



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

**DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E  
DELL'AMBIENTE**

**Corso di Laurea Magistrale  
Biologia Molecolare e Applicata**

**Sviluppo e validazione di un nuovo metodo analitico in  
cromatografia liquida ad alta prestazione accoppiata alla  
spettrometria di massa tandem (UHPLC-MS/MS) per la  
determinazione quali-quantitativa del THC, CBD e metaboliti  
in matrice cheratinica: applicazione a casi reali.**

**Development and validation of a new analytical method by  
ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass  
spectrometry (UHPLC-MS/MS) for the quantification of THC,  
CBD and their metabolites in hair: application to real cases.**

Tesi di Laurea Magistrale

di:

Giulia Pilli

Relatore

Chiar.mo Prof.:

Francesco Paolo Busardò

Correlatore:

Dott. A. Fabrizio Lo Faro

**Sessione FEBBRAIO 2022**

**Anno Accademico 2020/2021**

## INDICE

<b>INTRODUZIONE</b> .....	3
<b>1.1 Cannabis</b> .....	3
<b>1.1.1 Farmacocinetica</b> .....	5
<b>1.1.2 Farmacodinamica e sistema endocannabinoide</b> .....	7
<b>1.2 Cannabis ad uso medico</b> .....	12
<b>1.2.1. Stato giuridico in America ed Europa</b> .....	12
<b>1.2.2. Farmaci disponibili</b> .....	14
<b>1.2.3. Effetti del CBD</b> .....	19
<b>1.2.3.1. Effetti con alte evidenze</b> .....	19
<b>1.2.3.2. Effetti con basse evidenze</b> .....	28
<b>STUDIO SPERIMENTALE</b> .....	31
<b>2.1. Obiettivi della tesi</b> .....	31
<b>2.2. Materiali e Metodi</b> .....	32
<b>2.2.1. Calibratori e campioni di controllo qualità (QC)</b> .....	33
<b>2.2.2. Trattamento dei campioni</b> .....	34
<b>2.2.3. Condizioni strumentali</b> .....	35
<b>2.2.4. Validazione del metodo</b> .....	38
<b>2.2.5. Campioni biologici umani</b> .....	39
<b>Capitolo terzo</b> .....	43
<b>RISULTATI</b> .....	43
<b>3.1. Validazione</b> .....	43
<b>3.2. Campioni reali</b> .....	46
<b>DISCUSSIONI E CONCLUSIONI</b> .....	50
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	54
<b>SITOGRAFIA</b> .....	62

## Capitolo primo

### INTRODUZIONE

#### *1.1 Cannabis*

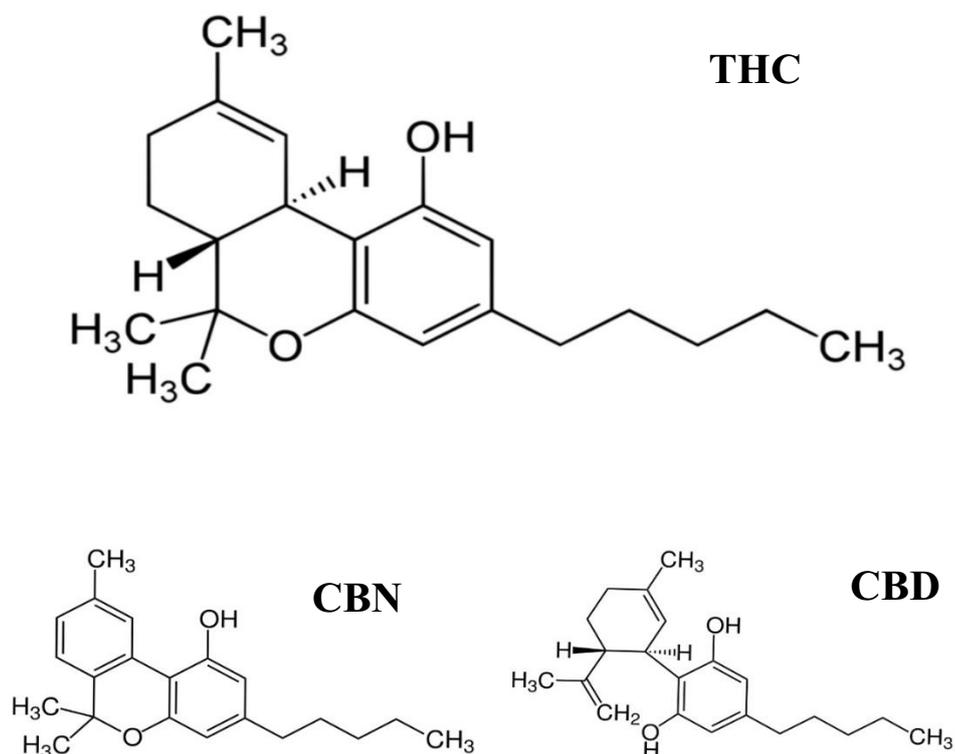
La cannabis è stata ritrovata per la prima volta in diverse zone dell'Estremo Oriente come la Cina ma anche nel Sud-est asiatico e in Asia centrale. L'inizio degli scambi commerciali, con il passare del tempo, ha portato alla diffusione anche in altri paesi quali Russia, Europa e infine in America.<sup>1</sup> La canapa è un'angiosperma che appartiene alla famiglia delle Cannabaceae. Si distinguono tre specie:

1. *Cannabis sativa* → più alta e fibrosa, tipica di ambienti caldi.
2. *Cannabis indica* → più corta e psicoattiva, tipica di zone fredde.
3. *Cannabis ruderalis* → solo alcuni tassonomi aggiungono questa specie putativa che risulta essere solo selvatica e bassa.<sup>2</sup>



**Figura 1** Rappresentazione varietà di cannabis

La pianta di *Cannabis*, così come i suoi prodotti e derivati, è caratterizzata da una significativa varietà di principi attivi: ad oggi, sono stati identificati 483 composti di cui 66 sono cannabinoidi e appartengono unicamente a questa pianta, mentre i restanti sono comunque molto frequenti nel regno vegetale. Possiamo distinguere i costituenti non cannabinoidi come terpenoidi, idrocarburi, composti contenenti azoto, carboidrati, flavonoidi, acidi grassi, fenoli, alcoli, aldeidi, chetoni, acidi, esteri e lattoni semplici. Tra i fitocannabinoidi i più abbondanti sono  $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo ( $\Delta^9$ -THC) che risulta essere psicoattivo, cannabinolo (CBN) e cannabidiolo (CBD).<sup>3</sup>



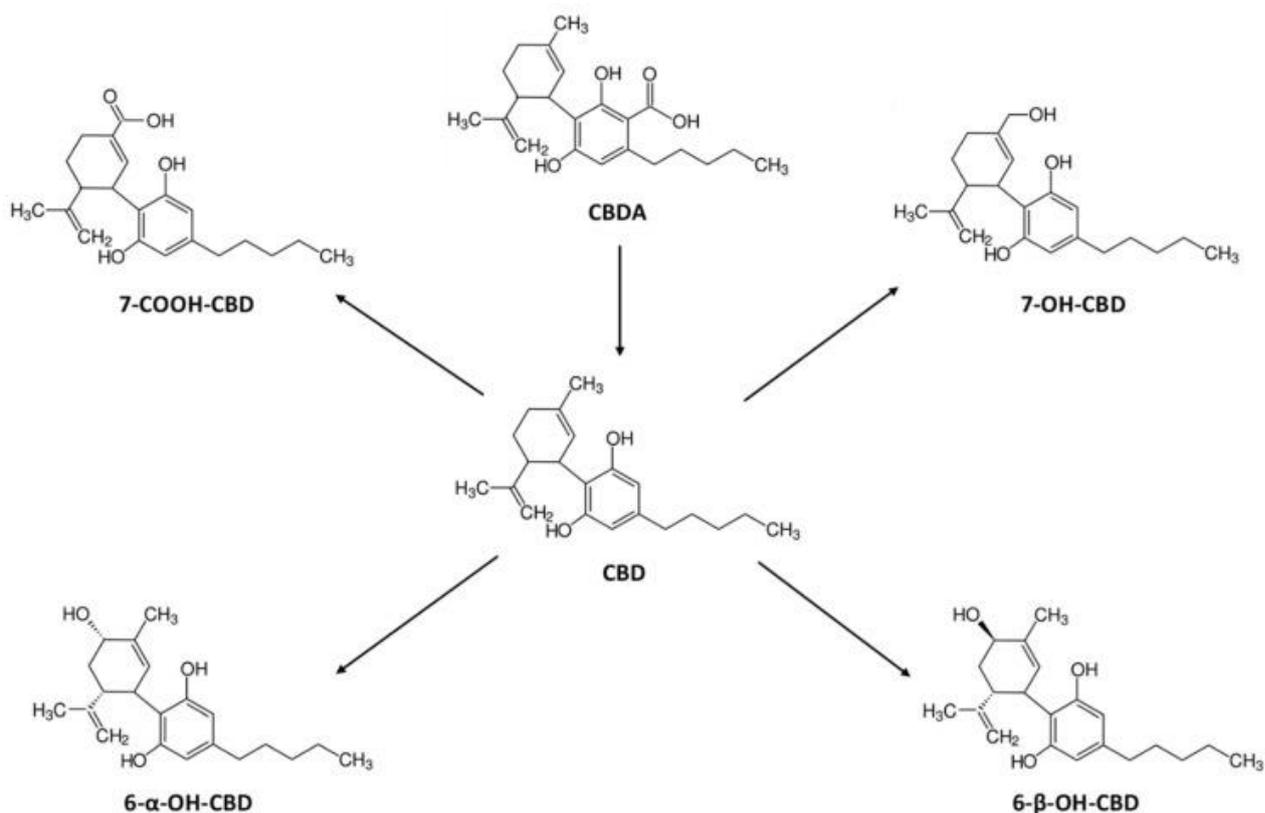
**Figura 2** Strutture di THC, CBN e CBD

### ***1.1.1 Farmacocinetica***

La farmacocinetica del sistema endocannabinoide è, ad oggi, argomento interessante di ricerca per il suo utilizzo in cure mediche e palliative. I recenti sviluppi e risultati hanno posto l'attenzione sul cannabidiolo (CBD) e sul suo potenziale effetto benefico nel trattamento di un ampio range di malattie.

L'assorbimento del CBD dipende dalle vie di somministrazione delle quali la via orale ed inalatoria sono le più diffuse. La prima ne permette una lunga durata dell'effetto anche se si manifesta dopo alcune ore con un picco d'azione tra la seconda e quarta ora. Tra gli svantaggi vi è una minor efficacia e una minor tolleranza da parte del paziente. La seconda via, invece, ha una durata dell'effetto di 3-5 ore, ma il picco si ha poco dopo un'ora. Una limitazione è l'assunzione dei prodotti di combustione, che però potrebbe essere arginata mediante vaporizzazione, e la differente efficacia data dalle diverse tecniche di inalazione.<sup>4</sup> Due altre vie meno comuni sono quella oromucosale e quella transdermica. La distribuzione del CBD avviene rapidamente negli organi che sono notevolmente vascolarizzati come cuore, cervello, polmoni con un notevole accumulo anche nel tessuto adiposo che dipende dal tempo. Il suo metabolismo avviene prevalentemente nell'intestino e nel fegato ad opera di diverse isoforme dell'ossidasi CYP450 di cui: CYP1A1, CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6, che ha un ruolo preponderante, CYP3A4 che è molto efficiente,

CYP3A5 e CYP2A9 che però ha un ruolo minore. L'espressione e la presenza di diverse isoforme cambiano l'azione terapeutica e gli effetti avversi.<sup>5</sup> Altri enzimi deputati al metabolismo sono la gluconil-transferase e sulfotransferasi. Il metabolita più abbondante è il 7-COOH-CBD (escreto intatto o come coniugati glucuronidici) inoltre i maggiori monoidrossilati sono: 6- $\alpha$ -CBD, 6- $\beta$ -CDB e 7-OH-CBD. La maggior parte dei metaboliti primari viene escreto con le feci e successivamente con le urine.<sup>6</sup>



**Figura 3** Struttura chimica del precursore acido del CBD e i suoi metaboliti

### ***1.1.2 Farmacodinamica e sistema endocannabinoide***

La maggior parte degli effetti dei fitocannabinoidi sono mediati da azioni agonistiche o antagoniste in specifici siti recettoriali. I recettori e i loro ligandi endogeni insieme costituiscono il sistema endocannabinoide (ECS).<sup>7</sup>

Devane et al. hanno caratterizzato il primo recettore dei cannabinoidi (CB1R) nel cervello di ratto e umano. Questo è una proteina, costituita da 472 amminoacidi, appartenente alla famiglia di recettori accoppiati a proteine G contenente 7 domini idrofobi che attraversano la membrana e molteplici potenziali siti di glicosilazione.<sup>8</sup>

Nel 1992, lo stesso autore in collaborazione con altri scienziati isolò il primo endocannabinoide, arachidonoiletanolamide (AEA), successivamente rinominato anandamide.<sup>9</sup> Nel 1995 il gruppo di Mechoulam scoprì un secondo importante endocannabinoide, il 2-arachidonilglicerolo (2-AG), avente la proprietà di legarsi non solo ai recettori CB1, ma anche ad un secondo tipo di recettori denominati CB2.<sup>10</sup>

Una singolarità del sistema endocannabinoide è la segnalazione retrograda, cioè la segnalazione che inizia nei neuroni postsinaptici e agisce sui terminali presinaptici. AEA e 2-AG sono prodotti nel neurone postsinaptico e rilasciati nello spazio sinaptico: viaggiano in direzione retrograda verso il terminale presinaptico per interagire con i CB1R con una conseguente diminuzione del

rilascio di neurotrasmettitori da parte del neurone presinaptico. Attraverso lo studio dell'ECS emerge come sia un sistema di segnalazione cerebrale complesso e diffuso che svolge un ruolo nelle funzioni affettive e cognitive e nei disturbi psicotici.<sup>9</sup>

Entrambi i recettori CB1 e CB2 sono accoppiati negativamente all'adenilato ciclasi e sono tipicamente espressi in molte diverse regioni del corpo.<sup>11</sup>

Il CB1 è altamente espresso nel sistema nervoso centrale sui neuroni concentrati nella corteccia prefrontale, gangli, ippocampo, amigdala, ipotalamo e cervelletto. Il CB2 è espresso nelle cellule mononucleate del sangue periferico, più fortemente sui macrofagi, linfociti B e cellule *natural killer*. È stato descritto anche nella microglia del sistema nervoso centrale di origine mesenchimale, dove si ipotizza che regola la risposta neuroinfiammatoria, ben descritta nel miocardio, endotelio vascolare e muscolatura liscia.<sup>12</sup>

La ricerca di ulteriori recettori dei cannabinoidi ha portato alla presentazione di convincenti prove nel 2007 di un ulteriore recettore orfano GPR55, potenzialmente collegato al sistema IP3/DAG/Ca<sup>2+</sup>.

