



Università  
Ca' Foscari  
Venezia

*Corso di laurea magistrale in  
Chimica e tecnologie sostenibili*

**Tesi di laurea**

STUDIO DI METODI ANALITICI PER LA  
DETERMINAZIONE DI COMPOSTI ORGANICI IN FLUIDI  
BIOLOGICI

Laureanda: **Gloria Berlese (842734)**

Relatore interno: **Prof.ssa Ligia Maria Moretto**

Relatore esterno: **Dottor Andrea Zanardo**

Anno accademico: **2018/2019**

# Indice

<u>Scopo della ricerca</u>	4
<u>Capitolo 1. Introduzione</u>	5
1.1 <u>Ossalati e citrati presenti nelle urine</u>	5
1.1.2 <u>Acido ossalico</u>	6
1.1.3 <u>Acido citrico</u>	8
1.1.4 <u>Metodo attualmente in uso</u>	8
1.1.5 <u>Complessi metallici degli acidi carbossilici</u>	9
1.2 <u>Cannabis e i suoi componenti</u>	9
1.2.1 <u>Botanica</u>	9
1.2.2 <u>Composizione chimica</u>	13
1.2.3 <u>Derivati sintetici</u>	18
1.2.4 <u>Proprietà farmacologiche</u>	20
1.2.5 <u>Recettori cannabinoidi</u>	21
1.2.6 <u>Applicazioni terapeutiche dei cannabinoidi</u>	29
1.2.7 <u>Legislazione sull'uso dei cannabinoidi</u>	34
1.2.8 <u>Realtà attuale</u>	35
1.2.9 <u>Tecniche di estrazione</u>	37
1.2.10 <u>Metodi analitici per la caratterizzazione dei composti</u>	41
<u>Capitolo 2. Parte sperimentale</u>	43
2.1 <u>Determinazione ossalati e citrati</u>	43
2.1.1 <u>Preparazione delle soluzioni</u>	43
2.2 <u>Ottimizzazione del metodo cromatografico per l'analisi dei     <u>Cannabinoidi</u></u>	43

2.2.1 <u>Preparazione degli standard</u>	43
2.2.2 <u>Preparazione della fase mobile</u>	43
2.2.3 <u>Strumentazione HPLC</u>	44
2.2.4 <u>Colonne cromatografiche</u>	44
2.2.5 <u>Preparazione degli standard di calibrazione</u>	44
2.2.6 <u>Preparazione dei campioni</u>	45
<u>Capitolo 3. Risultati e discussione</u>	46
3.1 <u>Analisi preliminari dei complessi metallici di ossalato e citrato</u>	46
3.1.1 <u>Analisi in assorbimento atomico</u>	46
3.2 <u>Ottimizzazione del metodo cromatografico per l'analisi dei cannabinoidi</u>	49
3.2.1 <u>Ottimizzazione delle condizioni di separazione</u>	49
3.2.2 <u>Colonna A</u>	50
3.2.3 <u>Colonna B</u>	58
3.2.4 <u>Altre colonne</u>	60
3.3. <u>Calibrazione</u>	60
3.3.1 <u>Colonna A</u>	61
3.3.2 <u>Colonna B</u>	62
3.4 <u>Analisi campioni reali</u>	64
3.4.1 <u>Colonna A</u>	64
3.4.2 <u>Colonna B</u>	65
<u>Capitolo 4. Conclusioni</u>	66
<u>Capitolo 5. Bibliografia</u>	69
<u>Ringraziamenti</u>	79
<u>Appendice</u>	80

## *Scopo della ricerca*

Questo lavoro di tesi è stato svolto al laboratorio dell'ospedale Ca' Foncello di Treviso, sotto la supervisione del Dottor Zanardo. Gli argomenti sono stati scelti sulla base di esigenze pratiche della struttura ospedaliera ospitante a fronte delle nuove richieste delle aziende sanitarie nazionali.

La tesi si articola in due parti: la prima riguarda la messa a punto di un nuovo metodo analitico per la determinazione di ossalati e citrati nelle urine, necessario in quanto il metodo attualmente in uso è alquanto lungo, laborioso e costoso. La seconda parte è volta ad ottimizzare un metodo in cromatografia liquida, già esistente, per la separazione e caratterizzazione dei principali componenti della *Cannabis sativa*. Questa seconda parte è oggetto di grande interesse da parte dei laboratori vista la crescita delle richieste di analisi di questa specie vegetale i cui componenti sono dotati di proprietà terapeutiche di particolare interesse. Infatti, sono sempre più numerosi gli studi che ne dimostrano l'efficacia nel trattamento di patologie soprattutto neurodegenerative. A questo si aggiungono le necessità crescenti di analisi di fluidi biologici a scopi legali in quanto queste sostanze sono classificate tra le sostanze d'abuso.

Nelle due parti della ricerca è centrale lo scopo di individuare metodi analitici ottimali sia in termini di accuratezza, sensibilità analitica, velocità delle analisi e non meno importante in termini economici, in quanto la maggior parte di queste procedure viene applicata in laboratori di analisi privati e ospedalieri, dove è necessario eseguire un numero molto elevato di analisi ogni giorno. La prima parte del progetto di ricerca è centrata su un lavoro di ricerca bibliografica volta a trovare un metodo analitico nuovo, vantaggioso ed efficace per la determinazione di ossalati e citrati nelle urine, con lo scopo di ampliarlo successivamente ad altri acidi carbossilici e a diverse matrici. Questo lavoro si sarebbe protratto oltre il periodo previsto dal tirocinio formativo e pertanto è stato interrotto in una fase iniziale; le prove preliminari hanno messo in luce tutte le difficoltà che un simile progetto avrebbe implicato, soprattutto nel momento in cui si doveva applicare il modello teorico ai campioni reali molto complessi.

La seconda parte che si è svolta in parte parallelamente alla prima, è centrata sull'ottimizzazione di un metodo in cromatografia liquida, già esistente per la caratterizzazione dei componenti della *Cannabis sativa*, con lo scopo di trovare le condizioni migliori per garantirne una buona separazione da applicare alle esigenze lavorative ovvero all'analisi di fluidi biologici, in particolare urine, a farmaci e a campioni oleosi.

## Capitolo 1. Introduzione

### ***1.1.1 Ossalati e citrati presenti nelle urine***

Numerosi studi sull'origine dei calcoli renali confermano che l'80 % di essi è costituito da ossalati di calcio, la cui formazione avviene tramite un meccanismo non ancora completamente noto. La maggior parte degli studi infatti conferma che un'alta concentrazione di ossalato urinario (iperossaluria) assume un ruolo importante come promotore di cristallizzazione, anche se la nucleazione, ovvero la prima fase della formazione dei calcoli, non dipende solo dallo stato di saturazione dell'ossalato di calcio urinario ma anche da altri fattori quali la concentrazione di inibitori e promotori della cristallizzazione urinaria. Questi studi hanno anche dimostrato l'effetto inibitorio del citrato nei confronti della calcolosi ossalico-calcica [1]. Da qui si comprende come la determinazione dei livelli di citrato e ossalato rappresenta un punto cruciale nell'investigazione dell'urolitiasi ossalico-calcica.

### ***1.1.2 Acido ossalico***

L'acido ossalico è un acido organico biprotico, la cui struttura molecolare è mostrata in Figura 1, presenta un peso molecolare di 90 g/mol e costanti di dissociazione acida uguali a  $pK_{a1} = 1.27$  e  $pK_{a2} = 3.8$ . È il più semplice acido bicarbossilico, che a pH fisiologico forma sali solubili con sodio e potassio, mentre con il calcio dà origine ad un sale insolubile. È proprio questa peculiarità dell'ossalato di calcio a renderlo un metabolita di grande importanza nella fisiologia umana, infatti il 75% dei calcoli renali sono composti principalmente da ossalato di calcio [2]. Questo sale viene escreto fisiologicamente nelle urine a livelli compresi tra 15 e 40 mg / 24 ore [2], con una variazione diurna che raggiunge le massime concentrazioni tra le 11.00 e le 23.00 h e una variazione stagionale che raggiunge l'apice nei mesi estivi [2]. Circa il 10-20 % dell'ossalato deriva dall'apporto dietetico, mentre la parte rimanente e più consistente è un prodotto del metabolismo degli acidi gliossilico e ascorbico [2]. La conversione dell'ascorbato in ossalato avviene a livello epatico [3] ed è responsabile della produzione del 35- 50% del sale, mentre la via del gliossilato determina una produzione di ossalato del 70-50% [4]. Poiché nell'uomo non esistono enzimi che metabolizzano l'ossalato, una volta prodotto questo sale deve essere completamente eliminato dall'apparato urinario.

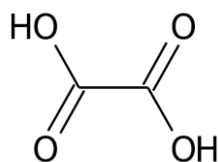


Figura 1. Struttura molecolare acido ossalico

### 1.1.3 Acido citrico:

L'acido citrico è un acido organico tricarbossilico, la cui struttura molecolare è presentata in Figura 2, presenta un peso molecolare di 192.1 g/mol e costanti di dissociazione acida uguali a  $pK_{a1}= 3.15$ ;  $pK_{a2}= 4.5$ ;  $pK_{a3}= 5.75$ . Il citrato è un inibitore urinario di grande importanza ed interesse in quanto la sua somministrazione determina un aumento del pH e della quantità di citrato urinario facilmente misurabile e che può correggere anomalie metaboliche responsabili della litogenesi, ovvero della formazione dei calcoli [5]. È la sua affinità con il calcio che consente l'abbassamento della sua concentrazione ionica diminuendo al contempo la saturazione urinaria di Sali di calcio. Il citrato inoltre è un diretto inibitore della nucleazione non solo del calcio ossalato ma anche del fosfato; a questo si aggiunge il fatto che determinando un'alcalinizzazione delle urine (pH 6-7) funge anche da inibitore della calcolosi uratica in quanto a tali valori di pH la maggior parte dell'acido urico si trova in forma dissociata e quindi solubile [5]. L'acido citrico viene prodotto dai processi ossidativi corporei, ed è un componente del ciclo degli acidi tricarbossilici, o ciclo di Krebs, responsabile della produzione di ATP durante la respirazione cellulare. Il citrato viene anche assorbito come nutriente nell'apparato intestinale sia nella forma acida che salificata ed è presente in cibi comuni come limone ed arancia.

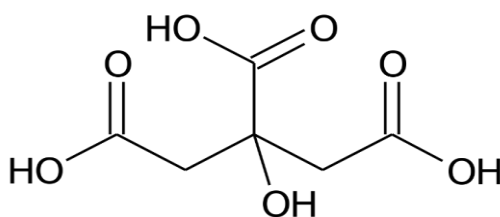


Figura 2. Acido citrico

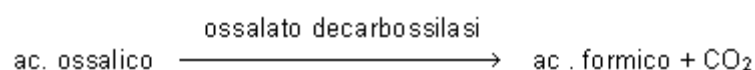
### 1.1.4 Metodi attualmente in uso

Attualmente sono in uso nei laboratori di tossicologia due metodi analitici per la determinazione di ossalati e citrati in matrici urinarie: un metodo cromatografico e uno enzimatico [5]. Nel primo caso si utilizza una procedura in cromatografia liquida, con una colonna C18 a fase inversa, lavorando a 60 °C, flusso 0.75 mL/min. e fase mobile costituita da acido solforico 0.01 molare e aceto nitrile al 5%. La lunghezza d'onda di rilevazione è 210 nm. Prima dell'iniezione è necessario purificare il campione, in modo da eliminare eventuali interferenze con i picchi dell'acido citrico, ossalico e dello standard interno. L'urina viene acidificata a pH 2 e trattata con acido fumarico (standard interno) e poi iniettata in colonna.

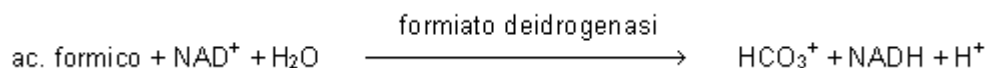
Per quanto riguarda invece il metodo enzimatico, l'analita viene precipitato come ossalato di calcio, praticamente insolubile a pH neutro o alcalino. Il precipitato è poi lavato con soluzione ammoniacale, ridisciolto in acido solforico (0,5 N) e quindi titolato con permanganato di potassio. La determinazione è resa difficoltosa nelle urine per la presenza di sostanze che influenzano negativamente la precipitazione (fosfato, magnesio) o reagiscono con il permanganato (urato, citrato).

I metodi che impiegano la tecnica di estrazione (generalmente in etere) eliminano in parte i problemi delle interferenze, ma le condizioni per una estrazione quantitativa sono estremamente critiche.

La determinazione enzimatica dell'acido ossalico richiede l'uso dell'ossalato decarbossilasi.

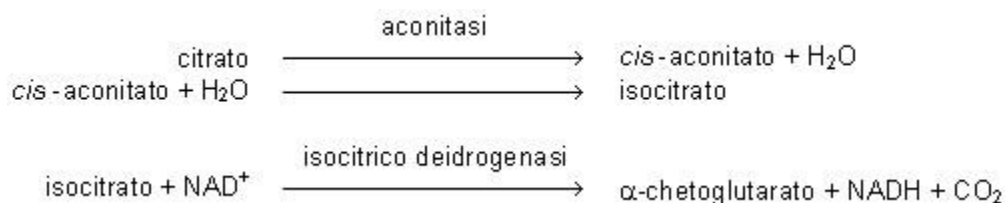


La reazione può essere seguita misurando la variazione di pH dovuta alla liberazione di CO<sub>2</sub> in un tampone alcalino o determinando direttamente il CO<sub>2</sub> prodotto mediante una tecnica gasmanometrica o enzimatica (utilizzante la formiato deidrogenasi).



L'acido citrico invece può essere determinato colorimetricamente in presenza di anidride acetica, acido tricloroacetico e piridina, misurando l'assorbimento del prodotto di reazione a 440

nm. Una determinazione enzimatica prevede l'azione combinata dell'aconitasi e della isocitrico deidrogenasi.



Confrontando queste due metodiche emerge come il metodo enzimatico tende a sovrastimare i valori di citrato rispetto al metodo cromatografico, molto probabilmente a causa della presenza di cross-reattività dell'enzima con molecole analoghe al citrato [5]. Il metodo cromatografico invece tende a sovrastimare l'ossalato a causa dell'influenza del fronte del solvente sull'acido ossalico derivante dalla stretta vicinanza dei picchi.

### 1.1.5 Complessi metallici degli acidi carbossilici

Gli anioni carbossilici, categoria a cui appartengono ossalato e citrato, sono capaci di formare complessi stabili con alcuni metalli di transizione, in particolare con ferro, rame, cromo, nichel, piombo [6]. I complessi più stabili formati con ferro, cromo e rame [7] sono complessi anionici, dotati di una cinetica di formazione piuttosto rapida, soprattutto con il citrato [8]. Un ruolo fondamentale nella formazione di questi complessi viene svolto dal pH, un suo aumento determina una maggiore dissociazione dei gruppi carbossilici e quindi influenza il grado di complessazione [7]. In Tabella 1 si riportano i valori delle costanti di stabilità dei complessi di citrato e ossalato con i principali metalli di transizione:

Tabella 1. Costanti di stabilità dei complessi di citrato e ossalato (pH 4)

Metallo di transizione	Mn <sup>2+</sup>	Co <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	Fe <sup>3+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>
Acido citrico	3.76	4.90	4.93	11.19	3.70	5.18
Acido ossalico	3.00	3.84	4.00	7.53	4.85	6.16

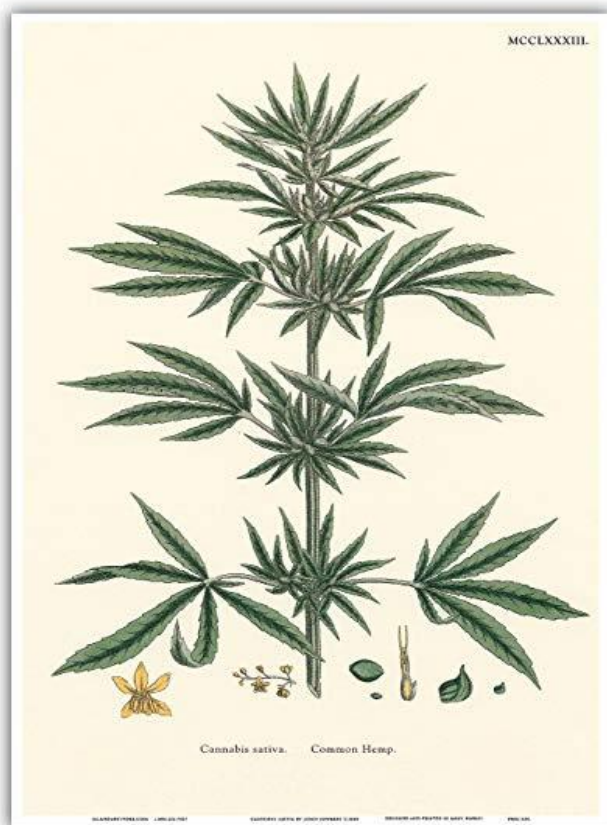
La Tabella 1 mostra chiaramente come il ferro dia i complessi più stabili soprattutto con l'acido citrico, in quanto essendo un composto tricarbossilico è in grado di legarsi in tre siti con il ferro creando un complesso piuttosto stabile. Nel caso del rame invece i complessi con l'ossalato risultano dotati di maggiore stabilità. Se si considera un range di pH compreso tra 4 e 6, probabile valore delle urine, il grado di dissociazione dell'acido ossalico è maggiore rispetto al citrico questo implica una maggiore condizione di stabilità per gli ossalati rispetto che per i citrati [7].



Alla luce di queste evidenze teoriche sono state progettate le prove sperimentali da realizzare, in modo da valutare la stabilità di citrato e ossalato con il ferro, il rame e il cromo. Sono state preparate soluzioni a diversi valori di pH: 3; 3,5 e 4,00 e sono state analizzate in assorbimento atomico UV-Vis, con lo scopo di osservare eventuali differenze nella frequenza di assorbimento del metallo da solo e del metallo in presenza dell'acido carbossilico. La situazione però è risultata ben complicata in quanto le differenze rilevate sono state minime e probabilmente inosservabili nel campione reale in cui le interferenze di altre sostanze sono di particolare rilevanza.

## 1.2 La Cannabis e i suoi componenti

### 1.2.1 Botanica



La *Cannabis sativa*, mostrata in Figura 3, appartiene alla famiglia delle cannabaceae, è una pianta a ciclo annuale originaria dall'Asia centrale ed orientale [1]. Più comunemente è nota come canapa nel caso in cui si considerino le fibre o gli oli dei semi mentre quando si parla di marijuana o canapa indiana si intende la droga con effetti euforici, o in generale psicotici, usata per la produzione di farmaci [2]. Sull'esatta classificazione tassonomica ci sono diverse opinioni a seconda che si consideri la specie monotipica o politipica. Il primo a classificarla fu Linneo nel 1751, egli la considerò come specie monotipica attribuendogli il nome *Cannabis sativa L.*

Figura 3. Pianta Cannabis Sativa

Una seconda specie venne descritta da Lamarck nel 1785, si tratta di una pianta di minore importanza rispetto alla precedente dotata però di maggiori effetti nell'uso ricreazionale; egli la denominò *cannabis indica*, nome con cui è entrata a far parte della farmacopea di numerose nazioni in quanto riguarda la specie usata per scopi medicinali [3]. Nel 1924 venne introdotta la

specie della *canapa ruderalis*, dal botanico russo Janichevsky definendola sia come una varietà della *C. sativa*, sia una come specie separata. Successivamente Small e Cronquist definirono una sola specie di *Cannabis* da cui si possono però distinguere due sottospecie la *C. sativa* e la *ruderalis*. Queste si differenziavano tra loro per l'utilizzo che l'uomo ne faceva; la prima era destinata alla produzione di fibra o semi mentre la seconda a scopi medici e ricreazionali.

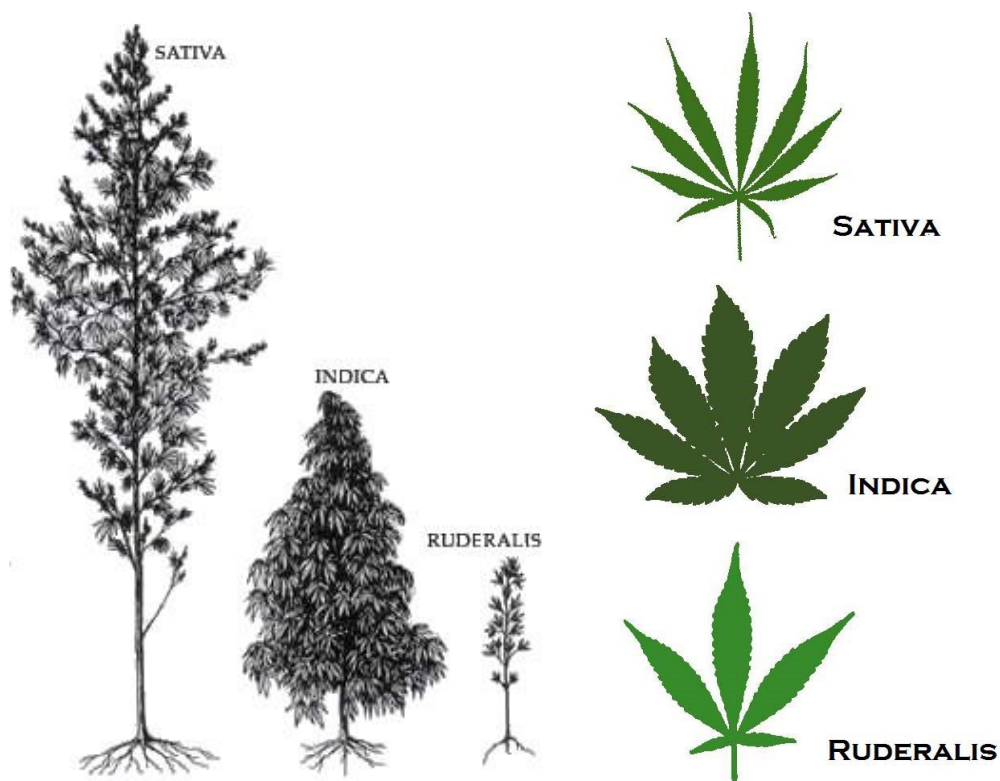


Figura 4. Differenti tipi di Cannabis

Degli studi successivi misero in evidenza delle differenze morfologiche tra le sottospecie come dimostrò il botanico Schultes che individuò ben tre varietà sativa, indica, ruderalis, mostrate in Figura 4, scartando così definitivamente l'ipotesi monotipica.

La *Cannabis Sativa* è una specie altamente variabile: oggi infatti viene divisa in 7 sottospecie secondo la classificazione di Hiling [5], riportata in Tabella 2. L'analisi proposta da quest'ultimo, pur non consentendo di classificare in modo certo la Cannabis in specie distinte, si basa sulla diversa composizione chimica di quest'ultima, cioè fa riferimento al differente contenuto di cannabinoidi riconducibile all'origine geografica e alle condizioni climatiche di crescita della pianta. Per quanto concerne la morfologia il solo carattere distintivo delle ipotetiche specie è riconducibile alla larghezza della lamina fogliare e alla data di fioritura, fattori correlati al contenuto del cannabinoide psicotropo THC [6]. Quindi attualmente si ritiene

che la Cannabis comprenda una specie altamente variabile, ibridata e introgressa che porta a considerarla una specie panmittica.

Tabella 2. Classificazione Cannabis Sativa secondo Hiling

<i>Specie</i>	<i>Fitocannabinoidi contenuti</i>
<i>Cannabis ruderalis</i>	Intorno all'1%, per lo più CBD
<i>Cannabis sativa ssp. Sativa</i>	Il CBD varia dal 4-5%. Il rapporto THC/CBD è circa di 1:3.
<i>Cannabis sativa ssp. Spontanea</i>	La composizione in fitocannabinoidi è intermedia fra quella della varietà sativa e indica.
<i>Cannabis indica ssp. Kafiristanica</i>	In basse quantità, anche se THC e CBD sono in quantità apprezzabili
<i>Cannabis indica ssp. Indica</i>	I fitocannabinoidi possono superare il 14% nei fiori e nei semi. Il rapporto THC/CBD è a netto favore del primo, ovvero 100:1.
<i>Cannabis indica ssp. Afghanica</i>	Fitocannabinoidi fino al 25%, THC/CBD molto variabile, si va dal 2:1 al 1:2, q
<i>Cannabis indica ssp. Chinensis</i>	Rapporto THC/CBD è intorno al 2,5:1, inoltre è presente un cannabinoide trovato solo in questa specie: è il CBGM.

Da un punto di vista legislativo molto utile è la classificazione basata sul diverso contenuto di THC ( $\Delta^9$ - THC + THCA) e CBD (CBD + CBDA) ottenute mediante analisi GC o HPLC, secondo cui le piante vengono classificate in [5]:

1. “Piante da droga”(chemiotipo I), THC > 2 % e CBD < 0,5 %;
2. “Piante intermedie” (chemiotipo II), THC > 0,5 % e CBD > 0,5 % ;
3. “Piante da fibra” (chemiotipo III), THC < 0,3 % e CBD > 0,5 %.

Oggi si individuano molte forme di Cannabis a causa dei millenni di coltivazione da parte dell'uomo, i produttori infatti hanno creato una “tassonomia popolare” a ceppi con diverse proprietà medicinali e chimiche in cui però la relazione dell'evoluzione tra le specie non è chiara poiché la sua impollinazione è anemofila ( grazie al vento) e quindi risulta molto difficile controllarne la riproduzione; a questo si aggiunge l'esistenza di banche del seme non opportunamente organizzate a causa delle restrizioni legali che non rendono possibile un'adeguata collezione dei campioni [7]. La classificazione attuale quindi risulta inconcludente, come dimostrano le numerose ricerche genetiche realizzate ultimamente; queste utilizzano come

punto di partenza le varianti del DNA nel genoma della cannabis e sottopongono ciascun polimorfismo (ne utilizzano in totale 14031 a singolo nucleotide) a genotipizzazione. In 81 campioni di marijuana e 43 di canapa è stato scoperto in questo modo che le piante di cannabis comunemente suddivise in tre specie (*C. sativa*, *C. indica* e *C. ruderalis*) vengono spesso etichettate in modo sbagliato e quindi molto spesso è necessario un sistema più pratico e affidabile [8].

La canapa è una pianta erbacea a ciclo annuale, con un'altezza che varia tra 1,5 e 2 m, ma in alcune sottospecie coltivate può arrivare fino a 5 metri, in generale l'altezza dipende dall'ambiente di crescita. La Cannabis è caratterizzata da una lunga radice a fittone e da un fusto eretto o ramificato solcato soprattutto se grande e legnoso, caratterizzato da escrescenze resinose soprattutto sopra il primo paio di foglie. Quest'ultime sono dotate di stipole, appaiono palmate e caratterizzate da 5/13 foglioline ciascuna, con margine seghettato, allungate, con punte acuminate.

La Cannabis è una pianta prevalentemente dioica la cui impollinazione avviene grazie all'azione del vento; solitamente la pianta cresce durante il primo ciclo vitale e la fioritura è indotta dal fotoperiodo [9]. I fiori unisessuali crescono su individui di sesso diverso, le piante maschili muoiono dopo l'impollinazione mentre quelle femminili se non sono esposte a temperature troppo fredde, ma vengono coltivate in serre in condizioni miti, possono vivere per molti anni anche se gradualmente perdono vigore. Per questo, in base al clima in cui viene coltivata, la Cannabis può essere classificata o come pianta annuale o come pianta perenne anche se da un punto di vista botanico viene considerata annuale.

I fiori, come si osserva dalla Figura 5, sono diversi a seconda del sesso: quelli maschili, staminiferi sono caratterizzati da fiori a forma di pannocchia con racemi ascellari con 5 petali fusi alla base e 5 stami, mentre quelli femminili, pistilliferi, sono più compatti e con più foglie, sono solitamente riuniti in gruppi di 2-6 alla base di brattee che formano spighe glomerulate.

Quest'ultimi mostrano un calice urceolato che circonda l'ovario e con la maturazione si ricoprono progressivamente di tricomi ghiandolari, siti di bioaccumulo di principi attivi [10]. Un metodo per riconoscere il sesso della pianta in modo univoco è dato dal fatto che solitamente le piante maschili muoiono dopo aver rilasciato il polline mentre quelle femminili in seguito a cambiamenti climatici e ambientali. Il frutto è simile a una noce e viene detto seme di canapa, si tratta di un achenio chiuso, con il pericarpo che lo riveste e contiene un solo seme. La pianta femminile ha più interesse dal punto di vista terapeutico e le varie coltivazioni sono caratterizzate da un diverso bioaccumulo di sostanze soprattutto se non vengono standardizzati il ciclo di coltivazione e i fattori di crescita ambientali.

Oltre a scopi farmaceutici la cannabis è utilizzata anche per la produzione di fibre di tessuto e cordame.



*Figura 5. Piante maschili e femminili di Cannabis sativa*  
*a. Piante maschili in piena fioritura. B. ramo di una pianta maschile ingrandita.*  
*c. fiori maschili ingranditi. D. fioritura di un ramoscello di una pianta femminile*

### ***1.2.2 Composizione chimica***

Nella Cannabis sono contenuti circa 483 composti chimici alcuni denominati cannabinoidi o fitocannabinoidi, da cui dipendono le proprietà agronomiche e produttive della pianta; altri noti come terpeni e flavonoidi. Il primo ad essere stato isolato è il  $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo ( $\Delta^9$ -THC) nel 1964, un composto psicoattivo ricavato dalla resina e dai fiori della pianta [11]. Successivamente sono stati isolati anche altri cannabinoidi, privi di effetti psicotici, come il cannabigerolo (CBG), cannabidiolo (CBD), cannabicromene (CBC),  $\Delta^9$ -tetraidrocannabivarina ( $\Delta^9$ -THCV) e cannabidivarina (CBDV). Ne sono stati scoperti altri 70 e tutti questi composti sono classificati in metaboliti primari o secondari [12].

