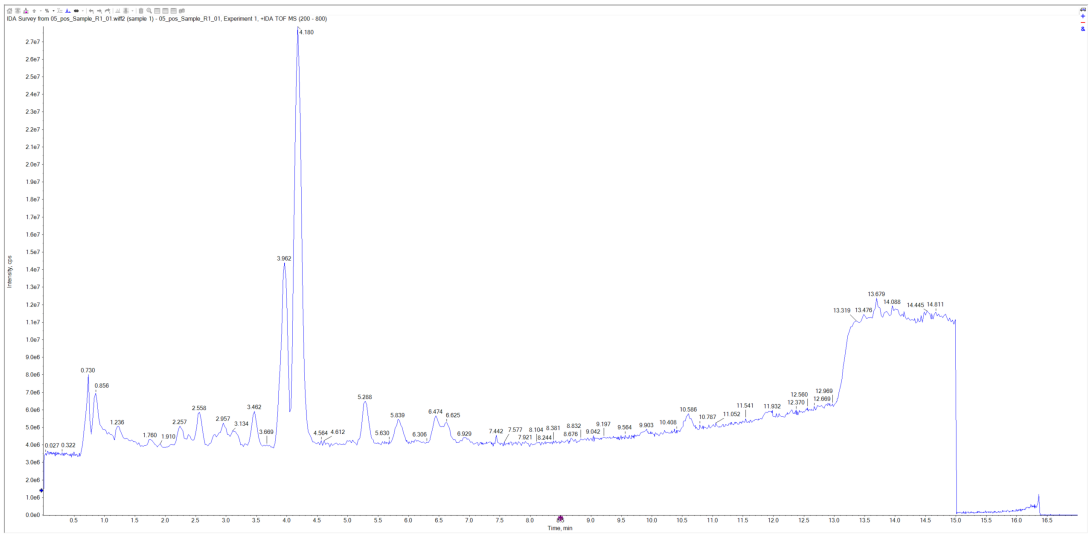


Figura 143: Cromatogramma del campione di resina Bedrocan ottenuto mediante HPLC-MS

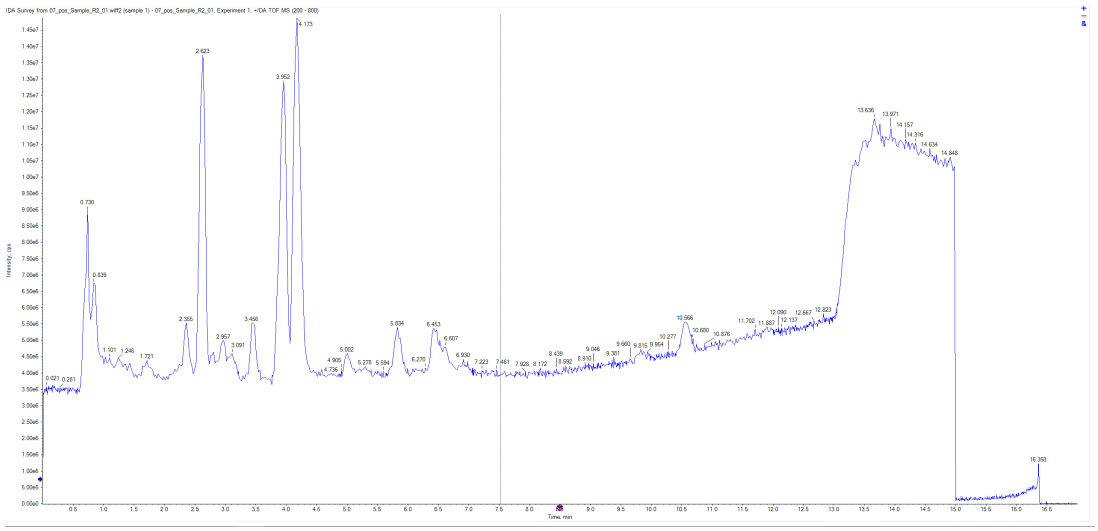


Figura 144: Cromatogramma del campione di resina Bediol ottenuto mediante HPLC-MS

