



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale

In

Biologia Molecolare e Applicata

Sviluppo e validazione del primo metodo analitico in UHPLC-MS/MS per la quali-quantificazione del 9R- e 9S-HHC e dei principali metaboliti. Applicazione a campioni reali per lo studio della sua farmacocinetica nell'uomo.

The first LC-MS/MS stereoselective bioanalytical methods to quantitatively detect 9R- and 9S-hexahydrocannabinols and their major metabolites. Application to human samples and preliminary pharmacokinetics data.

Tesi di Laurea Magistrale
di:

Giorgia Ricciardelli

Relatore
Chiar.mo Prof.

Alfredo Fabrizio Lo Faro

Sessione Straordinaria

Anno Accademico 2022/2023

Sommario

CAPITOLO 1	4
Cannabinoidi naturali, semisintetici e sintetici	4
1.1 Cannabinoidi naturali	4
1.2 Nuove sostanze psicoattive (NPS)	7
1.3 Cannabinoidi semi-sintetici.....	9
1.4 Cannabinoidi sintetici	10
1.5 Sistema endocannabinoide.....	12
1.6 Aspetti legislativi	18
CAPITOLO 2	20
L'esaidrocannabinolo (HHC)	20
2.1 Storia e legislazione	20
2.2 Nome, struttura e proprietà chimiche.....	26
2.3 Sintesi dell'HHC	29
CAPITOLO 3	32
Scopo della tesi	32
CAPITOLO 4	33
Materiali e metodi	33
4.1 Sostanze chimiche e reagenti	33
4.2 Preparazione degli standards e delle soluzioni di calibrazione e dei controlli di qualità....	33
4.3 Protocollo di somministrazione controllata di HHC.....	34
4.4 Preparazione dei campioni	35
4.4.1 Sangue e fluido orale.....	35
4.4.2 Urina.....	35
4.5 Condizioni strumentali.....	36
4.6 Caratterizzazione delle molecole	37
4.7 Validazione del metodo	39
4.7.1 Linearità	39
4.7.2 Limite di rilevamento e quantificazione	39
4.7.3 Trascinamento e interferenze	40
4.7.4 Integrità e stabilità della diluizione.....	40
4.7.5 Effetto matrice e recupero	41
CAPITOLO 5	42
Risultati	42
5.1 Sviluppo del metodo	42
5.2 Validazione del metodo	46

5.3 Applicazione del metodo a campioni reali	49
5.3.1 Dati farmacocinetici	51
CAPITOLO 6	56
Discussione	57
CAPITOLO 7	61
Conclusioni	61
BIBLIOGRAFIA.....	63

CAPITOLO 1

Cannabinoidi naturali, semisintetici e sintetici

1.1 Cannabinoidi naturali

I cannabinoidi naturali sono i principali costituenti della pianta di *Cannabis* e ne sono stati evidenziati oltre 500 componenti. Di questi più di 100 sono stati classificati come “cannabinoidi” per la loro struttura chimica e sono accomunate dalla capacità di interagire con i recettori cannabinoidi del nostro organismo [1].

La *Cannabis* è una delle piante psicoattive più conosciute e utilizzate nella storia. Fin dall'antichità le fibre venivano sfruttate per la produzione di tessuti e cordami, i semi per la produzione di olio e combustibile, ed i principi attivi per scopi medici, religiosi e ricreativi, soprattutto nelle regioni asiatiche e nell'Europa settentrionale [2, 3].

La somministrazione a scopo terapeutico diventò popolare in Europa e America soltanto nel XIX secolo: preparazioni e tinture a base di *Cannabis* venivano utilizzate per il trattamento di alcune patologie autoimmuni e neurologiche, come convulsioni, emicrania, reumatismi, malaria e gotta. Malgrado ciò, a causa della rapida e crescente popolarità dell'assunzione di *Cannabis* a scopo ricreativo, tale sostanza venne ben presto riconosciuta come illegale [4].

Nonostante tale divieto, ad oggi, continua ad essere la droga più consumata nel mondo, per cui rimane una delle sostanze più studiate ed attenzionate sotto il profilo chimico-tossicologico. In accordo con i dati riportati dallo *United Nations Office on Drugs and Crime* (UNODC), circa il 4% della popolazione globale compresa tra i 15 e i 64 anni (209 milioni di persone) ha assunto la *Cannabis* almeno una volta. Tali cifre sono aumentate di quasi il 18% negli ultimi 10 anni e sono in continuo aumento, soprattutto in Nord America (Canada e USA), in Europa Centrale e in Europa dell'Est. Nell'ultimo anno è stato evidenziato un consumo più elevato tra gli adolescenti (5,8% nella fascia di età 15-16 anni) [5].

I fitocannabinoidi, ovvero i composti presenti in natura e contenuti all'interno della pianta di *Cannabis*, vengono suddivisi in 10 sottoclassi: cannabigeroli, cannabicromeni, cannabidioli, Δ^8 -

tetraidrocannabinoli, Δ^9 -tetraidrocannabinoli, cannabiciololi, cannabielsoini, cannabinoli, cannabinodioli e cannabitrioli [6]. Sono biosintetizzati e accumulati come cannabinoidi acidi e successivamente subiscono una decarbossilazione con conseguente formazione della loro forma biologicamente attiva a livello recettoriale [7]. Dalla decarbossilazione di questi precursori si formano: Δ^9 -tetraidrocannabinolo (Δ^9 -THC) e il suo metabolita cannabinolo (CBN), cannabidiolo (CBD), cannabicromone (CBC) e il suo artefatto chimico cannabiciololo (CBL). Dal geranil difosfato e dall'acido divarinico si forma l'acido cannabigerovarico (CBGVA) un C3-fitocannabinoide con una catena laterale n-propilica. Dal CBGVA vengono sintetizzati l'acido Δ^9 -tetraidrocannabivarico (Δ^9 -THCVA), l'acido cannabidivarico (CBDVA) e l'acido cannabicromevarico (CBCVA). La loro decarbossilazione forma i rispettivi cannabinoidi: Δ^9 -tetraidrocannabivarina (Δ^9 -THCV), cannabivarina (CBNV), cannabidivarina (CBDV), cannabicromevarina (CBCV) e cannabiciolvarina (CBLV) [8].