All'interno della pianta questi vengono sintetizzati e sono presenti nella loro forma acida [13]; la loro biosintesi avviene all'interno dei tricomi ghiandolari, principalmente sviluppati nei fiori femminili ma anche sulle foglie [14]. Le loro concentrazioni dipendono dal tipo di tessuto, età, varietà, condizioni ambientali di crescita e di sviluppo, oltre che dal tempo di raccolta e

stoccaggio [15]. La quantità di tricomi è di grande importanza quando si vuole utilizzare la pianta per scopi farmaceutici. Da un punto di vista chimico la biosintesi avviene per condensazione di un composto terpenico, solitamente il geranil pirofosfato e un composto fenolico, l'acido olivetolico [16] la reazione è catalizzata dall'enzima geranilpirofosfato-olivetogeranil-transferasi (GOT), ottenendo in tal modo l'acido cannabigerolico (CBGA), precursore di tutti i cannabinoidi [17]. Il CBGA viene trasformato da diversi enzimi in oltre 100 diversi fitocannabinoidi [18], come si osserva in Figura 6. Quest'ultimi presentano delle catene laterali, derivate dall'uso dell'acido olivetolico o divarinico come componente fenolica, di diversa lunghezza; si tratta di una caratteristica determinata geneticamente, anche se attualmente questi geni non sono stati ancora identificati. Dal punto di vista farmaceutico, inoltre è possibile che ogni composto della serie degli alchil-omologhi possa avere proprietà terapeutiche diverse.

Dalla sintesi del CBGA, in seguito a trasformazioni enzimatiche, si ottengono i cannabinoidi più abbondanti, THCA, CBDA e acido cannabicromenico (CBCA). Questi composti sono ottenuti grazie alla ciclizzazione ossidativa di CBGA mediata da tre enzimi specifici, CBDA-sintasi (CBDAs), THCA-sintasi (THCAs) e CBCA-sintasi (CBCAs). Gli acidi cannabinoidi del THC sono privi di azione psicotropa, per essere attivi e produrre gli effetti tipici della marijuana devono subire il processo di decarbossilazione a fenoli. Nel caso del delta-9-THC il rapporto tra acido e fenolo varia tra 2:1 e >20:1 nelle foglie e nelle infiorescenze della *Cannabis sativa*.

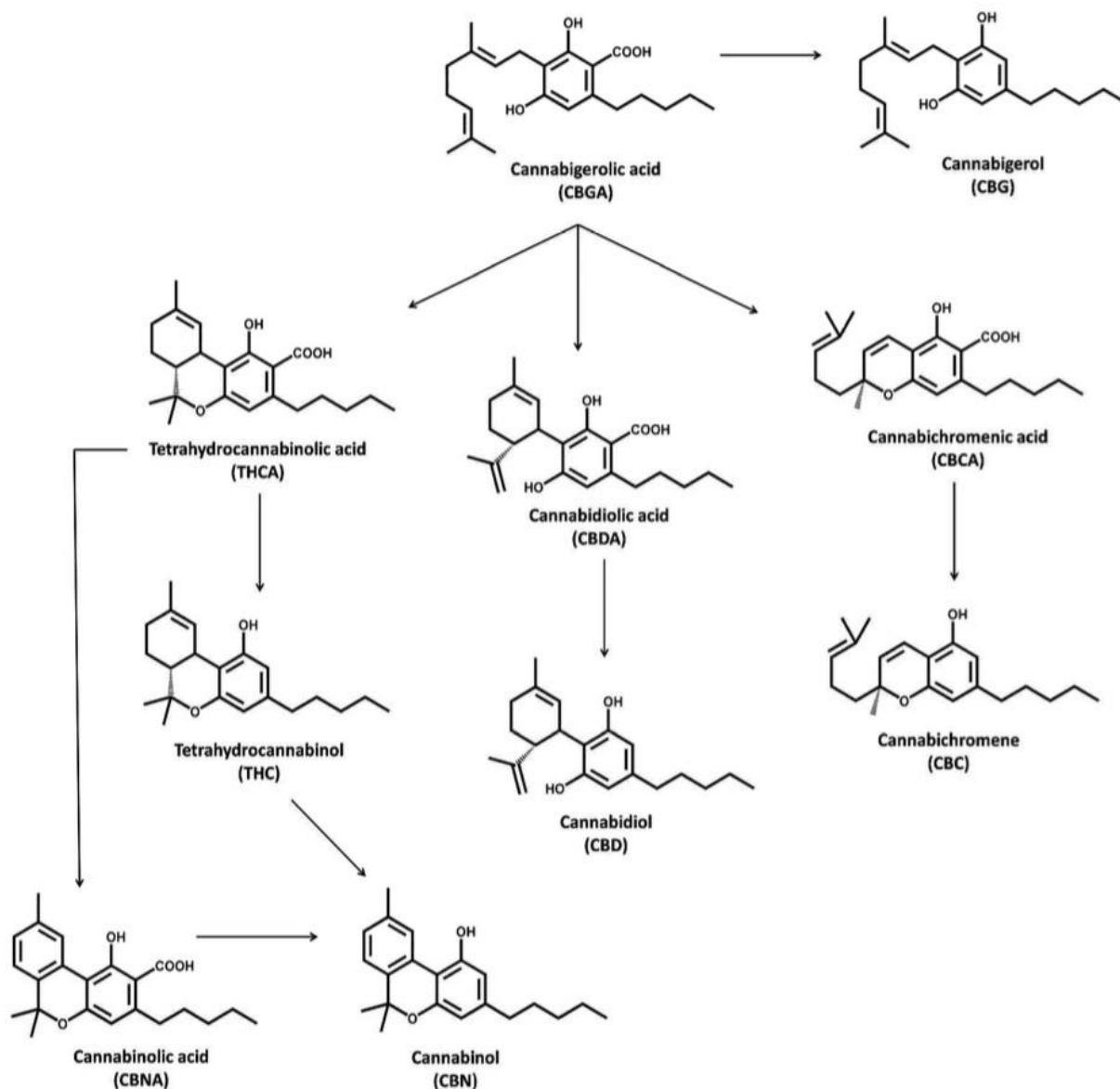


Figura 6. Struttura e meccanismo di sintesi dei cannabinoidi

I cannabinoidi presentano una struttura terpenofenolica a 21 atomi di carbonio (22 nella loro forma acida) in quanto derivano da una reazione di addizione tra terpeni e fenoli. Sono pertanto sostanze apolari, caratterizzate da una bassa solubilità in acqua la cui struttura chimica è descritta come quella di un terpene unito ad un resorcinolo a sostituzione alchilica, oppure come quella di un sistema ad anello benzopiranic. Queste due differenti rappresentazioni, riportate in Figura 7, implicano anche una nomenclatura variabile: nel primo caso il principale cannabinoide viene definito come delta-1-tetraidrocannabinolo ( $\Delta^1$ -THC), mentre nel secondo diventa delta-9-THC ( $\Delta^9$ -THC).

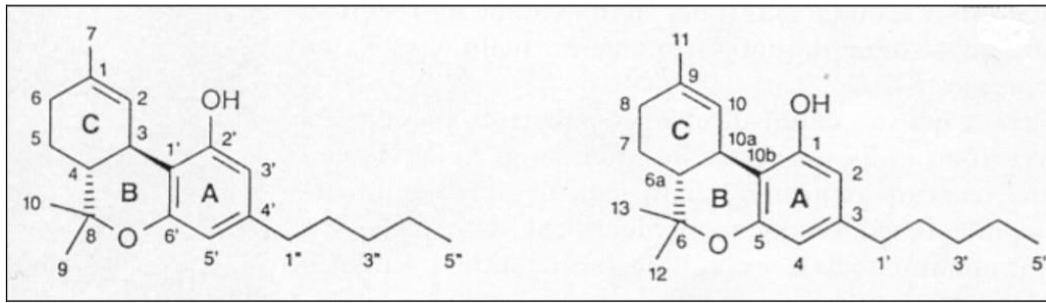


Figura 7. Numerazione secondo il sistema monoterpeneo ( $\Delta^1$ -THC) e secondo il sistema dibenzopirano ( $\Delta^9$ -THC)

I cannabinoidi in generale sono metaboliti secondari, caratteristici solo della *Cannabis* dotati di due caratteristiche chimiche particolarmente rilevanti: un gruppo carbossilico sull'anello fenolico e una catena polichetide situata in posizione meta al gruppo ossidrilico nella porzione fenolica. Il gruppo carbossilico può essere facilmente perso dopo essiccamento o blando riscaldamento, ottenendo la forma decarbossilata. Durante la decarbossilazione, il cui meccanismo viene mostrato in Figura 8, l'acido  $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolico (THCA) viene convertito in  $\Delta^9$ -THC, il cannabinoide più noto tra tutti per i suoi effetti psicotropi e inebrianti [19]. La catena polichetide invece nella maggioranza dei composti è un pentile, ma ne esistono alcuni che presentano propili e metili, come catena laterale [20].



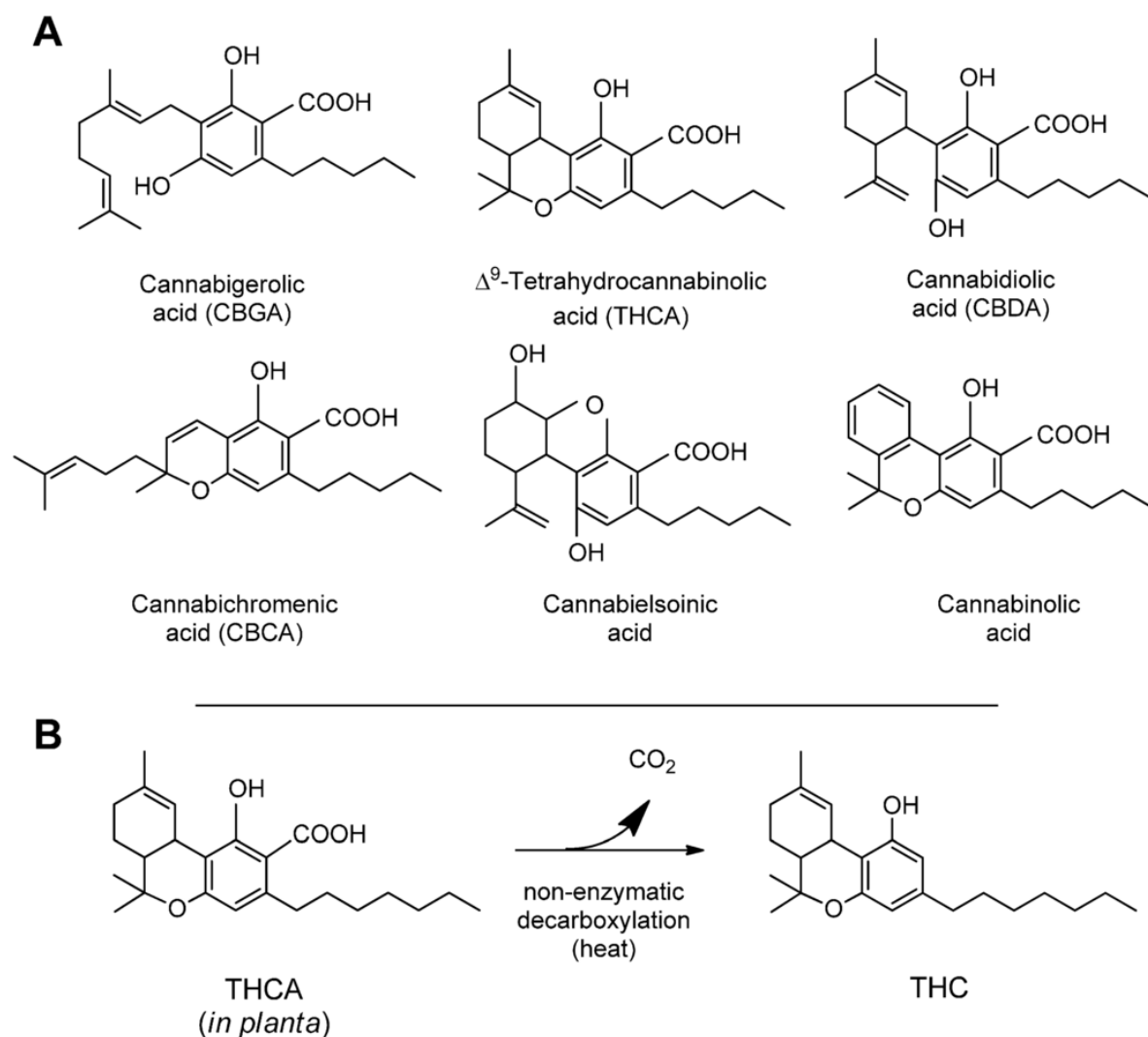


Figura 8. Principali cannabinoidi; A: cannabinoidi nella loro forma acida; B: esempio di decarbossilazione dei cannabinoidi

Attualmente sono stati scoperti 66 cannabinoidi, molti dei quali sono classificati in 10 sottoclassi, riportate sotto:

- ✓ Tipo cannabigerolo (CBG);
- ✓ Tipo cannabichromene (CBC);
- ✓ Tipo cannabidiolo (CBD);
- ✓ Tipo delta-9-THC ( $\Delta^9$ -THC: vi appartengono un totale di 9 molecole, con catene laterali di 1, 3, 4, 5 atomi di carbonio);
- ✓ Tipo delta-8-THC ( $\Delta^8$ -THC);
- ✓ Tipo cannabinolo (CBN);
- ✓ Tipo cannabinodiolo (CBDL);
- ✓ Tipo cannabiciclololo (CBL);
- ✓ Tipo cannabielsoino (CBE);

- ✓ Tipo cannabitriolo (CBTL);
- ✓ Tipo tetraidrocannabivarina (THCV).

Da un punto di vista quantitativo i composti più importanti e abbondanti sono gli acidi del delta-9-THC, del cannabidiolo, del cannabicromene, del cannabigerolo e del cannabinolo. A seconda dei diversi ceppi di cannabis la composizione cambia e solitamente solo tre o quattro cannabinoidi sono presenti in concentrazioni superiori allo 0.1%. Inoltre a seconda del principale cannabinoide sintetizzato e al rapporto tra di essi, è possibile distinguere 5 diversi chemiotipi [21]:

- ✓ Chemiotipo I: ha un rapporto tra l'acido cannabidiolico (CBDA) e il THCA molto basso, utile per la produzione di farmaci
- ✓ Chemiotipo II: è molto variabile, contiene circa la stessa quantità di CBDA e THCA, rapporto trovato principalmente nelle varietà più comunemente chiamate hashish, ma anche in alcune varietà costituite da fibre vecchie.
- ✓ Chemiotipo III: è caratterizzata da un elevato rapporto CBDA / THCA, al contrario del chemiotipo I, ed è tipico di tutte quelle varietà di fibre coltivate.
- ✓ Chemotipo IV: il cannabinoide in maggiori quantità è l'acido cannabigerolico (CBGA).
- ✓ Chemiotipo V: è composta da quelle piante che non mostrano quantità rilevanti di cannabinoidi su infiorescenze mature

La specificità dei differenti chemiotipi viene sfruttata nella produzione dei farmaci: a seconda del preparato che si vuole sintetizzare verrà usato un preciso chemiotipo; per esempio se è necessario produrre un estratto ad alto contenuto di CBGA verrà usato un chemiotipo di tipo 4.

### ***1.2.3 Derivati sintetici***

Le proprietà psicoattive della cannabis sono attribuite al delta-9-THC, capostipite dei fitocannabinoidi, il suo prodotto naturale di ossidazione è il cannabinolo che con il cannabidiolo, privo di attività psicotropa, è stato identificato negli anni Quaranta [22]. Tuttavia il delta-9-THC non è stato identificato prima del 1964, quando Gaoni e Mechoulam lo isolarono e sintetizzarono [23], grazie allo studio della stereochimica, riuscirono a dimostrare che le proprietà biologiche derivano dallo stereoisomero L [24]. Queste scoperte furono alla base, negli anni Settanta, dello sviluppo di un ampio numero di analoghi sintetici, che includevano non solo i composti strutturalmente simili ai fitocannabinoidi, ma anche quelli con strutture chimiche differenti, inclusi i cannabinoidi classici (Figura 9), non-classici (Figura 10) e gli amminoalchilindoli

(Figura 11). I cannabinoidi classici includono strutture tricicliche dibenzopirano, tra cui i più noti sono mostrati nella Figura 9.

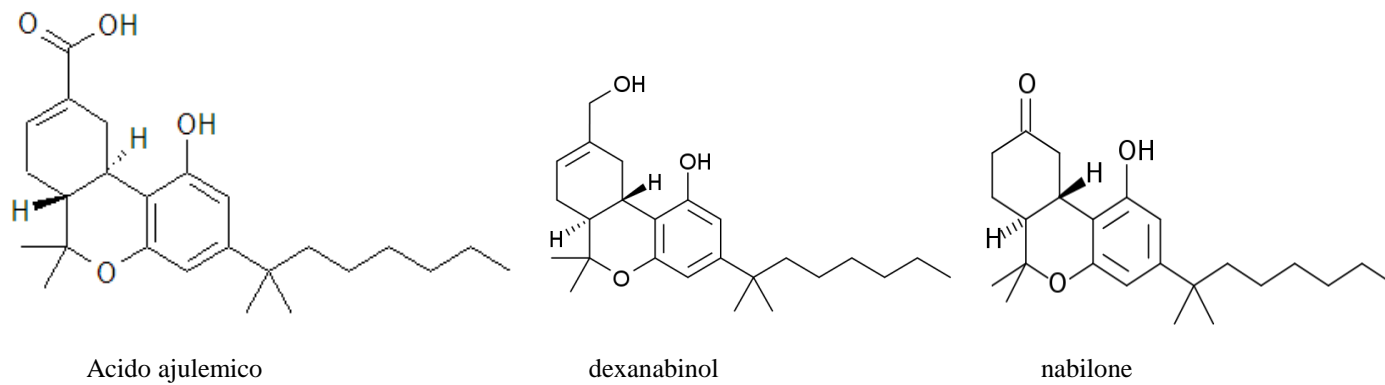


Figura 9. Cannabinoidi classici più noti

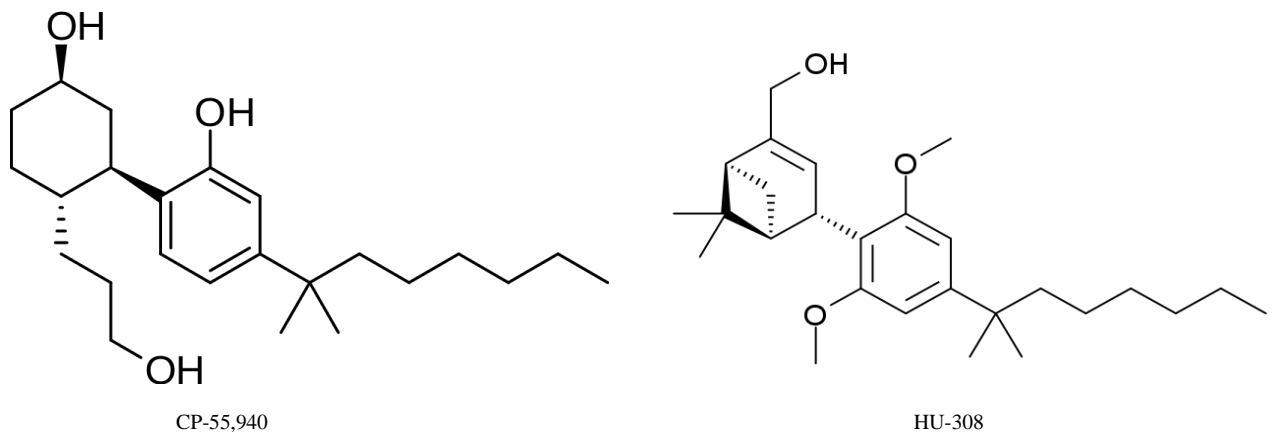


Figura 10. Cannabinoidi "non classici"

Tra gli amminoalchilindoli il più diffuso è l'amminoalchilindolo la cui formula strutturale è riportata in Figura 11:

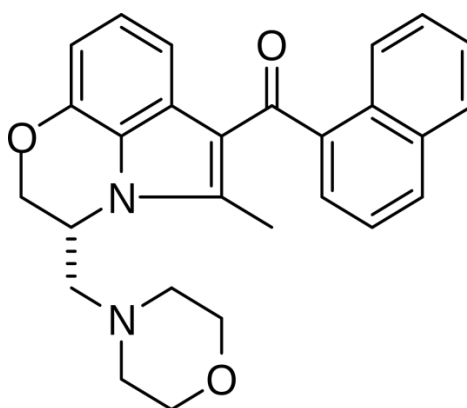


Figura 11. Amminoalchiliondolo più noto

I principali studi farmacologici si sono concentrati anche sulla sintesi di composti antagonisti

- ✓ AM 251;
- ✓ AM281;
- ✓ AM630
- ✓ SR 144528;
- ✓ Rimonabant (SR141716A);
- ✓ Surinabant (SR147778).

Si tratta di antagonisti inversi che bloccano la risposta indotta dagli antagonisti puri, attivando una via del segnale opposta a quella dell'antagonista puro stesso.

#### **1.2.4 Proprietà farmacologiche:**

La Canapa è una pianta dai molteplici usi e il suo impiego a scopo medico risale a 120 mila anni fa ed è testimoniato dal ritrovamento di semi, resina e cenere, in un sito paleolitico nella zona montuosa dell'Hindu Kush, in Pakistan per scopi rituali: gli occupanti del sito molto probabilmente gettavano grandi quantità di foglie, gemme e resina in camino posizionato in fondo alla grotta con l'intenzione di riempire l'intero sito di fumo, respirato per godere delle proprietà psicotrope della pianta.

Oggi questa rappresenta la più antica prova di utilizzo intenzionale di sostanze a scopo psicotropo da parte dell'uomo. Anche il suo utilizzo in ambito medico risale all'antichità: il primo riscontro per uso terapeutico è stato riportato all'interno di un erbario cinese, il Pen Ts'ao redatto dall'imperatore Shen Nung, del 2737 a.C, dove è stato documentato l'utilizzo di preparati di cannabis per alleviare diverse malattie come la gotta, i reumatismi, la malaria, la stipsi e la debolezza mentale. In occidente invece le prime prove risalgono al tempo degli Egizi: è stata

scoperta nelle piramidi una pietra in cui era inciso un testo risalente al Vecchio Regno egiziano di Memphis, intorno al 2350 aC, ritenuto il testo più antico che descrive l'utilizzo della canapa come medicamento [25]. Inoltre sempre in occidente, veniva usata assieme al sedano come gocce oculari applicate alla mattina molto probabilmente come anti- infiammatorio, in alternativa venivano realizzate preparazioni vaginali per azioni rinfrescanti e come aiuto nel parto. Intorno al 1500 A.C. si utilizzava per curare infezioni parassitarie sulle unghie sia di mani che di piedi.

Anche in India nel testo sacro Atharvaveda (1000 a.C.), vengono riportati gli terapeutici e religiosi usi di questa pianta, con la descrizione dettagliata dei metodi di somministrazione. Quello che si deduce è che nell'antichità la cannabis veniva utilizzata soprattutto per la sua attività vermicida, anche se non mancano testimonianze relative a suoi preparati, simili a clisteri, per uso rettale o per il trattamento della diassenteria, metodo poi utilizzato anche in India nel XIX secolo per combattere un grande epidemia di colera. Si deduce quindi che questa pianta produce buoni effetti analgesici e antiinfiammatori [25]. L'efficacia della cannabis nella cura dei tumori è stato riportato nei testi scritti da Plinio, Galeno e Dioscoride: il trattamento si basava sull'inalazione dei fumi derivanti dalla combustione della cannabis, l'effetto benefico deriverebbe dalla decarbossilazione, tramite combustione, dei precursori dei fitocannabinoidi. Questa teoria venne ripresa anche secoli più tardi da Marcandier nel *Traite' du chanvre*, a cui si aggiungono preparazioni per malattie dell'orecchio.

A questi primi usi si aggiunsero nel corso dei secoli l'impiego della cannabis come lenitivo dei dolori neuropatici, contro otalgie, contro l'asma e successivamente nel 1830 Aubert-Roche, alla fine di un'auto sperimentazione, ne verificò il trattamento su pazienti affetti da peste: si osservò che 7 degli 8 bubboni si riassorbirono, e 7 degli 11 pazienti trattati sopravvissero. La pubblicazione dove si riportarono questi risultati, stimolò il mondo medico a produrre nuovi trattamenti a base di estratti di cannabis e tinture.

Il medico persiano Sabur ibn Sahl nel "Dispensatorium Parvum" descrisse alcune miscele di erbe a base di fiori e semi di cannabis, come rimedio nella terapia dell'emicrania, dolori intensi (per esempio quelli uterini) e per prevenire l'aborto spontaneo [26]. A partire del 1800 in nord America e Gran Bretagna venne usata come antispasmodico, con effetti rilassanti.

La cannabis quindi è stata utilizzata in passato sia come droga ricreativa sia come droga con finalità terapeutiche (analgesico, anticonvulsivante, ipnotico, tranquillante, anestetico, antinfiammatorio, antibiotico, antiparassitario, antispasmodico, digestivo, stimolante dell'appetito, diuretico, afrodisiaco, antitossivo ed espettorante). All'inizio del novecento il suo uso è sempre più diffuso, compare nelle farmacie europee ed americane e viene inserito nella farmacopea ufficiale. Tuttavia, nel 1937 la cannabis viene inserita, negli USA, nella lista degli

stupefacenti e quindi il suo utilizzo, anche a scopo terapeutico, diventato illegale, crolla anche in Europa, in cui si riscontrò anche la scomparsa delle pubblicazioni scientifiche dedicate all'argomento. L'interesse medico si risveglia all'inizio degli anni settanta del novecento, in seguito alla scoperta, del delta-9-tetraidrocannabinolo ( $\Delta^9$ -THC); tanto che nel 1971 Lester Grispoon, uno psichiatra di Harvard, pubblicò il libro "Marijuana reconsidered" [27], in cui sono riportati i risultati delle sue ricerche sull'argomento e in cui l'autore sostenne che la posizione ufficiale, e di conseguenza il giudizio popolare, erano influenzati da pessime informazioni, se non vere e proprie bugie e manipolazioni. Più recentemente, nel 1988, alcuni ricercatori scoprirono la presenza nel corpo umano di un recettore di membrana capace di essere attivato dal THC [28], aprendo nuovi orizzonti all'uso terapeutico della cannabis.

### 1.2.5 Recettori cannabinoidi

Nell'uomo esistono dei specifici recettori cannabinoidi, le prime indicazioni derivano dal fatto che l'attività farmacologica di queste sostanze è influenzata dalla loro struttura chimica oltre che dalla stereoselettività dei centri chirali; a questo proposito si è osservato per esempio che l'attività farmacologica dell'isomero (-)-trans-delta-9-THC è 6-100 volte maggiore rispetto all'isomero (+)-trans [29]; la Figura 12 mostra i due principali stereoisomeri del THC.

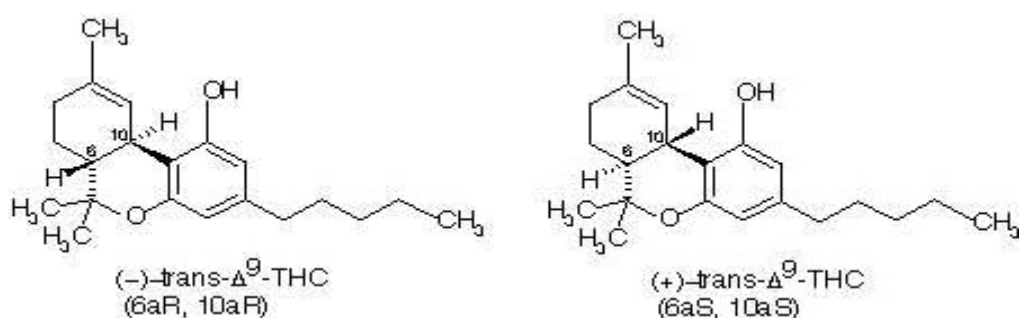
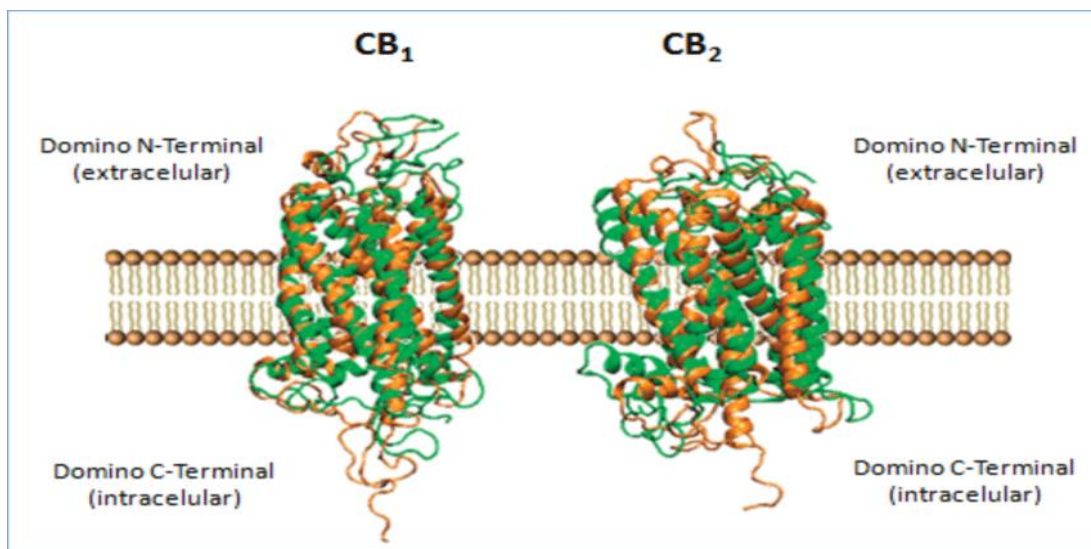


Figura 12. Stereoisomeri del delta-9-THC

Le strutture recettoriali vennero studiate e clonate in seguito ad un esperimento degli anni ottanta, in cui si dimostrò che un agonista radiomarcato possedeva dei siti leganti ad alta affinità, saturabili e stereospecifici [30]. È stato scoperto che nell'uomo questi recettori specifici dei cannabinoidi sono localizzati sulle membrane di molte cellule diverse; oggi se ne conoscono due diversi tipi, riportati in Figura 13, differenti per la loro distribuzione nei tessuti e per i loro

meccanismi di segnalazione: il primo, denominato CB1, è stato identificato nel 1990 [31]; mentre il secondo, denominato CB2, è stato descritto nel 1993 [32].