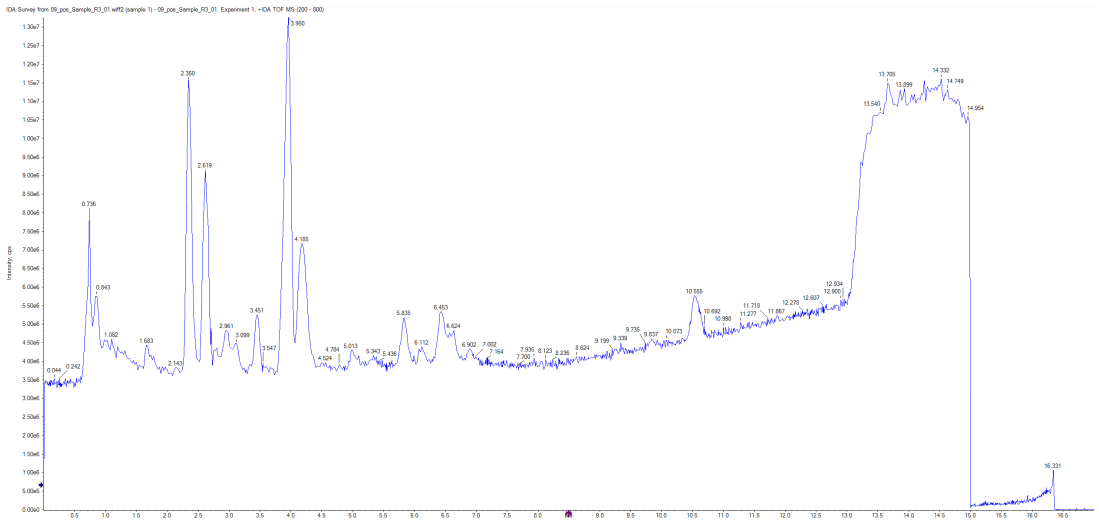


Figura 145: Cromatogramma del campione di resina Bedrolite ottenuto mediante HPLC-MS

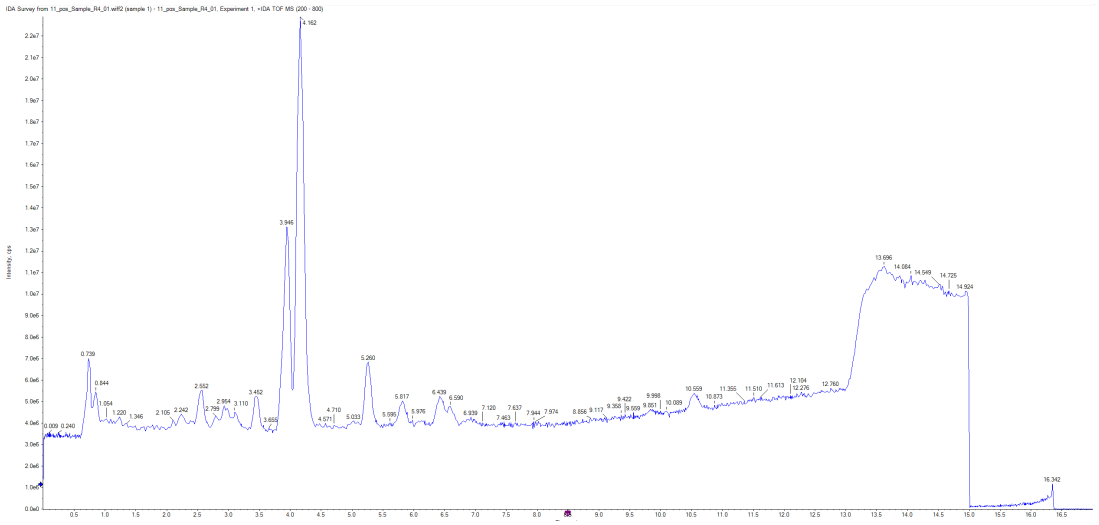


Figura 146: Cromatogramma del campione di resina Bedica ottenuto mediante HPLC-MS