Tra i vari costituenti della *Cannabis*, i sopracitati cannabidiolo (CBD) e Δ^9 -tetraidrocannabinolo (Δ^9 -THC o THC) sono i cannabinoidi naturali presenti in maggior quantità e di più ampio interesse. La molecola che viene maggiormente studiata è il Δ^9 -THC, poiché è il principale responsabile degli effetti psicoattivi della *Cannabis*, mentre il CBD è il secondo fitocannabinoide presente nella *Cannabis* ma non determina gli effetti psicoattivi del THC [9].

Il Δ^9 -THC (Fig.1), appartenente alla classe dei tetraidrocannabinoli, dal punto di vista farmacologico è un agonista parziale dei recettori dei cannabinoidi e gli effetti psicoattivi, solitamente acuti, transienti ed auto-limitanti, comprendono euforia, rilassamento, alterazione della percezione, aumento dell'appetito ed analgesia, ma anche ansia, paranoia, rallentamento motorio, ipotermia e catalessi. Questi effetti sono dovuti da un'inibizione presinaptica del rilascio di vari neurotrasmettitori, in particolare dopamina, N-metil-D-aspartato (NMDA) e glutammato [10].

Il CBD (Fig.2), appartenente alla classe dei cannabidioli, come il THC possiede una struttura molecolare composta da 21 atomi di carbonio, 30 atomi di idrogeno e 2 atomi di ossigeno; differisce

dal THC per la presenza di un gruppo ossidrilico in posizione C7 con conseguente perdita della struttura benzenica. Nonostante la somiglianza strutturale ha un antagonismo minore verso i recettori dei cannabinoidi ed è considerato un modulatore allosterico negativo [11].

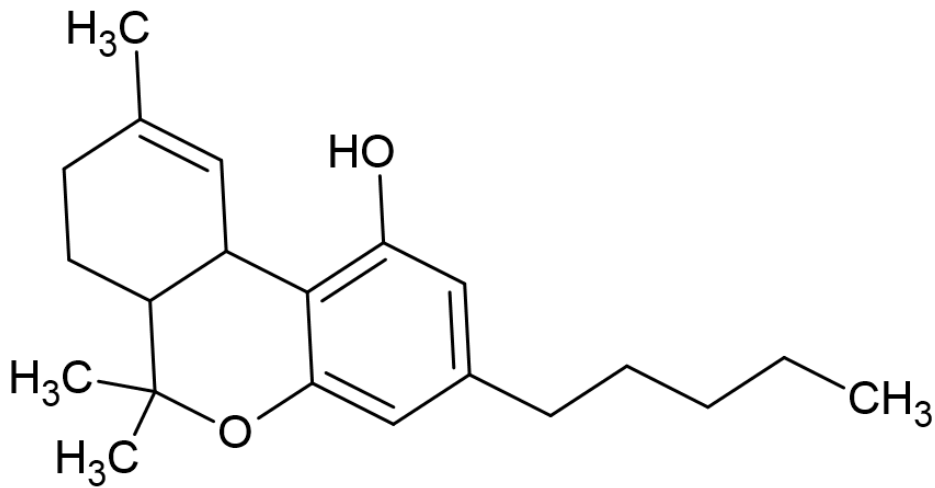


Fig.1: Struttura chimica del delta-9-tetraidrocannabinolo (Δ 9-THC).

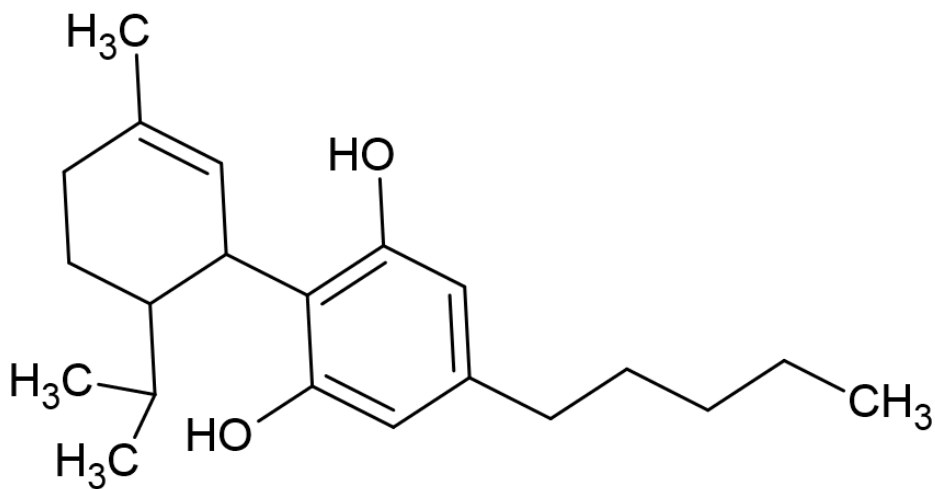


Fig.2: Struttura chimica del cannabidiolo (CBD).