Il primo CB1 presenta due sottotipi recettoriali che sono CB1A e CB1B [33], entrambi localizzati a livello del sistema nervoso centrale [35]. Questi recettori sono localizzati prevalentemente in aree neuronali adibite al movimento e alla coordinazione motoria, ovvero nei gangli basali, oppure sono concentrati in zone dell'ippocampo che controllano le complesse funzioni cognitive, dell'apprendimento, dello stress e dell'attenzione; si possono trovare anche nel cervelletto, in cui sono implicati nella coordinazione motoria e dell'equilibrio; o nell'ipotalamo in cui presiedono alla regolazione della temperatura, dell'appetito e dell'attività neuroendocrina; nell'amigdala in cui integrano la dimensione emozionale-affettiva delle percezioni e infine nella corteccia, sede delle attività cognitive superiori [34; 36], la Figura 14 ne mostra in modo dettagliato la posizione.



*Figura 13. Recettori CB1 e CB2*

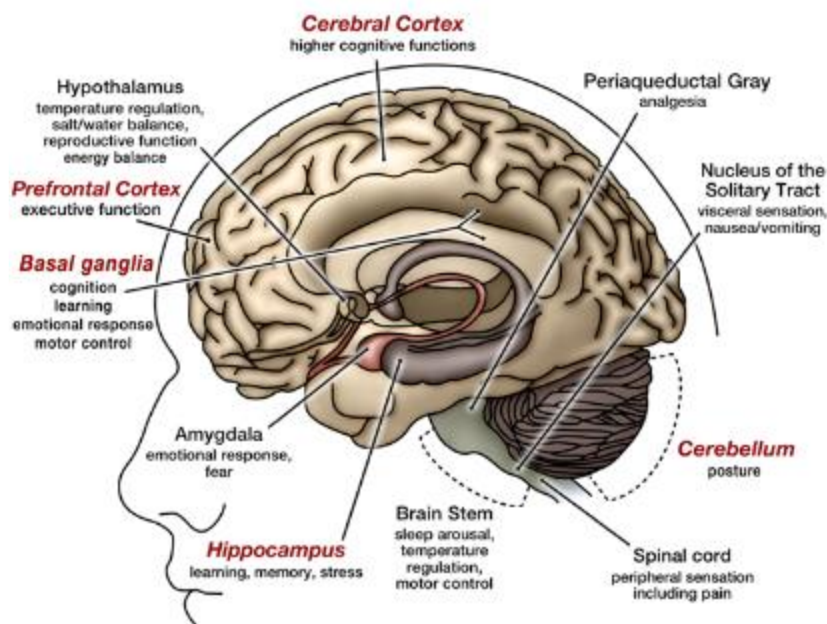


Figura 14. Localizzazione dei recettori CB1 a livello del sistema nervoso centrale. In rosso le regioni a maggior densità, in nero le regioni con una minor espressione recettoriale.

Infine in minor quantità, i recettori CB1 sono presenti a livello periferico in diversi tessuti come: cuore, ghiandole endocrine, milza, leucociti in parti dell'apparato urinario, riproduttivo e del sistema gastrointestinale[37]. La loro attivazione determina una riduzione dell'attività neuronale e interferisce con il rilascio di alcuni neurotrasmettitori come l'acido gamma-amminobutirrico (GABA), acetilcolina, serotonina, istamina, dopamina, noradrenalina e glutammato. Tale interferenza ha un effetto neuroprotettivo, protegge cioè il sistema nervoso centrale da danni di sovra-stimolazione e sovra-inibizione.

Il secondo tipo di recettori CB2 invece sono situati prevalentemente nel sistema nervoso periferico oltre che nelle cellule del sistema immunitario ed ematopoietico; anche se di recente né è stata individuata la presenza nel sistema nervoso centrale, a livello celebrale [38; 39] incluse le cellule gliali, nelle cellule non-parenchimatiche di fegato cirrotico [40], nel pancreas endocrino, nell'osso [41] e nei cheratinociti. In caso di eventi dannosi, come neuro-infiammazione e ipossia-ischemia celebrale, i recettori CB2 possono subire sovra-espressione del loro gene codificante a livello del cervello. Proprio per questo motivo hanno potenti effetti antiinfiammatori che modulano il rilascio di citochine [33].

I recettori CB1 e CB2 appartengono entrambi alla famiglia delle proteine G accoppiate a loro volta ad altri recettori, i GPCR, dove l'azione cannabinoidi sul sito di legame provoca un effetto agonista, provocando in tal modo un'inibizione sull'attività adenosin ciclasica [42]. Tale processo a sua volta blocca la conversione dell'adenosin trifosfato ciclico (ATP) a cAMP, che rappresenta un importante messaggero cellulare utilizzato nella trasduzione del segnale e



coinvolto nell'attivazione della proteina chinasi A (PKA). Inoltre in seguito alla stimolazione dei recettori cannabinici CB1 e CB2 si verifica l'attivazione di fattori nucleari di trascrizione, responsabili della regolazione del canale ionico, si osserva l'inibizione dei canali del calcio e l'attivazione dei canali del potassio [43]. Oltre a questi recettori i cannabinoidi agiscono su altri siti, simili ai CB1 e ai CB2 definiti no-CB1 e no-CB2, come il vanilloide 1 TRPV1, canale cationico non selettivo per il magnesio, calcio e ioni di sodio con un ruolo nella trasmissione e modulazione della nocicezione, nonché dell'integrazione di diversi stimoli dolorosi [44].

Recenti studi hanno dimostrato effetti dei anche sul recettore GPR55 e sul GPR18 [45,46]; si è inoltre scoperto che molti degli effetti terapeutici del CBD sono esercitati a livello del recettore 5-HT1A; la loro attivazione se riguarda particolari aree cerebrali, relative a risposte difensive, genera effetti ansiolitici, antidepressivi e antipsicotici [47].

Invece l'azione del  $\Delta$ 9-THC riguarda principalmente l'attivazione dei recettori CB1 / CB2, mentre gli altri fitocannabinoidi non psicotropi (CBD, CBG, CBC,  $\Delta$ 9-THCV e CBDV), hanno molteplici effetti farmacologici sia tramite i recettori CB1 / CB2, con i recettori no-CB1 e no-CB2, entrambi molto importanti per la fisiologia neuronale [48].

I cannabinoidi quindi sono in grado di controllare, fino a sopprimere, la produzione di una vasta gamma di citochine pro-infiammatorie, come il fattore di necrosi tumorale (TNF)  $-\alpha$  e l'interleuchina (IL-) [49]. A questo si aggiunge la loro azione sulla riduzione dello stress ossidativo e nitrosativo, modulando l'espressione e quindi la quantità di ossido nitrico sintasi (iNOS), diminuisce così la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) [50].

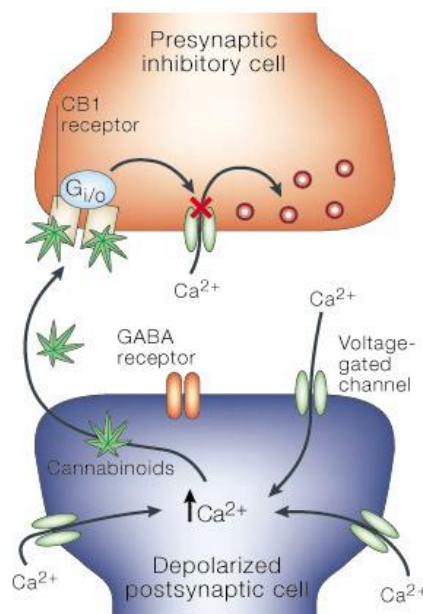
Importanti sono anche gli effetti dei cannabinoidi sulla neurotrasmissione, in questo un ruolo importante viene ricoperto dai recettori CB1 presenti anche a livello pre-sinaptico. Il fenomeno che si verifica viene definito plasticità sinaptica e implica l'inibizione del rilascio di numerosi mediatori tra cui: L-glutammato, GABA, noradrenalina, dopamina, serotonina e acetilcolina; questi effetti di inibizione sono molto probabilmente collegati al blocco dei canali del calcio di tipo N, derivato dall'attivazione del recettore CB1 [51]. Gli studi hanno evidenziato alcuni casi di meccanismi indipendenti dal calcio ma riguardanti i canali del potassio, in questi casi si osserva un effetto inibitorio sull'adenilato ciclasi ne deriva una ridotta fosforilazione dei canali del potassio di tipo A ad opera della chinasi A cAMP-dipendente: questo si traduce in un'attivazione dei canali con un accorciamento della durata del potenziale d'azione.

Altri studi hanno evidenziato il ruolo dei cannabinoidi sui meccanismi di soppressione dell'inibizione indotta dalla depolarizzazione (DSI) [52] e della soppressione dell'eccitazione indotta dalla depolarizzazione (DSE) [53]. La depolarizzazione DSI, nota già da diversi anni e il cui meccanismo è sintetizzato in Figura 15, coinvolge i neuroni GABAergici (di tipo inibitorio), coinvolge particolarmente l'ippocampo e il cervelletto, mentre la DSE, spiegata solo più

recentemente, coinvolge la neurotrasmissione glutammatergica (di tipo eccitatorio); tale meccanismo è legato ad un messaggero cannabinoide che, rilasciato da un neurone post-sinaptico, si lega agli eterocettori del neurone pre-sinaptico, modulandone il rilascio del neurotrasmettitore, ne deriva che il cannabinoide quindi funziona come un messaggero retrogrado.

L'implicazione dei cannabinoidi in questa forma di feedback venne scoperta nel 2001 mentre prima si supponeva l'intervento del glutammato. A conferma di questa nuova scoperta vi è la dimostrazione che l'antagonista CB1 AM251, già alle basse dosi, è in grado di bloccare la DSI, in contrasto con il debole e scarsamente specifico blocco ottenuto con gli antagonisti del glutammato [54].

Questi meccanismi di inibizione, che solitamente durano per alcuni secondi, sono noti come forme di plasticità sinaptica a breve termine, indotte da un aumento della concentrazione di calcio nel neurone post-sinaptico, che induce il rilascio degli endocannabinoidi. Tutti questi meccanismi giocano un ruolo fondamentale nel controllo dei circuiti neuronali, in particolare cerebellari ed ippocampali; per la DSE si aggiunge un effetto neuroprotettivo legato alla riduzione dell'eccitossicità e della morte neuronale causate da uno sbilanciamento del segnale glutammatergico.



*Figura 15. Meccanismo della DSI (soppressione della inibizione indotta dalla depolarizzazione): L'aumento di calcio a livello della cellula post-sinaptica depolarizzata induce la sintesi e la liberazione di cannabinoidi. I cannabinoidi agendo come messaggeri retrogradi, causano una iperpolarizzazione del terminale pre-sinaptico, che riduce l'ulteriore rilascio del neurotrasmettitore.*

A queste due forme di plasticità sinaptica mediate dagli endocannabinoidi se ne aggiungono altre [55] tra cui la soppressione metabotropica dell'inibizione o dell'eccitazione (MSI/MSE); questo meccanismo coinvolge l'acetilcolina ed il glutammato rilasciati dalle cellule adiacenti che, legandosi rispettivamente ai recettori muscarinici M1,M3 ed ai recettori metabotropici del glutammato del gruppo I, attivano la produzione degli endocannabinoidi che una volta rilasciati, diffondono attraverso lo spazio sinaptico e si legano ai recettori CB1 pre-sinaptici, producendo una inibizione transitoria della neurotrasmissione.

Un altro meccanismo è la depressione a lungo termine (LTD), in cui la stimolazione ripetuta a bassa frequenza della trasmissione glutammatergica conduce ad una prolungata attivazione dei recettori metabotropici del gruppo I e ad un'elevata produzione di endocannabinoidi, con conseguente inibizione a lungo termine della trasmissione glutammatergica che permane anche dopo la produzione stessa degli endocannabinoidi.

Gli endocannabinoidi rivestono quindi una grande importanza nella fisiologia umana e di conseguenza la loro scoperta è stata di grande rilevanza; l'esistenza infatti di specifici recettori nelle cellule dei mammiferi in grado di legare i fitocannabinoidi ha fatto supporre l'idea della presenza di ligandi endogeni. I primi studi portarono ad importanti conferme: nel 1992 venne isolato dal cervello del maiale il lipide arachidonoiletanolammide (AEA), amide dell'acido arachidonico con l'etanolammina [56]; questa molecola, denominata anandamide è dotata di un'alta affinità recettoriale, con proprietà simili al THC.

L'anandamide è infatti un agonista parziale o pieno dei recettori CB1, in base al tessuto e all'azione biologica considerata, mentre, anche se è in grado di legarsi ai recettori CB2, mostra con quest'ultimi una minor affinità e un'azione antagonista.

Nel 1995 grazie allo studio di due gruppi indipendenti [57; 58] venne scoperto un secondo endocannabinoide, il 2-arachidonoilglicerolo (2-AG), dotato di un'affinità per i due recettori simile a quella dell'anandamide, ma di un'attività superiore. Studi più recenti hanno permesso di scoprire altri 5 endocannabinoidi:

- ✓ Nolepidin etere, che mostra una buona affinità per il recettore CB1 ed una debole capacità legante per il CB2;
- ✓ Virodamina, agonista parziale dei recettori CB1 (con attività antagonista in vivo) e agonista pieno dei recettori CB2;
- ✓ N-arachidonoildopamina (NADA);
- ✓ Dihomo- $\gamma$ -linoleoiletanolammide (HEA), con affinità CB1;
- ✓ Docosotetraenoiletanolammide (DEA), con affinità CB1

Di fondamentale importanza è lo studio della biosintesi e del metabolismo di queste sostanze che non vengono immagazzinate ma vengono in generale sintetizzate al momento in risposta all'aumento dei livelli intracellulari di calcio. Si tratta di un comportamento diverso rispetto alla maggior parte dei neurotrasmettitori, molto probabilmente legato alla natura lipofila che caratterizza di questi ligandi: infatti le molecole fosfolipidiche di membrana servono sia da precursori, sia da forma di deposito.

In particolare per quanto riguarda l'anandamide, il suo precursore è l'Narachidonoilfosfatidiletanolamina (NAPE), che subisce conversione ad opera della fosfolipasi D; l'anandamide viene poi rimossa dai siti d'azione tramite processi di ricaptazione cellulare che coinvolgono: proteine carrier transmembranarie, proteine leganti associate alla membrana, e/o diffusione semplice.

In seguito viene metabolizzata a livello intracellulare mediante trasformazione ad acido arachidonico ed etanolamina, infine viene catalizzata dall'idrolasi delle ammidi degli acidi grassi (FAAH), enzima situato prevalentemente nelle superfici citosoliche delle cisterne del reticolo endoplasmatico liscio e nei mitocondri delle cellule dei neuroni del sistema centrale.

Lo studio del sistema endocannabinoide, con i suoi specifici recettori, ligandi ed enzimi inattivanti è di particolare rilevanza per il ruolo neuromodulatorio che esso svolge influenzando così l'attività degli altri sistemi di neurotrasmissione: i cannabinoidi infatti con il loro meccanismo di attivazione dei recettori CB1 sono coinvolti nell'effetto antinocicettivo, nel controllo del movimento e nell'inibizione della memoria a breve termine a questo si aggiunge il ruolo fondamentale nella regolazione della secrezione di ormoni, non solo per azione sull'ipotalamo, ma anche attraverso un'azione diretta sulla ghiandola pituitaria; di recente è infatti stata descritta l'espressione dei recettori CB1 e la sintesi degli endocannabinoidi a livello delle cellule ipofisarie.

Qui queste molecole sono in grado di inibire la secrezione della prolattina e dell'ormone della crescita, nonché di aumentare la produzione dell'ormone adrenocorticotropo (ACTH)[59]. A dimostrazione invece del ruolo dei cannabinoidi nella modulazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene e del loro coinvolgimento nelle risposte di stress, vi sono studi in grado di mostrare che gli agonisti cannabinoidi producono effetti ansiolitici.

A tutto questo si aggiunge la capacità del sistema endocannabinoide di modulare le risposte immunitarie ed infiammatorie e varie funzioni fisiologiche, tra cui quelle cardiovascolari (inducendo vasodilatazione e variazioni nella frequenza e nella gittata cardiaca), quelle respiratorie (provocando iper- o ipoventilazione e broncodilatazione), quelle riproduttive (inibendo la secrezione di testosterone, provocando anovulazione, rilassamento uterino) e quelle oculari (riducendo la pressione endoculare). Di grande interesse sono le proprietà antitumorali e

neuroprotettive di questa classe di composti, soggette a numerosi studi recenti con lo scopo di applicarle per la cura di malattie sempre più diffuse nel nostro secolo.

### ***1.2.6 Applicazioni terapeutiche dei cannabinoidi***

I cannabinoidi possono essere ampiamente utilizzati in ambito terapeutico grazie alla loro interazione recettori specifici ampiamente diffusi nel corpo umano; queste sostanze danno pertanto effetti che riguardano l'analgesia, il rilassamento muscolare, l'immunosoppressione, l'infiammazione, la regolazione della pressione intraoculare, l'emesi, l'attività antitumorale, la neuroprotezione, la stimolazione dell'appetito fino al miglioramento dell'umore [60].

La ricerca clinica attuale ha come obiettivo quello di sfruttare l'efficacia di queste sostanze contro il dolore cronico e i disturbi neurologici, mentre gli antagonisti dei recettori dei cannabinoidi sono oggetto di studi medici per combattere obesità e dipendenza da nicotina; a questo si aggiunge la loro potenziale utilità per il trattamento della dipendenza da alcool ed eroina, schizofrenia, condizioni di bassa pressione sanguigna, malattia di Parkinson, disturbi della memoria nel morbo di Alzheimer [61].

#### ➤ *ATTIVITÀ ANTIEPILETTICA*

I primi studi sugli effetti anticovulsivi dei cannabinoidi hanno riguardato il THC, ma successivamente sono stati estesi anche alle altre sostanze non psicoattive, perché dotate di caratteristiche simili al THC stesso. A questo scopo sono stati utilizzati i ratti ed è stato scoperto che CBDV e CBD potrebbero essere efficaci non solo per le crisi epilettiche, ma anche nel trattare specifici geni correlati [62].

In America la ricerca è in rapido sviluppo tanto che è stata permessa la sperimentazione clinica di cannabidiolo in diversi Stati (Alabama, Kentucky, Mississippi, Utah, e Wisconsin). Questa ricerca ha avuto inizio grazie alla storia di Charlotte Figi, affetta dalla sindrome da Dravet, una forma di epilessia, che arrivava a causarle 100 crisi epilettiche a settimana, i genitori, vivendo in Colorado dove dal 2000 esiste una legge che prevede l'uso di cannabis, hanno scelto di curarla proprio con un estratto di cannabis ricco di CBD, chiamato Charlotte's web, creato appositamente. La bambina da più di 4 anni assume l'estratto per tenere le crisi sotto controllo e oggi cammina da sola, va in bici e progredisce ogni giorno. La diffusione della notizia ha incentivato l'utilizzo di questi estratti per la cura di queste patologie; oggi si contano sempre più esperienze simili con importanti cambiamenti avvalorati anche da studi scientifici [63]. In uno studio recente il 90% dei bambini affetti da epilessia resistente ai farmaci, ai quali è stata

somministrata cannabis ad alto valore di CBD (rapporto CBD-THC 20:1), ha registrato una notevole diminuzione nella frequenza e nell'intensità delle crisi epilettiche [64].

➤ *ATTIVITÀ ANALGESICA*

Sin dall'antichità sono note le proprietà analgesiche della Cannabis, tra i suoi componenti infatti il CBD conferisce effetto analgesico più efficacemente del  $\Delta$ 9-THC, inibisce gli eritemi molto più che il  $\Delta$ 9-THC, blocca l'attività delle cicloossigenasi e delle lipossigenasi con una percentuale maggiore di quella del  $\Delta$ 9-THC [65]. Un altro componente dotato di buone proprietà analgesiche è il cannabicromene (CBC) , a questo si aggiunge effetto antimicrobico, calmante e stimolante.

➤ *RUOLO ANSIOLITICO*

Per quanto riguarda il rapporto tra la cannabis e l'ansia si possono avere due diversi effetti: in alcuni casi i cannabinoidi portano alcune persone a liberarsi da ansie, preoccupazioni e paure, generando fiducia e buon umore, in altre invece possono provocare reazioni opposte con lievi preoccupazioni fino a stati di negatività e agitazione. Questo è dovuto al fatto che molti dei recettori a cui si legano i cannabinoidi si concentrano nell'amigdala, la parte del cervello che gestisce le emozioni ed in particolar modo le nostre reazioni a paura, stress e paranoia e quando il THC agisce su questa parte del cervello ne modifica le comunicazioni o in modo positivo o negativo. Per questo dunque gli effetti variano sia da persona a persona, che a seconda delle differenti situazioni e dei diversi stati d'animo: il THC infatti a volte può sovraccitare i percorsi neurali portando stati ansiogeni, altre può invece influire positivamente, producendo benessere [66]; in particolare uno studio sui topi ha messo in evidenza come bassi dosaggi diano effetti anti-ansia [67]; uno studio più recente ha confermato questa ipotesi consentendo di concludere che bassi dosaggi di THC riducono l'ansia, alti dosaggi la incrementano [68]. Ma il cannabinoide più efficace per l'ansia e patologie ad essa associate, come la sindrome da disturbo post traumatico o il disturbo ossessivo-compulsivo, è il CBD [69]. Anche i terpeni svolgono un ruolo molto importante per combattere l'ansia, ne è un esempio il  $\beta$ -cariofillene, un agonista del recettore CB2 che produce molteplici cambiamenti comportamentali rilevanti per l'ansia e la depressione nei topi [70].

➤ *RILASSAMENTO MUSCOLARE*

Un altro importante effetto dei cannabinoidi riguarda le patologie che coinvolgono il sistema muscolare. I tremori muscolari derivano da un ciclo involontario di contrazioni e rilassamenti; si tratta di sintomi invalidanti comuni a svariate patologie motorie –associate,

come il Parkinson, la sclerosi multipla, la malattia di Huntington e forme di atassia. Degli studi hanno consentito di osservare un miglioramento dei sintomi nei fumatori di canapa e data l'alta densità di recettori dei cannabinoidi nell'area cerebrale responsabile delle funzioni motorie, molti ricercatori si sono chiesti se i composti cannabinoidi-associati potessero essere usati in terapia per alleviare tremori associati a disturbi del sistema nervoso centrale [71]. I cannabinoidi quindi trovano numerose applicazioni per combattere le malattie neurodegenerative, disordini con la più alta incidenza in tutte le popolazioni mondiali, caratterizzate dalla graduale perdita dei neuroni in aree del SNC. Alcuni esempi, tra le più famose e diffuse, sono: ischemia cerebrale, la malattia di Alzheimer (AD), Morbo di Parkinson (PD), la corea di Huntington (HD), la sclerosi multipla (SM) e la sclerosi laterale amiotrofica (SLA). Tutte queste sono accomunate dai meccanismi di progressione della malattia, la neuro-infiammazione, l'eccitotossicità, la disfunzione mitocondriale e lo stress ossidativo. Attualmente queste patologie non hanno una cura ma esistono solo terapie volte al trattamento dei sintomi e a ritardarne la progressione. Degli studi hanno dimostrato che il sistema degli endocannabinoidi, in presenza di malattie neurodegenerative, è alterato [72]; pertanto la sua modulazione potrebbe consentire il trattamento della neurodegenerazione oltre che nell'attenuazione dell'infiammazione e nella neuro-protezione, come è stato dimostrato da studi recenti. Nel caso del morbo di Parkinson, malattia cronica, neurodegenerativa e progressiva, caratterizzata dalla degenerazione dei neuroni dopaminergici che porta a sintomi motori caratteristici come: rigidità, bradicinesia e tremore. In seguito alla deplezione di dopamina, si osservano nel sistema endocannabinoide particolari alterazioni neurochimiche e neurofisiologiche, ovvero si nota una sovra espressione dei recettori CB1 e dei cannabinoidi endogeni con iperattività gluttamatergica che è contrastata dall'azione dei cannabinoidi (soprattutto quando interagiscono con i CB1). Per quanto concerne invece l'Alzheimer (AD), forma di demenza più diffusa che colpisce circa 34 milioni di persone, si sviluppa in seguito a lesioni del sistema nervoso centrale, per via della formazione di placche beta-amiloidi e atrofia corticale [73]. In seguito allo sviluppo di questa malattia il sistema endocannabinoide viene maggiormente espresso sulle cellule della microglia mentre c'è una deplezione di CB1 a livello ippocampale, si presuppone quindi un coinvolgimento di tali recettori nell'AD[74]. I farmaci più utilizzati dunque in terapia sono inibitori della acetilcolinaesterasi (AChE), capacità riconosciuta anche al  $\Delta^9$ -THC, o al CBD, in vivo, capace di inibire la formazione delle placche beta-amiloidi e determinare una riduzione della formazione dei ROS [75] limitando inoltre la propagazione della neuro-infiammazione e garantendo un effetto benefico nella via amiloidogena, tramite un meccanismo molecolare che coinvolge il recettore gamma proliferatore attivato del perossisoma (PPAR), riducendo l'apoptosi cellulare e aumentando la vita cellulare (studi svolti in vitro) [76]. Altri studi recenti hanno dimostrato che

l'uso combinato di  $\Delta$ 9-THC + CBD [77] ha migliori effetti rispetto all'utilizzo di un singolo cannabinoide, anche se gli effetti clinici dei cannabinoidi sull'uomo sono supportati ancora da dati scarsi.

➤ ATTIVITÀ IMMUNOSOPPRESSORIA

I cannabinoidi presentano anche spiccate attività immunosoppressive e antinfiammatorie, queste sostanze infatti interagiscono con i recettori CB1 e CB2, attivandoli e dando avvio a un meccanismo caratterizzato da quattro steps: apoptosi, inibizione della proliferazione cellulare, soppressione della produzione di citochine e chemiochine ed induzione delle cellule T regolatrici [78].

➤ ATTIVITÀ ANTINFIAMMATORIA

Il composto che presenta maggiori attività antinfiammatoria è il cannabidiolo (CBD), componente della canapa non psicotropo dotato di un elevato potenziale terapeutico [79]. Il CBD si lega in modo blando ai recettori CB1 e CB2, ma nonostante questo possiede una maggiore attività antinfiammatoria rispetto al  $\Delta$ 9-THC, riscontrata sia in saggi in vitro che in vivo; il CBD infatti è in grado di bloccare l'attività delle ciclossigenasi e lipossigenasi, portando al calo della formazione di TNF- $\alpha$ , fattore di necrosi tumorale, a questo si aggiunge il suo potenziale terapeutico contro l'artrite collagene-indotta murina. Tuttavia in condizioni acide può subire reazione di ciclizzazione trasformandosi in  $\Delta$ 9-THC.

Alcuni studi hanno dimostrato che un CBD-derivato, HU-444, che non può essere convertito tramite ciclizzazione in  $\Delta$ 9-THC, in vitro possiede attività antinfiammatoria: ovvero riduce la presenza degli intermedi reattivi dell'ossigeno e inibisce la produzione di TNF- $\alpha$  da parte dei macrofagi; in vivo invece porta alla soppressione di TNF- $\alpha$  ed al miglioramento dei danni epatici; inoltre, nei topi diminuisce l'incidenza dell'artrite collagene-indotta e non causa gli effetti psicotropi [80]. Altri studi hanno dimostrato che anche altri cannabinoidi come CBN, CBG, CBC e CBDA, sono inibitori delle prostaglandine più potenti del  $\Delta$ 9-THC [81].

➤ DIMINUZIONE DELLA PRESSIONE INTRAOCULARE

I due principali composti utilizzati in campo oculistico sono il CBN e il CBG, questi trovano applicazione per la cura del glaucoma oculare o come ipotensivo oculare oltre che come antimicrobico [82]. Alcuni cannabinoidi agonisti (WIN 55212-2, anandamide) si sono dimostrati una cura ideale per il glaucoma, riducendo efficacemente la pressione intraoculare, e comportandosi come neuroprotettori sulle cellule gangliari retiniche [83].



Il THC pur risultando come il componente della canapa in grado di diminuire maggiormente la pressione intraoculare [84], può portare a iperemia congiuntivale, eritema e chemosi; effetti indesiderati che con il CBD e il CBG non si verificano anche se la pressione intraoculare diminuisce in minor quantità [85].

➤ ATTIVITÀ ANTITUMORALE E NEUROPROTETTIVA

Per quanto riguarda il cancro per molti anni i cannabinoidi sono stati considerati farmaci lenitivi e non curativi, solo recenti studi hanno dimostrato la possibilità di utilizzare queste sostanze come veri e propri farmaci antitumorali.

Secondo lo studio pubblicato su Anticancer Research [86], infatti i cannabinoidi sono in grado di interferire con le cellule cancerose bloccandone lo sviluppo, e in alcuni casi, utilizzando schemi di dosaggio specifici, possono addirittura distruggerle. Dallo studio si evince che sono almeno 6 i cannabinoidi non-psicoattivi che hanno mostrato la capacità di inibire la crescita delle cellule leucemiche in tutte le fasi del ciclo cellulare; questa capacità viene accentuata dall'uso combinato dei differenti composti [87], la loro azione si basa sul blocco del ciclo cellulare (o autofagia) delle cellule cancerogene portando così alla loro morte.

Sempre nell'ambito della cura del cancro, in grande crescita è l'uso della Cannabis nella terapia del dolore. Il sistema endocannabinoide infatti esercita una vera e propria azione analgesica attraverso complessi meccanismi che modulano le informazioni

sopraspinali, spinali, e periferiche sensoriali e proprio grazie a questi processi che i cannabinoidi hanno un importante ruolo nel trattamento di tutti i tipi di dolore: acuto, post-operatorio, cronico, sia di origine neuropatica, sia di origine infiammatoria [88].