Nel caso specifico il CBD è un antagonista non competitivo del recettore CB1 e non interagisce direttamente con CB2.<sup>13</sup> È noto anche per legarsi a recettori-canale che determinano variazioni transitorie di potenziale (TRP). Questi sono

un gruppo di proteine di membrana che modulano l'ingresso di ioni mediando una varietà di processi di segnalazione neurale. Sono coinvolti in numerose funzioni fisiologiche come la sensazione di temperatura, l'olfatto, il gusto, la vista, la pressione o la percezione del dolore. Tra questi ci sono tre diverse sottofamiglie: TRPV (Vanilloide), TRPA (Ankyrina) e TRPM (Melastatina) sono formati da sei eliche transmembrana, un poro permeabile ai cationi ed estremità C- e N- intracellulari.

Il recettore TRPV1 è ampiamente espresso nel cervello e nei neuroni sensoriali (principalmente nella radice dorsale e nei gangli del trigemino). È coinvolto nella percezione del dolore, nella nocicezione e nel rilevamento della temperatura come anche i recettori TRPV2, TRPV3 e TRPV4. Inoltre, forti dati suggeriscono che alcune delle proprietà analgesiche e antiproliferative del CBD possono essere mediate dall'attivazione del TRPV2.

Altri canali TRP conosciuti sono: TRPA1 e TRPM8 che appartengono rispettivamente alle sottofamiglie ankyrina e melastatina dei canali TRP. Questi recettori sono coinvolti anche nella termosensazione. La loro interessante proprietà è che vengono attivati a basse temperature, oltre che da diverse molecole come il mentolo. Svolgono un ruolo nell'ipersensibilità al freddo associata al dolore infiammatorio e neuropatico. Pertanto, questi canali ionici

possono essere potenziali bersagli per il trattamento del dolore da freddo fisiopatologico.

Inoltre, è stato ulteriormente osservato che CBD desensibilizza potentemente il TRPA1, supportando così l'ipotesi che possa esercitare effetti analgesici tramite l'attivazione.<sup>14</sup>

Il CBD è anche classificato come un agonista del recettore della serotonina 5HT1a, perché ha la capacità di aumentare il legame GTP alla proteina G accoppiata al recettore, Gi, dimostrando il comportamento caratteristico di un agonista del recettore. In più i risultati di uno studio mostrano che il CBD mostra affinità micromolare nel sostituire un noto agonista, [3H]8-OH-DPAT, dal sito di legame del ligando 5-HT1aR mentre il THC, altra molecola indagata, è inattivo nello stesso intervallo di concentrazione.<sup>15</sup>

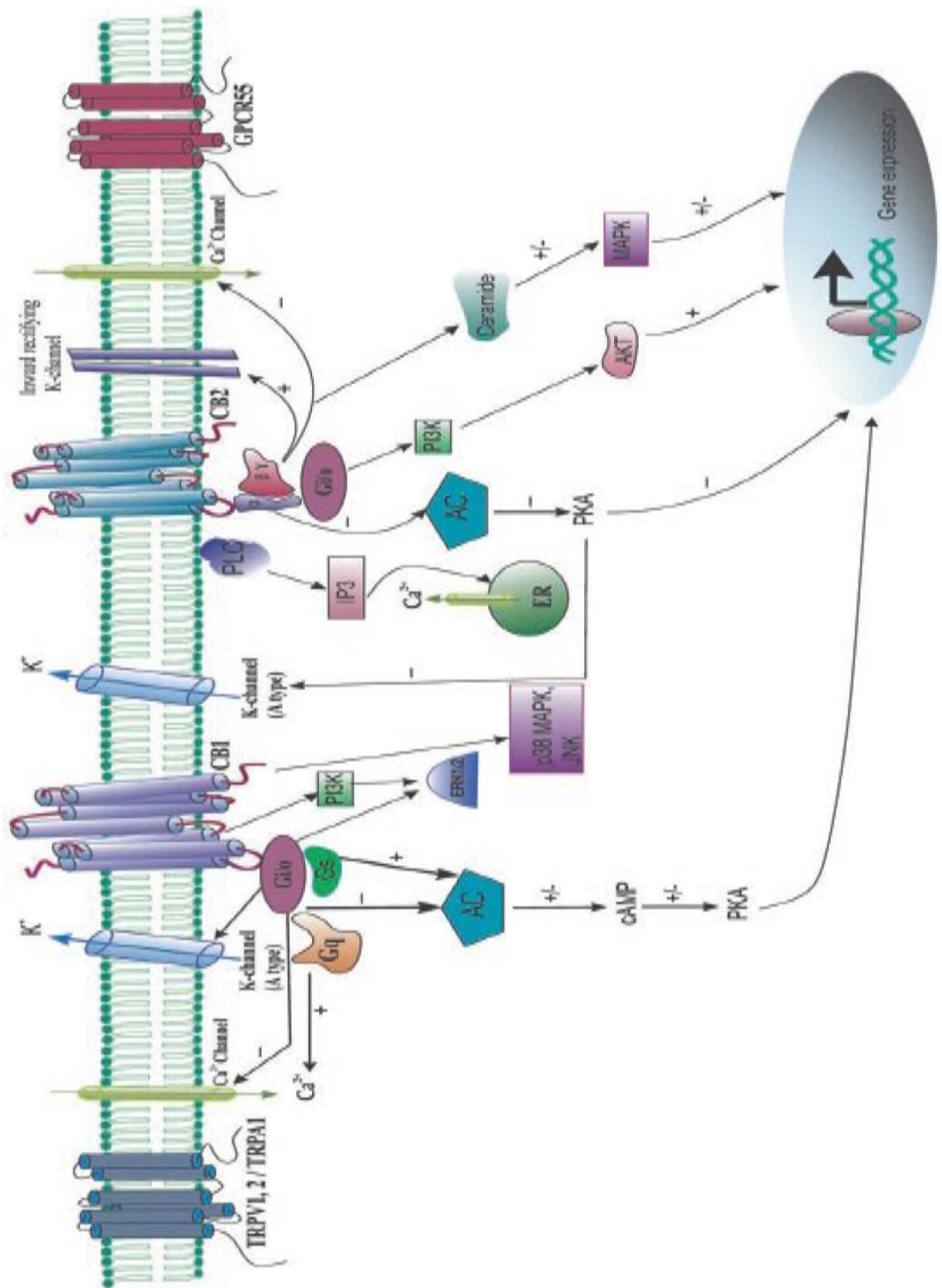


Figura 4 Schema di alcuni dei possibili recettori per i fitocannabinoidi ed endocannabinoidi.

## ***1.2. Cannabis ad uso medico***

Nella medicina orientale da sempre la canapa è stata utilizzata come medicinale sia a livello topico, come ad esempio su una un'inflammatione sia per ridurre il dolore, nausea, ansia, rilassamento dei muscoli, per conciliare il sonno e aumentare l'euforia. Nella medicina occidentale, invece, si dovrà attendere la fine del XIX, inizio del XX secolo per l'impiego.<sup>9</sup>

### ***1.2.1. Stato giuridico in America ed Europa***

Negli Stati Uniti d'America vi è una distinzione tra le leggi che regolamentano la cannabis medica e quella usata a scopo ricreativo. Per quanto riguarda la cannabis ad uso medico è presente una divisione tra la posizione dello Stato federale e quella dei singoli stati. Quanto al primo nel 1937 è stata approvata la Marijuana Tax Act, che non proibiva legalmente la distribuzione medica della cannabis ma ne scoraggiava l'uso. L'illegalità definitiva si ebbe però nel 1970 con la Drug Enforcement Agency (DEA) che la inserì nella "Schedule 1" dove sono presenti farmaci o sostanze chimiche che non sono attualmente accettate per uso medico e con un alto potenziale di abuso.<sup>16,17</sup> Di contro molti stati, ad oggi ne sono 28, con lo stato della California come primo paese (1996), hanno legiferato sull'uso delle cannabis per scopi medici con le Medical Marijuana Laws (MML). La FDA (Food and Drug Administration) ha approvato

solamente l'Epidiolex®, per poi successivamente riconsiderare l'utilizzo a livello medico e permettere la commercializzazione anche del Dronabinol (Marinol®, Syndros®) un sintetico del THC e Nabilone (Canemes®, Cesamet®) un cannabinoide sintetico simile al THC.<sup>18</sup>

Questa tendenza di rivalutazione della cannabis ad uso medico ha incoraggiato anche altri continenti, come l'Europa, a rivedere in tal senso le proprie leggi. Fino a pochi anni fa, nel vecchio continente non esisteva la differenziazione tra uso medico e ricreativo. Invece, al momento, il primo è generalmente permesso, mentre il secondo è dichiarato illegale. Negli stati membri dell'UE non vi è un'unificazione dal punto di vista legislativo e ogni stato è libero di legiferare apertamente.<sup>19</sup> Caso a parte è rappresentato dai prodotti medicinali (come il Sativex e l'Epidiolex) a base di CBD, il principale componente non psicoattivo della pianta, i quali sono autorizzati in molti paesi dell'UE e in alcuni, persino, rimborsati dallo Stato.

Qualsiasi farmaco contenente CBD richiede, per l'immissione in commercio in un paese membro, una Community marketing authorization (Autorizzazione Comunitaria alla Commercializzazione o AIC), rilasciata dall'EMA (European Medicines Agency) ed è valida in tutta la Comunità.

Per quanto concerne gli estratti di Cannabis sativa L., la principale delle tre varietà della pianta, e qualsiasi prodotto a cui viene aggiunto il CBD, devono

essere considerati come novel foods e sono strettamente controllati ai sensi del Regolamento UE sui novel foods (UE 2015/2283). In tal caso richiedono un'autorizzazione per l'immissione sul mercato, rilasciata dall'EFSA (Autorità Europea per la sicurezza alimentare). I prodotti contenenti CBD possono essere impiegati anche all'interno di cosmetici.

In altre parole, mentre lo status giuridico della cannabis in America è attualmente ben definito, quello dell'UE non è al momento omogeneo.<sup>20</sup>

#### ***1.2.1.1. Focus: Stato giuridico in Italia***

Attualmente, in Italia, la cannabis con alto contenuto di THC, componente psicotropo, è illegale ad uso ricreativo. Al contrario, vi è un vuoto legislativo sull'uso della cannabis a scopo medico: ne è stato permesso l'utilizzo solo a partire dal 2007 anche se al momento non è ancora registrata come medicinale. A causa di questo gap, alcuni negozi di canapa offrono liberamente prodotti a base di CBD (olio, cristalli, ecc.).<sup>20</sup>

#### ***1.2.2. Farmaci disponibili***

- Epidiolex® (a base vegetale, CBN metabolita della cannabis) è una soluzione orale da 100 mg/mL utilizzata per convulsioni associate a sindrome di Lennox-Gastaut, sindrome di Dravet o sclerosi tuberosa in pazienti di età pari o superiore a 1 anno.<sup>21</sup>

- Marinol® (capsule da 2.5/5/10 mg/mL) e Syndros® (soluzione orale 5 mg/mL) vengono utilizzati negli adulti affetti da anoressia associata a perdita di peso in pazienti con AIDS e nel trattamento di nausea e vomito associati a chemioterapia antitumorale, in pazienti che non hanno risposto adeguatamente al trattamento antiemetico convenzionale.<sup>22,23</sup>
- Canemes® (capsule 1mg) e Cesamet® (capsule 1mg) sono usati solo per il trattamento di questi ultimi pazienti.<sup>24,25</sup>
- Sativex® (a base vegetale, spray per mucosa orale) che contiene 2.7 mg di THC e 2.5 mg di CBD utilizzato per il trattamento della spasticità muscolare conseguente alla sclerosi multipla.<sup>26</sup>

**Tabella 1** Disponibilità di medicinali contenenti cannabinoidi nell'Unione Europea, in Turchia e in Norvegia<sup>27</sup>

	Principio attivo			Commenti
	Dronabinol	Nabilone	Nabiximols	
<b>Belgio</b>	No	No	Si	
<b>Bulgaria</b>	No	No	No	
<b>Repubblica ceca</b>	No	No	Si	Sativex dispone di un'autorizzazione all'immissione in commercio ma non è commercializzato.
<b>Danimarca</b>	Si	Si	Si	
<b>Germania</b>	No	Si	Si	Non esiste un'autorizzazione all'immissione in commercio dei medicinali contenenti dronabinol, ma il dronabinol è disponibile in preparati magistrali.