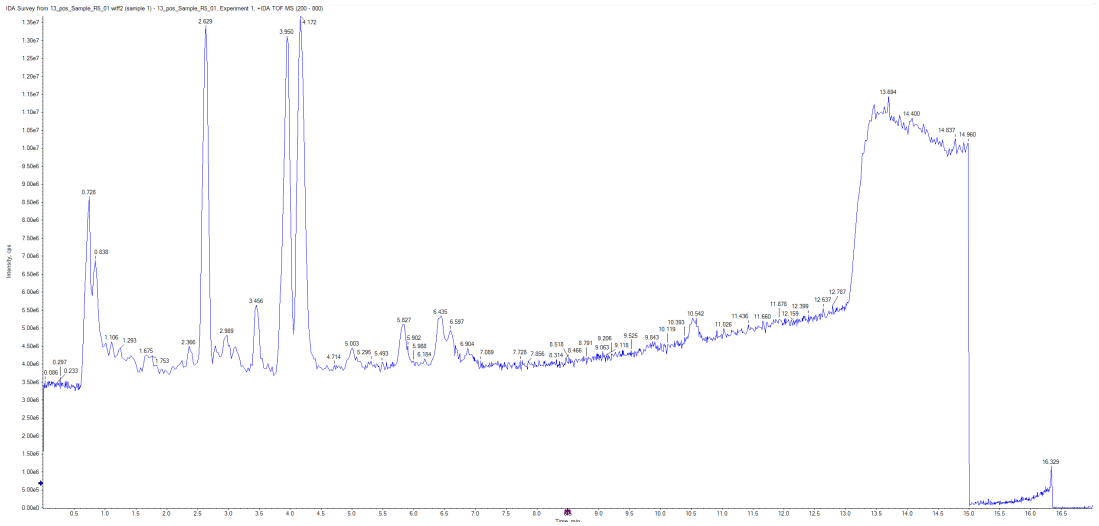


Figura 147: Cromatogramma del campione di resina FM2 ottenuto mediante HPLC-MS

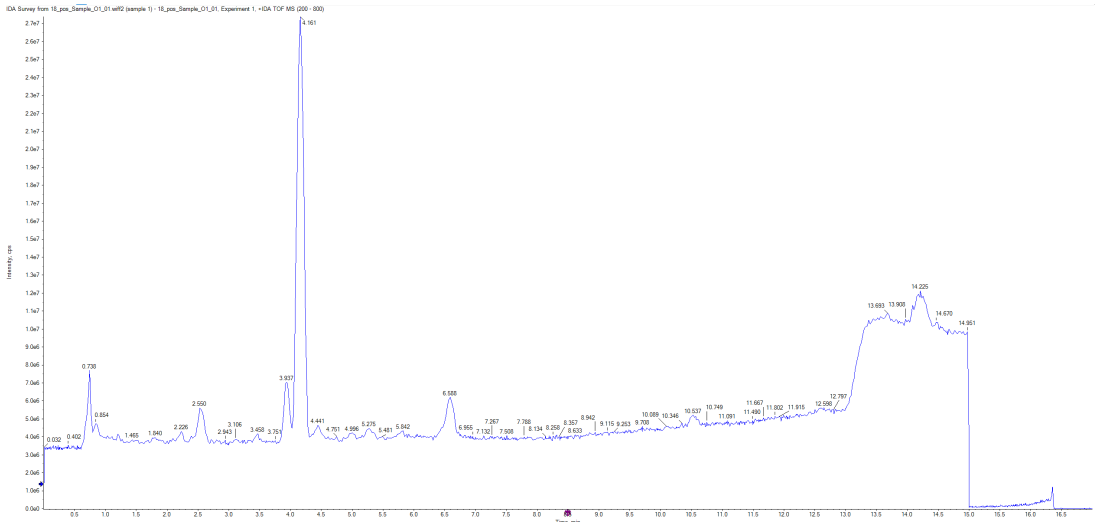


Figura 148: Cromatogramma del campione di oleolita Bedrocan ottenuto mediante HPLC-MS