Gli studi sugli animali hanno messo in evidenza che gli agonisti cannabinoidi sono anche 10 volte più potenti della morfina [89], l'efficacia analgesica clinica non si è dimostrata però altrettanto promettente: i risultati hanno evidenziato che i cannabinoidi non sono più efficaci della codeina nel controllo della sintomatologia e che il loro uso è associato a numerosi effetti indesiderati. Molto probabilmente questa differenza di risposta tra uomo e animali è dovuta alla necessità di riduzione di dosaggio nell'uomo con lo scopo di ridurre gli effetti collaterali soprattutto psicotropi. Nuovi studi però hanno dimostrato che i farmaci contenenti cannabis sono in grado di dare effetti benefici nel trattamento del loro tanto che in Italia la cannabis e i suoi derivati con fini terapeutici sono compresi nella Farmacopea italiana XII edizione e secondo l'ultimo decreto DL 36/2014, la cannabis è classificata nella sezione B della tabella dei medicinali, appartenente alla tabella degli stupefacenti. In questa tabella dei medicinali sezione B sono presenti prodotti vegetali sia di origine industriale che allestiti in farmacia a base di cannabis:

- Δ9-tetraidrocannabinolo e trans-Δ9-tetraidrocannabinolo.
- Nabilone noto commercialmente come cesamet (derivato sintetico del delta-9-THC).
- Medicinali di origine vegetale a base di Cannabis (sostanze e preparazioni vegetali, inclusi estratti e tinture).

In assenza di medicinali regolarmente registrati e commercializzati in Italia è concessa la loro preparazione in farmacia dietro prescrizione medica, purchè la terapia sia documentata nella letteratura scientifica internazionale. Per le sue proprietà chimico-fisiche è possibile però realizzare solo delle cartine per uso orale o inalatorio mediante vaporizzatore. In letteratura, le indicazioni terapeutiche della cannabis sativa sono:

1. Terapia del dolore
2. Diminuzione della spasticità associata a dolore
3. Nausea e vomito in chemioterapia
4. Stimolazione dell'appetito in pazienti malati di cancro o HIV

In generale la maggior parte dei preparati a base di cannabis sono commercializzati sui siti web, dove si possono comprare numerosi estratti medicinali, cosmetici e alimentari ricchi in CBD come: concentrati, capsule, tinture, gocce, creme per uso topico, olio concentrato, infusi di terpeni, bevande, saponi, capsule e prodotti per animali domestici. I loro usi terapeutici sono molteplici e infatti sono impiegati: come antinfiammatori, antispasmodici, vasodilatatori, antidiabetici, antimicrobici e per ridurre il dolore muscolare, articolare e neuropatico [90]. Sono inoltre disponibili prodotti alimentari a base di cannabinoidi, principalmente CBD, che portano notevoli benefici per la dieta; in particolare l'olio di semi di canapa è noto per il suo ottimo rapporto omega-sei/omega-tre di 3:1.

### ***1.2.7 Normativa sull'uso dei cannabinoidi***

La cannabis, come tutte le altre sostanze d'abuso, è da tempo oggetto di numerose dispute tra coloro che ne propongono il proibizionismo e le spinte antiproibizioniste. La questione è diventata di particolare interesse a partire dai primi anni del 900, colpendo il panorama internazionale a partire dal primo trattato riguardante il controllo delle sostanze d'abuso, l'International Opium Convention del 1912, sottoscritto da dodici potenze tra cui l'Italia, avente come obiettivo il controllo della produzione, della distribuzione, della vendita, dell'importazione di morfina e cocaina. Questo trattato entrò in vigore a livello mondiale nel 1919 con l'inclusione nel Trattato di Versailles. Successivamente nel 1924 una seconda conferenza istituì un organismo internazionale di controllo, il Permanent Central Opium Board e decise di inserire la cannabis, al pari di morfina e cocaina tra le sostanze narcotiche con la decisione di stabilire un

controllo che impedisse il traffico illecito della Cannabis indica; mentre ne furono dichiarate legittime la manifattura, l'importazione, la vendita, la distribuzione, l'esportazione e l'uso al solo scopo medicoscientifico. Nonostante questa convenzione, sulla base degli effetti psicotropi ritenuti dannosi, numerosi stati la dichiararono illegale anche se furono sempre più numerosi gli studi che portarono alla luce gli effetti benefici dell'azione euforizzante e stimolante dell'appetito negli stati depressivi e ansiosi, con il loro potenziale trattamento della sindrome astinenziale da morfina, dell'epilessia e della cura di infezioni batteriche.

Nel 1961 la Single Convention on Narcotic Drugs ratificò tutti i trattati multilaterali già esistenti sul controllo delle droghe, e il principale obiettivo fu di limitare il possesso, l'uso, il commercio, l'importazione, l'esportazione e la produzione delle sostanze stupefacenti esclusivamente a scopi medici e scientifici. Negli stessi anni però gli studi sulla cannabis si intensificarono e portarono a scoperte sempre più interessanti sul potenziale terapeutico di tale sostanza anche nel trattamento tumorale. Negli anni '70 le sostanze furono riorganizzate pertanto in quattro Programmi, al fine di regolamentarne l'uso: la cannabis fu inserita nel Programma I, il più restrittivo, tra i composti ad alto rischio di abuso, e senza approvazioni terapeutiche riconosciute.

### ***1.2.8 Realtà attuale***

La legislazione italiana non vieta espressamente la coltivazione di canapa industriale, tuttavia un'errata interpretazione delle leggi antidroga ha portato le forze dell'ordine ad arrestare e sequestrare le coltivazioni della canapa da fibra e seme negli anni '70, '80 e '90. Questa situazione di incertezza si è protratta fino al dicembre del 1997, anno della circolare n.734 del Ministero delle Politiche Agricole e Forestali contenente disposizioni relative alla coltivazione della Cannabis sativa, integrata poi della circolare n.1 dell'8 maggio 2002.

Il regolamento CE n. 73/2009, ha stabilito l'obbligo di impiegare esclusivamente sementi certificate, dalla direttiva 2002/57/CE inserite nel catalogo comune delle varietà per uso agricolo con un contenuto massimo di THC certificato dello 0,2; a questo si aggiunge la necessità di rispettare alcune condizioni ovvero una volta avvenuta la semi, si deve far comunicazione alla più vicina stazione delle Forze dell'Ordine e l'agricoltore deve inserire la coltivazione nella denuncia PAC (politica agricola comune) stipulando inoltre un contratto di coltivazione con un primo trasformatore autorizzato. Importante è una circolare del ministero della Salute del 22/05/2009 che consente la produzione e commercializzazione di prodotti a base di semi di canapa per l'utilizzo nei settori dell'alimentazione umana; per quanto invece riguarda la cannabis

“da droga” nel febbraio 2014 la Corte Costituzionale ha dichiarato la legge Fini-Giovanardi incostituzionale, per le modalità con cui era stata approvata, annullandola con effetto retroattivo: questa legge del 46/2006 equiparava le droghe leggere a quelle pesanti e reintroduceva il concetto quantitativo per distinguere tra consumo personale e spaccio. Dal 2006 alla sua abrogazione nel 2014, la Fini-Giovanardi ha portato ad una vera e propria incarcerazione di massa, con oltre 200mila ingressi in carcere.

Con la legge 79/2014 è stata confermata l’illegalità della coltivazione di cannabis, “ad eccezione della canapa coltivata esclusivamente per la produzione di fibre o per altri usi industriali (...), consentiti dalla normativa dell’Unione Europea”.

L’abrogazione della Fini-Giovanardi ha fatto ritornare in vigore la legge “Jervolino-Vassalli”, 162/1990, che pur considerandole entrambe illecite, distingueva tra droghe leggere pesanti e prevedeva sanzioni soprattutto di tipo amministrativo. Inoltre, il “decreto Lorenzin” (36/2014), riorganizzando le sostanze in quattro tabelle: la prima e la terza raggruppano le droghe pesanti (tra cui “i tetraidrocannabinoli, i loro analoghi, le sostanze ottenute per sintesi o semi-sintesi che siano ad essi riconducibili”); la seconda e la quarta quelle leggere (tra cui “la Cannabis indica e i prodotti da essa ottenuti”). In questo modo la detenzione o l’acquisto per uso personale non hanno più rilevanza penale e non viene fissata la quantità per uso personale, sarà il giudice a valutare l’entità della pena.

Per quanto riguarda l’uso medico e terapeutico della Cannabis, in Italia le cure sono ammesse e assolutamente legittime. Nel “bugiardino” pubblicato dal ministero della Salute sulla “Gazzetta Ufficiale” nel dicembre 2015, alcuni giorni dopo aver emanato il decreto 279/2015 sull’uso terapeutico della pianta, si afferma che l’uso medico della cannabis non può essere considerato una terapia a tutti gli effetti ma solo un trattamento sintomatico di supporto alle cure standard quando queste non hanno dato gli effetti desiderati.

Attualmente la legalizzazione della cannabis è un tema molto discusso: molti stati nel mondo si stanno aprendo a questa nuova opportunità. L’esperienza del Colorado mostra che la legalizzazione delle droghe leggere non comporta aumenti di spesa sanitaria, si registra invece una diminuzione delle risorse impiegate per reprimere i crimini connessi allo spaccio e in generale all’illegalità della sostanza.

Il 19 dicembre 2019 è stata varata una legge che consente e non considera pertanto punibile la coltivazione domestica di cannabis per solo uso personale: pertanto coloro che coltivano la Cannabis in ambito domestico e per impiego individuale non sono perseguibili penalmente. È stato così capovolto l’indirizzo assunto in precedenza, accogliendo l’orientamento secondo cui il bene giuridico della salute pubblica non è messo a repentaglio da chi semina e raccoglie, per sé, marijuana. In precedenza la Consulta aveva sancito il divieto di coltivazione di

cannabis e stabilito che la sua violazione risultava perseguibile penalmente indipendentemente dal quantitativo delle piantine e del principio attivo, comprendendo nel divieto ogni ipotesi di coltivazione finalizzata all'impiego personale. La legge affermava infatti che la coltivazione di piante da cui sono estraibili i principi attivi di sostanze stupefacenti veniva considerata idonea a minacciare il bene della salute dei singoli per il fatto di realizzare, anche solo in via potenziale, più opportunità di spaccio di droga. La Corte di Cassazione, in linea con la posizione assunta dalla Corte Costituzionale, ne aveva condiviso i principi giuridici propugnati: la coltivazione di marijuana, seppur in dosi esigue è perseguibile penalmente indipendentemente dallo stato in cui era trovata la piantagione al momento dei controlli da parte delle autorità.

### ***1.2.19 Tecniche di estrazione:***

A causa della sua complessità chimica, la Cannabis sativa viene sottoposta a metodi strumentali per l'estrazione dei suoi componenti; esistono infatti diverse metodiche per i composti naturali nelle infiorescenze di cannabis. Tra le più utilizzate vi è l'estrazione con solvente e l'estrazione con fluidi supercritici.

Dato il carattere apolare dei cannabinoidi, è necessario usare durante l'estrazione sostanze apolari, in passato si usavano solventi pericolosi e tossici come butano, esano, etanolo e alcool isopropilico; le concentrazioni di estratto che si ottenevano in queste condizioni erano estremamente variabili e presentavano anche varie percentuali di terpeni e altre sostanze oltre che residui di solvente impendendo quindi delle estrazioni ottimali ed ecologicamente sostenibili.

Poiché i cannabinoidi presenti originariamente nella Cannabis sono degli acidi, ovvero presentano un carbonio carbossilico sulla componente olivetolica, come mostrato nella figura 16 in posizione 2 nell'anello aromatico. I cannabinoidi neutri derivano dalla perdita del carbonio addizionale durante i processi di raccolta del materiale vegetale, di esposizione alla luce, alle alte temperature, di variazione del pH. Il THC, CBG, CBD, CBC e tutti gli altri composti neutri non sono dunque composti naturali, ma prodotti dell'estrazione in quanto nella pianta non sono presenti sostanze neutre [91]; a questo si aggiunge la possibilità di ossidazione dei diversi cannabinoidi in altri, per esempio il THC ossidandosi si trasforma in CBN [92].

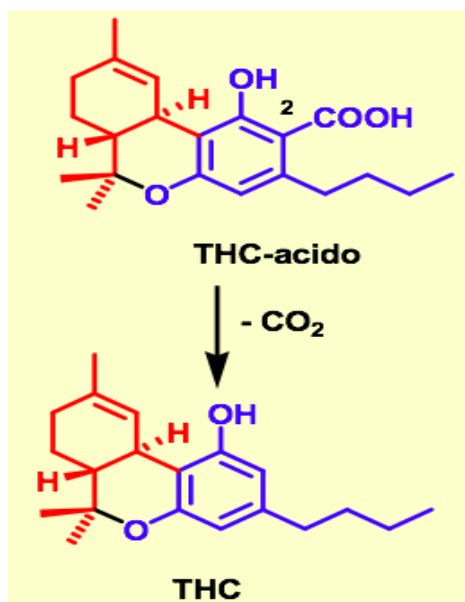


Figura 16. Decarbossilazione del THC

➤ ***ESTRAZIONE CON SOLVENTE***

Un metodo di separazione è l'estrazione con solvente che prevede l'uso di un solvente organico apolare consentendo la separazione di una o più sostanze da una matrice. Ci sono due tipologie di estrazione con solvente: estrazione liquido-solido ed estrazione liquido-liquido.

Il primo tipo consente di estrarre le sostanze direttamente dalla droga solida e usa un apparecchio noto come Soxhlet, in cui la droga, contenuta all'interno di un ditale in cellulosa, viene a contatto con il solvente estraente, che prima di bagnare la droga, viene sottoposto ad ebollizione e i cui vapori vengono poi condensati nel refrigerante e fatti ricadere all'interno della camera contenente la droga. Non appena il solvente raggiunge un certo volume, viene sifonato nel pallone di raccolta dove ricomincia il ciclo, si ha in questo modo un'estrazione a ciclo continuo. Un altro strumento molto simile al Soxhlet è il Soxtec, che a differenza del primo richiede un tempo di estrazione di gran lunga minore, in questo caso però la droga è a diretto contatto con il solvente e il processo è automatizzato. In seguito all'estrazione si procede con la separazione dei diversi componenti in base alla loro polarità mediante un'estrazione liquido-liquido; è necessario però che i solventi siano immiscibili tra loro in modo che il soluto si ripartisca tra essi.

➤ ***ESTRAZIONE CON FLUIDI SUPERCRITICI:***

Si tratta di un tipo di estrazione solido-liquido, in cui il solvente è costituito da un fluido supercritico, ovvero una sostanza che si trova al di sopra del suo punto critico, cioè l'insieme di

particolari condizioni di massima temperatura e massima pressione (dette temperatura critica e pressione critica) in corrispondenza delle quali una sostanza può esistere come miscela bifase gas-liquido con proprietà fisiche, densità e viscosità intermedie tra quelle di un gas e quelle di un liquido. In questo modo il fluido supercritico è in grado di penetrare in un materiale come se fosse un gas sotto alta pressione, ma di avere proprietà solvatanti simili a quelle di un liquido. I fluidi supercritici pertanto possono essere utilizzati per estrarre i principi attivi dal materiale vegetale in modo efficiente e rapido.

Il più utilizzato è sicuramente l'anidride carbonica poiché è dotata di parametri critici relativamente bassi ( $T_c = 31.04^\circ\text{C}$ ;  $P_c = 73.83 \text{ bar}$ ;  $\rho_c = 468 \text{ Kg/m}^3$ ); inoltre è priva di tossicità, è inerte, non infiammabile, poco costosa, riciclabile, non lascia residui di sostanze solventi e quindi priva di impatto sull'ambiente. Per questi motivi anche la Food and Drug Administration, cioè l'ente governativo statunitense che si occupa della regolamentazione dei prodotti alimentari e farmaceutici, ne riconosce l'innocuo utilizzo.

La preferibilità dell'utilizzo dell'anidride carbonica riguarda anche il fatto che le sostanze naturali spesso sono poco stabili a temperature elevate richiedendo di essere trattate a temperature vicine a quella ambiente, l'anidride carbonica ben si presta a questa necessità poiché possiede una temperatura critica di  $31^\circ\text{C}$ , inoltre ha buone proprietà solvatanti per molecole apolari o di media polarità. Gli estratti ottenuti mediante questa tecnica sono microbiologicamente stabili e praticamente sterili; inoltre questo procedimento è altamente selettivo e mirato, non comporta stress termico e, soprattutto, non richiede l'impiego di solventi organici, tossici per la salute umana e dannosi per l'ambiente consentendo l'ottenimento di prodotto di elevatissima qualità, aumentando così la sua resa economica.

### ➤ CROMATOGRAFIA SU COLONNA

In generale per separare i componenti di una matrice vegetale viene usata la cromatografia su colonna, che si sfrutta la diversa affinità delle singole sostanze nei confronti di una fase stazionaria prestabilita. Si tratta di una proprietà che dipende dalle diverse strutture molecolari delle sostanze e a come esse interagiscono con la fase stazionaria. In genere il sistema cromatografico su colonna è costituito da più parti: un serbatoio, detto reservoir, al cui interno è contenuta la fase mobile collegato alla cima della colonna, una colonna, di varie dimensioni in base alla quantità di campione da isolare, contenente la fase stazionaria e una serie di raccoglitori, solitamente provette.

L'eluizione della fase mobile all'interno della colonna può avvenire per gravità o in seguito all'applicazione di una leggera pressione utilizzando un gas inerte come l'azoto. Il

campione in genere viene caricato manualmente sulla sommità della fase stazionaria, la cui scelta assieme a quella della fase mobile deve essere molto accurata in quanto da esse dipende la qualità della separazione.

Solitamente la scelta si basa valutando le caratteristiche chimiche delle molecole da separare, a questo si aggiunge il fatto che la fase stazionaria può essere impaccata in due modi diversi:

- Impaccamento ad umido: la fase stazionaria è introdotta in colonna in sospensione con la fase mobile che viene poi fatta eluire permettendo così alla fase stazionaria un ulteriore impaccamento;
- Impaccamento a secco: la fase stazionaria è caricata a secco e poi verrà bagnata dalla fase mobile direttamente in colonna.

È importante che l'eluizione avvenga a velocità costante, successivamente le frazioni separate vengono raccolte in un sistema costituito quasi sempre da provette e possono essere poi analizzate con altre tecniche cromatografiche (gascromatografia, TLC) in modo da identificarne i componenti. Un'alternativa è rappresentata dalla cromatografia su strato sottile, in cui la fase stazionaria è costituita da uno strato sottile di materiale (di solito gel di silice, allumina o cellulosa) distribuito su un supporto di vetro o alluminio mentre la fase mobile utilizzata è un solvente in grado di separare i vari componenti della miscela. In questo caso per l'isolamento vengono utilizzate piastre TLC preparative, sulle quali è fatta eluire la fase mobile in apposite camere cromatografiche; successivamente le zone contenenti la sostanza da analizzare vengono individuate e asportate per poi essere recuperate.

#### ➤ DISTILLAZIONE:

Un altro metodo è la distillazione, un processo composto da tre fasi: estrazione, separazione e recupero di una sostanza. Durante il procedimento i vari componenti passano dallo stato liquido allo stato di vapore, per poi condensare. Si tratta di una tecnica particolarmente usata quando si vuole ottenere l'olio essenziale di una determinata pianta. Per la separazione si sfrutta il diverso punto di ebollizione del solvente di estrazione, solitamente acqua, e degli oli essenziali. Per l'ottenimento degli oli essenziali vengono utilizzate in generale due tecniche di distillazione: la distillazione in corrente di vapore e la distillazione a secco. La distillazione in corrente di vapore è adatta per la maggior parte delle piante aromatiche e soprattutto quando si ha la droga fresca, ai fini di evitare l'alterazione dei componenti della pianta; con questa tecnica infatti si predilige l'uso di sostanze termolabili, che cioè in prossimità del loro punto di ebollizione tendono a degradarsi.



La droga viene disposta su una griglia all'interno della camera di distillazione, senza essere a contatto diretto con l'acqua. Il vapore generato dal riscaldamento dell'acqua bagna la superficie della droga estraendone le sostanze volatili, per poi evaporare nuovamente trascinandole con sé, a tal punto il vapore con le sostanze volatili, viene condensato all'interno di un refrigerante e il condensato viene raccolto sotto forma di miscela eterogenea acqua-olio. Le due fasi, oleosa e acquosa, saranno in seguito separate. Nella distillazione a secco invece la droga viene riscaldata direttamente, senza l'utilizzo dell'acqua e i vapori che si formano vengono condensati e raccolti. L'apparecchiatura usata nei due diversi metodi è molto simile, la differenza sta nel fatto che con la distillazione a secco si raggiungono temperature molto elevate.

### **1.2.10 Metodi analitici per la caratterizzazione dei composti:**

I principali metodi analitici per la caratterizzazione della Cannabis sativa sono la gascromatografia (GC) o la cromatografia liquida su colonna (HPLC), si tratta di tecniche di separazione solitamente accoppiate o ad uno spettrometro di massa (MS) o ad un detector UV; queste consentono una determinazione sensibile, specifica, qualitativa e/o quantitativa dei costituenti della canapa. Vengono utilizzate anche altre tecniche come l'Optimum Performance Laminar Chromatography (OPLC), l'elettro-cromatografia capillare, time-resolved fluoro-immunological method, immunoassay, molte delle quali però richiedono tempi e costi elevati [93]. In generale vengono utilizzate tecniche come la cromatografia su strato sottile ad alta prestazione (HPTLC) ed altre tecniche non strumentali come la cromatografia su strato sottile (TLC), per scopi di screening o test sul campo.

La cromatografia è un metodo fisico per la separazione dei componenti di una miscela basata sulla distribuzione tra due fasi: la fase stazionaria e la fase mobile; il principio su cui si basa è che le sostanze che presentano una maggiore affinità per la fase stazionaria sono maggiormente trattenute per cui impiegheranno più tempo a percorrere la colonna cromatografica viceversa, le sostanze caratterizzate da una minore affinità con la fase stazionaria sono meno trattenute, quindi il tempo di ritenzione, ovvero il tempo necessario per attraversare la colonna, sarà più breve.

Poiché in questo lavoro di tesi è stata utilizzata la cromatografia liquida su colonna HPLC, si focalizzerà l'attenzione sulla descrizione dettagliata di questa tecnica.

➤ CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA PRESTAZIONE (HPLC)

La cromatografia liquida ad alta prestazione, HPLC (High Performance Liquid Chromatography), è una delle tecniche cromatografiche più utilizzate per le analisi fitochimiche per la sua specificità, sensibilità e precisione. Questa permette infatti di sfruttare l'equilibrio di affinità tra una fase stazionaria presente all'interno della colonna cromatografica e una fase mobile che scorre attraverso essa, per separare una miscela di composti presente nel campione in esame. Esistono vari tipi di colonne cromatografiche, distinte per tipo di fase stazionaria, dimensioni, lunghezza e diametro interno; a questi principali parametri caratterizzanti si aggiungono l'efficienza della colonna, proporzionale alla lunghezza stessa della colonna cromatografica; la capacità e il flusso proporzionali invece al diametro interno della colonna. Nella maggior parte dei casi vengono usate colonne impaccate, il cui supporto cioè è costituito da silice, se questa viene usata come fase stazionaria si parla di "Normal Phase HPLC", se invece la si derivatizza con sostanze apolari, tra cui le più diffuse sono catene idrocarburiche C8 e C18, si parla di "Reversed Phase HPLC", tecnica quest'ultima principalmente impiegata per l'analisi di composti di origine vegetale. Poiché è possibile scegliere tra diversi tipi di fasi stazionarie, fasi mobili e detector selettivi, i metodi HPLC si possono definire molto versatili e quindi adatti per analizzare composti attivi appartenenti a droghe vegetali e loro derivati. Altri vantaggi che rendono questa tecnica la più diffusa sono l'elevata sensibilità e risoluzione, la rapidità delle analisi e l'automazione, infatti grazie a degli autocampionatori lo strumento è in grado di proseguire le analisi senza bisogno di un operatore.

Per quanto riguarda l'analisi fitochimica della Cannabis sativa L., le tecniche HPLC descritte in letteratura sono basate su metodi HPLC-UV/DAD e HPLC-MS che per esempio rispetto alla gas cromatografia hanno il vantaggio di non causare la degradazione dei componenti dei campioni: le temperature raggiunte in GC infatti, portano alla decarbossilazione degli acidi presenti nella Cannabis, lasciando invariati i corrispettivi cannabinoidi neutri; con l'HPLC invece è possibile identificare e quantificare i cannabinoidi acidi senza avere inconvenienti.

L'HPLC in genere è accoppiato ad un detector e un computer, che consentono un'analisi in continuo all'uscita della colonna e, tramite il cromatogramma, permettono di poter identificare le sostanze iniettate in base alla presenza dei picchi e di quantificarle tramite opportune integrazioni delle aree sottese ai picchi.

## **Capitolo 2 .Parte sperimentale**

### **2.1 Determinazione di ossalati e citrati in campioni urinari**

#### **2.1.1 Preparazione delle soluzioni**

Per le prove preliminari sono state preparate soluzioni di tampone acetato 1 molare a tre diversi pH: 3; 3,5 e 4; a partire da acido acetico (Sigma Aldrich ) e sodio acetato (Sigma Aldrich).

Questi tamponi sono stati utilizzati per preparare le soluzioni madre di Ferro ossalato, Ferro citrato, Rame ossalato, Rame citrato, Cromo ossalato e Cromo citrato 10 mmol. Le soluzioni dei metalli usati sono soluzioni standard prodotte dalla Sigma Aldrich a concentrazione 1 g/L.

### **2.2 Ottimizzazione del metodo cromatografico per l'analisi dei Cannabinoidi**

#### **2.2.1 Preparazione dello standard**

Lo standard utilizzato in questo lavoro di tesi consiste negli otto componenti principali della Cannabis sativa, ovvero CBDA, CBD, CNBG, THCV, THCA, CBN, THC, CNBC; a cui è aggiunto lo standard interno. Tutti gli otto componenti utilizzati si trovano in commercio come fiale da 1 mg/mL prodotte dalla Sigma Aldrich. Ciascuna di queste fiale viene conservata a -20°C in congelatore. Lo standard interno consiste in una soluzione di acido mefenamico, 1mg/mL conservata in frigorifero. A partire dalle fiale dei diversi cannabinoidi si preparano delle soluzioni da 100 mL con concentrazione 2 µg/mL.

#### **2.2.2 Preparazione della fase mobile**

La fase mobile utilizzata in tutte le prove sperimentali eseguite è costituita da una componente organica (metanolo) e una acquosa (tampone di sodio fosfato). Il metanolo usato è della Carlo Erba per UHPL-C UN1230. Il tampone fosfato è stato preparato a partire da acido fosforico (Carlo Erba) e fosfato acido di sodio. E' stata preparata una soluzione madre a pH 3 e 50 mM e a partire da questa sono state realizzate le altre ai diversi pH di lavoro per aggiunta di fosfato acido di sodio. Lo strumento HPLC in dotazione è dotato di apparecchiatura in grado di miscelare le due componenti della fase mobile in modo automatico.

Alcune prove di ottimizzazione sono state realizzate con una fase mobile a tre componenti: metanolo, tampone fosfato e acetonitrile (Sigma Aldrich).

### **2.2.3 Strumentazione HPLC**

Lo strumento HPLC in dotazione nel laboratorio è un modello modulare 1100 prodotto da Agilent Technologies (Waldbronn, Germania), con un rivelatore UV-VIS impostato ad una lunghezza d'onda di 260 nm. Lo strumento è gestito dal software Agilent ChemStation per sistemi LC/LC-MS. Lo strumento è dotato di un autocampionatore che preleva un'aliquota di 10 µL ad iniezione.

### **2.2.4 Colonne cromatografiche utilizzate**

In questo lavoro di tesi sono state utilizzate colonne prodotte da Agilent Technologies e Variant, ad uso generico e molto versatili. Questa scelta è giustificata dal fine stesso del lavoro di questa ricerca, ovvero quello di ottimizzare un metodo che possa essere applicato anche nei laboratori meno forniti e con costi di lavoro contenuti.

In particolare sono state usate le seguenti colonne:

- ✓ Colonna C18 (Agilent) Zorbax Eclipse Plus 4,6 x 100 mm e particelle della fase stazionaria con dimensioni 3,5 µm (Colonna A);
- ✓ Colonna C18 (Agilent) Poroshell 120 EC-C18 4,6 x 50mm con fase stazionaria avente particelle di dimensioni 2,7 (Colonna B);
- ✓ Colonna Zorbax (Agilent) EC-18 3,0 x 50mm con dimensione delle particelle 2,7 µm;
- ✓ Colonna Varian Pursuit XRs C18 con le seguenti dimensioni 4,6 x 50 mm e particelle di 3 µm.

### **2.2.5 Preparazione delle soluzioni standard di calibrazione**

Per la realizzazione della retta di calibrazione sono stati utilizzati 5 soluzioni standard a concentrazione crescente e un bianco. Il bianco è costituito da metanolo e acido mefenamico. A partire dalla soluzione madre a 2 mg/mL contenente gli otto cannabinoidi per diluizione sono state preparate 5 soluzioni standard a concentrazione crescente 0,1, 0,2, 0,5, 1 e 2 mg/mL. A ciascuno degli standard sono stati aggiunti 50 µL di acido mefenamico 1 mg/mL.

### **2.2.6 Preparazione dei campioni**

Sono stati analizzati 10 campioni oleosi di cannabis. Ciascuno è stato diluito 1:100 con isopropanolo (Carlo Erba). I campioni così trattati sono stati ulteriormente diluiti con metanolo e ad essi è stato aggiunto lo standard interno.

## Capitolo 3. Risultati e discussione

### 3.1 Analisi preliminari di ossalati e citrati

#### 3.1.1 Analisi in assorbimento atomico

Le analisi preliminari sono state eseguite in assorbimento atomico e per ciascuna soluzione sono state registrate le assorbanze in un dato intervallo di lunghezza d'onda, con lo scopo di osservare se si fossero notate significative differenze del valore di assorbanza in presenza degli anioni carbossilici, con il fine di comprendere anche se ai valori di pH indagati i metalli considerati (Fe; Cu; Cr) formassero complessi stabili con citrato e ossalato. Di seguito le Tabelle 3-11 riportano le assorbanze registrate nell'intervallo di lunghezza d'onda 320 nm- 420 nm relative al ferro..