1.2 Nuove sostanze psicoattive (NPS)

Con la denominazione Nuove sostanze psicoattive (NPS), si fa riferimento ad un gruppo eterogeneo di molecole, prevalentemente di natura sintetica, caratterizzate da proprietà farmacologiche e tossicologiche estremamente insidiose per la salute dei consumatori. Sono spesso conosciute come “droghe sintetiche”, “droghe di design” o con termini colloquiali come “Sali da bagno”, “prodotti chimici di ricerca” e “droghe legali”, in quanto, data la loro continua evoluzione, vengono difficilmente e lentamente sottoposte a controllo internazionale. La maggior parte di queste sostanze sono vendute come sostituti “legali” delle droghe illecite, mentre altre sono destinate a coloro che vogliono sperimentarne i possibili nuovi effetti. L’ufficio delle Nazioni Unite contro la droga e il crimine (UNODC) definisce le NPS come “sostanze di abuso”, in forma pura o in un preparato, che non sono controllate dalla Convenzione unica sugli stupefacenti del 1961 o dalla Convenzione del 1971 sulle sostanze psicotrope, ma che possono rappresentare una minaccia per la salute pubblica [12]. Il termine NPS non si riferisce solamente a sostanze illegali sintetizzate per la prima volta, ma anche a sostanze già esistenti, ad esempio farmaci legali, che entrano a far parte del mercato illegale come sostanze con effetto psicotropo, anche molti anni dopo la pubblicazione della loro sintesi. Sono diverse dalle molecole già presenti, perché sono state modificate chimicamente in modo tale da conservarne il potere stupefacente e psicoattivo, ma anche in grado di renderle sostanze autonome dal punto di vista tossicologico e legale. Un esempio sono tutte quelle sostanze testate da industrie farmaceutiche come possibili medicinali, ma che non raggiungono il mercato farmaceutico per i troppi effetti collaterali o i pochi effetti farmacologici. Queste sostanze possono successivamente entrare nel mercato delle NPS ed essere vendute illegalmente a causa dei loro effetti psicoattivi pressoché simili a quelli delle droghe comuni, per il loro costo minore, per la loro difficile intercettazione, e perché la loro vendita non è stata espressamente vietata dalla regolamentazione nazionale [13].

Il fenomeno delle Nuove sostanze psicoattive rappresenta un emergente problema a livello internazionale, che coglie spesso impreparati i professionisti della salute. Questa eterogenea classe di

nuove droghe sintetiche, rappresenta la più recente e mutevole frontiera nel mondo dell'abuso di sostanze, data la rapidità con cui vengono concepite, sintetizzate e distribuite. Le informazioni ad oggi disponibili su questi prodotti in termini di composizione, meccanismi d'azione e potenziale d'abuso sono spesso limitate, come sono sconosciuti i possibili rischi correlati alla loro assunzione sotto il profilo tossicologico e psicopatologico [14].

Le nuove sostanze più diffuse in Europa sono i cannabinoidi sintetici e i catinoni sintetici (variante sintetica del khat, destinati a sostituire le amfetamine e lo MDMA), ma sono presenti anche gli oppioidi sintetici e la fenetilamine (sostanza che imitano gli allucinogeni), piperazine, sostanze ketamino e PCP-simili, triptamine, fentanili, nuovi oppioidi, analoghi azepanici e droghe da stupro (date-rape drugs). I recenti sviluppi nella sintesi a basso costo di prodotti chimici organici associati allo scambio di informazioni attraverso social network e forum dedicati (drugs forum), hanno fatto sì che ci sia stato un incremento di produzione e consumo dell'NPS. Tra le NPS troviamo anche le *Smart Drugs* (farmaci intelligenti), ovvero una serie di sostanze psicoattive, il cui scopo è di aumentare o alterare le facoltà cognitive, come la memoria, l'attenzione, ma possono anche migliorare la performance fisica di chi ne fa uso [15].

L'evento di NPS rappresenta un problema emergente a livello internazionale, tanto che le Nazioni unite, l'*International Narcotics Control Board* e l'Unione Europea stanno dedicando grande attenzione a quella che viene presentata come una nuova minaccia per la salute pubblica. Dal 2009, il Sistema Nazionale di Allerta Precoce per le droghe del Dipartimento Politiche Antidroga (SNAP) ha eseguito un monitoraggio costante della comparsa di NPS sul territorio italiano. La difficoltà di riconoscimento analitico delle NPS è elevata e la causa di ciò risiede principalmente nella mancanza di standard analitici di riferimento, inesistenti o non facilmente reperibili. Per ovviare a tali criticità operative e al fine di agevolare il lavoro del personale dei laboratori che si attengono al network dello SNAP, il Dipartimento Politiche Antidroga, in collaborazione con l'Istituto Superiore di Sanità, il Centro Antiveleni di Pavia e il Dipartimento delle Dipendenze ULSS 20 di Verona, nel 2010 e 2012 ha distribuito verso tali centri standard di riferimento di diverse nuove sostanze psicoattive. Ciò ha

permesso di aumentare la capacità analitica dei laboratori e, quindi, di migliorare la capacità di identificazione delle NPS [16].

1.3 Cannabinoidi semi-sintetici

I cannabinoidi semi-sintetici (SSC) sono quelle molecole che, a seguito di processi chimici, derivano da cannabinoidi naturali. La differenza principale tra cannabinoidi sintetici (SC) e semi-sintetici è che questi ultimi mantengono la struttura dei cannabinoidi naturali, su cui vengono effettuate piccole modifiche chimiche al fine di migliorarne o affinarne il profilo farmacologico.

In particolare, la variazione della struttura chimica rispetto ai cannabinoidi naturali interessa alcuni dei gruppi chimici, la cui modifica ne influenza il profilo farmacologico.

Tali molecole non sono ancora state completamente identificate, descritte o regolamentate.

Il cannabinoide semi-sintetico di maggiore interesse, riconducibile per struttura al THC, è l'esaidrocannabinolo (HHC). Sono anche conosciuti due suoi derivati, HHC-acetato (HHCO) ed esaidrossicannabiforolo (HHCP).

L'HHC si trova in dosi molto basse nella pianta di *Cannabis*, e quasi tutto l'HHC commercializzato è ottenuto in modo semi-sintetico, attraverso processi chimici di idrogenazione ottenuti in laboratorio.

Presenta una struttura chimica e molecolare simile al THC, ma resta un cannabinoide con caratteristiche differenti che saranno successivamente descritte nel dettaglio in quanto oggetto del presente studio.

L'HHC sembrerebbe essere un composto più stabile del THC e meno suscettibile a degradazione da esposizione a calore e luce. Questa caratteristica lo rende interessante per i produttori di cannabinoidi, poiché ne permetterebbe la conservazione a lungo termine. Ha effetto psicoattivo, difatti, proprio come il THC, sembrerebbe in grado di legarsi ai recettori cannabinoidi presenti nel nostro sistema endocannabinoide [17].

L'HHC è il primo cannabinoide semisintetico segnalato nell'UE e monitorato come nuova sostanza psicoattiva (NPS) dall'European Early Warning System (EWS) dal 21 ottobre 2022 ma attualmente il commercio è ancora legale in molti paesi del mondo [18].