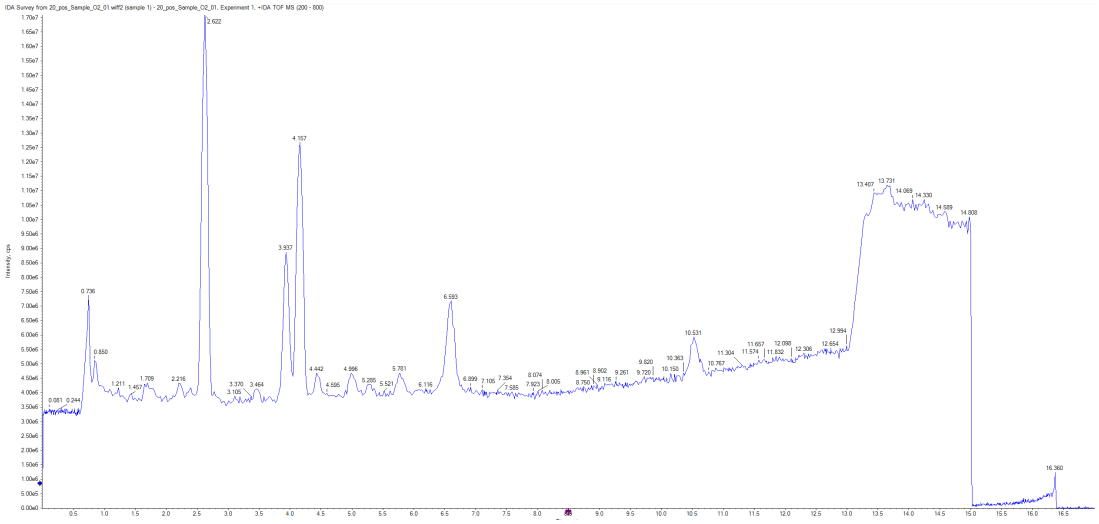


Figura 149: Cromatogramma del campione di oleolita Bediol ottenuto mediante HPLC-MS

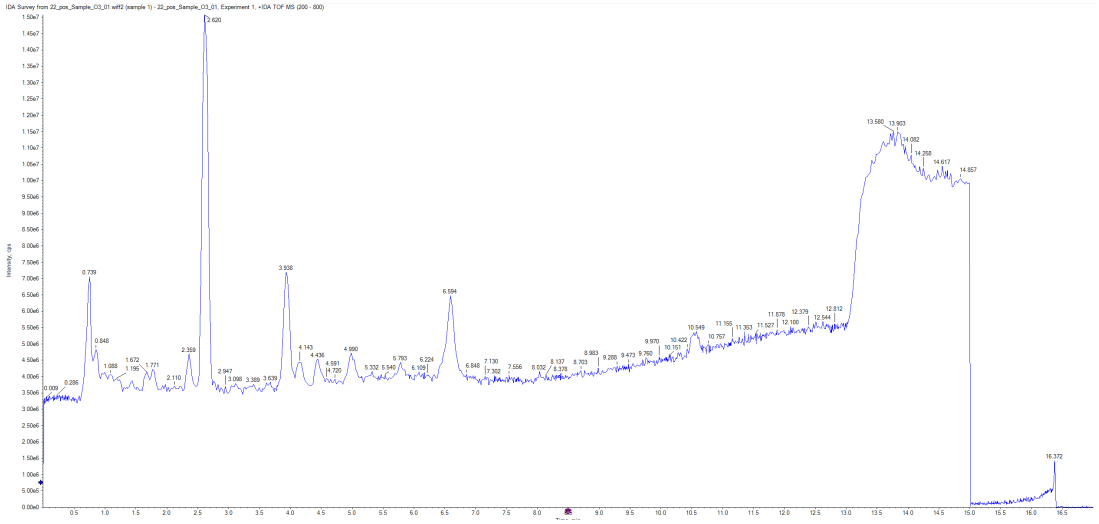


Figura 150: Cromatogramma del campione di oleolita Bedrolite ottenuto mediante HPLC-MS