*Tabella 3. Ferro in tampone acetato a pH 3*

<b>Lunghezza d'onda (nm)</b>	<b>Assorbanza</b>
320	0.454
330	0.624
340	0.450
360	0.268
380	0,087
400	0,004
420	0

*Tabella 4. Ferro e ossalato in tampone acetato a pH 3*

<b>Lunghezza d'onda (nm)</b>	<b>Assorbanza</b>
320	1.148
330	0.838
340	0.739
360	0.518
380	0.321
400	0.174
420	0.081

Tabella 5. Ferro e citrato in tampone acetato a pH 3

<b>Lunghezza d'onda (nm)</b>	<b>Assorbanza</b>
320	0.354
330	0.353
340	0.333
360	0.229
380	0.114
400	0.050
420	0.018

Tabella 6. Ferro in tampone acetato a pH 3.5

<b>Lunghezza d'onda (nm)</b>	<b>Assorbanza</b>
320	0.579
330	0.604
340	0.576
360	0.348
380	0.118
400	0.012
420	0

Tabella 7. Ferro e ossalato in tampone acetato a pH 3.5

<b>Lunghezza d'onda (nm)</b>	<b>Assorbanza</b>
320	0.798
330	0.576
340	0.524
360	0.362
380	0.226
400	0.124
420	0.056

Tabella 8. Ferro e citrato in tampone acetato a pH 3.5

<b>Lunghezza d'onda (nm)</b>	<b>Assorbanza</b>
320	0.686
330	0.688
340	0.666
360	0.488
380	0.276
400	0.146
420	0.073

Tabella 9. Ferro in tampone acetato a pH 4

Lunghezza d'onda (nm)	Assorbanza
320	0.600
330	0.619
340	0.589
360	0.349
380	0.118
400	0.012
420	0

Tabella 10. Ferro e ossalato in tampone acetato a pH 4

Lunghezza d'onda (nm)	Assorbanza
320	0.772
330	0.593
340	0.508
360	0.342
380	0.208
400	0.111
420	0.048

Tabella 11. Ferro e citrato in tampone acetato a pH 4

Lunghezza d'onda (nm)	Assorbanza
320	0.314
330	0.280
340	0.262
360	0.210
380	0.151
400	0.093
420	0.047

Come si può osservare non ci sono sostanziali differenze del valore di assorbanza nell'intervallo considerato, che corrisponde ai valori di lunghezza d'onda in cui il metallo può assorbire. Il ferro quindi non risulta idoneo allo scopo dello studio.

Le Tabelle 12-15 riportano i dati registrati con il Cromo; in questo caso la situazione risulta ancora più complicata in quanto in presenza degli anioni carbossilati viene meno l'assorbimento stesso, anche se si cambia il range di lunghezza d'onda. Pertanto poiché variando

il pH la situazione non cambia sono state riportate solamente le misure a pH 3 a scopo esplicativo.

*Tabella 12. Cromo in tampone acetato a pH 3*

<b>Lunghezza d'onda (nm)</b>	<b>Assorbanza</b>
550	0.013
570	0.014
590	0.013
610	0.008
620	0.006
640	0.004
660	0

*Tabella 13. Cromo e ossalato in tampone acetato a pH 3*

<b>Lunghezza d'onda (nm)</b>	<b>Assorbanza</b>
550	0
570	0
590	0
610	0
620	0
640	0
660	0

*Tabella 14. Cromo e citrato in tampone acetato a pH 3*

<b>Lunghezza d'onda (nm)</b>	<b>Assorbanza</b>
550	0
570	0
590	0
610	0
620	0
640	0
660	0

Il rame mostra un comportamento analogo al Cromo e pertanto non sono state riportate le tabelle lunghezza d'onda- assorbanza.

### **3.2 Ottimizzazione del metodo cromatografico per l'analisi dei cannabinoidi**

#### **3.2.1 Ottimizzazione delle condizioni di separazione**



Le prove di ottimizzazione delle condizioni di separazione sono state eseguite principalmente con due delle 4 diverse colonne cromatografiche indicate nel capitolo 2, colonna A e B. Un primo set di misurazioni è stato eseguito utilizzando la colonna A (C18 (Agilent) Zorbax Eclipse Plus 4.6 x 100 mm e particelle della fase stazionaria con dimensioni 3.5  $\mu\text{m}$ ); successivamente è stata usata la colonna B (C18 (Agilent) Poroshell 120 EC-C18 4,6 x 50mm con fase stazionaria di particelle di dimensioni 2.7  $\mu\text{m}$ ). I fattori discriminanti tra queste colonne sono la loro lunghezza ed il diametro delle particelle della fase stazionaria.

Facendo riferimento alla teoria della cromatografia liquida ci si può aspettare che con la colonna A i tempi di analisi siano maggiori, in quanto l'analita segue un percorso più lungo, ma il potere di separazione sia migliore in quanto all'aumentare della lunghezza della colonna aumenta anche il numero di piatti teorici presenti per unità di lunghezza. Esistono tuttavia dei limiti alla lunghezza di una colonna in relazione all'allargamento dei picchi.

Bisogna inoltre ricordare che il numero dei piatti teorici è strettamente correlato all'area della fase stazionaria: minori sono le dimensioni delle particelle della fase stazionaria migliore sarà la risoluzione anche se aumenta la resistenza al flusso dell'eluente. Pertanto può essere che con la colonna B si ottenga un potere di risoluzione migliore in quanto dotata di particelle più piccole.

### **3.2.1.1 Colonna A**

La maggior parte delle prove di ottimizzazione delle condizioni separative sono state eseguite con la colonna più lunga (A) e si sono articolate in una serie di fasi. In un primo momento si è ottimizzato il gradiente, lo scopo è stato identificare il gradiente che consentisse sia una separazione più netta dei picchi, soprattutto quelli relativi a CBD, CNBG e THCV, difficilmente separabili [92] sia una diminuzione dei tempi di analisi. In questa prima fase quindi lavorando a pH 3.5 della fase inorganica della fase mobile, ovvero di fosfato a una temperatura fissa è stato variato il gradiente nel corso del tempo di analisi. I diversi gradienti sperimentati e i relativi cromatogrammi sono riportati nell'appendice 1, la tabella sottostante riporta il gradiente di lavoro ottimale, ossia quello che risponde ai requisiti sopra descritti. In generale si è lavorato alternando fasi isocratiche, ovvero a percentuale di volume di componente organica costante con fasi a gradiente, cioè intervalli di variazione della percentuale delle due fasi. L'importanza della combinazione di questi due fattori incide sulla facilità di separazione, una rapida variazione della fase organica è fondamentale per il trasporto dei composti maggiormente lipofili ovvero THCA, THC, CBN e CNBC mentre la variazione della fase inorganica gioca un ruolo fondamentale per la separazione dei composti meno trattenuti perché meno lipofili ovvero CBDA, CBD, CNBG e THCV.

A conclusione di queste prove si conclude che il gradiente ottimale, ovvero quello che consente la migliore separazione con picchi ben definiti alla base, è quello riportato nella Tabella 15.

*Tabella 15. Gradiente ottimale*

<b>Tempo (min)</b>	<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%)</b>	<b>MeOH(%)</b>
0	30	70
7	15	85
10	5	95
13	5	95
14	30	70

#### ***Ottimizzazione della temperatura, flusso e pH***

Impiegando le condizioni ottimizzate del gradiente della fase mobile, sono state studiate le condizioni ottimali di temperatura, flusso e pH.

#### ***Studio dell'effetto del pH sulla separazione***

Per lo studio dell'influenza del pH sulla separazione sono stati mantenuti fissi i valori di temperatura e flusso e si è lavorato ai seguenti valori di pH: 3.25, 3.5, 3.75, 4.0, 4.25 e 4.5. Questo intervallo di pH è stato scelto sulla base delle caratteristiche della colonna; scendere sotto un pH di 3 significherebbe stressare l'analisi, facendo lavorare la colonna in condizione "estreme", la ditta produttrice indica come condizioni di lavoro ideali quelle tra pH 3 e 6. Inoltre sono state prese in considerazione le caratteristiche chimiche dei composti da separare e le indicazioni di studi analoghi riportati in letteratura. Per ciascun valore di pH sono state eseguite più misurazioni per verificare la ripetibilità dell'analisi e la loro veridicità; il gradiente usato è quello in tabella 4, il flusso di lavoro è 1,2 mL/min, la temperatura è di 20°C, scelta per rendere il metodo il più ampiamente sfruttabile in quanto lavorando a temperatura ambiente, anche laboratori non dotati di colonna termostata possono utilizzare questa procedura. Si riportano rispettivamente nelle Figure 17,18,19,20,21,22 i cromatogrammi registrati ai diversi valori di pH indagati.

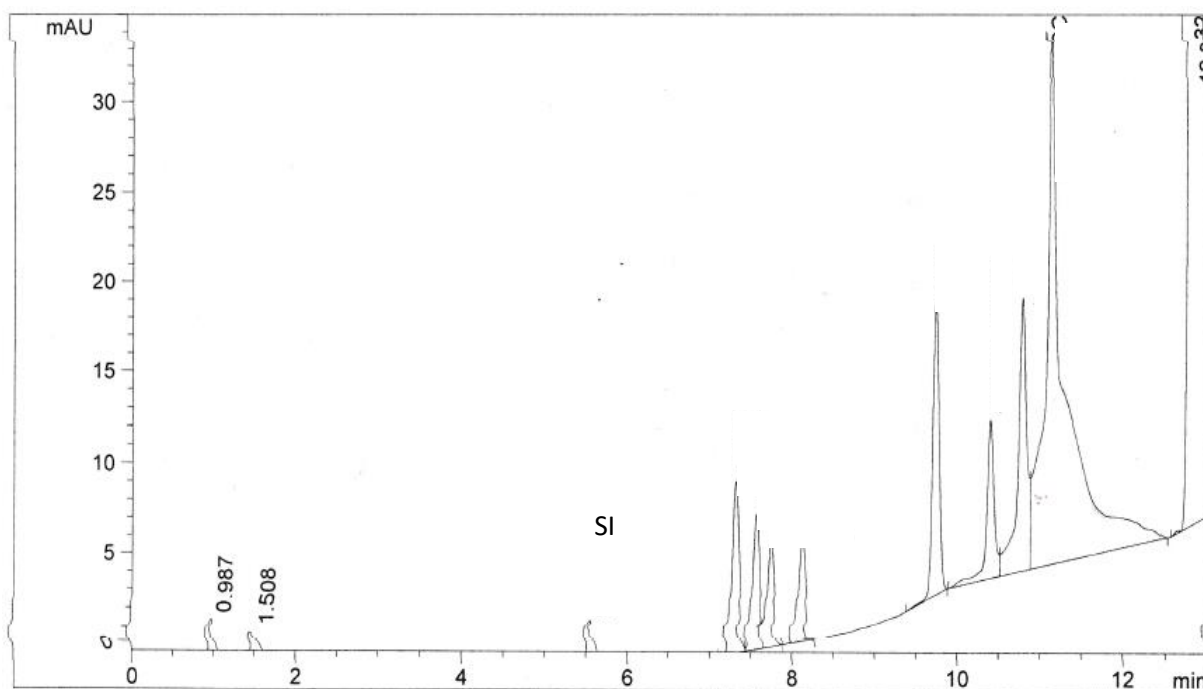


Figura 17. Cromatogramma pH 3.25 in ordine I picchi corrispondono a SI-CBDA-CBD-CNBG-THCV-CBN-THC-THCA-CNBC

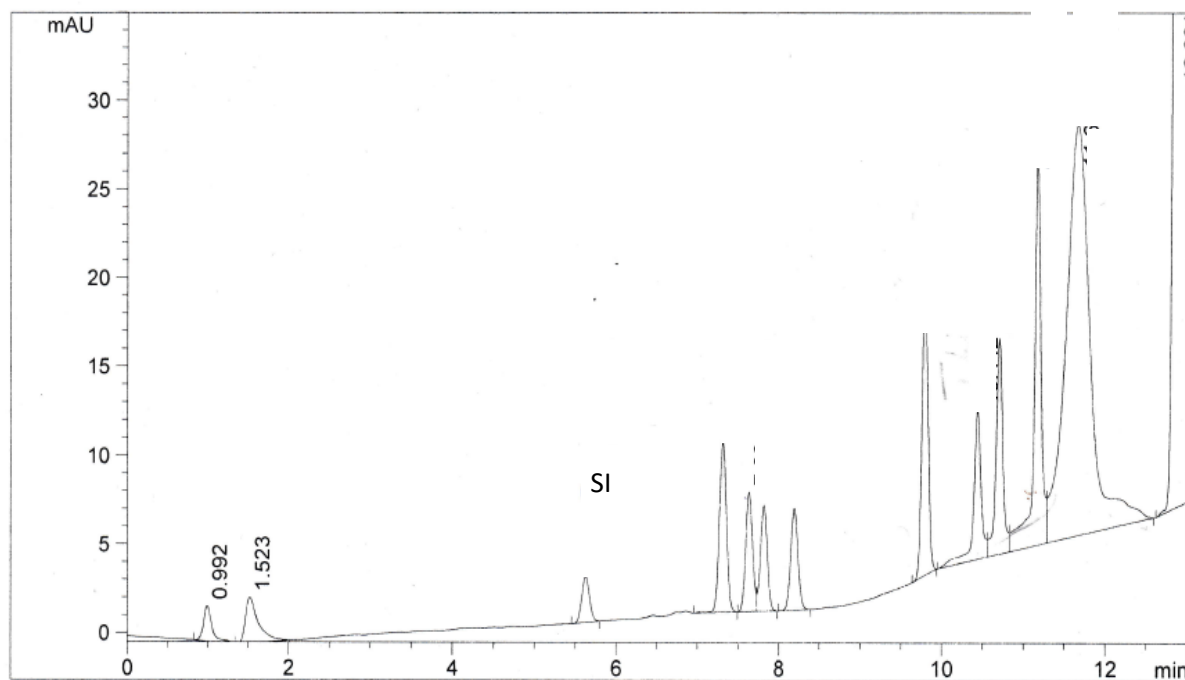


Figura 18. Cromatogramma pH 3.5 in ordine I picchi corrispondono a SI-CBDA-CBD-CNBG-THCV-CBN-THC-THCA-CNBC

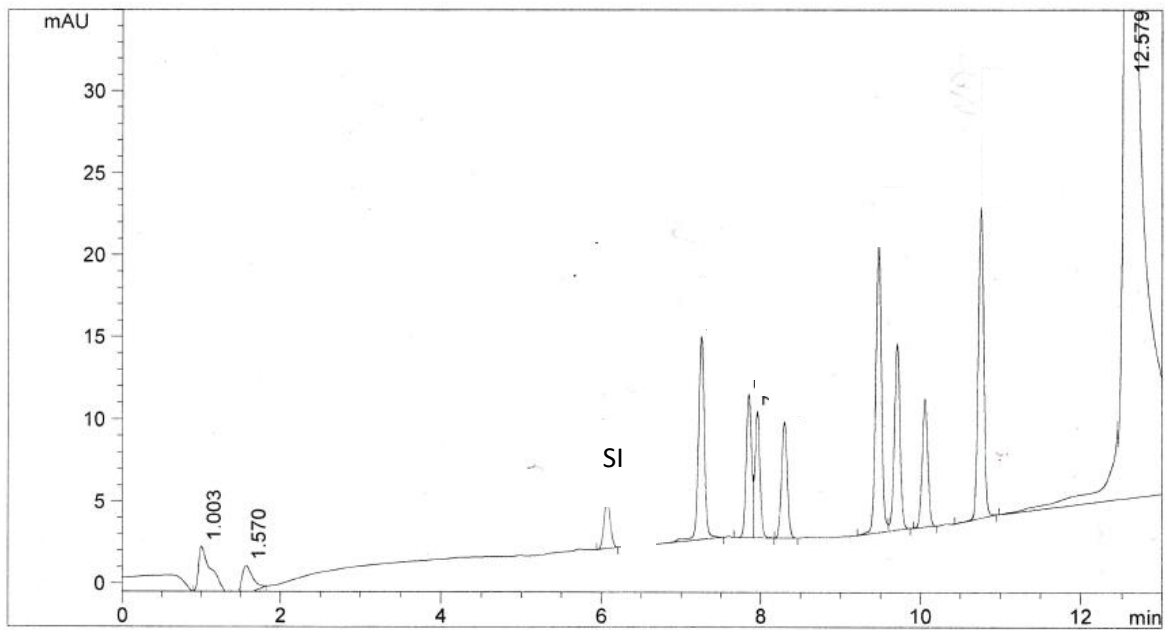


Figura 19. Cromatogramma pH 3.75 in ordine I picchi corrispondono a SI-CBDA-CBD-CNBG-THCV-CBN-THCA-THC-CNBC

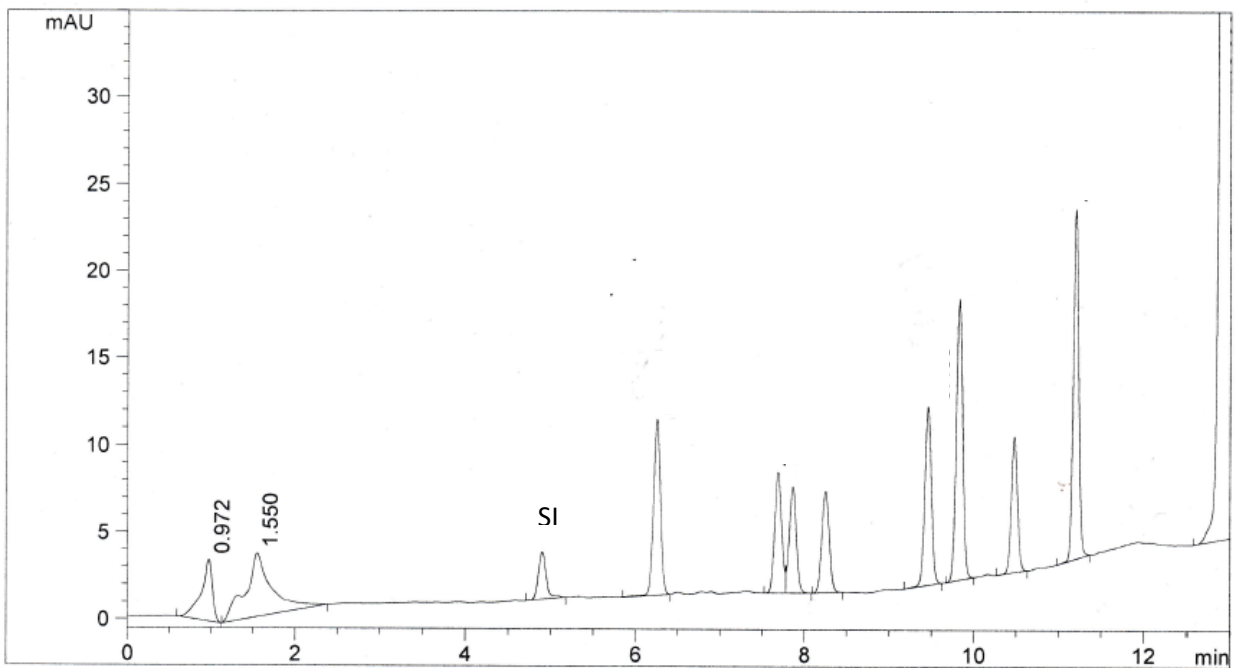


Figura 20. Cromatogramma pH 4.0 in ordine I picchi corrispondono a SI-CBDA-CBD-CNBG-THCV-THCA-CBN-THC-CNBC

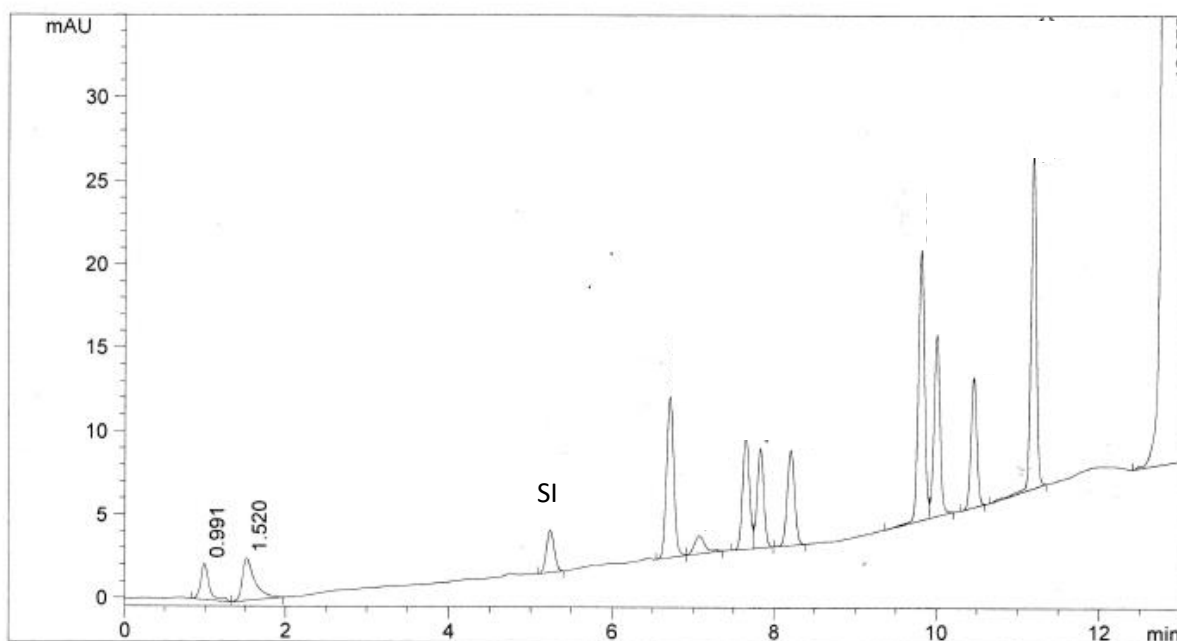


Figura 21. Cromatogramma pH 4.25 in ordine I picchi corrispondono a SI-CBDA-CBD-CNBG-THCV-CBN-THCA-THC-CNBC

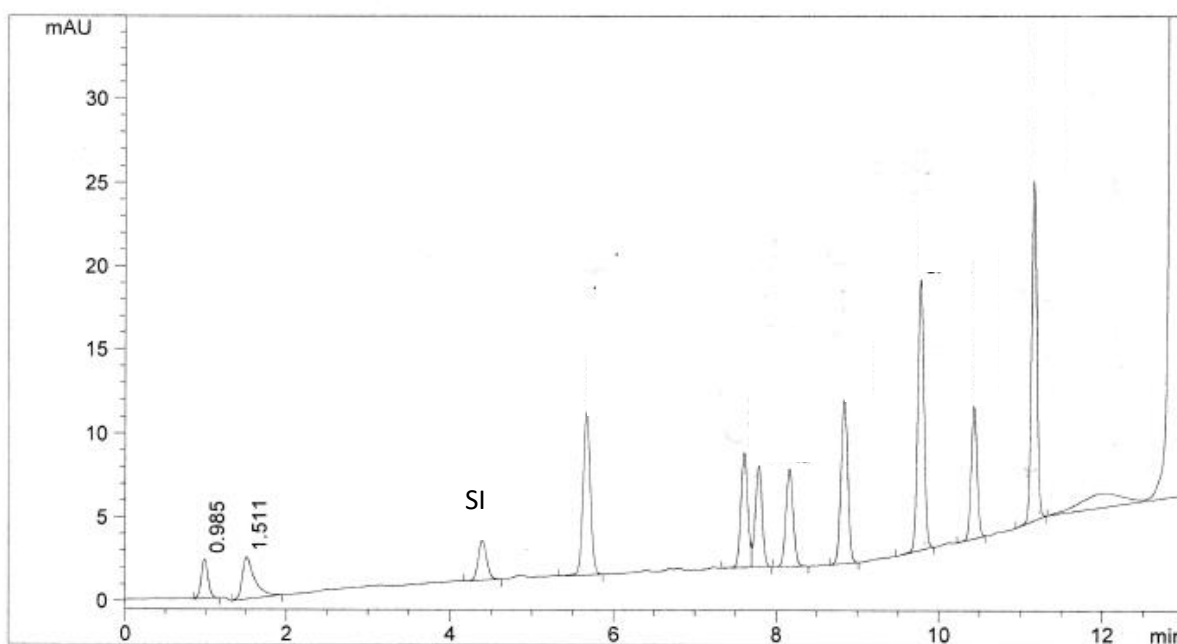


Figura 22. Cromatogramma pH 4.5 in ordine I picchi corrispondono a SI-CBDA-CBD-CNBG-THCV-THCA-CBN-THC-CNBC

Tutte queste analisi a diverso pH hanno lo scopo di trovare il valore di pH che consenta una migliore separazione dei picchi, rendendoli anche abbastanza distaccati tra loro in modo tale

che delle possibili interferenze nei campioni reali non compromettano la loro identificazione. Dai cromatogrammi riportati sopra si può osservare che aumentando il pH il CBDA si sposta a sinistra lungo il cromatogramma, allontanandosi da CBD, CNBG e THCV che escono a tempi leggermente maggiori. Considerando solo questi quattro composti, ovvero CBDA, CBD, CNBG e THCV la risoluzione migliore si ha a pH 4; in quanto appaiono ben separati e abbastanza distanti dal gruppo successivo di composti ovvero da THCA, CBN, THC e CNBC. Un comportamento simile a quello del CBDA viene osservato anche per il THCA: aumentando il pH, cioè passando in condizioni via via più basiche questo composto tende anch'esso a spostarsi a sinistra lungo il cromatogramma, venendo risolto a tempi minori. A pH acidi ovvero a 3,25 e 3,5 il THCA esce dopo il THC; mentre a partire da 3,75 fino a 4,5 esce prima del THC e addirittura nel range da 4 a 4,5 anche prima del CBN. Questo comportamento simile dei composti acidi è da imputare al fatto che in condizioni di maggiore basicità questi vengono più facilmente deprotonati e quindi meno trattenuti dalla colonna. Un aumento del pH inoltre consente di migliorare la separazione di CBN, THC, THCA e CNBC: i picchi si allontanano risultando così ben separati alla base.

Dopo tutte queste osservazioni, considerando anche le caratteristiche della colonna in uso, si può concludere che la migliore separazione si ha a pH 4: a questo valore infatti non si sottopone la colonna a condizioni di lavoro stressanti (come accade a pH troppo acidi) e la separazione dei picchi di tutti e 8 i composti contenuti nello standard in esame è buona in quanto questi appaiono ben risolti alla base, alti e stretti, con una forma che richiama quella ideale della gaussiana. Si riporta nella tabella 16 sotto le tabelle e nel grafico di figura 23 la variazione dei tempi di ritenzione di ciascun composto in funzione del pH considerato:

*Tabella 16. Variazione dei tempi di ritenzione relativi dei composti in funzione del pH*

<b>pH</b>	<b>t<sub>r</sub>CBDA (s)</b>	<b>t<sub>r</sub>CBD (s)</b>	<b>t<sub>r</sub>CNBG (s)</b>	<b>t<sub>r</sub>THCV (s)</b>	<b>t<sub>r</sub>THC (s)</b>	<b>t<sub>r</sub>CBN (s)</b>	<b>t<sub>r</sub>THCA (s)</b>	<b>t<sub>r</sub>CNBC (s)</b>
3.00	78,6	81,6	83,4	87,6	112,2	105	116,4	119,4
3.25	78	78,6	83,4	87,6	111,6	104,4	114	119,4
3.5	77,4	87	88,8	93	118,8	111,6	115,2	127,2
3.75	76,2	94,2	96	100,8	128,4	120,6	115,8	136,8
4.00	76,8	87,6	89,4	94,2	120	112,2	114,6	127,8
4.25	77,4	103,4	106,2	113,4	142,8	133,8	120,6	152,4
4.5	78,6	81,6	83,4	87,6	112,2	105	116,4	119,4

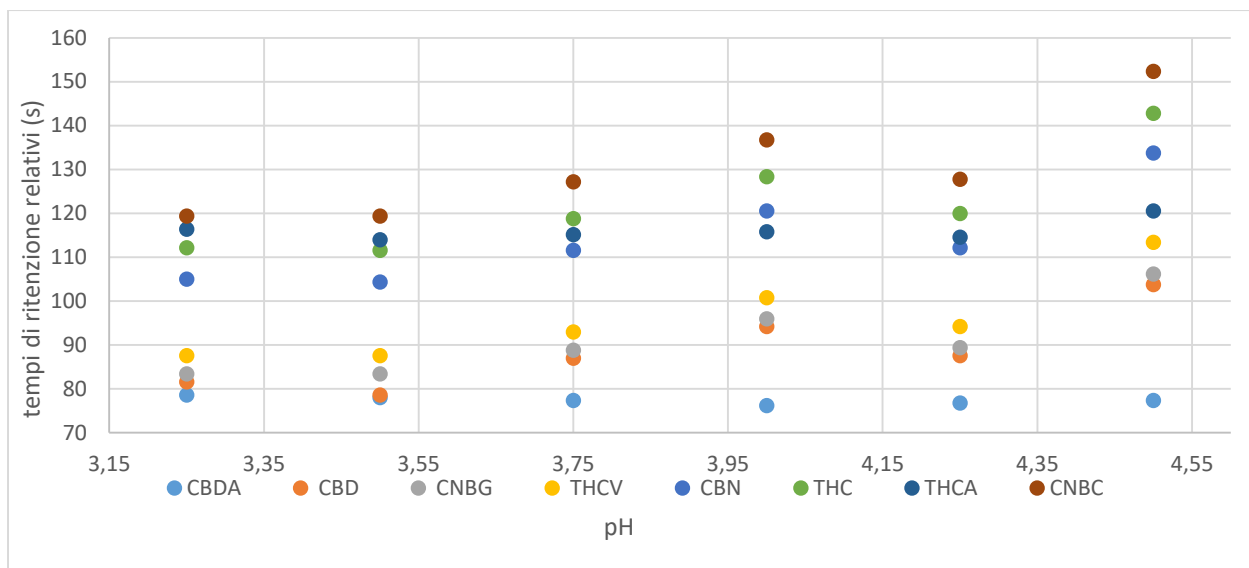


Figura 23. Grafico tempi ritenzione vs pH

Si può osservare come a pH 4,0 la separazione sia ottimale, senza sovrapposizione di picchi, questa condizione è verificabile anche a pH 4,5 ma nel primo caso i tempi di analisi sono di gran lunga minori.