<b>Estonia</b>	No	No	Si	L'Agenzia statale estone dei medicinali (ESAM) può autorizzare l'uso per un paziente specifico. Questi farmaci devono presentare una domanda per l'importazione del medicinale che è valutata dall'ESAM. Tre applicazioni per Sativex sono state presentate (due erano approvate).
<b>Irlanda</b>	Si	Si	Si	Medicinali contenenti nabilone e dronabinol non sono autorizzati per la vendita, ma possono essere prescritti e importati.
<b>Grecia</b>	No	No	No	
<b>Spagna</b>	Si	Si	Si	Medicinali contenenti dronabinol e nabilone usati solo in casi eccezionali (importato).
<b>Francia</b>	Si	No	Si	Medicinale contenente dronabinol hanno un'autorizzazione temporanea. L'autorizzazione è stata concessa per il Sativex a gennaio 2014, ma non è stato ancora commercializzato.
<b>Croazia</b>	Si	Si	Si	Nessuna autorizzazione all'immissione in commercio per i medicinali, ma possono essere importati sulla base di prescrizioni individuali.
<b>Italia</b>	No	No	Si	
<b>Cipro</b>	No	No	No	
<b>Lettonia</b>	No	No	No	
<b>Lituania</b>	No	No	Si	Nabiximols solo per studi clinici.
<b>Lussemburgo</b>	No	No	Si	
<b>Ungheria</b>	No	No	No	
<b>Malta</b>	No	No	Si	Sativex ha un'autorizzazione ma non è commercializzato.
<b>Olanda</b>	No	No	Si	

<b>Austria</b>	No	Si	Si	Non esiste un'autorizzazione all'immissione in commercio per i medicinali contenenti dronabinol, ma questo è disponibile in preparazioni galeniche.
<b>Polonia</b>	Si	Si	Si	Il Sativex ha un'autorizzazione alla commercializzazione. Gli altri due prodotti non ce l'hanno, ma possono essere resi disponibili ai pazienti attraverso un permesso speciale (importazione con nome del paziente).
<b>Portogallo</b>	No	No	Si	
<b>Romania</b>	No	No	No	
<b>Slovenia</b>	Si	Si	Si	Sativex, Marinol e Cesamet non hanno alcuna autorizzazione autorizzazione, ma possono essere resi disponibili ai pazienti attraverso un permesso speciale (importazione con nome del paziente).
<b>Slovacchia</b>	No	No	No	Il Sativex è stato autorizzato ma l'autorizzazione è scaduta nel giugno 2017.
<b>Finlandia</b>	No	No	Si	
<b>Svezia</b>	No	No	Si	Dronabinol: permesso speciale su base nominativa del paziente. Nessuna obiezione legale per il nabilone (se a scopo medico e per uso personale), ma nessun permesso speciale su base nominativa è stato richiesto negli ultimi 3 anni.
<b>Regno unito</b>	No	Si	Si	
<b>Turchia</b>	No	No	Si	
<b>Norvegia</b>	Si	Si	Si	Medicinali contenenti dronabinol e nabilone: uso nominativo.

- In commercio esistono anche delle varietà di cannabis per preparazioni galeniche in base al contenuto di CBD e THC differente. Come mostrato nella tabella 2.

**Tabella 2** Varietà di herbal cannabis per prescrizione medica.<sup>10</sup>

<b>Produttori</b>	<b>Varietà</b>	<b>%THC*</b>	<b>%CBD*</b>	<b>Origine</b>
<b>THC &gt; CBD</b>				
Bedrocan International®	Bedrocan®	≅22	<1	Netherlands
	Bedica®	≅14	<1	
	Bedrobinol®	≅13.5	<1	
Aurora Cannabis Inc. (ACB)	Pedanos 22/1	≅22	<1	Canada
Spectrum Therapeutics™	Red n°1 Flower	20-23 (21.5**)	<0.7	
	Red n°2 Flower	17-20 (18.5**)	<0.7	
	Orange Flower	10-13 (11.5**)	<0.7	
	Purple Flower	8-11 (9.5**)	<0.7	
-	FM1	13-20	<1	Italy
<b>THC ≅ CBD</b>				
Bedrocan International®	Bediol®	≅6.3	≅8	Netherlands
Aurora Cannabis Inc. (ACB)	Pedanos 8/8	≅8	≅8	Canada
Spectrum Therapeutics™	Blue Flower	6-9 (7.5**)	8-11 (9.5**)	
	Green Flower	4-7 (5.5**)	7-10 (8.5**)	
-	FM2	5.8	8.1	Italy

THC < CBD				
Bedrocan International®	Bedrolite®	<1	≅9	Netherlands
Aurora Cannabis Inc. (ACB)	Pedarios 1/9	<1	≅9	Canada
Spectrum Therapeutics™	Yellow Flower	<1	11-14 (12.5**)	

In Italia per ridurre i costi di importazione il Ministero della Salute ha avviato un progetto di coltivazione nello Stabilimento Chimico Farmaceutico militare di Firenze, dove vengono prodotte due differenti varietà.<sup>28</sup> In questo caso si tratta di infiorescenze femminili non fecondate che vengono essiccate e macinate; ci si può riferire a questo preparato con il nome di “herbal cannabis”. Quest’ultima può essere utilizzata sotto varie forme come oli, spray, decotto, semplicemente fumata o vaporizzata.<sup>29</sup>

### ***1.2.3. Effetti del CBD***

#### ***1.2.3.1. Effetti con alte evidenze***

##### **1. Antiepilettico**

Il report aneddótico più noto è quello di Charlotte, una bambina di cinque anni negli Stati Uniti a cui è stato diagnosticato nel 2013 la Sindrome di Dravet, con fino a 50 crisi generalizzate al giorno. Dopo tre mesi con trattamento con estratto di cannabis ad alto contenuto di CBD, i genitori hanno riferito che le

sue convulsioni si sono ridotte di oltre il 90%. Partendo da questo, numerosi studi hanno voluto approfondito l'effetto di estratti orali di cannabis sull'epilessia intrattabile. Tra questi lo studio di Press et al. (2015) di 75 pazienti, 23% con sindrome di Dravet e l'89% con la sindrome di Lennox-Gastaut negli Stati Uniti e di Tzadok et al. (2016) di 74 pazienti in Israele vedono la segnalazione di una riduzione delle crisi del 50% nel 33% dei casi, e una riduzione delle crisi del 50-75% nel 34% dei casi rispettivamente nei due studi. Inoltre, sulla base di una meta-analisi (n=670), Pamplona et al. (2018) forniscono prove a sostegno del valore terapeutico dei trattamenti con CBD ad alto contenuto (estratto di cannabis ricco di CBD o CBD purificato). I risultati hanno indicato un effetto favorevole per entrambi i pazienti sia con purificati CBD (27,1 mg/kg/giorno) che con estratti ricchi di CBD (6,1 mg/kg/giorno di CBD) e in questi ultimi l'effetto favorevole risultava più pronunciato.

Nel complesso, gli studi sugli oli arricchiti con CBD indicano una riduzione del 50% delle convulsioni in circa il 30-40% dei pazienti.

Tuttavia, va sottolineato che questi sono studi non controllati con preparazioni eterogenee di CBD, il cui contenuto di CBD varia in modo significativo (stimato <0,02-50 mg/kg/giorno).

Gli studi sopra descritti però hanno riportato anche eventi avversi nel 40-50% dei pazienti, inclusa una maggiore frequenza delle crisi, disturbi

gastrointestinali/diarrea, alterazione dell'appetito, variazioni di peso, nausea, disfunzione epatica, pancreatite e, in particolare, sonnolenza e affaticamento. Effetti più gravi includevano regressione dello sviluppo, movimenti anormali e stato epilettico.<sup>30</sup>

## 2. Ansiolitico

Nonostante le abbondanti prove, in studi compiuti sugli animali, degli effetti del CBD sul miglioramento dei sintomi di ansia, solo pochi studi sull' uomo studiano l'efficacia e la sicurezza del CBD. Alcuni studi vengono trattati dei pazienti con il disturbo di ansia sociale (SAD). I risultati dopo la somministrazione hanno mostrato una significativa diminuzione dei livelli di ansia, del deterioramento cognitivo e del disagio nel soggetto.

Questi studi clinici sono necessari per chiarire adeguatamente gli effetti del CBD, non solo nel SAD ma anche in altri disturbi d'ansia.<sup>31</sup>

## 3. Proprietà antipsicotiche

Nel 1995 Zuardi e alcuni colleghi hanno pubblicato il primo caso clinico di un paziente schizofrenico trattato con CBD: era una paziente di sesso femminile con gravi effetti collaterali da antipsicotici convenzionali trattata con un dosaggio fino a 1.500 mg/die per 4 settimane e ha avuto una significativa riduzione dei punteggi dei sintomi positivi e negativi della “Brief Psychiatric

Rating Scale” (BPRS). Ulteriori studi hanno esaminato l'efficacia e la tollerabilità del CBD nei pazienti affetti da schizofrenia confermando i risultati preliminari. Più recentemente, in uno studio in doppio cieco, i pazienti con schizofrenia sono stati randomizzati a ricevere per 6 settimane CBD (1.000 mg/giorno; N = 43) o placebo (N = 45) in aggiunta ai loro farmaci antipsicotici esistenti. Dopo il trattamento, il gruppo del CBD ha presentato punteggi psicotici positivi inferiori e sintomi cognitivi e generali di malattia migliorati. Gli effetti collaterali del CBD e del placebo erano equivalenti tra i gruppi. Poiché gli effetti antipsicotici del CBD non sembrano dipendere dall'antagonismo del recettore della dopamina, questo composto può rappresentare una nuova classe di trattamento per i disturbi psicotici in generale e la schizofrenia, in particolare.<sup>32</sup>

#### 4. Neuroprotezione

Il nostro cervello cambia continuamente nel corso della nostra vita, e lo studio del meccanismo che coinvolge la neuroplasticità offre una grande opportunità per lo studio dei meccanismi che portano a malattie mentali e possibili nuovi obiettivi per il loro trattamento. Ad esempio, nei pazienti diagnosticati con disturbi dell'umore, disturbo da stress post-traumatico, schizofrenia e malattia di Alzheimer si osserva una riduzione del volume dell'ippocampo.

Il CBD sembra proteggere i neuroni dalla morte potenziando il riciclo di componenti cellulari vecchi/danneggiati tramite facilitazioni di azione autofagica. Demirakca et al. hanno suggerito che nei consumatori cronici di cannabis a cui erano associati valori più elevati di THC e concentrazioni più basse di CBD vi era una diminuzione della materia grigia nell'ippocampo e ridotte prestazioni cognitive, mentre livelli più elevati di CBD nei campioni di cannabis nei consumati hanno impedito la neurotossicità indotta dal THC.

Quindi le proprietà antinfiammatorie e antiossidanti del CBD possono offrire un nuovo approccio farmacologico per la neuroprotezione e una riduzione della perdita di volume dell'ippocampo. Quindi il CBD protegge dalla patologia dell'ippocampo dopo un uso frequente di THC.<sup>33</sup>

## 5. Spasticità

Ci sono molti studi in doppio cieco, controllati con placebo per gli effetti dei cannabinoidi sulla spasticità che utilizzano o estratti dalla pianta intera di cannabis o Sativex®. Si è visto che per i pazienti più problematici i sintomi sono stati significativamente ridotti.<sup>34</sup>

## 6. Disturbi da dipendenza

In diversi studi con consumatori regolari di cannabis è stato somministrato CBD prima di fumare. La pre-somministrazione di CBD a qualsiasi dose non

ha cambiato le valutazioni del fumo di cannabis attiva. Inoltre, quando somministrato, il CBD non ha mostrato alcun segno di responsabilità di abuso che conferma ulteriormente la sicurezza del CBD ingerito per via orale.

Dopo aver completato il trattamento, i partecipanti hanno riferito di avere meno sintomi simil-psicotici e depressivi rispetto al periodo di pre-trattamento. Inoltre, durante il test cognitivo, i soggetti sono migliorati nel passaggio attenzionale, così come nell'apprendimento verbale e nella memoria.

Il CBD è stato anche testato per i suoi effetti sul desiderio di oppioidi. In combinazione con il fentanil, è stata esaminata la sicurezza del CBD, quando somministrato a consumatori di eroina astinenti. Lo studio ha dimostrato che il CBD era ben tollerato a tutte le dosi e che la co-somministrazione non ha prodotto i sintomi di depressione respiratoria o qualsiasi complicanza cardiovascolare, suggerendo il potenziale del CBD per essere potenzialmente utilizzato come trattamento per l'abuso di oppioidi.

È stato anche valutato l'impatto del CBD sull'intossicazione da alcol. Questo ha dato risultati che hanno suggerito effetti trascurabili o di miglioramento minimo del consumo di alcol. È interessante notare che sebbene non si abbia alcun effetto del CBD, la combinazione di questi ha comportato un significativo abbassamento dei livelli di alcol nel sangue.

Attualmente, sono in corso ampi studi randomizzati, quindi il potenziale terapeutico del CBD per il trattamento della dipendenza da alcol è ancora da determinare.<sup>35</sup>

## 8. Dolore cronico

L'uso di trattamenti derivati dalla cannabis nella fibromialgia e nelle malattie reumatiche è stato oggetto di notevole interesse negli ultimi anni e nonché oggetto di numerosi studi clinici e recensioni scientifiche. Questi pazienti sono spesso trattati con un approccio multidisciplinare utilizzando anche opzioni non farmacologiche, quindi i cannabinoidi stanno emergendo come una tendenza accanto ai più tradizionali farmaci.