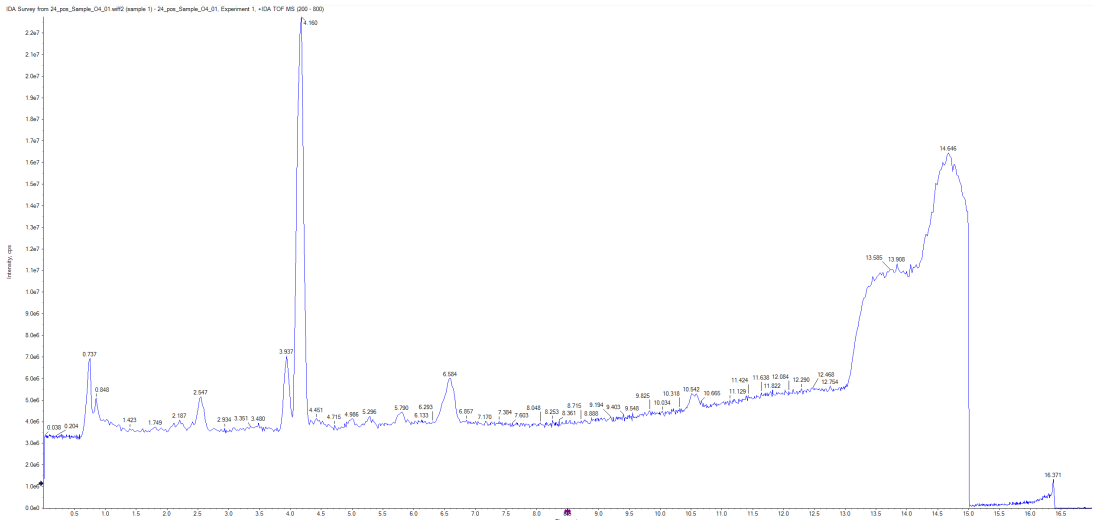


Figura 151: Cromatogramma del campione di oleolita Bedica ottenuto mediante HPLC-MS

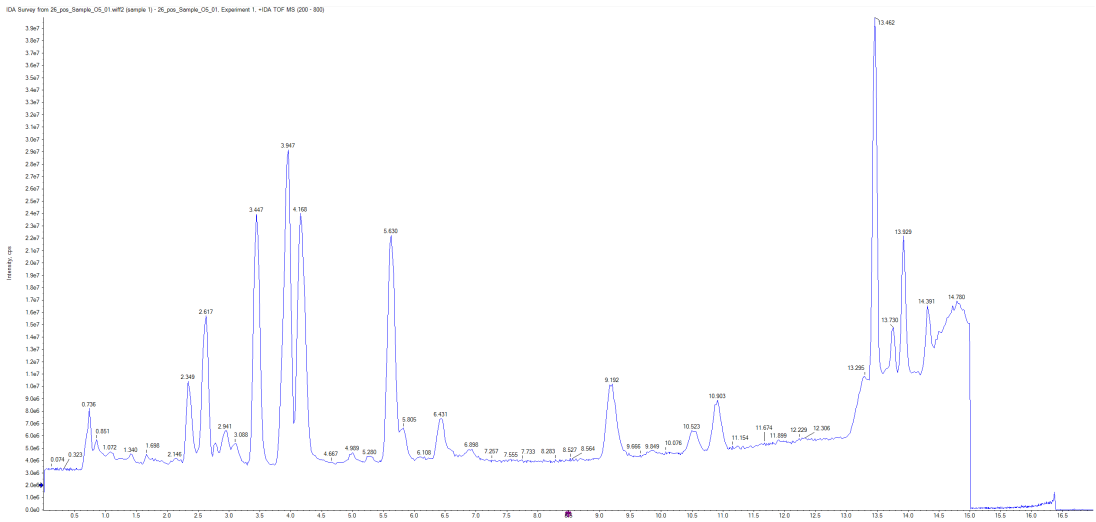


Figura 152: Cromatogramma del campione di oleolita FM2 ottenuto mediante HPLC-MS

Riferimenti bibliografici

[1] John M. McPartland. Cannabis systematics at the levels of family, genus, and species. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 3(1):203–212, 2018.