### ***Studio dell'effetto della temperatura sulla separazione***

A questo punto dopo aver scelto il pH di lavoro ottimale si considera cosa accade mantenendo fissi gradiente, flusso e pH e variando la temperatura di lavoro. A pH 4 e flusso 1,2 mL/min e gradiente ottimale sono state eseguite delle prove a 7 diverse temperature: 10°C; 12,5 °C; 15 °C; 17,5 °C; 20 °C; 22,5 °C; 25 °C, (i cui dati dettagliati sono riportati in Appendice. Queste prove non hanno mostrato sostanziali differenze; non si registrano infatti inversioni nelle posizioni dei picchi, semplicemente la durata dell'analisi diminuisce aumentando la temperatura, questo suggerisce che i picchi vengano risolti a tempi minori, perché aumenta la cinetica di interazione tra analita e fasi. Questo fenomeno è responsabile anche del fatto che un progressivo aumento della temperatura però rende i picchi più vicini tra loro, senza però che vi siano sovrapposizioni.

Si riporta nella tabella 17 sotto e in figura 24 la variazione dei tempi di ritenzione in funzione della temperatura per ciascun composto:

Tabella 17. Variazione dei tempi di ritenzione relativi in funzione della temperatura

Temperatura (°C)	10	12,5	15	17,5	20	22,5	25
t <sub>r</sub> CBDA (s)	73,8	75	76,8	77,4	77,4	78,6	79,2
t <sub>r</sub> CBD (s)	87,6	90,6	94,8	95,4	97,2	100,2	101,4
t <sub>r</sub> CNBG (s)	90	93	97,2	97,8	99,6	102	103,2
t <sub>r</sub> THCV (s)	93,6	96	100,2	100,8	102,6	105	106,2
t <sub>r</sub> THCA (s)	102,6	105	109,8	111	112,2	114,6	115,2
t <sub>r</sub> CBN (s)	108	111	116,4	118,2	120	123,6	125,4
t <sub>r</sub> THC (s)	113,4	114	123	124,8	125,4	131,4	133,2
t <sub>r</sub> CNBC (s)	120	123,6	130,2	132,6	135	139,8	142,2

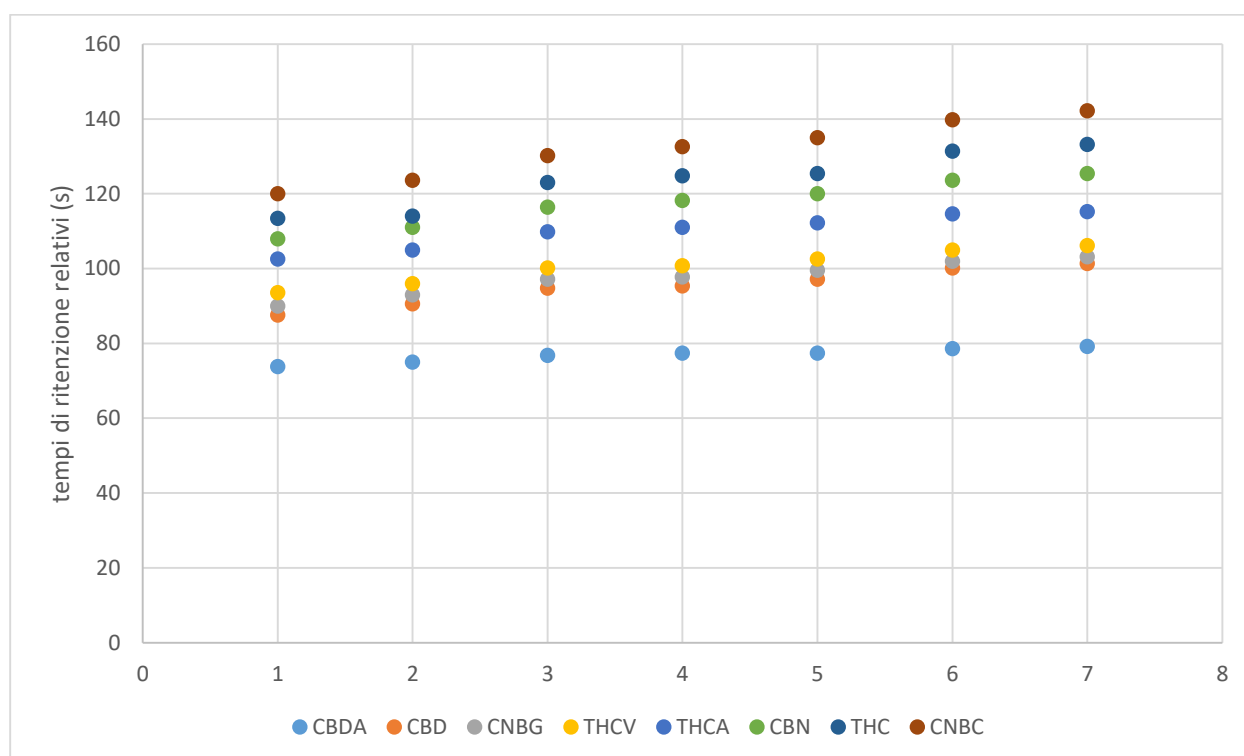


Figura 24. Grafico andamento dei tempi di ritenzione in funzione della temperatura

Alla luce di tutte queste considerazioni si conclude che le temperature migliori per eseguire le analisi sono nel range dai 15 °C ai 22,5 °C. Per far fronte appunto all'esigenza di applicazione del metodo anche in laboratori privi di colonna termostata e dotati di una strumentazione di ampio utilizzo e non altamente specializzata ad un solo tipo di analisi, si sceglie come temperatura di lavoro 20 °C.

### Studio della variazione di composizione della fase mobile

Ulteriori prove sono state eseguite provando ad usare una fase mobile costituita da tre solventi: metanolo, fosfato e aceto nitrile con lo scopo di verificare se la presenza di un altro



composto organico, in questo caso l'aceto nitrile, favorisse la separazione. Il criterio sfruttato riguarda infatti la maggiore affinità che tale solvente organico può avere con alcuni componenti dello standard sotto analisi.

In tal senso le prove eseguite hanno principalmente riguardato degli studi sul gradiente di lavoro. La temperatura, il flusso e il pH della fase inorganica sono stati mantenuti fissi rispettivamente a 15°C, 1,2 mL/min e 4, semplicemente si ha lavorato con gradienti della fase mobile diversi.

In appendice si riportano le tabelle relative ad alcune tra le migliori prove eseguite.

A fronte di tutte le prove realizzate si può concludere che l'aggiunta di un altro solvente, non modifica e migliora la separazione e quindi rifacendosi semplicemente a ragioni pratiche ed economiche si può tranquillamente lavorare solo con metanolo e fosfato, senza aggiungere l'aceto nitrile in quanto in termini di efficacia separativa non si hanno miglioramenti.

Con questo tipo di colonna quindi le condizioni di lavoro ottimali sono elencate sotto:

- Temperatura: 15 °C
- Flusso: 1,2 mL/min
- Fase mobile: metanolo e tampone fosfato a pH 4,0
- Gradiente della fase mobile (tabella 18)

*Tabella 18. Gradiente di lavoro ottimale*

<b>Tempo (min)</b>	<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%)</b>	<b>MeOH(%)</b>
0	30	70
7	15	85
10	5	95
13	5	95
14	30	70

### **3.2.2 Colonna B**

A questo punto è stata cambiata colonna, ne è stata utilizzata una più corta con le seguenti caratteristiche: Poroshell 120 EC-C18 4,6 x 50 mm; grandezza particelle 2,7 µm (Agilent). Con questo tipo di colonna sono state usate delle condizioni riportate in uno studio [93], per verificarne la validità; successivamente sono state apportate delle modifiche alle condizioni di lavoro in modo tale da valutare la possibilità di ottenere risultati migliori in grado di consentire una separazione più definita.

Le prime prove sono state eseguite nelle seguenti condizioni:

- Temperatura: 50°C
- Fase mobile: metanolo e tampone fosfato a pH 4,00
- Flusso 0,75 mL/min
- Gradiente (Tabella 19)
- 

*Tabella 19. Gradiente riportato in letteratura*

<b>Tempo (min)</b>	<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%)</b>	<b>MeOH(%)</b>
0	40	60
6	23	77
7,2	5	95
9	5	95
10	40	60

Inizialmente sono state effettuate delle misure sul tempo di ritenzione dei singoli composti o su uno standard di soli tre componenti; ovvero prima si è registrato il tempo di ritenzione del solo THCA, poi della combinazione di CBD, CBN e THC e infine degli otto componenti; alla luce di queste misure si può concludere che in queste condizioni la separazione è molto buona: i picchi critici (CBD, CNBG, THCV) risultano ben separati alla base e distanziati sia dal CBDA che dal THCA; inoltre essi appaiono alti e stretti e il tempo di analisi è breve ovvero in circa 9 minuti la misura viene completata. A questo punto si è cercato di migliorare le condizioni agendo sulla temperatura: 50°C possono essere troppo elevati e proibitivi per laboratori privi di colonna termostata per questo si è cercato di diminuire progressivamente la temperatura in modo tale da valutare la possibilità di lavorare a 15 °C o 20°C, valori accessibili a tutti. Mantenendo fisso gradiente, flusso e pH si è lavorato a 40°C; condizione in cui CBD, CNBG e THCV risultano ben definiti e separati, mentre il THCA e il CBN appaiono in un unico picco.

Per provare a risolvere questo problema si è agito sul pH, tenendo in considerazione le osservazioni fatti negli studi a variazione di pH con la colonna precedente: un aumento del pH fa sì che i composti acidi, nel caso specifico d'interesse il THCA, si spostino lungo il cromatogramma. Sfruttando questo si sono eseguite prove a 4,25 unità di pH prima a 50°C e poi a 40 °C. Nel primo caso si osserva la divisione dei picchi di CBN e THCA, con il THCA che cade a destra rispetto al CBN piuttosto attaccato; situazione diversa rispetto al quella a pH 4 in cui cadeva a sinistra. A tal punto la temperatura è stata portata a 40°C, migliorando da una lato la separazione di THCA e CBN ma condensando il CBD e il CNBG in un solo picco. Risulta quindi necessario agire sul gradiente, rallentando la spinta della fase organica. In appendice si riportano le tabelle delle diverse prove in cui simultaneamente si è variato gradiente e

temperatura e alla luce delle quali per la colonna presa in esame le condizioni di lavoro ottimali sono:

- Temperatura: 15°C
- pH: 4,5
- Flusso: 0,7 mL/min
- Gradiente (Tabella 20)
- 

Tabella 20. Gradiente ottimale

<b>Tempo (min)</b>	<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%)</b>	<b>MeOH(%)</b>
0	35	65
3.5	25	75
8	5	95
11	5	95
11.5	35	65

Confrontando i risultati ottenuti con le due colonne si può concludere che la colonna da 50 mm risulta più idonea alle analisi in quanto, a parità di temperatura di lavoro (15°C), la durata dell'analisi risulta minore di circa 2 minuti, si lavora a flusso molto più basso; 1,2 mL/min con la lunga contro i 0,7 mL/min con la corta, con una riduzione quindi della quantità di fase mobile usata.

Le prove però sui campioni reali verranno eseguite con entrambe le colonne allo scopo di confrontarne i risultati.

### **3.2.3 Altre colonne**

Sono state utilizzate altre due colonne: una Zorbax EC-18 3.0 x 50mm con dimensione delle particelle 2,7 µm e una colonna di un'altra casa produttrice ovvero della Varian una Pursuit XRs C18 con le seguenti dimensioni 4,6 x 50 mm e particelle di 3 µm.

La prima colonna dunque presenta un diametro minore a parità di lunghezza e dimensione delle particelle mentre la seconda è dotata di particelle più grandi con conseguente riduzione del numero di piatti teorici.

In appendice si riportano alcuni risultati delle prove eseguite.

### **3.3 Calibrazione**

Dopo aver individuato le condizioni di lavoro ottimale per la separazione degli otto principali componenti degli estratti di Cannabis Sativa, è stata realizzata una retta di calibrazione a 5 punti per ciascun componente. A partire dalla soluzione madre di standard a concentrazione

20 mg/mL di cannabinoidi (CBDA, CBD, CNBG, THCV, THCA, CBN, THC, CNBC) sono state realizzate altre 5 soluzioni a concentrazione decrescente: 10 mg/mL, 5 mg/mL, 2 mg/mL, 1 mg/mL e un bianco realizzato con solo metanolo (solvente usato per portare a volume le soluzioni) e standard interno. La descrizione dettagliata della realizzazione delle soluzioni è stata descritta nel capitolo 2 relativo alla parte sperimentale del lavoro. Una volta realizzate le soluzioni, è stata costruita la retta di calibrazione con entrambe le colonne (A e B) e per ciascun punto sono state eseguite tre misure usando poi per la realizzazione delle rette le medie dei diversi valori dell'altezza dei picchi alle concentrazioni analizzate. Preliminarmente però ciascuna altezza è stata normalizzata rispetto all'altezza dello standard interno, in particolare è stato scelto quello della prima corsa analitica del bianco.

Prima di analizzare le soluzioni di calibrazione, per entrambe le colonne sono state realizzate delle corse analitiche con la soluzione standard, in modo da condizionare la colonna e porsi nelle migliori condizioni di lavoro.

### **3.3.1 Colonna A**

Nella tabella 21 sottostante si riporta per ciascun composto analizzato le relative altezze dei picchi alle diverse concentrazioni considerate e il grafico, in Figura 25, delle rispettive rette ottenute. Le condizioni di lavoro sono state descritte nel capitolo 4.1 relativo all'ottimizzazione della colonna.

*Tabella 21. Altezza dei picchi vs concentrazione (mg/mL)*

<b>Concentrazione (mg/mL)</b>	<b>0</b>	<b>0.1</b>	<b>0.2</b>	<b>0.5</b>	<b>1.0</b>	<b>2.0</b>
<b>CBDA</b>	0	0,335	0,663	1,554	3,382	6,709
<b>CBD</b>	0	0,317	0,639	1,51	3,249	6,584
<b>CNBG</b>	0	0,279	0,7	1,361	2,982	6,091
<b>THCV</b>	0	0,252	0,571	1,343	2,999	5,916
<b>THCA</b>	0	0,549	1,168	2,834	6,608	12,217
<b>CBN</b>	0	1,02	2,06	4,811	11,197	20,491
<b>THC</b>	0	0,478	1,07	2,147	5,053	9,291
<b>CNBC</b>	0	1,025	2,077	4,73	10,051	20,426

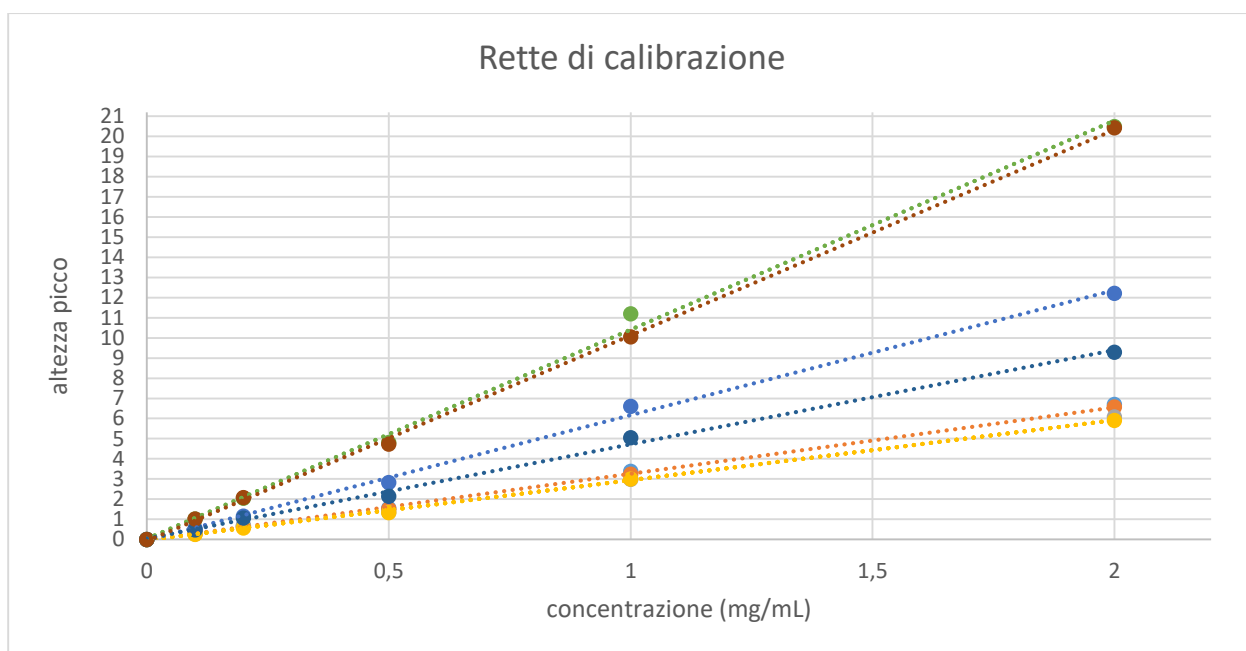


Figura 25. Grafico delle rette di calibrazione di ciascun cannabinoide

Per ciascun cannabinoide è stata calcolata la retta di calibrazione, riportate in Tabella 22, che come si può osservare sulla base del valore di  $R^2$ , molto vicino a 1, è buona. Queste rette saranno usate nel paragrafo 4.3 per determinare la concentrazione dei cannabinoidi nei campioni reali. Si riporta sotto una tabella con le rette di calibrazione calcolate.

Tabella 22. Rette di calibrazione cannabinoidi

Cannabinoide	Retta di calibrazione
CBDA	$h = 3,3649[\text{CBDA}] - 0,024 R^2 = 0,99$
CBD	$h = 3,298[\text{CBD}] - 0,0389 R^2 = 0,99$
CNMG	$h = 3,036[\text{NBG}] - 0,0206 R^2 = 0,99$
THCV	$h = 2,9806[\text{THCV}] - 0,0409 R^2 = 0,99$
THCA	$h = 6,2014[\text{THCA}] - 0,0315 R^2 = 0,99$
CBN	$h = 10,38[\text{CBN}] + 0,0227 R^2 = 0,99$
THC	$h = 4,6817[\text{THC}] + 0,0414 R^2 = 0,99$
CNBC	$h = 10,204[\text{CNBC}] - 0,0777 R^2 = 0,99$

### 3.3.2 Colonna B

Nella Tabella 23 si riporta per ciascun composto analizzato le relative altezze dei picchi alle diverse concentrazioni considerate e il grafico delle rispettive rette ottenute, riportato in Figura 26. Le condizioni di lavoro sono state descritte nel capitolo 4.1 relativo all'ottimizzazione della colonna.

Tabella 23. Altezza dei picchi vs concentrazione (mg/mL)

Concentrazione (mg/mL)	0	0.1	0.2	0.5	1.0	2.0
<b>CBDA</b>	0	1,05	2,07	4,86	9,70	18,29
<b>CBD</b>	0	0,76	1,59	3,87	7,93	14,95
<b>CNBG</b>	0	0,69	1,37	3,29	6,69	12,58
<b>THCV</b>	0	0,67	1,33	3,15	6,40	12,02
<b>THCA</b>	0	1,15	2,21	5,20	10,46	19,72
<b>CBN</b>	0	2,12	4,01	9,17	18,38	34,33
<b>THC</b>	0	0,84	1,69	3,95	8,02	15,12
<b>CNBC</b>	0	1,93	3,85	8,86	17,80	33,46

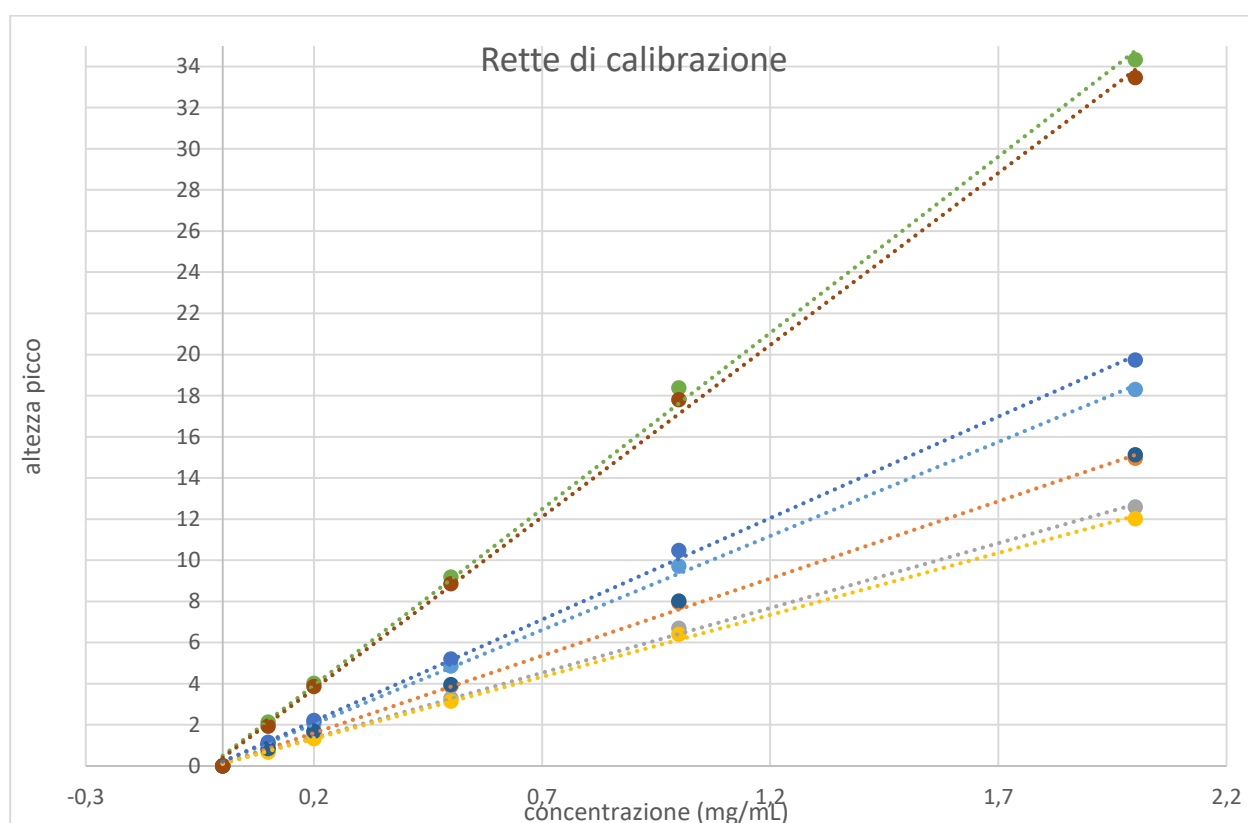


Figura 26. Rette di calibrazione cannabinoidi

Per ciascun cannabinoide è stata calcolata la retta di calibrazione, riportate in Tabella 24, che come si può osservare sulla base del valore di  $R^2$ , molto vicino a 1 indica una ottima correlazione lineare nell'intervallo di concentrazione considerato. Queste rette saranno usate nel paragrafo 4.3 per determinare la concentrazione dei cannabinoidi nei campioni reali. Si riportano sotto in Tabella 24 le rette di calibrazione calcolate.

Tabella 24. Rette di calibrazione cannabinoidi

Cannabinoidi	Retta di calibrazione
CBDA	$h = 6,414[\text{CBDA}] + 0,1364 R^2 = 0,999$
CBD	$h = 5,3551[\text{CBD}] + 0,054 R^2 = 0,999$
CNBG	$h = 4,5535[\text{CNBG}] + 0,0628 R^2 = 0,999$
THCV	$h = 4,357[\text{THCV}]x + 0,0683 R^2 = 0,999$
THCA	$h = 6,895[\text{THCA}] + 0,1369 R^2 = 0,999$
CBN	$h = 11,776[\text{CBN}] + 0,3107 R^2 = 0,999$
THC	$h = 5,3917[\text{THC}] + 0,0902 R^2 = 0,999$
CNBC	$h = 11,484[\text{CBNC}] + 0,2462 R^2 = 0,999$

### 3.4 Analisi campioni reali

Con entrambe le colonne sono stati analizzati 10 campioni oleosi reali, a concentrazioni non note dei vari cannabinoidi. La preparazione di tali composti è stata descritta nella parte sperimentale nel capitolo 2.

Poiché i campioni a disposizione sono di due diverse tipologie, sono state eseguite misure ripetute di alcuni di essi, al fine di verificare la riproducibilità nella serie di analisi.

#### 3.4.1 Colonna A

Si riportano in Tabella 25 per ciascun campione le altezze relative ai picchi corrispondenti ai differenti cannabinoidi. Ciascuna altezza è stata normalizzata rispetto all'altezza dello standard interno della prima corsa analitica del bianco della calibrazione.

Tabella 25. Campioni oleosi altezze relative ai picchi dei cannabinoidi

Campioni	hCBDA	hCBD	hCNBG	hTHCV	hTHCA	hCBN	hTHC	hCNBC
1	0	0.066	0.034	0.244	12.630	0	3.142	0.095
2	3.199	0.632	0.042	0.042	2.455	0	1.298	0.140
3	0	0.064	0.034	0.225	10.449	0	2.571	0
4	2.517	0.922	0.083	0.097	1.420	0	1.811	0.211
5	0	0	0.045	0.144	8.784	0.206	2.038	0.071
6	2.668	0.781	0.036	0.054	1.987	0.057	1.711	0.169
7	0	0.074	0	0.210	14.171	0	1.991	0.060
8	5.882	1.222	0.066	0.142	5.662	0.136	2.732	0.279
9	3.871	0.9	0.054	0.082	3.052	0.061	1.878	0.212
10	0	0.049	0	0.240	19.586	0	2.541	0.084

A questo punto per ciascun campione si inseriscono i valori delle altezze dei picchi nelle rette di calibrazione di ciascun composto riportate nella Tabella 26 e si calcolano le rispettive

concentrazioni. Sotto è riportata la tabella con la concentrazione di ciascun cannabinoide nei diversi campioni analizzati.

*Tabella 26. Concentrazione dei cannabinoidi nei campioni oleosi*

<b>Campioni</b>	<b>[CBDA]</b>	<b>[CBD]</b>	<b>[CNBG]</b>	<b>[THCV]</b>	<b>[THCA]</b>	<b>[CBN]</b>	<b>[THC]</b>	<b>[CNBC]</b>
1	0	0.03	0.02	0.1	2.04	0	0.66	0.01
2	0.96	0.021	0.204	0.03	0.4	0	0.26	0.02
3	0	0.03	0.03	0.07	1.70	0	0.54	0
4	0.76	0.29	0.03	0.04	0.23	0	0.38	0.02
5	0	0	0.02	0.04	1.47	0.01	0.47	0.01
6	0.8	0.25	0.01	0.02	0.33	0	0.37	0.02
7	0	0.03	0.01	0.05	2.45	0	0.42	0.01
8	1.76	0.36	0.01	0.04	0.92	0	0.58	0.02
9	1.17	0.28	0.01	0.02	0.50	0	0.38	0.02
10	0	0.01	0	0.04	3.45	0	0.57	0.01

### **3.4.2 Colonna B**

Si riportano in Tabella 27 per ciascun campione le altezze relative ai picchi corrispondenti ai differenti cannabinoidi. Ciascuna altezza è stata normalizzata rispetto all'altezza dello standard interno della prima corsa analitica del bianco della calibrazione.

*Tabella 27. Campioni altezze relative ai picchi dei cannabinoidi*

<b>Campioni</b>	<b>hCBDA</b>	<b>hCBD</b>	<b>hCNBG</b>	<b>hTHCV</b>	<b>hTHCA</b>	<b>hCBN</b>	<b>hTHC</b>	<b>hCNBC</b>
1	0	0	0.467	0.256	19.649	0.470	5.535	0.313
2	9.293	0	1.443	0.254	4.224	0.370	2.054	0.461
3	0	0	0.469	0.332	18.526	0.504	4.661	0.339
4	7.113	2.285	0	0.201	2.463	0.403	3.146	0.577
5	0	0	0.400	0.246	15.650	0.441	3.749	0.269
6	7.782	1.885	0	0.155	3.511	0.424	3.074	0.523
7	0	0	0.405	0.268	24.909	0.401	3.555	0.289
8	16.918	2.697	0	0.275	9.341	0.534	4.659	0.661
9	11.115	2.119	0	0.163	5.050	0.421	3.270	0.576
10	0	0.	0.510	0.279	35.393	0.356	4.669	0.319

Impiegando le equazioni delle rette di calibrazione ricavate per ciascun cannabinoide analizzato (vedi tabella xxx), e con i valori delle altezze dei rispettivi picchi relativi ai 10 campioni analizzati (Tabella 27) sono state calcolate le concentrazioni riportate nella Tabella 28.



Tabella 28. Concentrazione mg/mL dei cannabinoidi nei campioni

Campioni	[CBDA]	[CBD]	[CNBG]	[THCV]	[THCA]	[CBN]	[THC]	[CNBC]
1	0	0	0.02	0.1	1.97	0	0.71	0
2	0.99	0	0.02	0.02	0.41	0	0.25	0
3	0.	0	0.06	0.04	1.86	0	0.60	0
4	0.76	0.29	0	0.02	0.23	0	0.40	0.01
5	0	0	0.05	0.02	1.56	0	0.48	0
6	0.83	0.24	0	0.01	0.33	0	0.39	0.01
7	0	0	0.05	0.03	2.5	0	0.45	0.01
8	1.83	0.35	0	0.03	0.92	0	0.60	0.01
9	1.19	0.27	0	0.01	0.49	0	0.41	0.01
10	0	0	0.06	0.03	3.56	0	0.60	0

Confrontando i risultati ottenuti con le due diverse colonne si osserva che i dati sono coerenti tra loro; la differenza tra i valori numerici ottenuti è infatti inferiore al 5%. Questo significa che entrambe le colonne hanno una resa analitica simile, quindi la scelta di una piuttosto che dell'altra si basa su un'analisi dei costi e del tempo necessario per condurre le prove sperimentali. In tal senso la colonna corta, colonna B, poiché consente di lavorare a flusso minore, la metà rispetto a quello della colonna lunga, è vantaggiosa in quanto la quantità di fase mobile necessaria è inferiore rispetto a quella consumata con le analisi eseguite mediante la colonna da 100 mm, che inoltre richiede un tempo di analisi maggiore, 14 minuti anziché 11. Il solo vantaggio della colonna A è che i picchi relativi a CBD, CNBG e THCV vengono separati meglio, questo però non è un problema perché comunque la colonna B li separa bene alla base, rendendoli facilmente identificabili e consentendo un'ottima analisi quantitativa.