Il primo studio randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo sui cannabinoidi per la fibromialgia è stato condotto nel 2008, indagando l'uso del nabilone (Cesamet, USA) in ambito riabilitativo ambulatoriale. In questo studio, il gruppo di trattamento con nabilone (n = 20) ha mostrato diminuzioni significative del dolore e ansia. Non c'era nessun miglioramento significativo nel gruppo con il placebo.<sup>36</sup>

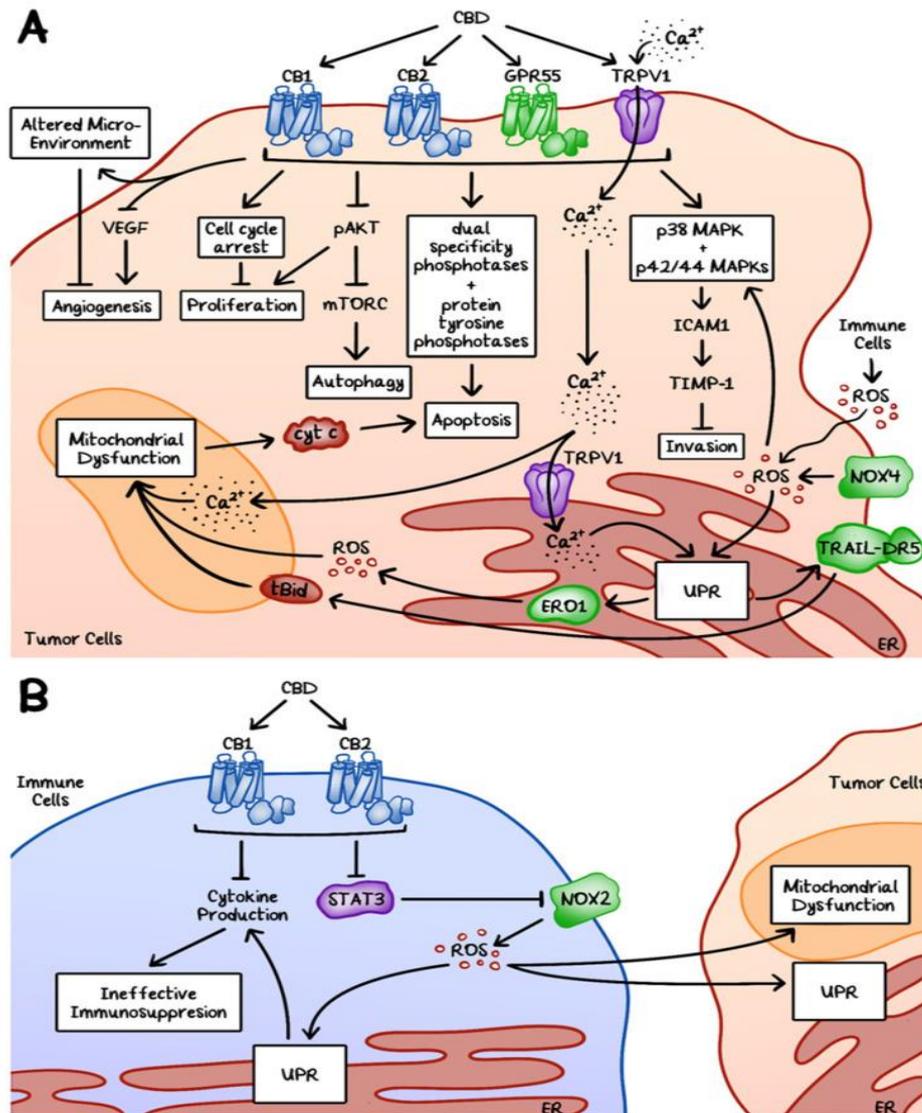
## 9. Cancro

Su questa applicazione vi è una notevole letteratura che dimostra il CBD si è dimostrato avere robusti effetti anti-proliferativi e pro-apoptotici su un'ampia

varietà di tipi di cancro come glioma, cancro al seno, ai polmoni, alla prostata ecc. ma anche in cellule tumorali in linee coltrali e nei modelli di tumore del topo. I meccanismi antitumorali variano in base ai tipi di tumore, che vanno dal ciclo cellulare arrestato all'autofagia, alla morte cellulare o questi effetti in combinazione tra loro. Inoltre, il CBD può anche inibire la migrazione del tumore, invasione e neovascolarizzazione, suggerendo che quest'ultimo non agisce solo sulle cellule tumorali ma può anche influenzare il microambiente tumorale, ad esempio modulando le cellule mesenchimali infiltranti e cellule immunitarie. Meccanicamente il CBD sembra interrompere l'omeostasi redox cellulare e indurre un drastico aumento dello stress da ROS e ER, che potrebbe quindi esercitare gli effetti citati sopra.

La maggior parte delle ricerche sugli effetti del CBD sui tumori deve ancora raggiungere la fase di sperimentazione clinica, quindi siamo limitati nella comprensione del profilo di sicurezza, alle dosi richieste, per inibire la crescita del tumore. A differenza di altre sostanze controllate, i pazienti non sembrano sviluppare una tolleranza al CBD. Possono verificarsi interazioni farmacologiche con il CBD poiché influisce anche sull'espressione di vari

enzimi CYP, pertanto occorre prestare attenzione nei pazienti che assumono farmaci metabolizzati nel fegato.<sup>37</sup>



**Figura 5** Gli effetti del CBD sulle cellule tumorali e sulle cellule immunitarie infiltranti

### ***1.2.3.2. Effetti con basse evidenze***

#### **1. Disturbi gastrointestinale**

I cannabinoidi colpiscono parti dell'intestino attraverso un meccanismo simile a quello degli oppioidi attualmente utilizzati nel trattamento della sindrome dell'intestino irritabile (IBS). Questo rende i cannabinoidi un trattamento potenzialmente efficace. La carenza di endocannabinoide può essere un fattore da sottolineare in disturbi come l'IBS, suggerendo ulteriormente che i cannabinoidi possono fornire sollievo ai pazienti con questa condizione. Molti pazienti riferiscono che la cannabis allevia i sintomi dei disturbi gastrointestinali, come nausea, spasmi e basso appetito.

Per quanto riguarda invece il morbo di Crohn (CD) ci sono stati pochissimi studi che esaminano come i pazienti rispondono alla cannabis.

La maggior parte delle terapie per la celiachia sono mirate alla riduzione dell'infiammazione. Tuttavia, in alcuni pazienti, questi farmaci non eliminano i sintomi come la diarrea cronica, ed è qui che l'uso di cannabinoidi può fornire sollievo. Il CBD è anche un farmaco promettente nel trattamento di malattie infiammatorie intestinali; è stato mostrato che allevia i sintomi e potenzialmente può aumentare l'efficacia di altri antinfiammatori che sono tipicamente indicati per la colite ulcerosa e CD.

#### **2. Sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS)**

Negli ultimi decenni sono stati condotti diversi studi che hanno esaminato l'uso della cannabis medica in pazienti con AIDS. L'uso attuale della cannabis medica è stato studiato in numerosi casi, ma i risultati sono stati contrastanti. I motivi più comuni per cui questi pazienti hanno usato la cannabis sono da ricercare nel miglioramento dell'appetito, nell'aumento di peso e nella diminuzione della nausea. Ci sono state solo una manciata di prove cliniche che dimostrano una significativa efficacia.

### 3. Glaucoma

L'uso della cannabis in aiuto nella cura del glaucoma è stato esplorato dall'inizio degli anni '70. Sebbene la cannabis sembrasse efficace poiché i risultati mostravano che diminuiva la pressione intraoculare negli occhi sia sani che glaucomatosi, ulteriori revisioni hanno mostrato un'efficacia del trattamento limitata. L'Accademia americana di oftalmologia non supporta questo uso per il glaucoma, data la durata limitata dell'azione. Inoltre, anche se la cannabis diminuisce temporaneamente anche la pressione intraoculare abbassa, altresì, la pressione sanguigna. Questo potrebbe portare a una diminuzione nel flusso sanguigno al nervo ottico, aumentando il rischio di perdita della vista.

### 4. Disturbo da stress post-traumatico

C'è un plausibile meccanismo a supporto del possibile utilizzo dei cannabinoidi, in particolare CBD, come farmacoterapia per il disturbo da stress

post-traumatico (PTSD). La cannabis è comunemente utilizzata nei pazienti con PTSD per sintomi come ipereccitazione, pensieri invadenti e problemi di sonno. Tuttavia, in uno studio era associato a una maggiore gravità dei sintomi del PTSD come comportamento violento e tassi più elevati di alcol e uso di droghe. Al contrario altri, hanno descritto una riduzione del 75% dei sintomi.

## 5. Morbo di Parkinson

Prove aneddotiche hanno portato allo studio della cannabis e dei cannabinoidi come farmacoterapia per il morbo di Parkinson. Un numero limitato di casi suggerisce che i cannabinoidi possono migliorare i sintomi associati al morbo di Parkinson, ma la maggior parte di questi studi erano osservazionali e non contenevano un gruppo di controllo.<sup>38</sup>

## Capitolo secondo

### STUDIO SPERIMENTALE

#### *2.1. Obiettivi della tesi*

Il primo obiettivo della seguente tesi è stato quello di sviluppare e validare, per la prima volta, un metodo analitico mediante la cromatografia liquida ad ultra prestazione accoppiata alla spettrometria di massa tandem (UHPLC-MS/MS) per l'identificazione e la quantificazione del THC, CBD e relativi metaboliti ovvero 11-nor-9-carbossi-THC, 11-idrossi-THC, 6-alfa-idrossicannabidiolo, 6-beta-idrossicannabidiolo, 7-idrossicannabidiolo e carbossi-cannabidiolo (THC-COOH, 11-OH-THC, 6- $\alpha$ -CBD, 6- $\beta$ -CBD, 7-OH-CBD e CBD-COOH) in matrice cheratinica (capelli).

Al termine dello sviluppo del metodo e del calcolo di linearità, limite di quantificazione, limite di rivelabilità, precisione, accuratezza carry-over, effetto matrice, efficienza del processo, stabilità a breve e medio termine, il metodo è stato testato con uno studio pilota su una serie di 25 campioni reali di pazienti assuntori cronici di differenti varietà di cannabis a scopo medico come ad esempio Bediol, Bedrolite, Pedanios e FM2 per determinare i ranges di concentrazione degli analiti.

Questo permetterà di effettuare monitoraggio terapeutico utilizzando matrici biologiche non-convenzionali (capelli) andando a valutare la compliance dei pazienti.

Infine, aumentando il numero di campioni esaminati sarà possibile descrivere e analizzare le distribuzioni degli analiti in esame, così da poter determinare un profilo caratteristico che possa essere utilizzato per discriminare assuntori di cannabis per uso medico da quelli a scopo voluttuario.

## ***2.2. Materiali e Metodi***

Le soluzioni standard del CBD e dei suoi metaboliti (7-COOH-CBD, 7-OH-CBD, 6- $\alpha$ -OH-CBD, 6- $\beta$ -OH-CBD e CBN) sono state fornite dalla Dalton Research Molecules (Toronto, Ontario, Canada), mentre quelle del THC (11-THC-COOH e 11-OH-THC) sono acquistate dalla Cerilliant Analytical Reference Standards (SigmaAldrich®). Le soluzioni deuterate (ISs) usati come standard interni (THC-d<sub>3</sub>, THC-COOH-d<sub>3</sub>, 11-OH-THC-d<sub>3</sub>, CBD-d<sub>3</sub>, CBN-d<sub>3</sub>), sono stati forniti dalla Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) e conservati a - 20 °C fino al momento dell'utilizzo.

L'acqua e l'acetonitrile (ACN) di grado LC-MS sono stati acquistati dalla Carlo Erba Reagents S.r.l. (Val-de-Reuil, Francia).

La soluzione acquosa a pH 8.5 con ammonio formiato 2mM è stata preparata usando l'ammonio formiato sale di ammonio puro al 97% (SigmaAldrich®). Il pH è stato modulato utilizzando idrossido d'ammonio e acido acetico della Honeywell Fluka™.

Il reagente M3® è stato acquistato dalla Comedical® s.r.l. (Trento, Italy).

### ***2.2.1. Calibratori e campioni di controllo qualità (QC)***

Le *stock solutions* degli analiti non deuterati e di un solo deuterato (THC-COOH-d<sub>3</sub>) sono state acquistate alla concentrazione di 1 mg/mL in metanolo; al contrario, tutti gli altri deuterati sono a nostra disposizione in concentrazione 100 µg/mL in metanolo. Queste sono state conservate in vials di vetro a – 20 °C. Le standard solutions contenenti tutti e 8 gli analiti non deuterati sono state preparate a 0,1 ng/mL, 0,1 ng/mL, 1 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL e 1 µg/mL in fase mobile 80:20 acqua\ammonio formiato 2 mM pH 8,5: ACN.

La soluzione di lavoro contenente deuterati e adoperata come standard interno è stata allestita a 100 ng/mL in fase mobile 80:20 acqua\ammonio formiato 2 mM pH 8,5: ACN. Non essendo attualmente disponibili in commercio gli standard deuterati dei metaboliti del CBD sono stati utilizzati gli standard deuterati del THC.

Sulla base di un'analisi semi-quantitativa di campioni sono stati stabiliti i seguenti 7 calibratori: 0,05, 0,1, 0,25, 0,50, 1, 2,50 e 5 ng/mg per THC, CBD, 11-OH-THC, 7-OH-CBD e 7-COOH-CBD; 7 calibratori a 0,0002, 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1 e 1 ng/mg per THC-COOH, 6- $\alpha$ -OH-CBD e 6- $\beta$ -OH-CBD.