Si rimanda al successivo capitolo ove sarà trattato nel dettaglio l'HHC.

1.4 Cannabinoidi sintetici

I cannabinoidi sintetici sono droghe artificiali agonisti del recettore tetraidrocannabinolo (THC), il principio attivo primario nella cannabis. I cannabinoidi sintetici agiscono sugli stessi recettori della cannabis nel cervello e in altri organi. Tali sostanze sono state progettate conservando le proprietà potenzialmente terapeutiche dei cannabinoidi naturali, privandole però dei suoi effetti indesiderati, inclusi quelli relativi alla capacità di sviluppare dipendenza; contestualmente si sono diffusi anche prodotti con altre finalità, generalmente sintetizzati in laboratori clandestini e venduti a scopo ricreativo [19]. I cannabinoidi sintetici sono quindi una classe di molecole sintetizzate in laboratorio con lo scopo di ottenere composti in grado di attivare selettivamente e con diverse affinità i recettori endogeni per i cannabinoidi. A differenza dei SSC, non sono strutturalmente correlati ai cannabinoidi naturali e sono unicamente prodotti tramite sintesi chimica. I primi tentativi di sintesi erano orientati verso la preparazione di molecole del tutto analoghe al THC, ma successivamente, si è assistito ad un'evoluzione delle loro caratteristiche strutturali, con lo scopo di individuare i siti di legame con i recettori e di conseguenza di produrre solo le porzioni attive della molecola, discostandosi dalla classica struttura tricyclica benzopiranic del THC. Visto che le strutture molecolari dei cannabinoidi sintetici differiscono dal THC, non era inizialmente vietato l'uso e, all'inizio degli anni 2000, i cannabinoidi sintetici iniziarono ad essere utilizzati a scopo ricreativo nel tentativo di ottenere effetti simili alla *Cannabis*. Ben presto aumentò la loro popolarità in quanto poco costosi e, in genere, non rilevabili dai test antidroga standard. Nel 2008 alcuni cannabinoidi sintetici sono stati inseriti tra le sostanze illecite; tuttavia, nuovi composti analoghi vengono continuamente sintetizzati [20]. Negli ultimi anni sono stati sviluppati illegalmente oltre 250, avente come bersaglio il sistema endocannabinoide e progettati nel tentativo di eludere le normative vigenti in materia di sostanze stupefacenti [21].

Questi composti sono generalmente denominati “*Spice*” (*Spice Silver, Spice Gold, Spice Diamond, e Yucatan Fire, Sence, Chill X, Smoke, Genie, Algerian Blend e molti altri*) o “*K2*”, *Blanck Mamba*”, “*Scooby Snax*” ecc [22, 23].

I cannabinoidi sintetici, secondo quanto riportato dall’*European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction* (EMCDDA), sono classificati in sette gruppi strutturali principali: naftoilindoli (JWH-018, JWH-073 e JWH-398), natfilmetilindoli, naftoilpirroli, naftilmetilindeni, fenilacetilindoli (ovvero benzoilindoli come JWH-250), cicloesilfenoli (CP 47.497 e omologhi di CP 47.497) e cannabinoidi classici (HU-210).

Verso la fine del 2008 si assistette all’esplosione dei cannabinoidi sintetici in Europa e nel mondo. In questi anni il JWH-018 e il JWH-073, definiti anche “*herbal mixture*” o “*herbal blend*”, rappresentarono i cannabinoidi sintetici più comunemente riscontrati nelle diverse miscele vegetali. Successivamente, numerosi altri cannabinoidi sono stati immessi sul mercato, come ad esempio JWH-200, JWH-250, JWH-122, 5F-THJ, 5F-THJ-018, THJ-018, A-796, CUMYL-BICA, CUMYL-PINACA, RCS-3, trans-CP 47,497-C8, LS91297, 5-CI-MN-24, 5F-APINACA, 5F-AB-144, 5F-ABICA, 5F-NPB-22, 5FADBICA, 5F-SDB-006, 5F-ADB, FUMINA, AM-678 [24].

Gli effetti di questi prodotti sono dovuti sia alla porzione (ingrediente) vegetale che ai cannabinoidi sintetici intenzionalmente aggiunti. I cannabinoidi sintetici sono una grande famiglia di preparazioni con differente o totale diversità nella struttura chimica sia tra loro che rispetto al THC. Agiscono come quest’ultimo e si legano agli stessi recettori cerebrali -CB1 e CB2- cui si legano sia gli endocannabinoidi (i cannabinoidi presenti nel nostro organismo) che i fitocannabinoidi (i cannabinoidi che derivano dalla pianta della canapa). I cannabinoidi sintetici sono più potenti della cannabis naturale, in quanto presentano un’affinità molto più elevata per i recettori cerebrali, in particolare quelli che agiscono come antagonisti completi sul recettore CB1. Diversamente dalla cannabis naturale, tali cannabinoidi, non contengono il CBD. I cannabinoidi sintetici possono manifestare azioni biologiche diverse da quelle proprie dei cannabinoidi, in quanto alcuni di essi incorporano gruppi derivati dall’indolo, che sono strutturalmente simili alla serotonina, e quindi

possono causare un'attivazione particolarmente elevata dei recettori della serotonina, nota come sindrome serotoninergica.

Fino a qualche anno fa, i casi clinici che descrivevano la tossicità dei cannabinoidi sintetici sugli esseri umani erano pochi, ma attualmente l'uso di cannabinoidi sintetici è sempre più associato a gravi problemi di salute [25].

1.5 Sistema endocannabinoide

Lo studio dei meccanismi che sono alla base degli effetti associati all'azione dei fitocannabinoidi, ha portato alla scoperta di un complesso sistema biologico di comunicazione cellulare che oggi è conosciuto come il sistema endocannabinoide (ECS). Nella comunità scientifica, tuttavia, il sistema endocannabinoide è stato anche oggetto di numerosi studi finalizzati allo sviluppo di nuovi composti con scopi terapeutici potenzialmente utili in una grande varietà di disturbi.