[2] Mohamed M. Radwan, Suman Chandra, Shahbaz Gul, and Mahmoud A. ElSohly. Cannabinoids, phenolics, terpenes and alkaloids of Cannabis. *Molecules*, 26(9):2774, 2021.

[3] C. A. S. Tanney, R. Backer, A. Geitmann, and D. L. Smith. Cannabis glandular trichomes: A cellular metabolite factory. *Frontiers in Plant Science*, 12:721986, 2021.

[4] David Charles Simiyu, Jin Hoon Jang, and Ok Ran Lee. Understanding Cannabis sativa L.: Current status of propagation, use, legalization, and haploid-inducer-mediated genetic engineering. *Plants*, 11(9):1236, 2022.

[5] Ivan A. Ross. The history of Cannabis. In *Plant-Based Therapeutics, Volume 1: Cannabis sativa*, pages 1–9. Springer, Cham, 2023.

[6] Lumír Ondřej Hanuš, Stefan Martin Meyer, Eduardo Muñoz, Orazio Taglialatela-Scafati, and Giovanni Appendino. Phytocannabinoids: A unified critical inventory. *Natural Product Reports*, 33(12):1357–1392, 2016.

[7] Christelle M. Andre, Jean-Francois Hausman, and Gea Guerriero. Cannabis sativa: The plant of the thousand and one molecules. *Frontiers in Plant Science*, 7:19, 2016.

[8] Rasiravathanahalli Kaveriyappan Govindarajan, Awdhesh Kumar Mishra, Kiu-Hyung Cho, Ki-Hyun Kim, Kyoung Mi Yoon, and Kwang-Hyun Baek. Biosynthesis of phytocannabinoids and structural insights: A review. *Metabolites*, 13(3):442, 2023.

[9] Mahmoud A. ElSohly, Mohamed M. Radwan, Waseem Gul, Suman Chandra, and Ahmed Galal. Phytochemistry of Cannabis sativa L. In A. Douglas Kinghorn, Heinz Falk, Simon Gibbons, and Jun'ichi Kobayashi, editors, *Phytocannabinoids: Unraveling the Complex Chemistry and Pharmacology of Cannabis sativa*, volume 103 of *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, pages 1–36. Springer International Publishing, Cham, 2017.

[10] Crist N. Filer. Acidic cannabinoid decarboxylation. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 7(3):262–273, 2022.

[11] Krishna Prasad Bastola, Arno Hazekamp, and Robert Verpoorte. Synthesis and spectroscopic characterization of cannabinolic acid. *Planta Medica*, 73(3):273–275, 2007.

[12] Kenneth B. Walsh, Amanda E. McKinney, and Andrea E. Holmes. Minor cannabinoids: Biosynthesis, molecular pharmacology and potential therapeutic uses. *Frontiers in Pharmacology*, 12:777804, 2021.

[13] Diego Caprioglio, Hawraz Ibrahim M. Amin, Orazio Taglialatela-Scafati, Eduardo Muñoz, and Giovanni Appendino. Minor phytocannabinoids: A misleading name but a promising opportunity for biomedical research. *Biomolecules*, 12(8):1084, 2022.

[14] Andrea Capucciati, Emanuele Casali, Arianna Bini, Filippo Doria, Daniele Merli, and Alessio Porta. Easy and accessible synthesis of cannabinoids from CBD. *Journal of Natural Products*, 87(4):869–875, 2024.

[15] Mehdi Haghdoost, Scott Young, Matthew Roberts, Caitlyn Krebs, and Marcel O. Bonn-Miller. Cannabielsoin (CBE), a CBD oxidation product, is a biased CB1 agonist. *Biomedicines*, 12(7):1551, 2024.

[16] C. A. L. Bercht, R. J. J. Ch. Lousberg, F. J. E. M. Küppers, and C. A. Salemink. Cannabicitran: A new naturally occurring tetracyclic diether from Lebanese Cannabis sativa. *Phytochemistry*, 13(3):619–621, 1974.