Le Low, medium e high-quality control (QC) working solutions sono state preparate da matrici di capello bianco contenenti THC e CBD, 11-OH-THC, 7-OH-CBD e 7-COOH-CBD a 0,15, 1,5 e 4 ng/mg e THC-COOH, 6- $\alpha$ -OH-CBD e 6- $\beta$ -OH-CBD rispettivamente a 0,0006, 0,04 e 0,8 ng/mg.

### ***2.2.2. Trattamento dei campioni***

I campioni di capelli vengono lavati con 4 mL diclorometano per tre volte e asciugati in stufa a 100°C per 5 minuti.

Un'aliquota di capelli è stata finemente sminuzzata in frammenti (<5 mm) e pesata mediante bilancia analitica direttamente in provette di vetro per arrivare a un peso di 20 mg. In seguito, è stata addizionata con 2,5 ng/mg di standard interno. Dopo l'aggiunta di 500  $\mu$ L di reagente M3®, le provette sono state vortexate e centrifugate per 5 minuti a 3500 rpm. Terminato tale passaggio, sono state chiuse con tappo apposito e incubate in stufa a 100°C per un'ora in modo che ne avvenisse la completa digestione. Infine, i campioni sono stati raffreddati a temperatura ambiente e centrifugati una seconda volta a 3500 rpm

per 5 minuti. 200  $\mu$ L di campione sono stati, quindi, trasferiti in vials di vetro autocampionanti prima di essere iniettati 1  $\mu$ l nel sistema cromatografico.

### **2.2.3. Condizioni strumentali**

L'analisi UHPLC-MS/MS è stata svolta con cromatografo liquido accoppiato a rivelatore di massa a triplo quadrupolo (LC/MS) serie G6470A dotato di cromatografo UHPLC serie 1290 Infinity II (Agilent Technologies Italia S.p.A).

La sorgente di ionizzazione utilizzata è di tipo elettrospray in modalità positiva e negativa (ESI). I dati sono stati acquisiti con il software MassHunter® Workstation Quantitative Analysis 10.0 Software (Agilent®). Il processo di ottimizzazione è stato condotto in maniera automatica mediante il *tool* “MassHunter Optimazer” fornito dalla Agilent e confermato manualmente dall'operatore. In particolare, “MassHunter Optimazer” automatizza la selezione dei migliori ioni precursori, l'ottimizzazione del *fragmentor voltage* per ogni ione “precursore”, la selezione dei migliori ioni “prodotto” e l'ottimizzazione dei valori dell'energia di collisione per ciascuna transizione dei composti.

La cromatografia è stata condotta su una colonna C18 della Phenomenex® (lunghezza: 100 mm, diametro interno: 2,1 mm, dimensione delle particelle: 2,6  $\mu$ m). La durata della corsa è stata di 8 minuti (seguiti da 2 minuti di *post-*

run) con un gradiente di fase mobile composto da acqua e ammonio formiato 2 mM a pH 8,5 (A) e ACN (B) ad una velocità di flusso di 0,4 mL/min. Il volume di iniezione è stato di 1 µL.

Le condizioni cromatografiche sono riportate nella tabella sottostante:

**Tabella 3** Gradiente utilizzato durante la corsa cromatografica

<b>Tempo (min)</b>	<b>A (%)</b>	<b>B (%)</b>
<b>0,25</b>	80,00	20,00
<b>3,10</b>	37,00	63,00
<b>5,00</b>	35,00	65,00
<b>6,00</b>	5,00	95,00
<b>8,00</b>	5,00	95,00
<b>8,10</b>	80,00	20,00
<b>10,00</b>	80,00	20,00

L'identificazione e la quantificazione degli analiti in esame è avvenuta in modalità MRM (multiple reaction-monitoring) utilizzando due transizioni per ogni analita e IS (standard interno), riportate in Tabella 3.

L'infusione degli standard di riferimento in fase mobile 80:20 acqua\ammonio formiato 2 mM pH 8,5: ACN ha condotto ai tempi di ritenzione (RT) elencati in Tabella 3.

Il tempo di scansione (dwell time) è 50 ms e le condizioni della sorgente sono state ottimizzate come segue:

- Tensione del capillare = 3500 V,
- Temperatura della sorgente = 350°C,
- Temperatura di desolvatazione = 250°C,
- Flusso del cono = 9 l/min,
- Flusso del gas di desolvatazione = 12 l/min.

**Tabella 4** Parametri della spettrometria di massa per analiti e standard interno in esame. Velocità di scansione (il “d-well time” e le “detection windows” sono stati impostati in fase di validazione).

Analiti	RT (min)	Polarità	Transizioni MRM					
			Transizione del quantificatore MRM			Transizione del qualificatore MRM		
			m/z	CV (V)	CE (eV)	m/z	CV (V)	CE (eV)
7-COOH CBD	2,55	ESI -	343,4>179,4	40	20	343,4>231,0	40	20
THC-COOH	3,11	ESI -	343,3>245,2	40	30	343,3>191,1	40	34
THC-COOH- d <sub>3</sub>	3,11	ESI -	346,3>302,3	40	30	346,3>248,3	40	30
6-α-OH-CBD	3,78	ESI -	329,1>158,2	40	32	329,1>173,1	40	30
7-OH-CBD	3,88	ESI -	329,1>268,1	40	24	329,1>261,1	40	20
6-β-OH-CBD	3,97	ESI -	329,1>158,2	40	35	329,1>173,1	40	30
THC	4,58	ESI +	315,2>193,2	40	20	315,2>123,1	40	20
THC-d <sub>3</sub>	4,58	ESI +	318,2>196,2	40	20	318,2>126,1	40	20
11-OH-THC	4,73	ESI -	329,2>311,2	40	18	329,2>173,1	40	30
11-OH-THC-d <sub>3</sub>	4,73	ESI -	332,2>270	40	25	332,2>314,3	40	45
CBD	6,13	ESI -	313,3>107,1	40	50	313,3>245	40	50

CBD-d <sub>3</sub>	6,13	ESI -	316.3>248.3	40	50	316,3>231,9	40	30
--------------------	------	-------	-------------	----	----	-------------	----	----

Abbreviazioni: RT, Retention time; MRM, multiple reaction monitoring.; CV, cone voltage; CE, collision energy; IS, internal standard.

#### **2.2.4. Validazione del metodo**

Il metodo sviluppato è stato completamente validato in matrice cheratinica in accordo con i più recenti criteri internazionali di validazione della tossicologia analitica e forense.<sup>39-42</sup>

I punti di calibrazione sono compresi tra il limite di quantificazione (LLOQ) e 5 ng/mg per il THC, CBD, 11-OH-THC, 7-OH-CBD e 7-COOH-CBD; e tra il LLOQ e 1 ng/mg per il THC-COOH, 6- $\alpha$ -OH-CBD e 6- $\beta$ -OH-CBD.

Linearità, sensibilità (limite di rilevazione (LOD) e LOQ), precisione, accuratezza e carryover sono stati calcolati iniettando cinque diverse repliche dei punti di calibrazione (0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2,5, 5 ng/mg per THC e CBD, 11-OH-THC, 7-OH-CBD e 7-COOH-CBD, e 0,0002, 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1 e 1 ng/mg per THC-COOH, 6- $\alpha$ -OH-CBD e 6- $\beta$ -OH-CBD) e cinque diverse repliche dei controlli di qualità (QC) alle seguenti concentrazioni:

basso QC = 0,15, medio QC = 1,5 e alto QC = 4 ng/mg per THC, CBD 11-OH-THC, 7-OH-CBD e 7-COOH-CBD; basso QC = 0,0006, medio QC = 0,04 a alto QC = 0,8 ng/mg per tutti gli altri metaboliti per tre giorni consecutivi.

In accordo con i criteri internazionali, per calcolare LOD e LLOQ sono stati utilizzati cinque replicati di capelli bianchi.<sup>39-42</sup> La deviazione standard (DS) è stata utilizzata per determinare il limite di rilevabilità (LOD = 3 DS) e il limite di quantificazione (LLOQ = 10 DS). Per essere accettato, il LLOQ calcolato doveva mostrare precisione e accuratezza entro il 20% della relativa SD e stessa cosa vale per l'errore relativo. La stabilità a breve termine (0, 1, 2, 4, 24 e 48 h) e quella a medio termine (1 mese) sono state valutate utilizzando cinque diverse aliquote di QC conservate a temperatura ambiente.

Le valutazioni di soppressione/aumento ionico dovuto all'effetto matrice (ME), recupero estrattivo ed efficienza del processo di estrazione (PE) sono state effettuate mediante il disegno sperimentale proposto da Matuszewski et al.<sup>39</sup>

#### ***2.2.5. Campioni biologici umani***

I campioni analizzati derivano da 20 soggetti randomizzati a cui vengono somministrati preparazioni galeniche dalla Farmacia Clinica dell'Ospedale Geriatrico INRCA di Ancona e/o sono in cura presso l'Ambulatorio di Medicina del Dolore dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Ospedali Riuniti di Ancona. Ai pazienti è stato fornito il modulo di consenso informato della valenza delle analisi e del loro significato. I campioni sono stati prelevati dalla regione occipitale della testa dopo che sono state raccolte tutte le informazioni utili quali: inizio della terapia, tipologia di preparazione galenica assunta, data

del prelievo ed eventuali patologie. I campioni di capelli sono conservati a temperatura ambiente fino al momento dell'analisi.

**Tabella 4:** Campioni di capelli dall'INRCA e dall'ospedale Riuniti di Ancona

<b>CODICE</b>	<b>VARIETA' DI CANNABIS</b>	<b>DATA PRELIEVO</b>	<b>DURATA TERAPIA</b>	<b>PATOLOGA</b>	<b>LNGHEZZA CAPELLI</b>	<b>LUNGHEZZA ANALIZZATA</b>
<b>DP040221</b>	BETROLITE + FM2	30\03\2021	1 mese	Fibromialgia, adenoma ipofisario, sensibilità chimica multipla	4 cm	1 cm
<b>AR51020</b>	FM2	08\04\2021	5 mesi	fibromialgia	10 cm	4 cm
<b>FEVA87</b>	FM2 + PEDANIOS	19\04\2021	2 anni		2 cm	2 cm
<b>LP68</b>	FM2	26\05\2021	1 anno	fibromialgia	3 cm	3 cm
<b>150380</b>	FM2	27\05\2021	2 mesi	fibromialgia	5 cm	2 cm
<b>UN91</b>	FM2	7\06\2021	2 settimane	fibromialgia	11 cm	1 cm
<b>PL68</b>	FM2	29\06\2021	6 mesi	reumatismi	3 cm	3 cm
<b>PQ01</b>	FM2	30\06\2021	1 anno	fibromialgia	12 cm	12 cm
<b>RM21</b>	FM2	3\07\2021	2 anni	reumatismi	3 cm	3 cm
<b>HPL1</b>	BEDROLITE	21\05\2021	3 mesi	Cervicalgia cronica	7 cm	2.5 cm
<b>HPL2</b>	BEDROLITE	21\05\2021	6 mesi	Rachialgia cronica	6 cm	6 cm
<b>HPL3</b>	BEDIOL	28\05\2021	6 anni e 8 mesi	Artirrite polidistr sieronegativo	11 cm	11 cm
<b>HPL4</b>	BEDROLITE	31\05\2021	2 anni e 6 mesi	Dolore miofasciale diffuso	7.5 cm	7.5 cm
<b>HPL5</b>	BEDIOL	15\06\2021	11 mesi	dolore rachide in tetraplegico	9 cm	9 cm
<b>HPL6</b>	FM2	19\07\2021	9 mesi	Dolore miofasciale diffuso	5 cm	5 cm

<b>HPL7</b>	FM2	26\07\2021	2 anni e 5 mesi	Nevragia post herpetica	4 cm	4 cm
<b>HPL8</b>	BEDROLITE	27\07\2021	2 anni e 8 mesi	Dolore miofasciale diffuso	3 cm	3 cm
<b>HPL9</b>	BEDROLITE	27\07\2021	7 mesi	Lombosciatalgia cronica in FBSS	5.5 cm	5.5 cm
<b>HPL10</b>	FM2	5\08\2021	2 anni e 8 mesi	fibromialgia	6 cm	6 cm
<b>HPL11</b>	BEDROLITE	5\08\2021	10 mesi	Cervicobrachialgia subacuta	17 cm	8 cm
<b>HPL12</b>	BEDROLITE	12\08\2021	6 mesi	Cervicobrachialgia bilaterale subacuta	9 cm	5 cm
<b>HPL13</b>	BEDROLITE	14\08\2021	8 mesi	Lombosciatalgia subacuta	6 cm	6 cm
<b>HPL14</b>	BEDIOL	19\08\2021	3 mesi	fibromialgia	10 cm	4 cm
<b>HPL15</b>	BEDIOL	19\08\2021	2 settimane	Dolore miofasciale diffuso	4.5 cm	1 cm
<b>HPL16</b>	BEDIOL	2\09\2021	1 anno e 9 mesi	Lomboscitalgia cronica	4 cm	4 cm

## Capitolo terzo

### RISULTATI

#### 3.1. Validazione

Nell'arco di cinque giorni il metodo è stato completamente validato in campioni di capelli per gli analiti presi in esame.<sup>39-42</sup>

Questo si può vedere nelle tabelle 5 e 6 riportate di seguito.