L'ECS è una diffusa rete neuromodulatoria coinvolta nello sviluppo del sistema nervoso centrale (SNC) ed in numerosi processi fisiologici [26].

Il sistema endocannabinoide è costituito da recettori cannabinoidi (CB1 e CB2), dai corrispondenti ligandi endogeni (endocannabinoidi), anandamide (AEA) e 2-arachinoilglicerolo (2-AG) e da tutti quegli enzimi responsabili della loro biosintesi, degradazione e trasporto. È importante considerare che la maggior parte dei componenti dell'ECS sono multifunzionali, pertanto, piuttosto che essere un sistema discreto e isolato, l'ECS influenza ed è influenzato da molti altri percorsi di segnalazione [27].

L'ECS è ampiamente distribuito a livello del sistema nervoso sia centrale che periferico nonché in molteplici organi. Esso ricopre un importante ruolo nella regolamentazione di numerosissimi processi fisiologici come il controllo motorio, la regolazione dell'omeostasi, l'alimentazione, le funzioni cognitive superiori quale l'attenzione e la memoria, l'ansia, l'umore, l'appetito, i circuiti della ricompensa, la percezione del dolore, le funzioni sessuali, la neuroprotezione, il sistema immunitario e le funzioni endocrine [28, 29].

Come precedentemente accennato, sono noti due sottotipi di recettori CB: di tipo 1 (CB1) e di tipo 2 (CB2). Questi recettori appartengono alla famiglia dei recettori metabotropici accoppiati a proteine G (GPCR), che mediano le risposte funzionali degli endocannabinoidi e di molecole esogene. Sono caratterizzati da una struttura aminoacidica che forma un'unica catena il cui terminale amminico si affaccia nella porzione extracellulare mentre il terminale carbossilico protrude sulla faccia interna della membrana citoplasmatica. La struttura aminoacidica è ordinata in sette domini α -elica transmembranali connessi da tre segmenti loop extracellulari, i quali, insieme al terminale amminico, compongono importanti siti di glicosilazione e di interazione con i ligandi e tre segmenti intracellulari che ospitano siti regolatori, fungendo da sede di interazione con le subunità delle proteine G (Fig. 3) [30, 31].

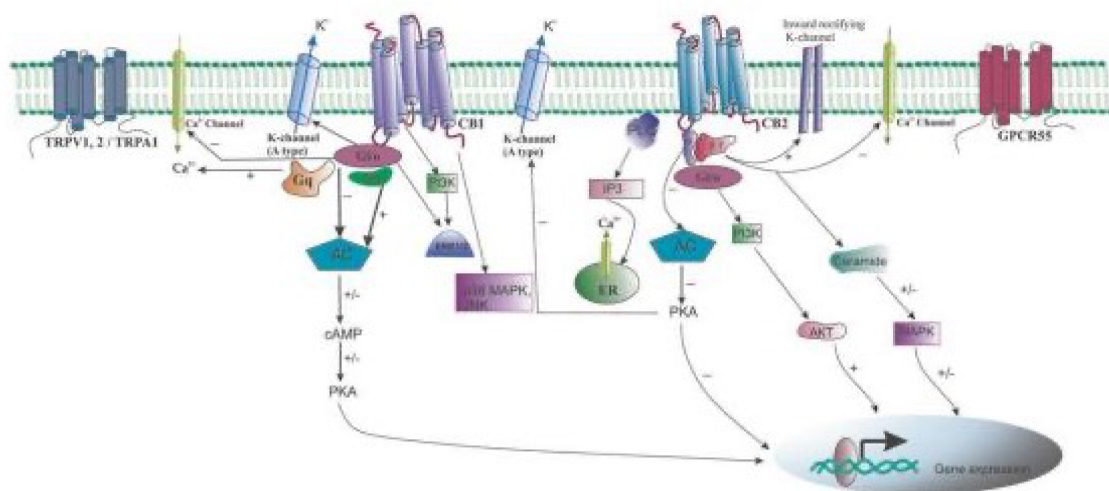


Fig.3: Rappresentazione schematica della struttura e del funzionamento dei recettori cannabinoidi CB1 e CB2.

I recettori CB1 furono caratterizzati per la prima volta come sito di legame per i cannabinoidi nel 1988 da *Devane et al.* [32] e pochi anni più tardi furono clonati e dunque descritti nella loro struttura sia nel ratto [33] che nell'uomo [34]. Tali recettori sono ampiamente distribuiti in gran parte del

sistema nervoso centrale e risultano essere i recettori GPCR più abbondanti nel cervello dei mammiferi [35].

Si trovano principalmente sulle cellule nervose (neuroni) del SNC (oltre che nell'encefalo quindi, anche nel midollo spinale). A livello dell'encefalo, la distribuzione dei CB1 (Fig.4) è particolarmente marcata nelle regioni responsabili della coordinazione motoria e del movimento, dell'attenzione e delle funzioni cognitive complesse come il giudizio, l'apprendimento, la memoria e le emozioni. Nella figura 4 nello specifico, le aree indicate con i puntini neri sono quelle in cui maggiormente si lega il cannabinoide THC modificandone il normale funzionamento e sviluppo. I recettori CB1 sono presenti in minor quantità, anche in alcuni organi e tessuti periferici tra cui ghiandole endocrine, ghiandole salivari, leucociti, milza, cuore e parte dell'apparato riproduttivo, urinario e gastrointestinale [36].

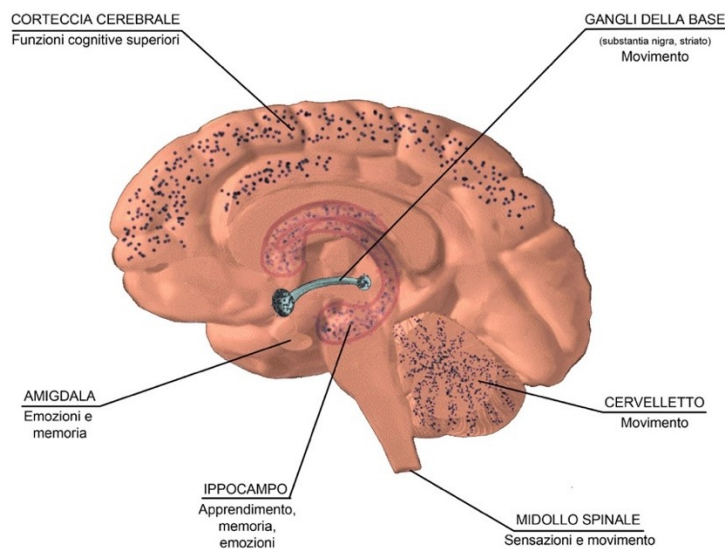


Fig. 4: Distribuzione dei recettori CB1 nel cervello.