I campioni inoltre sono stati rianalizzati in sessioni di lavoro differenti in modo da verificare la riproducibilità del metodo. I dati ottenuti dimostrano l'ottima riproducibilità dell'analisi, l'accordo tra i dati numerici infatti è maggiore del 95%.

## Capitolo 4. Conclusioni

Questo lavoro di tesi si è articolato in due parti: una parte iniziale finalizzata all'impostazione di un nuovo metodo per la determinazione di ossalati e citrati in campioni urinari e la seconda parte, più articolata, dedicata all'ottimizzazione di un metodo analitico per la determinazione dei componenti della Cannabis. Per quanto concerne lo studio relativo a citrati e ossalati, la ricerca bibliografica, particolarmente ardua, ha messo in evidenza le difficoltà che si sarebbero incontrate nell'impostazione del metodo. Infatti le informazioni ricavate dalla letteratura per quanto riguarda la capacità e stabilità dei complessi degli acidi carbossilici con i metalli di transizione, sono risultate molto scarse e poco precise. Per di più la situazione sarebbe stata complicata dall'applicazione del metodo nei campioni urinari, matrice completamente diversa e più complicata rispetto a quella utilizzata nei lavori di letteratura esaminati in cui si lavorava con il suolo. Le urine sono infatti un materiale in cui le interferenze di altri metaboliti sono elevatissime e in cui è necessario lavorare in condizioni precise di pH e di concentrazione. Pertanto si è concluso che la messa a punto di un nuovo metodo per la determinazione di citrati e ossalati risulta particolarmente complicato e richiede ulteriori ricerche circa la stabilità dei complessi che possono formare i metalli di transizione con gli acidi carbossilici.

La seconda parte del lavoro invece fa fronte ad un crescente interesse circa gli effetti farmacologici dei cannabinoidi. Sempre più numerosi sono gli studi che valutano vantaggi e svantaggi dell'utilizzo dei fitocannabinoidi in farmacologia. A questo si aggiunge la necessità di poter analizzare e quantificare la quantità dei componenti della Cannabis nei prodotti commercializzati legalmente oltre che determinarne il contenuto in campioni urinari di soggetti sottoposti a controlli periodici. Risulta quindi fondamentale disporre di un metodo efficace, economico e preciso che consenta di svolgere questo tipo di analisi. In questo lavoro di tesi si è cercato di ottimizzare le condizioni di lavoro mediante l'utilizzo di diversi tipi di colonne, a diversa lunghezza, diverse fasi mobili e diverse condizioni di pH, temperatura e flusso.

Il filo conduttore della ricerca è stato quello di scegliere le condizioni più facilmente riproducibili nei vari laboratori, anche in quelli dotati di strumentazione meno avanzata e all'avanguardia e di proporre un metodo economico che consenta di svolgere analisi precise a bassi costi. Alla luce dei risultati ottenuti durante il lavoro sperimentale si può concludere che le condizioni di lavoro migliori si realizzano utilizzando la colonna Poroshell 120 EC-C18 4,6 x 50 mm; grandezza particelle 2,7 µm (Agilent) e lavorando nelle condizioni riportate sotto:

- Temperatura: 15°C
- pH: 4,5
- Flusso: 0,7 mL/min
- Gradiente (Tabella 29)
- 

Tabella 29. Gradiente ottimale

<b>Tempo (min)</b>	<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%)</b>	<b>MeOH(%)</b>
0	35	65
3.5	25	75
8	5	95
11	5	95
11.5	35	65

In queste condizioni si garantisce un'analisi ottimale, con un'ottima separazione dei picchi e una durata dell'analisi di soli 14 minuti tra l'iniezione di due campioni successivi; durante questo intervallo infatti viene eseguita l'analisi e si garantisce il ripristino delle condizioni iniziali ottimali.

## **Bibliografia**

### **Bibliografia parte ossalati e citrati**

1. M. Hassan Khaskhali, M. Iqbal Bhangar, F.D. Khand: “ Simultaneous determination of oxalic and citric acids in urine by high-performance liquid chromatography. “Journal of Chromatography B 1996; 675:147-151.
2. Hibbard E. Williams and Theodore R. Wandzilak : “ Oxalate synthesis transport and hyperoxaluric syndromes” The Journal of Urology 1989; part 2 141: 742-747
3. Baker, E. M., J.C. and Tolbert, B.M. : “Ascorbic acid metabolism in man.” Amer. J. Clin. Nutr. 1966; 19: p.371
4. Williams, H.E. and Smith, L.H., Jr.: Primary hyperoxaluria in: the Metabolic basis of inherited Disease 5th edition chapt. 10, p 204-229
5. E. Cicerello, F. Merlo, G. Anselmo: “Citrato alcalino e calcolosi urinaria”. Urologia pratica 2002; 3: 75-80
6. M. Hassan Khaskhali a, M. Iqbal Bhangar , F.D. Khand: Simultaneous determination of oxalic and citric acids in urine by high-performance liquid chromatography aNational Centre of Excellence in Analytical Chemistry, University of Sindh, Jamshoro, Sindh, Pakistan Institute of Chemistry, University of Sindh, Jamshoro, Sindh, Pakistan, 1995
7. Simultaneous separation of inorganic anions and metal–citrate complexes on a zwitterionic stationary phase with on-column complexation Ekaterina P. Nesterenko, Pavel N. Nesterenko, Brett Paull . National Centre for Sensor Research, School of Chemical Sciences, Dublin City University, Glasnevin, Dublin 9, Ireland ACROSS – Australian Centre for Research on Separation Science, School of Chemistry, University of Tasmania, Private Bag 75, Hobart, TAS 7001, Australia
8. P.R. Haddad, P.W. Alexander, M. Trojanowicz, J. Chromatogr. 324 (1985) 319.

## ***1.2 Bibliografia parte cannabinoidi***

1. Analysis of cannabinoids in laser-microdissected trichomes of medicinal *Cannabis sativa* using LCMS and cryogenic NMR Nizar Happyana a,b, Sara Agnolet c, Remco Muntendam d, Annie Van Dame, Bernd Schneider c, Oliver Kayser a,†
2. Tesi ctf andrea bartolacelli
3. Tesi valeria fabbri
4. Cronquist A. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press; 1981. 1288 p.
5. Hillig KW. Genetic evidence for speciation in *Cannabis* (Cannabaceae). *Genet Resour Crop Evol.* Marzo 2005;52(2):161–80.
6. De Meijer, E.P.M., van der Kamp, H.J., van Eeuwijk, F.A., 1992. Characterisation of *Cannabis* accessions with regard to cannabinoid content in relation to other plant characters. *Euphytica* 62, 187–200. Doi:10.1007/BF00041753
7. Grayson, M., 2015. *Cannabis*: 4 big question. *Nature* 525, S1. Doi:10.1038/525S1a
8. Sawler, J., Stout, J.M., Gardner, K.M., Hudson, D., Vidmar, J., Butler, L., Page, J.E., Myles, S., 2015. The Genetic Structure of Marijuana and Hemp. *PLOS ONE* 10, e0133292. Doi:10.1371/journal.pone.0133292
9. Fishedick JT, Hazekamp A, Erkelens T, Choi YH, Verpoorte R. Metabolic fingerprinting of *Cannabis sativa* L., cannabinoids and terpenoids for chemotaxonomic and drug standardization purposes. *Phytochemistry.* Dicembre 2010;71(17-18):2058–73.
10. Hillig, K.W., Mahlberg, P.G., 2004. A chemotaxonomic analysis of cannabinoid variation in *Cannabis* (Cannabaceae). *Am. J. Bot.* 91, 966–975. Doi:10.3732/ajb.91.6.966
11. Mechoulam R, Gaoni Y. A Total Synthesis of dl- $\Delta^1$ -Tetrahydrocannabinol, the Active Constituent of Hashish1. *J Am Chem Soc.* 1 luglio 1965;87(14):3273–5.
12. Brenneisen R. Chemistry and Analysis of Phytocannabinoids and Other Cannabis Constituents. In: ElSohly MA, curatore. *Marijuana and the Cannabinoids* [Internet]. Humana Press; 2007 [citato 29 ottobre 2015]. Pag. 17–49. Recuperato da: [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-59259-947-9\\_2](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-59259-947-9_2)
13. Happyana N, Agnolet S, Muntendam R, Van Dam A, Schneider B, Kayser O. Analysis of cannabinoids in laser-microdissected trichomes of medicinal *Cannabis sativa* using LCMS and cryogenic NMR. *Phytochemistry.* Marzo 2013;87:51–9.
14. Potter, D., 2009. The propagation, signaling and signaling of cannabis sativa as a phytopharmaceutical. King's College London, London.

15. Sanchez, I.J.F., Verpoorte, R., 2008. Introduction to secondary metabolism in cannabis. *Phytochem Rev* 7615-639.
16. Ranalli, P., Casarini, B., 1998. Canapa: il ritorno di una coltura prestigiosa. Nuove produzioni di fibra e cellulosa. Avenue Media, Bologna.
17. Taura, F., Morimoto, S., Shoyama, Y., Mechoulam, R., 1995. First direct evidence for the mechanism of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinolic acid biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 9766–9767. Doi:10.1021/ja00143a024
18. Brenneisen, R., 2007. Chemistry and Analysis of Phytocannabinoids and Other Cannabis Constituents, in: ElSohly, M.A. (Ed.), *Marijuana and the Cannabinoids, Forensic Science And Medicine*. Humana Press, pp. 17–49.
19. Crombie L, L. Crombie WM. Cannabinoid formation in Cannabis sativa grafted interracially, and with two Humulus species. *Phytochemistry*. 1 febbraio 1975;14(2):409–12.
20. de Zeeuw RA, Wijsbeek J, Breimer DD, Vree TB, van Ginneken CA, van Rossum JM. Cannabinoids with a propyl side chain in cannabis: occurrence and chromatographic behavior. *Science*. 18 febbraio 1972;175(4023):778–9.
21. Mandolino G, Carboni A. Potential of marker-assisted selection in hemp genetic improvement. *Euphytica*. Gennaio 2004;140(1-2):107–20.
22. HAWKS RL. The constituents of cannabis and the disposition and metabolism of cannabinoids. *NIDA Res Monogr* 1982;42:125-37.
23. GAONI Y, MECHOULAM R. Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Chem Soc* 1964;86:1646-7.
24. MECHOULAM R, GAONI Y. The absolute configuration of  $\Delta^9$ -1-tetrahydrocannabinol, the major active constituent of hashish. *Tetrahedron Lett* 1967;12:1109-11.
25. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*. 9 agosto 1990;346(6284):561–4.
26. Fagan SG, Campbell VA. The influence of cannabinoids on generic traits of neurodegeneration. *Br J Pharmacol*. Marzo 2014;171(6):1347–60.
27. Grinspoon, 1971. *Marihuana Reconsidered*, 2<sup>nd</sup> edition. Ed. Quick American Archives, Oakland, CA.
28. Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., Mechoulam, R., 1992. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258, 1946–1949.

29. DEWEY WL, MARTIN BR, MAY EL. Cannabinoid stereoisomers: pharmacological effects. In: Smith, DF, eds. CRC Handbook of stereoisomers: drugs in psychopharmacology. Boca Raton (FL): CRC Press, 1984:317-26.
30. DEVANE WA, DYSARZ FA III, JOHNSON MR, MELVIN LS, HOWLETT AC. Determination and characterization of cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 1988;34:605-13.
31. MATSUDA LA, LOLAIT SJ, BROWNSTEIN MJ, YOUNG CA, BONNER TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature (Lond)* 1990;346:561-64.
32. MUNRO S, THOMAS KL, ABU-SHAAR M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature (Lond)* 1993;365:61-5.
33. Russo EB. History of cannabis and its preparations in saga, science, and sobriquet. *Chem Biodivers*. Agosto 2007;4(8):1614-48.
34. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*. 9 agosto 1990;346(6284):561-4.
35. Shire D, Carillon C, Kaghad M, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, et al. An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing. *J Biol Chem*. 24 febbraio 1995;270(8):3726-31.
36. Glass M, Dragunow M, Faull RL. Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience*. Marzo 1997;77(2):299-318.
37. Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 2 settembre 1993;365(6441):61-5.
38. VAN SICKLE MD, DUNCAN M, KINGSLEY PJ, MOUIHATE A, URBANI P, MACKIE K, STELLA N, MAKRIYANNIS A, PIOMELLI D, DAVISON JS. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science (Wash DC)* 2005;310:329-32.
39. GONG J-P, ONAIVI ES, ISHIGURO H, LIU Q-R, TAGLIAFERRO PA, BRUSCO A, UHL GR. Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res* 2006;1071:10-23
40. JULIEN B, GRENARD P, TEIXEIRA-CLERC F, VAN NHIEU JT, LIL, KARSAK M, ZIMMER A, MALLAT A, LOTERSZTAJN S. Antifibrogenic role of the cannabinoid receptor CB2 in the liver. *Gastroenterology* 2005;128:742-55.

41. KARSAK M, OFEK O, FOGEL M, WRIGHT K, TAM J, GABET Y, BIRENBOIM R, ATTAR-NAMDAR M, MÜLLER R, COHENSOLAL M. The cannabinoid CB2 receptor: a potential target for the treatment of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2004;19:S383
42. Maccarrone M, Finazzi-Agrò A. Endocannabinoids and their actions. *Vitam Horm.* 2002;65:225–55.
43. 26. Mackie K, Devane WA, Hille B. Anandamide, an endogenous cannabinoid, inhibits calcium currents as a partial agonist in N18 neuroblastoma cells. *Mol Pharmacol.* Settembre 1993;44(3):498–503.
44. 27. Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, et al. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science.* 14 aprile 2000;288(5464):306–13.
45. 28. Henstridge CM, Balenga NA, Schröder R, Kargl JK, Platzer W, Martini L, et al. GPR55 ligands promote receptor coupling to multiple signaling pathways. *Br J Pharmacol.* Giugno 2010;160(3):604–14.
46. 29. McHugh D, Hu SSJ, Rimmerman N, Juknat A, Vogel Z, Walker JM, et al. N-arachidonoyl glycine, an abundant endogenous lipid, potently drives directed cellular migration through GPR18, the putative abnormal cannabidiol receptor. *BMC Neurosci.* 2010;11:44.
47. 30. Campos AC, Moreira FA, Gomes FV, Del Bel EA, Guimarães FS. Multiple mechanisms involved in the large-spectrum therapeutic potential of cannabidiol in psychiatric disorders. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci.* 5 dicembre 2012;367(1607):3364–78.
48. 31. Kunos G, Osei-Hyiaman D, Bátkai S, Sharkey KA, Makriyannis A. Should peripheral CB1 cannabinoid receptors be selectively targeted for therapeutic gain? *Trends Pharmacol Sci.* Gennaio 2009;30(1):1–7.
49. Jean-Gilles L, Gran B, Constantinescu CS. Interaction between cytokines, cannabinoids and the nervous system. *Immunobiology.* Agosto 2010;215(8):606–10.
50. 33. Esposito G, De Filippis D, Maiuri MC, De Stefano D, Carnuccio R, Iuvone T. Cannabidiol inhibits inducible nitric oxide synthase protein expression and nitric oxide production in beta-amyloid stimulated PC12 neurons through p38 MAP kinase and NF-kappaB involvement. *Neurosci Lett.* 15 maggio 2006;399(1-2):91–5.
51. CAULFIELD MP, BROWN DA. Cannabinoid receptor agonists inhibit Ca current in NG108–15 neuroblastoma cells via a pertussis toxinsensitive mechanism. *Br J Pharmacol* 1992;106:231-2.



52. ALGER BE, PITLER TA. Retrograde signaling at GABAA-receptor synapses in the mammalian CNS. *Trends Neurosci* 1995;18:333-40.
53. KREITZER AC, REGEHR WG. Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron* 2001;29:717-727.
54. WILSON RI, KUNOS G, NICOLL RA. Presynaptic specificity of endocannabinoid signaling in the hippocampus. *Neuron* 2001;31:453-62.
55. MACKIE K. Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Handb Exp Pharmacol* 2005;168:299- 325.
56. DEVANE WA, HANUS L, BREUER A, PERTWEE RG, STEVENSON LA, GRIFFIN G, GIBSON D, MANDELBAUM A, ETINGER A, MECHOULAM R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science (Wash DC)* 1992;258:1946-9.
57. MECHOULAM R, BENSHABAT S, HANUS L, LIGUMSKY M, KAMINSKI NE, SCHATZ AR, GOPHER A, SHOLOMO A, MARTIN BR, COMPTON DR. Identification of an endogenous 2 monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 1995;50:83-90.
58. SUGIURA T, KONDO S, SUKAGAWA A, NAKANE S, SHINODA A, ITOH K, YAMASHITA A, WAKU K. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;215:89-97.
59. PAGOTTO U, MARSICANO G, FEZZA F, THEODOROPOULOU M, GRUBLER Y, STALLA J, ARZBERGER T, MILONE A, LOSA M, DI MARZO V, LUTZ B, STALLA GK. Normal human pituitary gland and pituitary adenomas express cannabinoid receptor type 1 and synthesize endogenous cannabinoids: first evidence for a direct role of cannabinoids on hormone modulation at the human pituitary level. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 2687-96.
60. Grotenhermen, F., 2005. *Current Drug Targets CNS Neurological Disorders. Cannabinoids* 507–530.
61. Grotenhermen, F., Müller-Vahl, K., 2012. The Therapeutic Potential of Cannabis and Cannabinoids. *Dtsch. Ärztebl. Int.* 109, 495–501 doi:10.3238/arztebl.2012.0495
62. Amada, N., Yamasaki, Y., Williams, C.M., Whalley, B.J., 2013. Cannabidiol (CBD) suppresses pentylenetetrazole (PTZ)-induced increases in epilepsy-related gene expression. *PeerJ* 1, e214. Doi:10.7717/peerj.214
63. Longo, D.L., Friedman, D., Devinsky, O., 2015. Cannabinoids in the Treatment of Epilepsy. *N. Engl. J. Med.* 373, 1048–1058. Doi:10.1056/NEJMra1407304

64. Tzadok, M., Uliel-Siboni, S., Linder, I., Kramer, U., Epstein, O., Menascu, S., Nissenkorn, A., Yosef, O.B., Hyman, E., Granot, D., Dor, M., Lerman-Sagie, T., Ben-Zeev, B., 2016. CBD-enriched medical cannabis for intractable pediatric epilepsy. *Seizure – Eur. J. Epilepsy* 35, 41–44. Doi:10.1016/j.seizure.2016.01.004
65. Costa, B., Trovato, A.E., Comelli, F., Giagnoni, G., Colleoni, M., 2007. The non-psychoactive cannabis constituent cannabidiol is an orally effective therapeutic agent in rat chronic inflammatory and neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* 556, 75–83. Doi:10.1016/j.ejphar.2006.11.006
66. Ramikie, T.S., Nyilas, R., Bluett, R.J., Gamble-George, J.C., Hartley, N.D., Mackie, K., Watanabe, M., Katona, I., Patel, S., 2014. Multiple Mechanistically Distinct Modes of Endocannabinoid Mobilization at Central Amygdala Glutamatergic Synapses. *Neuron* 81, 1111–1125. Doi:10.1016/j.neuron.2014.01.012
67. Patel, S., Hillard, C.J., 2006. Pharmacological Evaluation of Cannabinoid Receptor Ligands in a Mouse Model of Anxiety: Further Evidence for an Anxiolytic Role for Endogenous Cannabinoid Signaling. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 318, 304–311. doi:10.1124/jpet.106.101287
68. Mechoulam, R., Parker, L.A., 2013. The Endocannabinoid System and the Brain. *Annu. Rev. Psychol.* 64, 21–47. Doi:10.1146/annurev-psych-113011-143739
69. Bergamaschi, M.M., Queiroz, R.H.C., Chagas, M.H.N., de Oliveira, D.C.G., De Martinis, B.S., Kapczinski, F., Quevedo, J., Roesler, R., Schröder, N., Nardi, A.E., Martín-Santos, R., Hallak, J.E.C., Zuardi, A.W., Crippa, J.A.S., 2011. Cannabidiol Reduces the Anxiety Induced by Simulated Public Speaking in Treatment-Naïve Social Phobia Patients. *Neuropsychopharmacology* 36, 1219–1226. Doi:10.1038/npp.2011.6
70. Bahi, A., Al Mansouri, S., Al Memari, E., Al Ameri, M., Nurulain, S.M., Ojha, S., 2014. B-Caryophyllene, a CB2 receptor agonist produces multiple behavioral changes relevant to anxiety and depression in mice. *Physiol. Behav.* 135, 119–124. doi:10.1016/j.physbeh.2014.06.003
71. Arjmand, S., Vaziri, Z., Behzadi, M., Abbassian, H., Stephens, G.J., Shabani, M., 2015. Cannabinoids and Tremor Induced by Motor-related Disorders: Friend or Foe Neurother. *J. Am. Soc. Exp. Neurother.* 12, 778–787. Doi:10.1007/s13311-015-0367-5
72. Alexander GE. Biology of Parkinson's disease: pathogenesis and pathophysiology of a multisystem neurodegenerative disorder. *Dialogues Clin Neurosci.* Settembre 2004;6(3):259–80.
73. Benito C, Tolón RM, Pazos MR, Núñez E, Castillo AI, Romero J. Cannabinoid CB2 receptors in human brain inflammation. *Br J Pharmacol.* Gennaio 2008;153(2):277–85.

74. Iuvone T, Esposito G, Esposito R, Santamaria R, Di Rosa M, Izzo AA. Neuroprotective effect of cannabidiol, a non-psychoactive component from *Cannabis sativa*, on beta-amyloid-induced toxicity in PC12 cells. *J Neurochem*. Aprile 2004;89(1):134–41.
75. Scuderi C, Steardo L, Esposito G. Cannabidiol promotes amyloid precursor protein ubiquitination and reduction of beta amyloid expression in SHSY5YAPP+ cells through PPAR $\gamma$  involvement. *Phytother Res*. Luglio 2014;28(7):1007–13.
76. Aso E, Sánchez-Pla A, Vegas-Lozano E, Maldonado R, Ferrer I. Cannabis-based medicine reduces multiple pathological processes in A $\beta$ PP/PS1 mice. *J Alzheimers Dis*. 2015;43(3):977–91.
77. Pryce G, Baker D. Control of Spasticity in a Multiple Sclerosis Model is mediated by CB1, not CB2, Cannabinoid Receptors. *Br J Pharmacol*. Febbraio 2007;150(4):519–25.
78. Rieder, S.A., Chauhan, A., Singh, U., Nagarkatti, M., Nagarkatti, P., 2010. Cannabinoid-induced apoptosis in immune cells as a pathway to immunosuppression. *Immunobiology* 215, 598–605. Doi:10.1016/j.imbio.2009.04.001
79. Burstein, S., 2015. Cannabidiol (CBD) and its analogs: a review of their effects on inflammation. *Bioorg. Med. Chem.* 23, 1377–1385. Doi:10.1016/j.bmc.2015.01.059
80. Haj, C.G., Sumariwalla, P.F., Hanuš, L., Kogan, N.M., Yektin, Z., Mechoulam, R., Feldmann, M., Gallily, R., 2015. HU-444, a Novel, Potent Anti-Inflammatory, Nonpsychotropic Cannabinoid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 355, 66–75. Doi:10.1124/jpet.115.226100
81. Burstein, S., Levin, E., Varanelli, C., 1973. Prostaglandins and cannabis. II. Inhibition of biosynthesis by the naturally occurring cannabinoids. *Biochem. Pharmacol.* 22, 2905–2910.
82. Eisohly, H.N., Turner, C.E., Clark, A.M., Eisohly, M.A., 1982. Synthesis and antimicrobial activities of certain cannabichromene and cannabigerol related compounds. *J. Pharm. Sci.* 71, 1319–1323.
83. Pinar-Sueiro, S., Rodríguez-Puertas, R., Vecino, E., 2011. [Cannabinoid applications in glaucoma]. *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.* 86, 16–23. Doi:10.1016/j.oftal.2010.11.015
84. Novack, G.D., 2016. Cannabinoids for treatment of glaucoma. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 146–150. Doi:10.1097/ICU.0000000000000242
85. Pertwee, R.G., 2005. Cannabidiol as a potential medicine, in: Mechoulam, R. (Ed.), *Cannabinoids as Therapeutics, Milestones in Drug Therapy MDT*. Birkhäuser Basel, pp.47–65.

86. Scott, K.A., Shah, S., Dalglish, A.G., Liu, W.M., 2013. Enhancing the Activity of Cannabidiol and Other Cannabinoids In Vitro Through Modifications to Drug Combinations and Treatment Schedules. *Anticancer Res.* 33, 4373–4380.
87. Scott, K.A., Dalglish, A.G., Liu, W.M., 2014. The Combination of Cannabidiol and  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol Enhances the Anticancer Effects of Radiation in an Orthotopic Murine Glioma Model. *Mol. Cancer Ther.* Doi:10.1158/15357163.MCT-14-0402
88. BRIDGES D, AHMAD K, RICE AS. The synthetic cannabinoid WIN55,212-2 attenuates hyperalgesia and allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Br J Pharmacol* 2001;133:586-94.
89. FOX A, KESINGLAND A, GENTRYM C, MCNAIR K, PATEL S, URBAN L, JAMES I. The role of central and peripheral Cannabinoid 1 receptors in the antihyperalgesic activity of cannabinoids in a model of neuropathic pain. *Pain* 2001;92:91-100.
90. <http://www.assocanapa.org/>.
91. Aizpurua-Olaizola, O., Soydaner, U., Öztürk, E., Schibano, D., Simsir, Y., Navarro, P., Etxebarria, N., Usobiaga, A., 2016. Evolution of the Cannabinoid and Terpene Content during the Growth of *Cannabis sativa* Plants from Different Chemotypes. *J. Nat. Prod.* 79, 324–331. Doi:10.1021/acs.jnatprod.5b00949
92. Russo, E.B., 2007. History of cannabis and its preparations in saga, science, and sobriquet. *Chem. Biodivers.* 4, 1614–1648. Doi:10.1002/cbdv.200790144
93. Galand, N., Ernouf, D., Montigny, F., Dollet, J., Pothier, J., 2004. Separation and identification of cannabis components by different planar chromatography techniques (TLC, AMD, OPLC). *J. Chromatogr. Sci.* 42, 130–134.

## *Ringraziamenti*

Concludo questo percorso universitario, ricco di difficoltà, momenti bui, crisi in cui avrei voluto mollare tutto, con la soddisfazione di avercela fatta con le mie forze. Ripensando agli esami sostenuti, ai pianti e alle serate passate sui libri mi viene la nausea ma ne è valsa la pena. Quindi in primis ringrazio me stessa, la mia determinazione e la mia forza di volontà. Senza l'appoggio però di due persone speciali forse ora non sarei qui a scrivere tutto questo....grazie mia dolce Cami e dolce Mamma per avermi sempre sostenuto, aiutato e capito e grazie per avermi spinto a cambiare la mia vita, ad uscire dalla mia zona confort e a buttarmi nel mare più aperto, rischioso ma bellissimo. Non è stato per me un anno semplice a livello personale ma ho avuto la fortuna di incontrare persone meravigliose: la professoressa Ligia e il Dottor Zanardo, due grandi persone prima che due bravissimi professionisti che mi hanno accolto e aiutato andando oltre il piano lavorativo. Vi sono enorme grata e vi porterò sempre nel cuore.

Non voglio dimenticare la mia psicologa la dott.ssa Beraldo che ha ascoltato pazientemente i miei sfoghi e mi ha aiutato a trovare la luce in fondo al tunnel della mia condizione. Ringrazio i miei alunni che a loro modo mi hanno fatta sentire importante e mi hanno spronato a farcela per poter realizzare il mio sogno ovvero quello di insegnare. Voglio concludere questo percorso con la consapevolezza di essere cresciuta, cambiata e voglio far tesoro di tutto ciò che le persone che in questi anni ho incontrato mi hanno saputo dare.

Grazie e buona vita a me, perché il bello comincia ora!!!!

## Appendice

Si riportano in questa appendice le tabelle relative alle prove di ottimizzazione del gradiente eseguite nel corso del lavoro di tesi, con allegati alcuni cromatogrammi.

*Ottimizzazione del gradiente:*

*Colonna A:*

*Tabella 1. Gradiente 1*

<b>Tempo (min)</b>	<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%)</b>	<b>MeOH(%)</b>
0	30	70
3	30	70
10	5	95
14	5	95
15	30	70

La scelta di questo gradiente, riportato in Tabella , prevede una prima fase isocratica, da 0 a 3 minuti, in cui la percentuale delle due fasi resta costante; vi è poi un rapido incremento della fase organica, in 7 minuti si passa da un 70 % di metanolo ad un 95 %; questo per spingere i composti più lipofili. Per 4 minuti il regime di gradiente rimane inalterato in modo tale che i picchi possano uscire ben risolti e poi si ritorna allo stato di partenza. In questo modo si ottiene una buona separazione nella zona critica relativa al CBD, CNBG e THCV e picchi ben separati anche per tutti gli altri 5 composti. L'analisi ha una durata di circa 13 minuti con un flusso di 1.1 mL/min e una temperatura di 15 °C, si ha una riduzione del tempo se si innalza il flusso a 1.2 mL/min; il guadagno però è di un solo minuto.

*Tabella 5. Gradiente 2*

<b>Tempo (min)</b>	<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%)</b>	<b>MeOH(%)</b>
0	30	70
5	30	70
11	5	95
13	5	95
14	30	70

Anche in questo caso, come si osserva dalla Tabella 2, si ha una prima fase isocratica però di durata maggiore rispetto a quanto sperimentato nel gradiente 1, questo implica che l'uscita dei primi picchi CBDA, CBD, CNBG, THCV sia ritardata e che i picchi siano più ravvicinati; loro risultando una peggiore risoluzione risulta. Aumentando più rapidamente la quantità di fase organica, cioè passando in 6 minuti dal 70 al 95 %, si osserva che i picchi più lipofili escono con una separazione migliore, anche se il THCA cade molto vicino al THCV, mentre nel caso precedente essi risultavano più efficacemente separati. In questo caso il tempo di analisi, a parità di flusso e temperatura della precedente (1.2 mL/min e 15 °C), risulta più lunga perché l'ultimo picco, ovvero quello relativo al CNBC cade a circa 14 minuti.