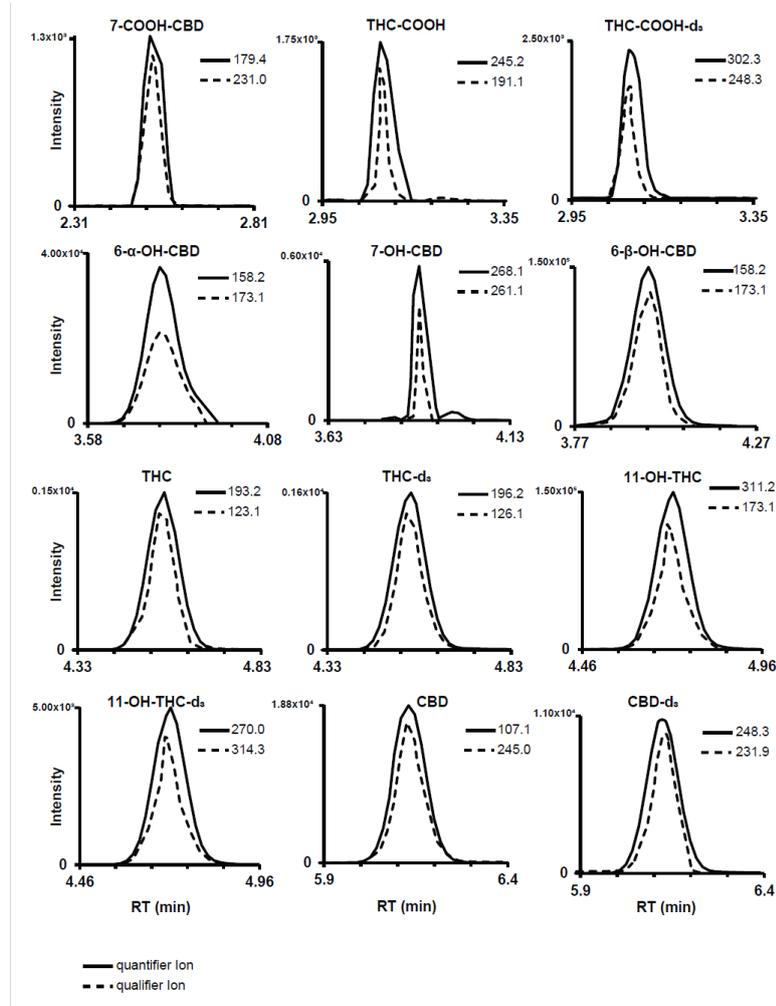
**Tabella 5** Valori di linearità, limite inferiore di rilevabilità (LLOD) e limite inferiore di quantificazione (LLOQ) per gli analiti presi in esame nei campioni di capelli.

<b>Analiti</b>	<b>Equazione lineare</b>	<b>Coefficiente di correlazione (r<sup>2</sup>)</b>	<b>LLOD (ng/mg)</b>	<b>LLOQ (ng/mg)</b>	<b>Test di Mandel</b>	<b>p-value</b>
<b>THC</b>	$y = 0.0968x - 0.3653$	$0.997 \pm 0.0421$	0,01	0,05	3,8426	0,9985
<b>CBD</b>	$y = 0.8112x - 0.0173$	$0.998 \pm 0.017$	0,01	0,05	9,7184	1,00
<b>6-<math>\alpha</math>-OH-CBD</b>	$y = 0.2143x + 0.2074$	$0.992 \pm 0.207$	0,00006	0,0002	2,4948	0,9798
<b>6-<math>\beta</math>-OH-CBD</b>	$y = 0.4566x + 0.6227$	$0.992 \pm 0.627$	0,00006	0,0002	2,8634	0,9905
<b>7-OH-CBD</b>	$y = 0.0677x - 0.1346$	$0.995 \pm 0.134$	0,01	0,05	1,0645	0,5556
<b>7-COOH-CBD</b>	$y = 0.0904x - 0.5818$	$0.982 \pm 0.581$	0,01	0,05	2,7630	0,9884
<b>11-OH-THC</b>	$y = 0.0438x - 0.1655$	$0.980 \pm 0.136$	0,01	0,05	1,3316	0,9999
<b>11-COOH-THC</b>	$y = 0.0068x - 0.0122$	$0.997 \pm 0.013$	0,00006	0,0002	0,9772	0,4776

**Tabella 6** Valori di accuratezza, precisione, recupero ed effetto matrice per gli analiti presi in esame nei campioni di capelli.

Analiti	Concentrazioni QC (ng/mg)			Accuratezza (%)			Precisione intra-day (% CV)			Precisione inter-day (% CV)			Recupero (%)			Effetto matrice (%)		
	Basso QC	Medio QC	Alto QC	Basso QC	Medio QC	Alto QC	Basso QC	Medio QC	Alto QC	Basso QC	Medio QC	Alto QC	Basso QC	Medio QC	Alto QC	Basso QC	Medio QC	Alto QC
<b>THC</b>	0,15	1,5	4	12,6	5,6	8,3	1,2	7,8	2,1	79	7,6	5,6	87,2	87,1	88,5	87,7	96,9	94,1
<b>CBD</b>	0,15	1,5	4	12,6	5,6	8,3	1,2	7,8	2,1	7,9	7,6	5,6	87,2	87,1	88,5	87,7	96,9	94,1
<b>6-<math>\alpha</math>-OH-CBD</b>	0,0006	0,04	0,8	4,6	6,8	7,5	5,5	4,4	0,8	6,6	4,0	4,2	89,1	96,6	95,8	93,1	98,5	97,4
<b>6-<math>\beta</math>-OH-CBD</b>	0,0006	0,04	0,8	2,6	4,2	8,0	4,3	1,6	3,6	3,1	5,0	5,0	96,6	97,0	98,6	86,3	95,7	93,4
<b>7-OH-CBD</b>	0,15	1,5	4	3,4	1,1	4,7	4,1	1,2	4,5	4,2	2,2	3,4	82,5	95,8	96,9	83,2	98,3	97,7
<b>7-COOH-CBD</b>	0,15	1,5	4	12,3	7,0	1,5	1,5	1,8	0,5	4,4	1,6	0,8	93,9	92,2	93,5	75,1	93,6	93,1
<b>11-OH-THC</b>	0,15	1,5	4	2,7	9,1	2,3	2,1	1,5	3,3	1,6	2,4	2,6	93,8	95,3	81,1	96,1	94,9	94,9
<b>THC-COOH</b>	0,0006	0,04	0,8	3,6	3,8	1,6	1,6	4,5	1,5	2,1	4,2	1,2	78,4	79,8	89,6	79,6	76,8	95,0

Nella figura 7 è mostrato il cromatogramma degli ioni estratti da capelli bianchi con l'aggiunta degli analiti a LLOQ. Ai tempi di ritenzione degli analiti non sono state osservate interferenze o *carryover*.



**Figura 5** Cromatogramma (EIC) di un campione di capelli addizionato con gli analiti in esame alle seguenti concentrazioni: al limite inferiore di quantificazione (LLOQ). LLOQ= 0.05 ng/mg per THC, CBD, 7-OH-CBD, 7-COOH-CBD, 11-OH-CBD. LLOQ= 0.0002 ng/mg per 6-α-OH-CB, 6-β-OH-CBD, 11-COOH-THC.

La linearità del metodo è stata verificata eseguendo il test di Mandel, inoltre il coefficiente di correlazione ( $r^2$ ) è stato maggiore di 0,98. In accordo con i

criteri internazionali per lo sviluppo e validazione di metodi analitici, l'accuratezza e la precisione hanno valori entro  $\pm 20\%$  del LLOQ ed entro  $\pm 15\%$  in tutti QC.

I risultati hanno mostrato un coefficiente di variazione (CV) inferiore al 5% con un errore relativo medio (RE) entro il 15% per le concentrazioni dei campioni QC testati. L'effetto matrice è sempre stato inferiore al 20%. Non è stata osservata alcuna degradazione rilevante per i campioni QC conservati a temperatura ambiente per un massimo di un mese, con concentrazioni sempre entro il 15 % del target per tutti i composti in esame.

### 3.2. *Campioni reali*

I risultati ottenuti sono stati suddivisi in tabelle differenti sulla base delle diverse formulazioni di preparazioni galeniche assunte dai pazienti.

**Tabella 7** Formulazione FM2 (decocto), concentrazione rilevata per CBD, THC e i metaboliti nei pazienti.

CODICE	CBD					THC		
	CBD (ng/mg)	7- COOH- CBD (ng/mg)	7-OH- CBD (ng/mg)	6- $\alpha$ - OH- CBD (ng/mg)	6- $\beta$ - OH- CBD (ng/mg)	THC (ng/mg)	11-OH- THC (ng/mg)	THC- COOH (ng/mg)
<b>HPL6</b>	0,636	0,254	0,003	0,080	0,010	0,005	0,061	0,012
<b>HPL7</b>	0,724	0,382	0,150	0,740	0,040	0,680	0,062	0,019
<b>HPL10</b>	0,753	0,303	3,550	0,234	0,030	4,150	0,062	5,417
<b>AR51020</b>	0,741	0,170	0,038	0,050	0,050	0,680	0,063	0,012
<b>LP68</b>	2,930	0,362	0,107	0,650	0,020	2,470	0,062	0,128
<b>150380</b>	0,081	0,106	0,300	0,920	0,060	2,330	0,063	0,015
<b>RM21</b>	0,639	0,345	2,600	0,090	0,002	0,740	0,062	0,009
<b>UN91</b>	0,101	0,199	0,400	0,002	N.R.	1,550	0,062	0,015
<b>PL68</b>	0,796	0,569	0,035	N.R.	0,007	2,660	0,062	0,021

<b>PQ01</b>	0,735	0,269	2,560	0,700	N.R.	0,440	0,062	0,014
-------------	-------	-------	-------	-------	------	-------	-------	-------

I soggetti di questa prima tabella sono trattati con FM2 con THC al 5,8% e CBD all' 8,1%. L'intervallo di concentrazione del CBD in questi campioni è tra 0,101 e 2,93 ng/mg. Si può notare come per i rispettivi metaboliti ci siano concentrazioni tra 0,106 e 0,569 ng/mg e tra 0,003 e 3,550 ng/mg rispettivamente per 7-COOH-CBD e 7-OH-CBD. Possiamo notare invece come ci sia un unico campione che è risultato negativo per il 6- $\alpha$ -OH-CBD che presenta un range di concentrazione tra 0,002 e 0,920 ng/mg. Inoltre, due campioni diversi sono risultati negativi per il 6- $\beta$ -OH-CBD che risulta essere anche il metabolita del CBD meno abbondante con una concentrazione che oscilla tra 0,002 e 0,06 ng/mg. Il THC presenta una quantità tra 0,005 e 4,150 ng/mg. Il metabolita del THC più abbondante in questo caso è il THC-COOH con una concentrazione tra 0,009 e 5,417 ng/mg. L'11-OH-THC è molto stabile come concentrazioni, infatti, varia tra 0,061 e 0,063 ng/mg.

**Tabella 8** Formulazione BEDROLITE (granulare), concentrazione rilevata per CBD, THC e i metaboliti nei pazienti.

CODICE	CBD					THC		
	CBD (ng/mg)	7-COOH-CBD (ng/mg)	7-OH-CBD (ng/mg)	6- $\alpha$ -OH-CBD (ng/mg)	6- $\beta$ -OH-CBD (ng/mg)	THC (ng/mg)	11-OH-THC (ng/mg)	THC-COOH (ng/mg)
<b>HPL1</b>	0,78	0,250	0,660	0,002	0,001	N.R.	N.R.	N.R.
<b>HPL2</b>	0,666	0,163	0,850	0,050	0,020	N.R.	N.R.	N.R.
<b>HPL4</b>	0,771	0,325	0,052	0,024	0,040	N.R.	N.R.	N.R.
<b>HPL8</b>	0,860	0,544	0,200	0,030	0,001	N.R.	N.R.	N.R.
<b>HPL9</b>	1,076	0,228	0,060	0,660	0,054	N.R.	N.R.	N.R.

<b>HPL11</b>	0,628	0,280	0,500	0,045	0,012	N.R.	N.R.	N.R.
<b>HPL12</b>	1,118	3,269	0,027	0,870	0,007	N.R.	N.R.	N.R.
<b>HPL13</b>	0,674	0,116	0,280	0,022	0,016	N.R.	N.R.	N.R.
<b>DP040221</b>	0,928	0,261	0,220	0,890	0,009	N.R.	N.R.	N.R.

Questo secondo gruppo di campioni rappresenta consumatori di Bedrolite con CBD 9% e THC <1%. Questi sono positivi a CBD compresi tutti i metaboliti. Il CBD oscilla tra 0,628 e 1,118 ng/mg. Il suo metabolita più abbondante in questo caso è 7-COOH-CBD con una concentrazione tra 0,116 e 3,269 ng/mg. Di seguito 7-OH-CBD, 6- $\alpha$ -OH-CBD e 6- $\beta$ -OH-CBD rispettivamente con quantità tra 0,027 e 0,850 ng/mg, 0,002 e 0,890 ng/mg e 0,001 e 0,054 ng/mg. Il THC e i suoi metaboliti non sono stati rilevati vista la bassa concentrazione presente nella preparazione.