Recentemente i recettori CB1 sono stati localizzati anche su cellule non neuronali come gli astrociti e su cellule neuronali in sede postsinaptica. La loro localizzazione cellulare riguarda prevalentemente

le aree presinaptiche dei neuroni, compatibilmente con l'attività neuromodulatoria della trasmissione tipica di questi recettori [37, 38].

I recettori CB2, descritti nel 1993 da Munro et al. [39] benché siano accomunati ai CB1 da omologie di natura strutturale e, per alcuni aspetti, di trasduzione del segnale, sono caratterizzati da una diversa distribuzione: presentano un'elevata e diffusa localizzazione a livello periferico e una estesa, seppur bassa, espressione a livello di tutto il SNC [40].

I recettori CB2 risultano abbondantemente espressi nelle cellule del sistema immunitario come monociti, macrofagi, linfociti B e T, nelle quali partecipano all'induzione del rilascio di citochine proinfiammatorie e modulano il rilascio di fattori angiogenici e linfoangiogenici [41].

I CB2 effettuano una modulazione della risposta immunitaria anche in altre sedi correlate al sistema immunitario come la milza, le tonsille, il timo, il tessuto osseo ematopoietico e i cheratinociti [42].

La loro presenza è stata rilevata anche a livello del pancreas e dell'apparato gastrointestinale [43].

I CB2 sono espressi a livello delle microglia e dei macrofagi del SNC solo in caso di neuroinfiammazione, ciò indica una funzione protettiva nei confronti dei neuroni in quanto, in caso di danno tissutale, l'up-regolazione del recettore e la conseguente azione degli endocannabinoidi su di esso, determina la diminuzione del rilascio di radicali liberi e del fattore di necrosi tumorale (TNF). Questo suggerisce che i recettori CB2 possano mediare una vera e propria risposta endogena di tipo protettivo a condizioni potenzialmente dannose, tali da renderli un possibile bersaglio farmacologico nel trattamento di alcune patologie neurodegenerative [44].

Gli effetti associati all'attivazione dei CB2 a livello del SNC non sono ancora chiari, ma è stato ipotizzato un loro coinvolgimento nei disturbi del comportamento e nel consumo di sostanze d'abuso [45, 46].

Nella Figura 5 viene riportata una rappresentazione della distribuzione dei recettori CB1 e CB2.

L'attivazione dei recettori è mediata dalle proteine *Gi* e *Go*, che regolano diverse vie di trasduzione del segnale, tra cui canali ionici, enzimi che producono secondi messaggeri ciclici (cAMP e cGMP) e varie chinasi. A seconda della posizione specifica del CB e della proteina G coinvolta, la

stimolazione recettoriale può comportare l'inibizione o la stimolazione dei vari neurotrasmettitori, tra cui l'acetilcolina, L-glutammato, acido γ -aminobutirrico, dopamina, norepinefrina e 5-idrossitriptamina [47-49].

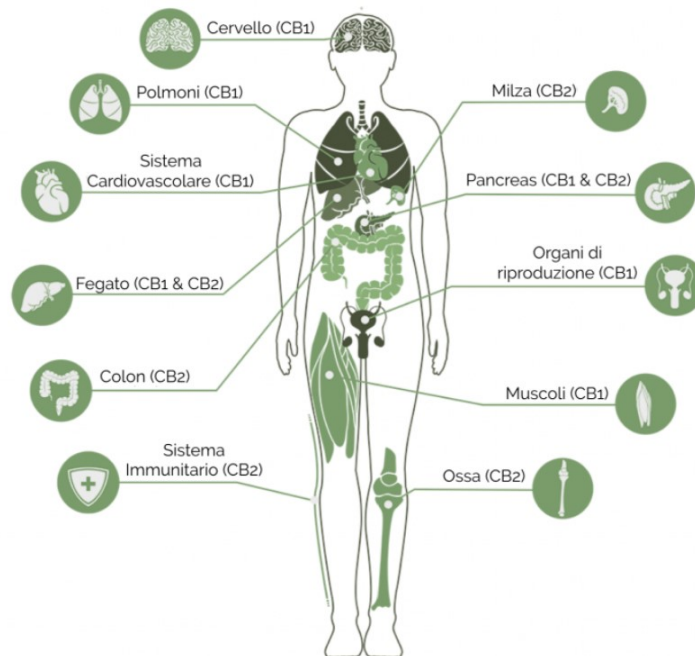


Fig.5: Distribuzione dei recettori cannabinoidi.

I recettori CB1 e CB2 dopo numerosi studi sono stati identificati come i principali mediatori degli effetti fisiologici del sistema endocannabinoide, sebbene negli ultimi anni sia stata avanzata la proposta, confermata da evidenze crescenti, che anche altri recettori contribuiscono alla modulazione del ECS. Difatti alcune evidenze scientifiche suggeriscono l'interazione degli endocannabinoidi con altre strutture recettoriali come il GPR55 [50] ed il recettore canale TRPV1 (*transient receptor potential vanilloid type-1*) [51]. Il sistema ECS, inoltre, interagisce con il sistema serotonergico: infatti è stato dimostrato, anche in studi effettuati sull'uomo, che l'attivazione dei recettori serotonergici può attivare il sistema endocannabinoide. Infine, è stato evidenziato che l'attivazione dei recettori dell'angiotensina AT1 accoppiati a proteina G può portare alla stimolazione dei recettori CB1, regolando così la pressione sanguigna nell'ipotalamo [52].