[17] Jared S. Wood, William H. Gordon, Jeremy B. Morgan, and R. Thomas Williamson. Cannabicitran: Its unexpected racemic nature and potential origins. *Chirality*, 35(9):540–548, 2023.

[18] Arianna Bini, Sofia Salerno, Stefano Protti, Federica Pollastro, Antonella Profumo, Luca Morini, and Daniele Merli. Photodegradation of cannabidiol (CBD) and Δ^9-THC in cannabis plant material. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 23(7):1239–1249, 2024.

[19] Diego Caprioglio, Daiana Mattoteia, Federica Pollastro, Roberto Negri, Annalisa Lopatriello, Giuseppina Chianese, Alberto Minassi, Juan A. Collado, Eduardo Muñoz, Orazio Taglialatela-Scafati, and Giovanni Appendino. The oxidation of phytocannabinoids to cannabinoquinoids. *Journal of Natural Products*, 83(5):1711–1715, 2020.

[20] Diego Caprioglio, Daiana Mattoteia, Orazio Taglialatela-Scafati, Eduardo Muñoz, and Giovanni Appendino. Cannabinoquinones: Synthesis and biological profile. *Biomolecules*, 11(7):991, 2021.

[21] Willi Schirmer, Isabelle Mösch, Stefan Schürch, and Wolfgang Weinmann. Identification of tetrahydrocannabidiol metabolites in human urine. *Drug Testing and Analysis*, 17(12):2333–2346, 2025.

[22] Mauro Maccarrone, Vincenzo Di Marzo, Jürg Gertsch, Uwe Grether, Allyn C. Howlett, Tian Hua, Alexandros Makriyannis, Daniele Piomelli, Natsuo Ueda, and Mario van der Stelt. Goods and bads of the endocannabinoid system as a therapeutic target: Lessons learned after 30 years. *Pharmacological Reviews*, 75(5):885–958, 2023.

[23] Nephi Stella. THC and CBD: Similarities and differences between siblings. *Neuron*, 111(3):302–327, 2023.

[24] Marilyn A. Huestis. Human cannabinoid pharmacokinetics. *Chemistry & Biodiversity*, 4(8):1770–1804, 2007.

[25] Catherine J. Lucas, Peter Galettis, and Jennifer Schneider. The pharmacokinetics and the pharmacodynamics of cannabinoids. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 84(11):2477–2482, 2018.

[26] Presidente della Repubblica Italiana. Decreto del Presidente della Repubblica 9 ottobre 1990, n. 309. Testo unico delle leggi in materia di disciplina degli stupefacenti e sostanze psicotrope, prevenzione,

cura e riabilitazione dei relativi stati di tossicodipendenza. Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, n. 255 del 31 ottobre 1990, Supplemento Ordinario n. 67, 1990.

[27] Ministero della Salute. Decreto 9 novembre 2015. Funzioni di Organismo statale per la cannabis previsto dagli articoli 23 e 28 della convenzione unica sugli stupefacenti del 1961, come modificata nel 1972. Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, n. 279 del 30 novembre 2015, 2015.

[28] Ministero della Salute. Uso medico della cannabis. `https://www.salute.gov.it/new/it/tema/medicinali-stupefacenti-e-precursori-di-droghe/uso-medico-della-cannabis/`. Consultato il 7 ottobre 2026.

[29] Repubblica Italiana. Legge 2 dicembre 2016, n. 242. Disposizioni per la promozione della coltivazione e della filiera agroindustriale della canapa. Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, n. 304 del 30 dicembre 2016, 2016.

[30] Repubblica Italiana. Decreto-legge 11 aprile 2025, n. 48. Disposizioni urgenti in materia di sicurezza pubblica, di tutela del personale in servizio, nonché di vittime dell'usura e di ordinamento penitenziario. Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, n. 85 dell'11 aprile 2025, 2025. Convertito, senza modificazioni, dalla Legge 9 giugno 2025, n. 80.