**Tabella 9** Formulazione BEDIOL (olio), concentrazione rilevata per CBD, THC e i metaboliti nei pazienti.

<b>CODICE</b>	<b>CBD</b>					<b>THC</b>		
	CBD (ng/mg)	7- COOH- CBD (ng/mg)	7-OH- CBD (ng/mg)	6- $\alpha$ - OH- CBD (ng/mg)	6- $\beta$ - OH- CBD (ng/mg)	THC (ng/mg)	11-OH- THC (ng/mg)	THC- COOH (ng/mg)
<b>HPL3</b>	0,634	0,193	0,410	0,650	0,005	0,550	0,061	0,016
<b>HPL5</b>	0,671	0,234	0,360	0,880	0,028	1,050	0,061	0,016
<b>HPL14</b>	1,609	0,840	4,630	0,048	0,030	2,770	0,154	1,546
<b>HPL15</b>	0,756	0,204	0,660	0,440	0,440	0,990	0,061	0,009
<b>HPL16</b>	0,851	1,692	3,400	0,540	0,540	0,840	0,061	0,012

Tutti i metaboliti sono stati rilevati in pazienti trattati con Bediol una varietà di *Cannabis sativa* con 6,3% di THC e 8% di CBD. Il CBD ha un range di concentrazione tra 0,634 e 1,609 ng/mg, il 7-COOH-CBD tra 0,193 e 1,692

ng/mg, il 7-OH-CBD tra 0,36 e 4,63 ng/mg, il 6- $\alpha$ -OH-CBD tra 0,048 e 0,88 ng/mg e per ultimo il 6- $\beta$ -OH-CBD tra 0,005 e 0,54 ng/mg. Come ci suggeriscono i dati il metabolita più abbondante del CBD è il 7-OH-CBD, seguito dal 7-COOH-CBD, 6- $\alpha$ -OH-CBD e 6- $\beta$ -OH-CBD. Per quanto riguarda il THC invece questo ha una concentrazione che oscilla tra 0,55 e 2,77 ng/mg. I suoi metaboliti invece vanno da 0,061 a 0,154 ng/mg e da 0,009 a 1,546 ng/mg rispettivamente per 11-OH-THC e THC-COOH. In questo caso il metabolita più abbondante del THC è il THC-COOH seguito dall'11-OH-THC.

**Tabella 10** Formulazione PEDANIOS (fumata), concentrazione rilevata per CBD, THC e i metaboliti nei pazienti.

CODICE	CBD					THC		
	CBD (ng/mg)	7- COOH- CBD (ng/mg)	7-OH- CBD (ng/mg)	6- $\alpha$ - OH- CBD (ng/mg)	6- $\beta$ - OH- CBD (ng/mg)	THC (ng/mg)	11-OH- THC (ng/mg)	THC- COOH (ng/mg)
<b>FEVA87</b>	0,0284	0,284	3,819	0,021	0,020	0,580	0,072	0,015

È presente un unico campione di consumatore di Pedanios con 22% di THC e <1% di CBD. Positivo per tutti i metaboliti, nonostante la concentrazione di CBD sia bassa abbiamo una concentrazione di 3,819 ng/mg del 7-OH-CBD, un suo metabolita. I valori degli altri metaboliti sono riportati in tabella.

## Capitolo quarto

### DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

Nella tossicologia clinica e forense l'analisi del capello ha acquisito rilevanza per il monitoraggio della terapia con cannabis medica. Questo a causa della sua capacità di accumulare i cannabinoidi dopo l'assunzione in modo permanente, senza ulteriore metabolismo e senza che si noti degradazione.

Questo permette una più ampia finestra temporale di rilevazione dei composti, mesi e persino anni, rispetto alle matrici classiche. Ad oggi nella letteratura scientifica ci sono solo pochi studi di metodi analitici su matrice cheratinica ma nessuno di questi quantifica contemporaneamente THC, CBD e i loro rispettivi metaboliti<sup>44-68</sup>. Solo pochi metodi sono attualmente disponibili per la quantificazione di questi ultimi composti ma nelle matrici biologiche convenzionali ovvero sangue, siero, plasma e urina<sup>67-73</sup>.

Per la prima volta, è stato sviluppato e completamente convalidato un metodo unico UHPLC-MS/MS per rilevare e quantificare THC, 11-OH-THC, THC-COOH insieme al CBD, 6- $\alpha$ -OH-CBD, 6- $\beta$ -OH-CBD, 7-OH-CBD e 7-COOH-CBD in campioni di capelli di pazienti a cui sono state somministrate diverse preparazioni di cannabis medica. Il metodo qui riportato è abbastanza veloce, infatti prevede una separazione cromatografica di 10 minuti, e la sensibilità è maggiore rispetto ai test presentati in passato.<sup>45-60</sup>

Il principale vantaggio di questo metodo include sia la modesta quantità di materiale biologico per l'analisi, ovvero 20 mg di capelli, che un trattamento del campione semplice e veloce (1 ora di idrolisi con il reagente M3) che permette di analizzare un numero elevato di campioni (circa 100-120 al giorno). Questo metodo è stato impiegato per l'analisi di 25 campioni reali appartenenti a soggetti in trattamento con preparazioni galeniche a base di *Cannabis sativa* L.

Nelle varietà FM2, Bediol e Pedanios il metabolita del CBD più abbondante è risultato essere il 7-OH-CBD. Tra di esse la sua concentrazione varia da 0.003 a 3.819 ng/mg. Diversamente, nella Bedrolite è più presente il 7-COOH-CBD. In tutte e quattro le preparazioni galeniche invece quello meno rilevato è il 6-β-OH-CBD, come in accordo con altri studi.<sup>74,75</sup>

Riguardo ai metaboliti del THC il più abbondante è l'11-OH-THC nei pazienti con prescrizione di Pedanios mentre THC-COOH con Bediol e FM2. È anche vero che se andassimo ad escludere i campioni HPL10 e HPL14, che portano all'innalzamento della media della concentrazione del THC-COOH, rispettivamente nelle due preparazioni sopra citate il metabolita più presente sarebbe l'11-OH-THC indipendentemente dal tipo di varietà somministrata. Questo comunque risulta essere molto stabile nelle sue concentrazioni rispetto agli altri composti, poiché ha una variabilità di solo ±0.010 ng/mg. Ovviamente

per tutti i composti vi è una certa variabilità interindividuale che dipende sia dalla varietà ma anche dalla metodologia di somministrazione, dal metabolismo e dalla durata della terapia.

Questo studio rappresenta un approccio preliminare per valutare la fattibilità del test dei capelli per valutare la conformità a lungo termine al trattamento con cannabis medica risulta chiaro come una successiva analisi segmentale della matrice cheratinica permetta, in una sola seduta, ogni 4-6 mesi di verificare nel tempo l'adesione alla terapia, pur con tutti i limiti legati alla fase di crescita e quiescenza del capello. Va anche detto che in Italia l'utilizzo di questa terapia a base di cannabis per il dolore cronico è prescritta in alternativa ai farmaci tradizionali solo da pochi anni.

Un limite di questo metodo sviluppato è stata l'esclusione dei precursori acidi di THC e CBD tra gli analiti esaminati: l'acido tetraidrocannabinolico A e l'acido cannabidiolico. Questi due composti avrebbero dovuto essere presenti nelle preparazioni somministrate, ma purtroppo la loro presenza e concentrazione non sono state riportate nelle etichette delle preparazioni, né sono state quantificate insieme agli altri principi farmacologicamente attivi nei prodotti somministrati.<sup>76,77</sup>

In conclusione, solo con tale metodica si può ottenere un dato analitico che permetta di verificare mese per mese l'adesione alla terapia ed escludere

l'adulterazione nello stesso tempo; si potrà comparare capelli provenienti da consumatori d'abuso con quelli ad uso medico per discriminare queste differenti popolazioni ma anche preparazioni galeniche con differente quantità di THC e CBD.

## BIBLIOGRAFIA

1. Pisanti S, Bifulco M. Medical Cannabis: A plurimillennial history of an evergreen. *J Cell Physiol* 2019 Jun; 234(6):8342-8351. doi:10.1002/jcp.27725.
2. Chayasirisobhon S. Cannabis and Neuropsychiatric Disorders: An Updated Review. *Acta Neurol Taiwan*. 2019 Jun 15;28(2):27-39.
3. Romero-Sandoval E.A., Kolano A.L., Abigail Alvarado-Vázquez P.: Cannabis and Cannabinoids for Chronic Pain. *Curr Rheumatol Rep*. 2017 Oct 5;19(11):67. doi: 10.1007/s11926-017-0693-1.
4. Brunetti P, Lo Faro A.F, Pirani F, Berretta P, Pacifici R, Pichini S, Busardò F.P. Pharmacology and legal status of cannabidiol. *Ann Ist Super Sanita*. Jul-Sep 2020;56(3):285-291. doi: 10.4415/ANN\_20\_03\_06.
5. Ujváry I, Hanuš L. Human Metabolites of Cannabidiol: A Review on Their Formation, Biological Activity, and Relevance in Therapy. *Cannabis Cannabinoid Res*. 2016 Mar 1;1(1):90-101. doi: 10.1089/can.2015.0012.
7. Grotenhermen F. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. *Clin Pharmacokinet*. 2003;42(4):327-60. doi: 10.2165/00003088-200342040-00003.
8. Matsuda L.A, Lolait S. J, Brownstein M. J, Young A. C, Bonner T. I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. 1990 Aug 9;346(6284):561-4. doi: 10.1038/346561a0.
9. Marc-Antoine Crocq. History of cannabis and the endocannabinoid system *Dialogues Clin Neurosci*. 2020 Sep;22(3):223-228. doi: 10.31887/DCNS.2020.22.3/mcrocq.
10. Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski N.E, Schatz A.R, Gopher A, Almog S, Martin B.R, Compton D. R, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*. 1995 Jun 29;50(1):83-90. doi: 10.1016/0006-2952(95)00109-d.
11. Ruhul Amin MD, Declan W. A. Pharmacology of Medical Cannabis *Adv Exp Med Bio*. 2019;1162:151-165. doi: 10.1007/978-3-030-21737-2\_8.

12. Ebbert J. O, Scharf E. L, Hurt R. T. Medical Cannabis. *Mayo Clin Proc.* 2018 Dec;93(12):1842-1847. doi: 10.1016/j.mayocp.2018.09.005.
13. Laprairie R. B, Bagher A. M, Kelly M. E. M, Denovan-Wright E. M. Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB1 receptor. *Br J Pharmacol.* 2015 Oct;172(20):4790-805. doi: 10.1111/bph.13250.
14. Morales P, Hust D. P, Reggio P. H. Molecular Targets of the Phytocannabinoids: A Complex Picture. *Prog Chem Org Nat Prod.* 2017;103:103-131. doi: 10.1007/978-3-319-45541-9\_4.
15. Russo E. B, Burnett A, Hall B, Parker K. K. Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT1a receptors. *Neurochem Res.* 2005 Aug;30(8):1037-43. doi: 10.1007/s11064-005-6978-1.
16. Carliner H, Brown Q. L, Sarvet A. L, Hasin D. S. Cannabis use, attitudes, and legal status in the U.S.: A review. *Prev Med.* 2017 Nov;104:13-23. doi: 10.1016/j.ypmed.2017.07.008.
17. United States Drug Enforcement Administration. Drug scheduling. Disponibile: <https://www.dea.gov/drug-information/drug-scheduling>
18. Brunetti P, Pichini S, Pacifici R, Busardò F. P, A. Herbal Preparations of Medical Cannabis: A Vademecum for Prescribing Doctors. *Medicina (Kaunas).* 2020 May 15;56(5):237. doi: 10.3390/medicina56050237.
19. Bifulco M, Pisanti S. Medicinal use of cannabis in Europe: the fact that more countries legalize the medicinal use of cannabis should not become an argument for unfettered and uncontrolled use. *EMBO Rep.* 2015 Feb;16(2):130-2. doi: 10.15252/embr.201439742.
20. Brunetti P, Lo Faro A. F, Pirani F, Beretta P, Pacifici R, Pichini S, Busardò F. P. Pharmacology and legal status of cannabidiol. *Ann Ist Super Sanita.* Jul-Sep 2020;56(3):285-291. doi: 10.4415/ANN\_20\_03\_06.
21. Highlights of prescribing information. Epidiolex. Disponibile: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2020/210365s005s006s007lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2020/210365s005s006s007lbl.pdf)
22. Highlights of prescribing information. Marinol. Disponibile: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2017/018651s029lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/018651s029lbl.pdf)

23. Highlights of prescribing information. Syndros. Disponibile: <https://syndros.com/wp-content/uploads/2021/04/Syndros-Package-Insert-2021-1.pdf>
24. Highlights of prescribing information. Cesamet. Disponibile: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2006/018677s011lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2006/018677s011lbl.pdf)
25. Highlights of prescribing information. Canemes. Disponibile: <https://medikamio.com/downloads/de-at/drugs/canemes-1-mg-kapseln.pdf>
26. Associazione Italiana Sclerosi Multipla (AISM). Disponibile: [https://allegati.aism.it/manager/UploadFile/2/20130904\\_460\\_docsativex.pdf](https://allegati.aism.it/manager/UploadFile/2/20130904_460_docsativex.pdf)
27. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. Medical use of cannabis and cannabinoids. Disponibile: [https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/10171/20185584\\_TD0618186ENN\\_PDF.pdf](https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/10171/20185584_TD0618186ENN_PDF.pdf)
28. Ministero della salute. La produzione nazionale di sostanze attive di origine vegetale a base di Cannabis. Disponibile: [https://www.salute.gov.it/portale/temi/p2\\_6.jsp?lingua=italiano&id=4588&area=sostanzeStupefacenti&menu=organismo](https://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_6.jsp?lingua=italiano&id=4588&area=sostanzeStupefacenti&menu=organismo)
29. Poyatos L, Pérez-Acevedo A. P, Papaseit E, Pérez-Mañá C, Martín S, Hlandun O, Siles A, Torrens M, Busardò F. P, Farré M. Oral Administration of Cannabis and  $\Delta$ -9-tetrahydrocannabinol (THC) Preparations: A Systematic Review. *Medicina (Kaunas)*. 2020 Jun 23;56(6):309. doi:10.3390/medicina56060309.
30. Arzimanoglou A, Brandl U, Cross J. H, Gil-Nagel A, Lagae L, Landmark C. J, Specchio N, Nabbout R, Thiele E. A, Gubbay O, The Cannabinoids International Experts Panel, Collaborators. Epilepsy and cannabidiol: a guide to treatment. *Epileptic Disord*. 2020 Feb 1;22(1):1-14. doi: 10.1684/epd.2020.1141.
31. Elsaid S, Kloiber S, Le Foll B. Effects of cannabidiol (CBD) in neuropsychiatric disorders: A review of pre-clinical and clinical findings. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2019;167:25-75. doi:10.1016/bs.pmbts.2019.06.005.