In sintesi, è evidente come l'attivazione dei recettori CB1 e CB2 da parte dei ligandi endogeni ed esogeni provochi un ampio spettro di risposte biochimiche a livello cellulare, con conseguenti effetti centrali e periferici osservati nella tossicità dei cannabinoidi.

La scoperta dei recettori CB, sostenuta da numerose ricerche volte alla comprensione del meccanismo d'azione della *Cannabis*, suscitò da subito un forte interesse della comunità scientifica nei confronti di quelle molecole Δ^9 -THC simili che si presumevano essere i loro ligandi endogeni. Tale spinta portò *Devane et al.* nel 1992, all'isolamento, a partire da estratti di cervello porcino, di una molecola di natura lipidica identificata come amide dell'acido arachidonico (N-arachidonoiletanamide), successivamente chiamata anandamide (AEA) dal sanscrito "ananda" (che significa stato di grazia o beatitudine), la quale mostrava un'elevata affinità per i recettori CB [53].

Qualche anno più tardi fu isolato il secondo ligando endogeno, anch'esso di natura lipidica, che prese il nome di 2-arachidonoilglicerolo (2-AG) [54]. Oggi sappiamo che tale classe ha al suo interno anche altri composti scoperti all'inizio del nuovo millennio, come il 2-arachidonoilgliceriletere (2-AGE o noladin-etere), l'O-arachidonoiletanamina (virodamina) e la N-arachidonoildopamina (NADA), tutti in grado di interagire con i recettori CB, sebbene AEA e 2-AG rimangono gli endocannabinoidi più importanti [55-57].

Oltre ad essere agonisti parziali dei recettori CB1 e CB2, sia il Δ^9 -THC che il CBD hanno un meccanismo d'azione più complesso e attivano il sistema endocannabinoide attraverso diversi percorsi. Il CBD può anche agire come modulatore allosterico negativo del recettore cannabinoide CB1, pertanto, quando CBD e THC sono co-somministrati, il CBD sembrerebbe ridurre la psicoattività e gli effetti ansiogeni del Δ^9 -THC [58].

1.6 Aspetti legislativi

La *Cannabis* è la droga illecita più comunemente utilizzata in Europa, ma a causa degli effetti psicoattivi che includono potenziale dipendenza ed abuso, la *Cannabis* e i suoi prodotti sono inclusi nella categoria delle sostanze stupefacenti controllate e il loro possesso è illecito in molti paesi.

Attualmente, in Italia, la *Cannabis* ad alto contenuto di THC è illegale ad uso ricreativo. Al contrario, non esistono leggi che vietino il CBD, anche se al momento non è ancora registrato come farmaco.

A causa di questo *gap* legislativo, alcuni negozi specializzati nella vendita di derivati della canapa offrono liberamente prodotti a base di CBD (olio, cristalli, ecc.) [59].

I cannabinoidi sintetici rappresentano il gruppo più ampio di sostanze monitorate come Nuove Sostanze Psicoattive (NPS) dal Sistema di Allerta Precoce dell'Unione Europea. Nonostante le intense misure volte a ridurre la disponibilità di cannabinoidi sintetici sul mercato della droga, i dati presentati dall'EMCDDA, attraverso il Sistema di Allerta Precoce, documentano una grande popolarità e diffusione in Europa.

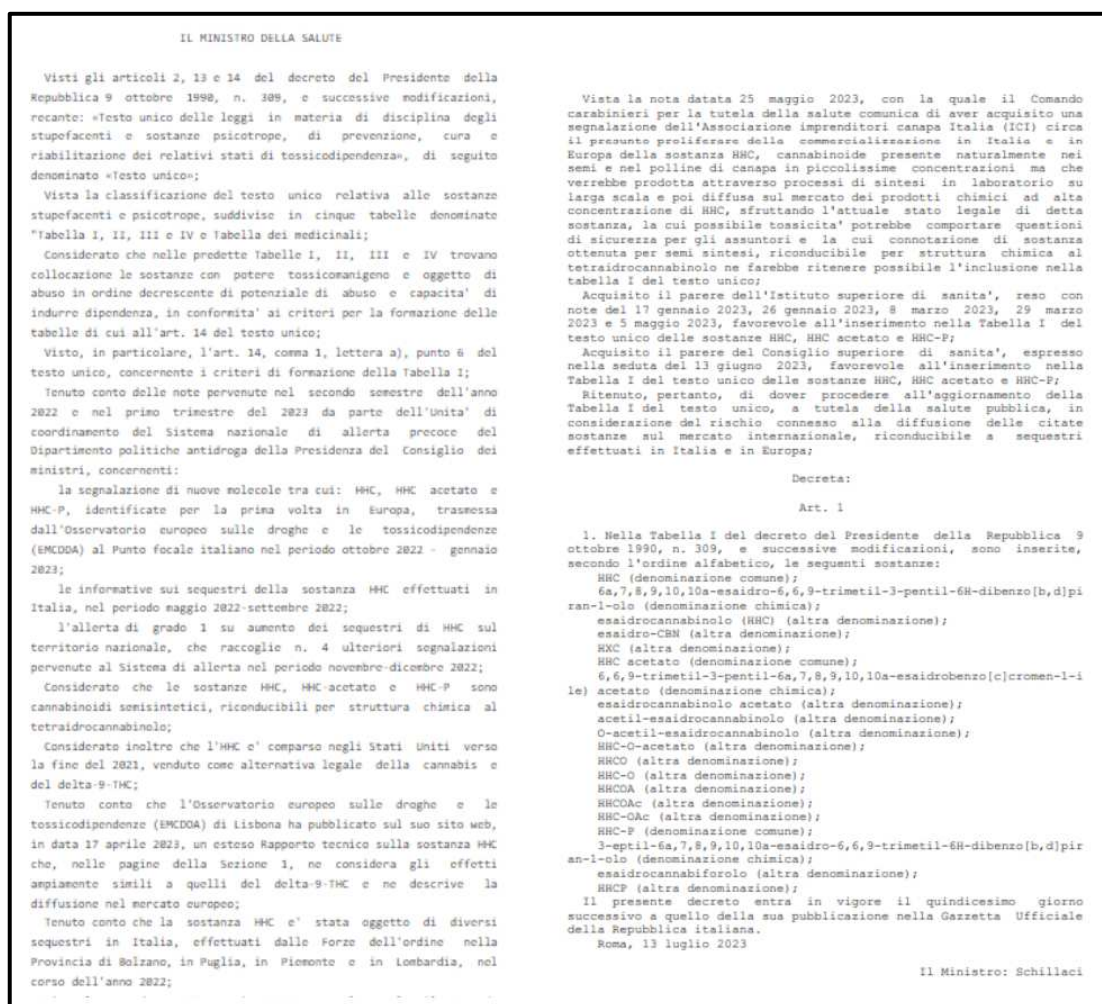
In Italia, i cannabinoidi sintetici sono annotati nella Tabella I contenente l'indicazione delle sostanze stupefacenti e psicotrope, di cui al decreto del Presidente della Repubblica 9 ottobre 1990, n. 309 e successive modificazioni e integrazioni.