[31] Commissione Europea. Regolamento (UE) 2023/915 della Commissione del 25 aprile 2023 relativo ai tenori massimi di alcuni contaminanti negli alimenti e che abroga il regolamento (CE) n. 1881/2006. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, L 119 del 5 maggio 2023, 2023.

[32] Parlamento Europeo e Consiglio dell'Unione Europea. Regolamento (UE) 2015/2283 del Parlamento europeo e del Consiglio del 25 novembre 2015 relativo ai nuovi alimenti. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, L 327 dell'11 dicembre 2015, 2015.

[33] Repubblica Italiana. Decreto legislativo 12 gennaio 2016, n. 6. Recepimento della direttiva 2014/40/UE sul ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari e amministrative degli Stati membri relative alla lavorazione, alla presentazione e alla vendita dei prodotti del tabacco e dei prodotti correlati e che abroga la direttiva 2001/37/CE. Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, n. 13 del 18 gennaio 2016, 2016.

[34] Cinzia Citti, Fabiana Russo, Salvatore Sgrò, Alfonso Gallo, Antonio Zanotto, Flavio Forni, Maria Angela Vandelli, Aldo Laganà, Carmela Maria Montone, Giuseppe Gigli, and Giuseppe Cannazza. Pitfalls in the analysis of phytocannabinoids in cannabis inflorescence. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412(17):4009–4022, 2020.

[35] Gjoshe Stefkov, Ivana Cvetkovikj Karanfilova, Veronika Stoilkovska Gjorgievska, Ana Trajkovska, Nikola Geskovski, Marija Karapandzova, and Svetlana Kulevanova. Analytical techniques for phytocannabinoid profiling of cannabis and cannabis-based products—A comprehensive review. *Molecules*, 27(3):975, 2022.

[36] Lutfun Nahar, Mingquan Guo, and Satyajit D. Sarker. Gas chromatographic analysis of naturally occurring cannabinoids: A review of literature published during the past decade. *Phytochemical Analysis*, 31(2):135–146, 2020.

[37] Lutfun Nahar, Georgiana-Luminita Gavril, and Satyajit D. Sarker. Application of gas chromatography in the analysis of phytocannabinoids: An update (2020–2023). *Phytochemical Analysis*, 34(8):903–924, 2023.

[38] Eduarda M. P. Silva, Antonella Vitiello, Agnese Miro, and Carlos J. A. Ribeiro. Recent HPLC-UV approaches for cannabinoid analysis: From extraction to method validation and quantification compliance. *Pharmaceuticals*, 18(6):786, 2025.

[39] Anna Laura Capriotti, Giuseppe Cannazza, Martina Catani, Chiara Cavaliere, Alberto Cavazzini, Andrea Cerrato, Cinzia Citti, Simona Felletti, Carmela Maria Montone, Susy Piovesana, and Aldo Laganà. Recent applications of mass spectrometry for the characterization of cannabis and hemp phytocannabinoids: From targeted to untargeted analysis. *Journal of Chromatography A*, 1655:462492, 2021.

[40] Caterina Durante, Lisa Anceschi, Virginia Brighenti, Clarissa Caroli, Cindy Afezolli, Andrea Marchetti, Marina Cocchi, Stefano Salamone, Federica Pollastro, and Federica Pellati. Application of experimental design in HPLC method optimisation for the simultaneous determination of multiple bioactive cannabinoids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 221:115037, 2022.

[41] Mostafa A. Elhendawy, Mohamed M. Radwan, Elsayed A. Ibrahim, Amira S. Wanas, Suman Chandra, Murrell Godfrey, and Mahmoud A. ElSohly. Validation and quantitation of fifteen cannabinoids in cannabis and marketed products using high-performance liquid chromatography-ultraviolet/photodiode array method. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 9(4):e1091–e1107, 2024.

[42] Arianna Bini, Elisa Roda, Stefano Protti, Luca Morini, Antonella Profumo, Marco Cavallo, Adolfo Gregori, Carlo Alessandro Locatelli, and Daniele Merli. GC-MS as a valuable tool for analysing cannabinoid-containing gummies and identifying the synthetic process used for their production. *Forensic Chemistry*, 44:100672, 2025.