32. Crippa J. A, Guimarães F. S, Campos A. C, Zuardi A. W. Translational Investigation of the Therapeutic Potential of Cannabidiol (CBD): Toward a New Age. *Front Immunol.* 2018 Sep 21;9:2009. doi: 10.3389/fimmu.2018.02009.
33. Campos A.C, Fogaça M. V, Sonogo A. B, Guimarães F. S. Cannabidiol, neuroprotection and neuropsychiatric disorders. *Pharmacol Res.* 2016 Oct;112:119-127. doi: 10.1016/j.phrs.2016.01.033.
34. Huestis M. A, Solimini R, Pichini S, Pacifici R, Carlier J, Busardò F. P. Cannabidiol Adverse Effects and Toxicity. *Curr Neuropharmacol.* 2019;17(10):974-989. doi: 10.2174/1570159X17666190603171901.
35. Hurd YL, Yoon M, Manini AF, et al. Early phase in the development of cannabidiol as a treatment for addiction: opioid relapse takes initial center stage. *Neurotherapeutics.* 2015;12(4):807–815. doi: 10.1007/s13311-015-0373-7.
36. Berger A. A, Keefe J, Winnick A, Gilbert E, Eskander J. P, Yazdi C, Kaye A. D, Viswanath O, Urtis I. Cannabis and cannabidiol (CBD) for the treatment of fibromyalgia. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2020 Sep;34(3):617-631. doi: 10.1016/j.bpa.2020.08.010.
37. Seltzer E. S, Watters A. K, MacKenzie Jr. D, Granat L. M, Zhang D. Cannabidiol (CBD) as a Promising Anti-Cancer Drug. *Cancers (Basel).* 2020 Oct 30;12(11):3203. doi: 10.3390/cancers12113203.
38. Hill K. P, Palastro M, D. Medical cannabis for the treatment of chronic pain and other disorders: misconceptions and facts. *Pol Arch Intern Med.* 2017 Nov 30;127(11):785-789. doi: 10.20452/pamw.4123.
39. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem.* 2003 Jul 1;75(13):3019-30. doi: 10.1021/ac020361s.
40. Scientific Working Group for Forensic Toxicology. Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) standard practices for method validation in forensic toxicology. *J Anal Toxicol* 2013, 37, 452-474.

41. Wille, S.M.R.; Coucke, W.; De Baere, T.; Peters, F.T. Update of Standard Practices for New Method Validation in Forensic Toxicology. *Curr Pharm Des* 2017, 23, 5442-5454.
42. Remane, D.; Wissenbach, D.K.; Peters, F.T. Recent advances of liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry in clinical and forensic toxicology - An update. *Clin Biochem.* 2016, 49,1051-1071.
43. Sánchez-González, J.; Salgueiro-Fernández, R.; Cabarcos, P.; Bermejo, A.M.; Bermejo-Barrera, P.; Moreda-Piñeiro, A. Cannabinoids assessment in plasma and urine by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry after molecularly imprinted polymer microsolid-phase extraction. *Anal Bioanal Chem* 2017, 409, 1207-1220.
44. Indorato, F.; Liberto, A.; Ledda, C.; Romano, G.; Barbera, N. The therapeutic use of cannabinoids: Forensic aspects. *Forensic Sci Int* 2016, 265, 200-203.
45. Yang, R.; Xie, W. Determination of cannabinoids in biological samples using a new solid phase micro-extraction membrane and liquid chromatography-mass spectrometry. *Forensic Sci Int* 2006, 162, 135-139.
46. Pigliasco, F.; Barco, S.; Dubios, S.; Marchese, F.; Striano, P.; Lomonaco, T.; Mattioli, F.; Tripoli G.; Cangemi, G. Cannabidiol Determination on Peripheral Capillary Blood Using a Microsampling Method and Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry with On-Line Sample Preparation. *Molecules* 2020, 25, 3608.
47. Pichini, S.; Mannocchi, G.; Gottardi, M.; Perez-Acevedo, A.P.; Poyatos, L.; Papaseit, E.; Pérez-Mañá, C.; Farré, M.; Pacifici, R.; Busardò, F.P. Fast and sensitive UHPLC-MS/MS analysis of cannabinoids and their acid precursor in pharmaceutical preparations of medical cannabis and their metabolites in conventional and non-conventional matrices of treated individual. *Talanta* 2020, 209, 120537
48. Pérez-Acevedo, A.P.; Pacifici, R.; Mannocchi, G.; Gottardi, M.; Poyatos, L.; Papaseit, E.; Pérez-Mañá, C.; Martin, S.; Busardò, F.P.; Pichini, S.; Farré, M. Disposition of cannabinoids and their metabolites in serum, oral fluid, sweat patch and urine from healthy individuals treated with pharmaceutical preparations of medical cannabis. *Phytother Res* 2021, 35, 1646-1657.

49. Uhl, M.; Sachs, H. Cannabinoids in hair: strategy to prove marijuana/hashish consumption. *Forensic Sci Int* 2004, 145, 143-147.
50. Auwärter, V.; Wohlfarth, A.; Traber, J.; Thieme, D.; Weinmann, W. Hair analysis for Delta9-tetrahydrocannabinolic acid A--new insights into the mechanism of drug incorporation of cannabinoids into hair. *Forensic Sci Int* 2010, 196, 10-13.
51. Cobo-Golpe, M.; de-Castro-Ríos, A.; Cruz, A.; López-Rivadulla, M.; Lendoiro, E. Determination and distribution of cannabinoids in nail and hair samples. *J Anal Toxicol* 2020, bkaa164. Epub ahead of print.
52. Kieliba, T.; Lerch, O.; Andresen-Streichert, H.; Rothschild, M.A.; Beike, J. Simultaneous quantification of THC-COOH, OH-THC, and further cannabinoids in human hair by gas chromatography-tandem mass spectrometry with electron ionization applying automated sample preparation. *Drug Test Anal* 2019, 2, 267-278.
53. Roth, N.; Moosmann, B.; Auwärter, V. Development and validation of an LC-MS/MS method for quantification of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinolic acid A (THCA-A), THC, CBN and CBD in hair. *J Mass Spectrom* 2013, 48, 227-233.
54. Angeli, I.; Casati, S.; Ravelli, A.; Minoli, M.; Orioli, M. A novel single-step GC-MS/MS method for cannabinoids and 11-OH-THC metabolite analysis in hair. *J Pharm Biomed Anal* 2018, 155, 1-6.
55. Shin, Y.; Kim, J.Y.; Cheong, J.C.; Kim, J.H.; Kim, J.H.; Lee, H.S. Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry for the determination of three cannabinoids, two (-)-trans- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol metabolites, and six amphetamine-type stimulants in human hair. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2020, 1149, 122-157.
56. Salomone, A.; Gerace, E.; D'Urso, F.; Di Corcia, D.; Vincenti, M. Simultaneous analysis of several synthetic cannabinoids, THC, CBD and CBN, in hair by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Method validation and application to real samples. *J Mass Spectrom* 2012, 47, 604-610.
57. Heintl, S.; Lerch, O.; Erdmann, F. Automated GC-MS Determination of  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol, Cannabinol and Cannabidiol in Hair. *J Anal Toxicol* 2016, 40, 498-503.
58. Beasley, E.; Francese, S.; Bassindale, T. Detection and Mapping of Cannabinoids in Single Hair Samples through Rapid Derivatization and

Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. *Anal Chem* 2016, 88, 10328-10334.

59. Hill, V.A.; Schaffer, M.I.; Paulsen, R.B.; Stowe, G.N. The Cannabinoids Tetrahydrocannabinol, Cannabinol, Cannabidiol, Tetrahydrocannabivarin, and 11-nor-9-carboxy- $\Delta^9$ -THC in Hair. *J Anal Toxicol* 2021, bkab068. Epub ahead of print.

60. Gambelunghe, C.; Fucci, N.; Aroni, K.; Bacci, M.; Marcelli, A.; Rossi, R. Cannabis Use Surveillance by Sweat Analysis. *Ther Drug Monit* 2016, 38, 634-639.

61. Uematsu, T. Therapeutic drug monitoring in hair samples. Principles and practice. *Clin Pharmacokinet*, 1993, 25, 83-87.

62. Beumer, J.H.; Bosman I.J.; Maes, R.A. Hair as a biological specimen for therapeutic drug monitoring. *Int J Clin Pract* 2001, 55, 353-357.

63. Marchei, E.; Muñoz, J.A.; García-Algar, O.; Pellegrini.; Vall, O.; Zuccaro, P.; Pichini, S. Development and validation of a liquid chromatography-mass spectrometry assay for hair analysis of methylphenidate. *Forensic Sci Int* 2008, 176, 42-46

64. Papaseit, E.; Marchei, E.; Mortali, C.; Aznar, G.; Garcia-Algar, O.; Farré, M.; Pacifici, R.; Pichini, S. Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for hair analysis of atomoxetine and its metabolites: Application in clinical practice. *Forensic Sci Int* 2012, 218, 62-67

65. Avataneo, V.; D'Avolio, A.; Cusato, J.; Cantù, M.; De Nicolò, A. LC-MS application for therapeutic drug monitoring in alternative matrices. *J Pharm Biomed Anal* 2019, 166, 40-51.

66. Sun, X.; Wang, L.; Yang, F.; Ren, J.; Jiang, P.; Liu, H.; Li, H.; Li, C.; Zhang, C. Correlation of hair risperidone concentration and serum level among patients with schizophrenia. *Gen Psychiatr* 2019, 32, e100042

67. 68. Grauwiler, S.B.; Scholer, A.; Drewe, J. Development of a LC/MS/MS method for the analysis of cannabinoids in human EDTA-plasma and urine after small doses of Cannabis sativa extracts. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007, 850, 515-522.

68. Pichini, S.; Malaca, S.; Gottardi, M.; Pérez-Acevedo, A.P.; Papaseit, E.; Perez-Maña, C.; Farré, M.; Pacifici, R.; Tagliabracchi, A.; Mannocchi, G.; Busardò, F.P. UHPLC-MS/MS analysis of cannabidiol metabolites in serum

and urine samples. Application to an individual treated with medical cannabis. *Talanta* 2021, 223, 1217-1272.

69. Gherzi, M.; Milano, G.; Fucile, C.; Calevo, M.G.; Mancardi, M.M.; Nobili, L.; Astuni, P.; Marini, V.; Barco, S.; Cangemi, G.; Manfredini, L.; Mattioli, F.; De Grandis, E. Safety and pharmacokinetics of medical cannabis preparation in a monocentric series of young patients with drug resistant epilepsy. *Complement Ther Med*. 2020, 51,102402.

70. Hädener, M.; Gelmi, T.J.; Martin-Fabritius, M.; Weinmann, W.; Pfäffli, M. Cannabinoid concentrations in confiscated cannabis samples and in whole blood and urine after smoking CBD-rich cannabis as a "tobacco substitute". *Int J Legal Med* 2019, 133, 821-832.

71. Meier, U.; Dussy, F.; Scheurer, E.; Mercer-Chalmers-Bender, K.; Hangartner, S. Cannabinoid concentrations in blood and urine after smoking cannabidiol joints. *Forensic Sci Int* 2018, 2, 62-67.

72. Carlini, E.A.; Cunha, J.M. Hypnotic and antiepileptic effects of cannabidiol. *J Clin Pharmacol* 1981, 21, 417S-427S.

73. Aizpurua-Olaizola, O.; Zarandona, I.; Ortiz, L.; Navarro, P.; Etxebarria N, Usobiaga A. Simultaneous quantification of major cannabinoids and metabolites in human urine and plasma by HPLC-MS/MS and enzyme-alkaline hydrolysis. *Drug Test Anal* 2017, 9, 626-633.

74. Malaca, S.; Gottardi, M.; Pigliasco, F.; Barco, S.; Cafaro, A.; Amadori, E.; Riva, A; Marcenaro, M.; Striano, P.; Cangemi, G.; Pacifici. R.; Pichini. S.; Busardò, F.P. UHPLC-MS/MS Analysis of Cannabidiol and Its Metabolites in Serum of Patients with Resistant Epilepsy Treated with CBD Formulations. *Pharmaceuticals (Basel)* 2021, 14, 630

75. Pichini, S.; Malaca, S.; Gottardi, M.; Pérez-Acevedo, A.P.; Papaseit, E.; Perez-Maña, C.; Farré, M.; Pacifici, R.; Tagliabracci, A.; Mannocchi, G.; Busardò, F.P. UHPLC-MS/MS analysis of cannabidiol metabolites in serum and urine samples. Application to an individual treated with medical cannabis. *Talanta* 2021, 223, 1217-1272.

76. Auwärter, V.; Wohlfarth, A.; Traber, J.; Thieme, D.; Weinmann, W. Hair analysis for Delta9-tetrahydrocannabinolic acid A--new insights into the mechanism of drug incorporation of cannabinoids into hair. *Forensic Sci Int*. 2010, 196, 10-13.

77. Raikos N, Schmid H, Nussbaumer S, Ambach L, Lanz S, Längin A, König S, Roth N, Auwärter V, Weinmann W. Determination of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinolic acid A ( $\Delta^9$ -THCA-A) in whole blood and plasma by

LC-MS/MS and application in authentic samples from drivers suspected of driving under the influence of cannabis. *Forensic Sci Int.* 2014, 243, 130-136.

### **SITOGRAFIA**

1. <https://growshopgws.com/>
2. <https://europepmc.org/article/PMC/PMC7828520>