Tabella 3. Gradiente 3

<b>Tempo (min)</b>	<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%)</b>	<b>MeOH(%)</b>
0	25	75
5	25	85
10	5	95
13	5	95
14	25	75

In Tabella 3 sono riportate condizioni di gradiente analoghe a quelle della Tabella 2, con la sola differenza che si parte da una concentrazione di fase organica maggiore e quindi dopo la prima fase isocratica l'aumento della percentuale di metanolo avviene più lentamente in quanto la quantità di partenza è maggiore. Questo fa sì che i picchi relativi a CBD, CNBG e THCV siano poco risolti anche se distinguibili; i problemi in questo caso riguardano i picchi di THC, CBN e CNBC che praticamente sono indistinguibili.

Tabella 4. Gradiente 4

<b>Tempo (min)</b>	<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%)</b>	<b>MeOH(%)</b>
0	30	70
9	15	85
10	5	95
13	5	95
14	30	70

In questo caso, come mostra la Tabella 4, si parte subito con un innalzamento blando della fase organica: in 9 minuti la percentuale di fosfato si dimezza; questo fa sì che i picchi relativi a CBD, CNBG e THCV siano stretti, alti e separati alla base. Anche il picco relativo al THCA è facilmente distinguibile così come quelli relativi ai composti rimanenti. Il tempo di analisi è buono, circa 13.5 minuti; molto simile a quello che caratterizza anche le misure precedenti.

Tabella 5. Gradiente 5

<b>Tempo (min)</b>	<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%)</b>	<b>MeOH(%)</b>
0	30	70
5	15	85
10	5	95
13	5	95
14	30	70

Applicando il gradiente 5, riportato in Tabella 5 il dimezzamento della percentuale di fosfato avviene in 5 minuti, quasi la metà del gradiente 4. Come conseguenza si osserva che i primi picchi compaiono a tempi minori, ma non appaiono ben risolti in quanto il THCV si fonde

con il THCA. I picchi relativi ai composti più lipofilici risultano invece ben risolti perché la fase isocratica ad alta percentuale di metanolo ha la stessa durata del caso precedente. In questo caso si riducono i tempi di analisi, circa 10.5 minuti a scapito però della separazione dei picchi meno lipofilici.

Tabella 6. Gradiente 6

Tempo (min)	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (%)	MeOH(%)
0	30	70
3	30	70
10	5	95
13	5	95
14	30	70

In questo caso, come si osserva dalla Tabella 6 dopo una breve fase isocratica di 3 minuti, si ha in 7 minuti un rapido aumento della percentuale di metanolo, la fase inorganica diventa 6 volte minore in questo lasso di tempo. La conseguenza di questa scelta è che i picchi di CBD, CNBG e THCV appaiono ben risolti, così come il THCA non si fonde con il THCV. Anche gli ultimi tre picchi, relativi a THC, CBN e CNBC sono ben risolti. Rispetto al gradiente precedente però i tempi di analisi si allungano fino a 12 minuti circa, ma la risoluzione migliora.

Tabella 7. Gradiente 7

Tempo (min)	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (%)	MeOH(%)
0	25	75
3	25	75
10	5	95
13	5	95
14	25	75

Applicando il gradiente 7, descritto in Tabella 7, che differisce del precedente nel punto di partenza che è a maggiore percentuale di fase organica, si ottiene una migliore risoluzione dei picchi più lipofilici. I tempi di analisi sono molto simili a precedente caso.

#### Ottimizzazione della temperatura

##### Colonna A

Si riportano per ciascun cannabinoide le Tabelle 8;9;10;11;12;13;14 e i grafici nelle Figure 1;2;3;4;5;6;7;8 che mostrano la variazione dei tempi di ritenzione relativi in funzione della temperatura.

Tabella 8. CBDA variazione dei tempi di ritenzione relativi in funzione della temperatura

Tempo di ritenzione relativo (s)	Temperatura (°C)
87,6	10
90,6	12,5



94,8	15
95,4	17,5
97,2	20
100,2	22,5
101,4	25

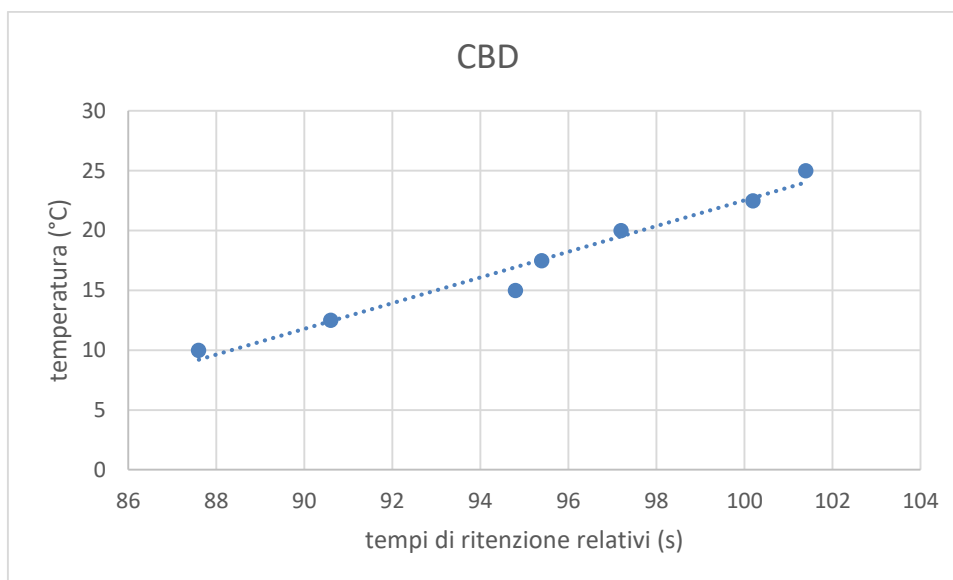


Figura 1. Grafico tempi di ritenzione vs temperatura

Tabella 9. CNBG variazione dei tempi di ritenzione relativi in funzione della temperatura

<b>Tempo di ritenzione relativo (s)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
90	10
93	12,5
97,2	15
97,8	17,5
99,6	20
102	22,5
103,2	25

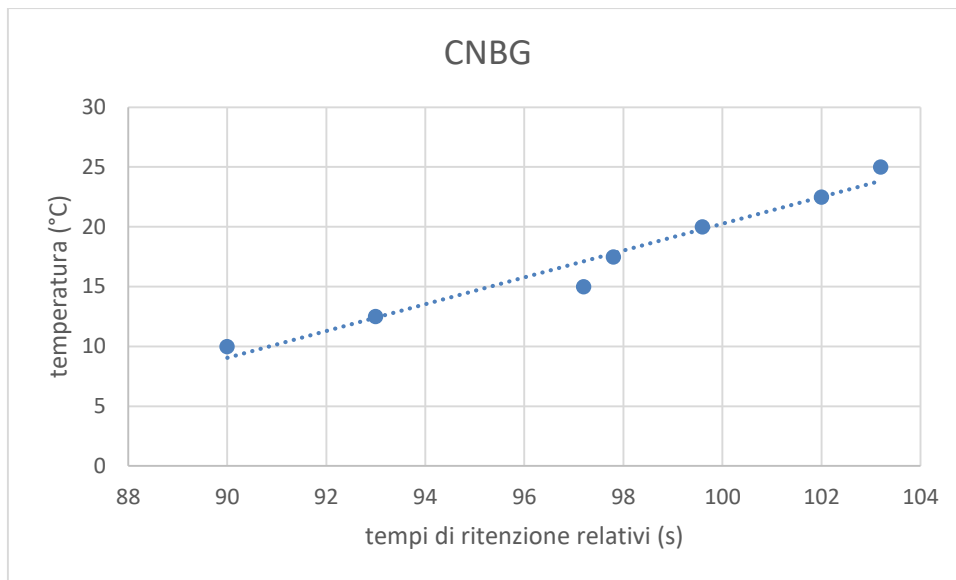


Figura 2. Grafico tempi di ritenzione vs temperatura

Tabella 10. THCv variazione dei tempi di ritenzione relativi in funzione della temperatura

Tempo di ritenzione relativo (s)	Temperatura (°C)
93,6	10
96	12,5
100,2	15
100,8	17,5
102,6	20
105	22,5
106,2	25

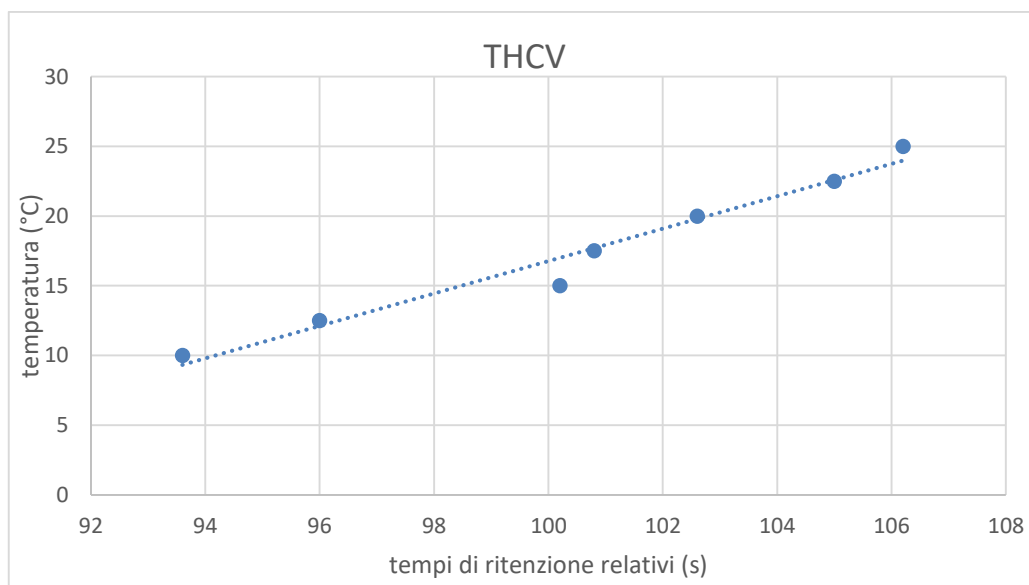


Figura 3. Grafico tempi di ritenzione vs temperatura

Tabella 11. THC variazione dei tempi di ritenzione relativi in funzione della temperatura

<b>Tempo di ritenzione relativo (s)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
113,4	10
114	12,5
123	15
124,8	17,5
125,4	20
131,4	22,5
133,2	25

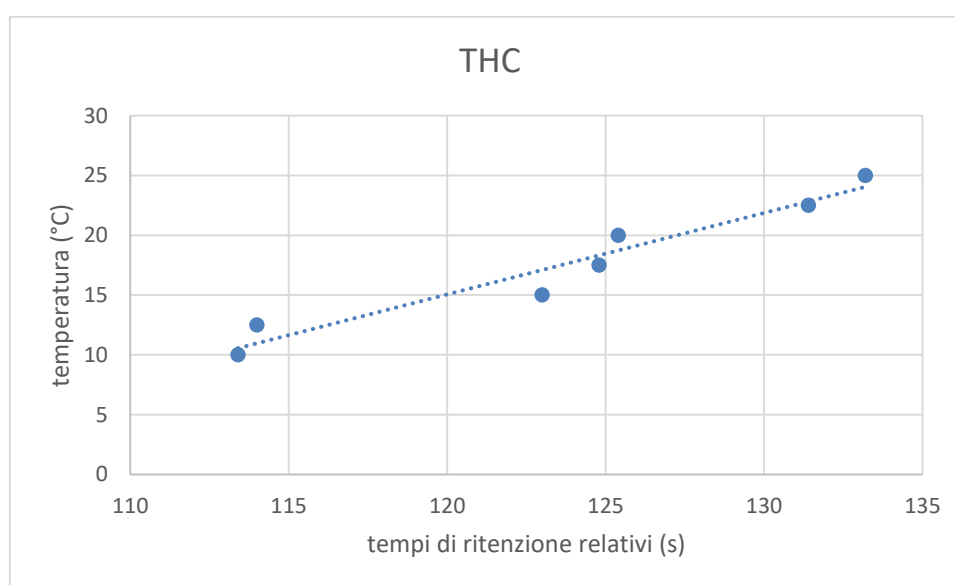


Figura 5. Grafico tempi di ritenzione vs temperatura

Tabella 12. THCA variazione dei tempi di ritenzione relativi in funzione della temperatura

<b>Tempo di ritenzione relativo (s)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
102,6	10
105	12,5
109,8	15
111	17,5
112,2	20
114,6	22,5
115,2	25

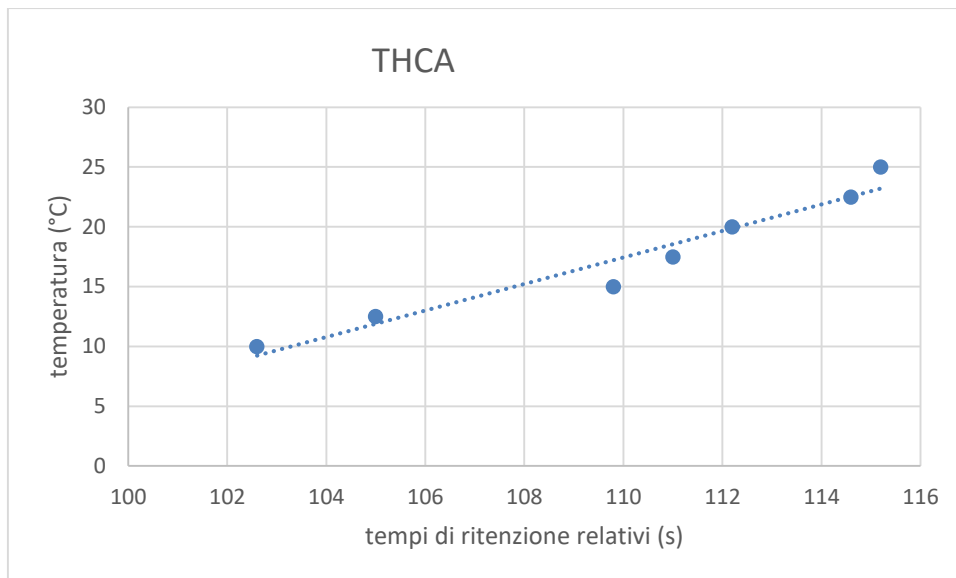


Figura 6. Grafico tempi di ritenzione vs temperatura

Tabella 13. CBN variazione dei tempi di ritenzione relativi in funzione della temperatura

Tempo di ritenzione relativo (s)	Temperatura (°C)
108	10
111	12,5
116,4	15
118,2	17,5
120	20
123,6	22,5
125,4	25

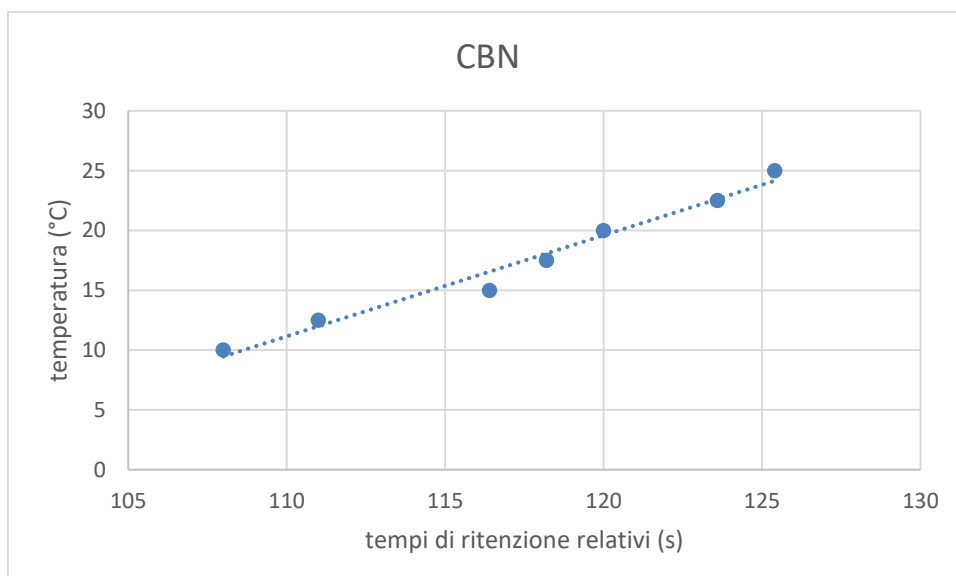


Figura 7. Grafico tempi di ritenzione vs temperatura

Tabella 14. CNBC variazione dei tempi di ritenzione relativi in funzione della temperatura

Tempo di ritenzione relativo (s)	Temperatura (°C)
120	10
123,6	12,5
130,2	15
132,6	17,5
135	20
139,8	22,5
142,2	25

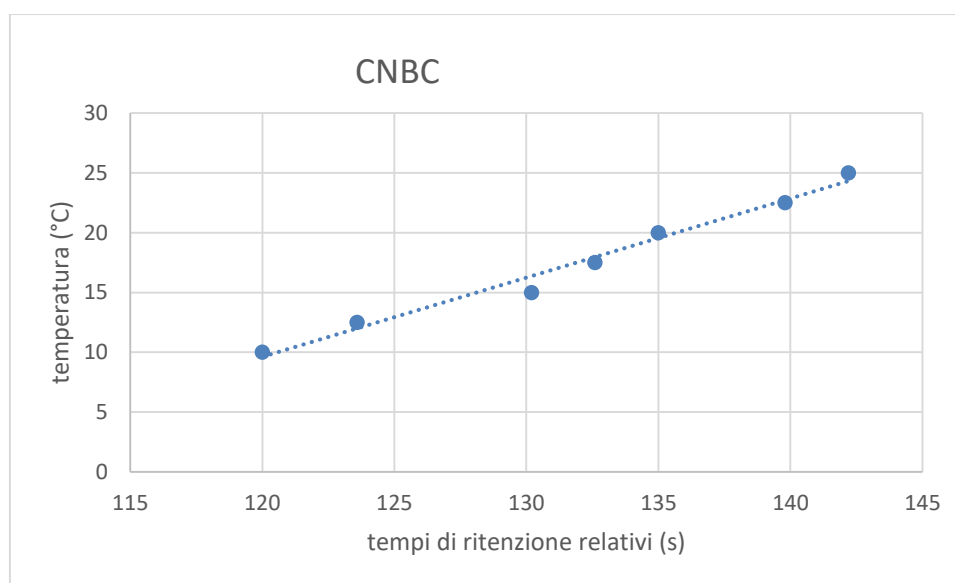


Figura 8. Grafico tempi di ritenzione vs temperatura

Per ciascun composto si osserva che esiste una relazione lineare tra la variazione dei tempi di ritenzione relativi e la variazione di temperatura. Questo spiega perché passando da una temperatura all'altra non cambia sostanzialmente l'aspetto del cromatogramma, cioè i picchi appaiono in posizioni, distanze simili, senza alcun tipo di inversione, visibile invece variando il pH. L'effetto della temperatura è quello di variare la cinetica di interazione tra i composti e le

fasi mobile e stazionaria: a temperature più basse i picchi vengono risolti a tempi maggiori questo significa che tendono ad essere maggiormente trattenuti e che la cinetica di interazione è più lenta.

*Ottimizzazione della fase mobile: aggiunta di Aceto Nitrile*

*Tabella 15. Gradiente 1*

<b>Tempo (min)</b>	<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%)</b>	<b>MeOH (%)</b>	<b>Ac.nitrile (%)</b>
0	40	60	0
10	5	80	15
14	5	80	15
15	40	60	0

In questo caso è stato realizzato un gradiente di aceto nitrile; come si osserva in Tabella 15, si parte infatti da zero % per arrivare in 10 minuti al 15 %, si mantiene una condizione isocratica per 4 minuti e poi si decresce ritornando a zero. Il cromatogramma presenta una buona separazione alla base dei picchi, che appaiono alti e stretti con una buona linea di base. La durata dell'analisi è sempre di circa 12 minuti.

*Tabella 16. Gradiente 2*

<b>Tempo (min)</b>	<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%)</b>	<b>MeOH (%)</b>	<b>Ac.nitrile (%)</b>
0	35	65	0
9	5	85	10
10	5	80	15
14	5	80	15
15	35	65	0

In questo caso, come si osserva dalla Tabella 16, è stato realizzato un gradiente di aceto nitrile, a due diverse percentuali; il cromatogramma mostra picchi ben definiti e stretti inoltre l'analisi si riduce di circa un minuto.

*Tabella 17. Gradiente 3*

<b>Tempo (min)</b>	<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%)</b>	<b>MeOH (%)</b>	<b>Ac.nitrile (%)</b>
0	30	60	10
7	15	75	10
10	5	85	10
13	5	85	10
14	30	60	10

In questo caso invece la percentuale di aceto nitrile è stata mantenuta fissa, come si vede nella Tabella 17 e di fatto non si notano sostanziali differenze rispetto alle prove precedenti a gradiente di aceto nitrile. La durata della misura aumenta in questo caso di circa 1 minuto.

*Tabella 18. Gradiente 4*

<b>Tempo (min)</b>	<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%)</b>	<b>MeOH (%)</b>	<b>Ac.nitrile (%)</b>
0	30	70	0
3	30	65	5
7	15	75	10
10	5	85	10
13	5	90	5
14	30	70	0

In questo caso invece è stato realizzato un gradiente doppio: la Tabella 18 mostra come dopo una prima fase in crescita e è stata realizzata una fase in diminuzione con lo stesso andamento; con una fase isocratica nel mezzo delle due tendenze. Anche in questa misura i picchi appaiono ben separati, alti e stretti. La durata dell'analisi è sempre di circa 12 minuti.

*Tabella 19. Gradiente 5*

<b>Tempo (min)</b>	<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%)</b>	<b>MeOH (%)</b>	<b>Ac.nitrile (%)</b>
0	30	35	35
13	0	65	35
14	0	65	35
15	30	35	35

Interessante è questa prova, riportata in Tabella 19 in cui si lavora con una percentuale particolarmente elevata di aceto nitrile, portando anche per un minuto la fase inorganica a zero. Quello che si osserva è un cromatogramma di fatto simile a quelli precedenti: i picchi però risultano maggiormente distanziati e l'analisi ha una durata di 11 minuti.

*Tabella 20. Gradiente 6*

<b>Tempo (min)</b>	<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%)</b>	<b>MeOH (%)</b>	<b>Ac.nitrile (%)</b>
0	30	65	5
10	5	85	10
14	5	80	15
15	30	65	5

In questo caso (Tabella 20) si ha un gradiente lento e crescente di aceto nitrile, seguito da una rapida diminuzione nella parte finale dell'analisi. Le differenze del cromatogramma non sono evidenti: i picchi risultano sempre ben separati alla base, alti e stretti. La misura dura sempre 11.5 minuti.

*Ottimizzazione del gradiente*

*Colonna B:*

*Tabella 21. Gradiente 2*

<b>Tempo (min)</b>	<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%)</b>	<b>MeOH(%)</b>
0	40	60

7	23	77
8,5	5	95
9,5	5	95
10	40	60

In questo caso, come mostra chiaramente la Tabella 21 si è rallentato l'aumento della fase organica, riuscendo a migliorare la separazione dei picchi CBD, CNBG e THCV anche se per i primi due si può ancora migliorarne la definizione. In quanto i picchi non risultano ben separati alla base.

Non favorevole per la loro separazione è la sperimentazione del gradiente riportato sotto in Tabella 22:

Tabella 22. Gradiente 3

<b>Tempo (min)</b>	<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%)</b>	<b>MeOH(%)</b>
0	35	65
6,5	23	77
8,5	5	95
9,5	5	95
10	35	65

Anche in questo caso è stata ulteriormente rallentato l'aumento della fase organica partendo però da una condizione più lipofila, né deriva una mancata separazione dei picchi relativi a CBD e CNBG. A questo punto si è variato ancora una volta il pH, aumentato a 4,5 unità, lavorando con condizioni di flusso, temperatura e gradiente originarie.

Il risultato non è per nulla buono, in quanto i picchi appaiono molto ravvicinati tra loro e difficilmente distinguibili. Per farsi un'idea delle eventuali sovrapposizioni, sono state fatte le prove con il solo THCA e con la miscela a tre CBD, CBN e THC ottenendo in quest'ultimo caso, come mostra il cromatogramma un risultato pessimo. A questo punto è stato modificato il gradiente lavorando alle condizioni riportate in Tabella 23:

Tabella 23. Gradiente 4

<b>Tempo (min)</b>	<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%)</b>	<b>MeOH(%)</b>
0	40	60
3	23	77
5	5	95
9	5	95
10	40	60



In questo caso i picchi appaiono risolti.

Sono state eseguite altre prove a temperatura maggiore, ovvero a 55°C, in condizioni di gradiente 1 e flusso 0,7 mL/min. Ridurre il flusso è una condizione necessaria dal momento che si innalza la temperatura per non rendere troppo veloce l'analisi, schiacciando i picchi e rendendoli poco definiti.

L'aumento di temperatura quindi è da scartare, pertanto risulta necessario lavorare sul gradiente, riportandosi alla temperatura di 50°C.

Tabella 24. Gradiente 5

<b>Tempo (min)</b>	<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%)</b>	<b>MeOH(%)</b>
0	40	60
3	23	77
7.2	5	95
9	5	95
10	40	60

In questo tentativo, riportato in Tabella 24 di aumento della velocità di aumento della fase organica, non si ha la risoluzione dei picchi relativi a CBD e CNBG.

Tabella 25. Gradiente 6

<b>Tempo (min)</b>	<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%)</b>	<b>MeOH(%)</b>
0	40	60
3.5	23	77
8	5	95
9.5	5	95
10	40	60

In tal caso (Tabella 25) pur diminuendo di poco la velocità di aumento della fase organica, il CBD e il CNBG appaiono separati, anche se molto schiacciati.

Tabella 26. Gradiente 7

<b>Tempo (min)</b>	<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%)</b>	<b>MeOH(%)</b>
0	40	60
3.5	23	77
8	5	95
10	5	95
11	40	60

In Tabella 26 si riporta una variazione di gradiente in cui si è potuto osservare che, aumentando la durata della fase isocratica organica, viene meno la separazione tra CBN e THCA. Anche tutte le altre variazioni del gradiente sono risultate sfavorevoli ai fini dell'ottimizzazione della separazione. Pertanto si è agito sulla temperatura, abbassandola progressivamente in quanto la sua diminuzione rallenta l'uscita dei picchi facendo presupporre una loro migliore separazione.

Sotto si riporta la Tabella 27, relativa a una temperatura di 40°C:

*Tabella 27. Gradiente 8*

<b>Tempo (min)</b>	<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%)</b>	<b>MeOH(%)</b>
0	35	65
4	20	80
7	5	95
10	5	95
11	35	65

In questo caso l'ulteriore diminuzione della velocità di crescita della percentuale di fase organica, unita alla diminuzione della temperatura consentono una separazione dei picchi relativi al CBD, CNBG e THCV ma non del CBN e del THCA che appaiono risolti in un unico picco.

Abbassando ulteriormente la temperatura a 30°C e modificando il gradiente come riportato in Tabella 28, la situazione CBN-THCA resta immutata, ovvero non vengono separati:

*Tabella 28. Gradiente 9*

<b>Tempo (min)</b>	<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%)</b>	<b>MeOH(%)</b>
0	35	65
4	20	80
7	5	95
10	5	95
11	35	65

A 20°C, la situazione migliora in quanto CBN e THCA vengono separati mentre CBD e CNBG risultano ravvicinati.

Sotto viene riportata la Tabella 29 di gradiente, che mostra un aumento in questo caso nella velocità di crescita del metanolo:

*Tabella 29. Gradiente 10*

<b>Tempo (min)</b>	<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%)</b>	<b>MeOH(%)</b>
0	35	65
3.5	25	75
7.5	5	95
10	5	95
11	35	65

A 15°C la situazione migliora, rendendo anche CBD, CNBG e THCV ben separati; questo è prevedibile in quanto la diminuzione della temperatura rallenta la cinetica di interazione dei composti dello standard con la fase mobile consentendo quindi ai picchi di risultare ben separati.

Variazioni di gradiente a 15°C hanno consentito di migliorare la separazione, riducendo prima la velocità del secondo aumento della fase organica e poi rendendo più lunga la fase isocratica al 95 % di MeOH, secondo una modalità riportata in Tabella 30.

Tabella 30. Gradiente 11

<b>Tempo (min)</b>	<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%)</b>	<b>MeOH(%)</b>
0	35	65
3.5	25	75
8	5	95
11	5	95
11.5	35	65

A 10°C la separazione risulta ancora più definita ma il tempo di analisi aumenta, come si può osservare dalla Tabella 31 sotto:

Tabella 31. Gradiente 12

<b>Tempo (min)</b>	<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%)</b>	<b>MeOH(%)</b>
0	35	65
3	25	75
8	5	95
11	5	95
11.5	35	65

Tuttavia questa temperatura viene esclusa perché troppo bassa, quindi difficile da realizzare senza la presenza di un termostato.

#### *Ottimizzazione condizioni di separazione*

*Altre colonne:*

#### Colonna 1:

- Temperatura: 15°C
- pH: 4,5
- Flusso: 0,5
- Gradiente (Tabella 32):

Tabella 32. Gradiente di lavoro

<b>Tempo (min)</b>	<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%)</b>	<b>MeOH(%)</b>
--------------------	--	----------------

0	35	65
3.5	25	75
8	5	95
11	5	95
11.5	35	65

La difficoltà in questo caso riguarda la separazione tra CNBG e THCv che risultano condensati in un solo picco.

Colonna 2:

- Temperatura: 15°C
- pH: 4,5
- Flusso: 0,5
- Gradiente (Tabella 33):

*Tabella 33. Gradiente di lavoro*

<b>Tempo (min)</b>	<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%)</b>	<b>MeOH(%)</b>
0	30	70
3	20	80
6,5	5	95
14	5	95
15	30	70

In questo caso oltre che alla mancata separazione dei componenti CBD e CNBG, la durata dell'analisi aumenta di circa 3 minuti, rispetto alla colonna scelta per consentire un'analisi ottimale dei campioni.