Per quanto riguarda l'esaidrocannabinolo, esso è stato il primo cannabinoide semisintetico segnalato nell'UE nel 2022. È stato identificato in due terzi degli Stati membri e, in alcuni paesi, viene venduto come "*Cannabis light*", ovvero un'alternativa legale della *Cannabis*. Dall'ottobre 2022, l'HHC è oggetto di monitoraggio dal Sistema di Allerta Precoce dell'UE al fine di comprendere meglio i suoi effetti e i potenziali rischi per la salute pubblica. Inoltre, l'EMCDDA ha pubblicato ad aprile 2023 una relazione tecnica sulla sostanza HHC, descrivendo gli effetti pressoché sovrapponibili a quelli del THC confermandone la preoccupante diffusione nel mercato europeo. Sulla base di tali evidenze, è stata aggiornata la tabella delle sostanze stupefacenti e psicotrope ai sensi del Decreto del Ministero della Salute del 13 luglio 2023 (GU Serie Generale n.172 del 25 luglio 2023), pubblicato nella

Gazzetta ufficiale riportata in fondo a questo capitolo, elencati nella Tabella 1 HHC e i suoi derivati: HHC-acetato (HHCO) ed esaidrossicannabiforolo (HHCP).

Tale decisione tiene conto dei sequestri effettuati in Italia nel 2022, in particolare nella provincia di Bolzano, Puglia, Piemonte e Lombardia, unitamente alle numerose segnalazioni tra la fine del 2022 e l'inizio del 2023 da parte dell'Unità di Coordinamento del Sistema Nazionale di Allerta Precoce (SNAP) del Dipartimento Politiche Antidroga (DPA), ed infine, dei pareri favorevoli dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) e del Consiglio Superiore di Sanità.

Figura 6: Decreto del Ministero della Salute del 13 luglio 2023 (GU Serie Generale n.172 del 25 luglio 2023), pubblicato nella Gazzetta ufficiale): aggiornamento delle tabelle contenenti l'indicazione delle sostanze stupefacenti e psicotrope.



CAPITOLO 2

L'esaidrocannabinolo (HHC)

2.1 Storia e legislazione

L'esaidrocannabinolo (HHC) fu identificato per la prima volta negli anni 40 durante l'esecuzione di indagini mirate a chiarire la struttura chimica dei costituenti psicoattivi di marijuana e hashish nei laboratori di *Adams et al.* e *Todd et al.* [60-62].

Le caratteristiche molecolari come l'instabilità chimica e la predisposizione all'isomerizzazione, oltre che la mancanza di tecniche analitiche, ne hanno successivamente ostacolato una conoscenza scientifica più approfondita. Negli anni successivi sono stati condotti solo alcuni studi sugli animali, mentre non è stato ancora effettuato alcuno studio relativo alla farmacologia e tossicologia dell'HHC nell'uomo.

L'HHC si trova naturalmente in piccole concentrazioni nel polline e nei semi delle piante di canapa, è chimicamente simile al Δ^9 -THC e, secondo studi di laboratorio *in vitro* e su alcune specie animali *in vivo*, sembra avere effetti sostanzialmente simili ai prodotti a base di *Cannabis* [17].

Recentemente, a seguito della sua rapida diffusione e popolarità come sostanza d'abuso, l'HHC ha nuovamente attirato l'attenzione di ricercatori e tossicologi a livello internazionale.

Infatti, all'inizio degli anni 2000 si è verificata una crisi del mercato illecito globale dei cannabinoidi e, parallelamente ai cambiamenti legislativi, sono emersi nel mercato cannabinoidi semi-sintetici e sintetici, economici e facili da produrre. Tale diffusione è correlata ai cambiamenti normativi negli Stati Uniti riguardanti lo status giuridico della canapa. L'entrata in vigore nel 2018 dell'*Agriculture Improvement Act*, noto come "*Farm Bill*", ha difatti aperto le porte alla coltivazione su larga scala di canapa industriale e della *Cannabis* "a basso contenuto di Δ^9 -THC" [63].

Il mercato della canapa e dei suoi derivati, sia quelli a scopo terapeutico che ricreazionale, è cresciuto in modo esponenziale. Di conseguenza, aumentandone l'offerta, i prezzi di molti prodotti sono diminuiti e proliferati nel mercato i prodotti non sottoposti a restrizioni legislative, contenenti derivati della canapa (in particolare CBD o *Cannabis* a basso contenuto di Δ^9 -THC).

L'HHC viene venduto come sostituto “legale” dei prodotti a base di Δ^9 -THC, spesso sotto forma di vaporizzatori o sostanze liquide destinate alle sigarette elettroniche e prodotti alimentari come dolci e caramelle. Tutt'ora, in molti paesi, viene distribuito liberamente come “*cannabis ligh*” [64,65].

L'HHC è emerso alla fine del 2021 sul mercato dei farmaci negli Stati Uniti (USA) e successivamente, intorno a maggio 2022, è stato identificato per la prima volta in Europa, reperito in un prodotto a scopo alimentare commercializzato come ipnoinducente e denominato “*CBN night*”, sequestrato dalla polizia danese (Fig.7) [66].

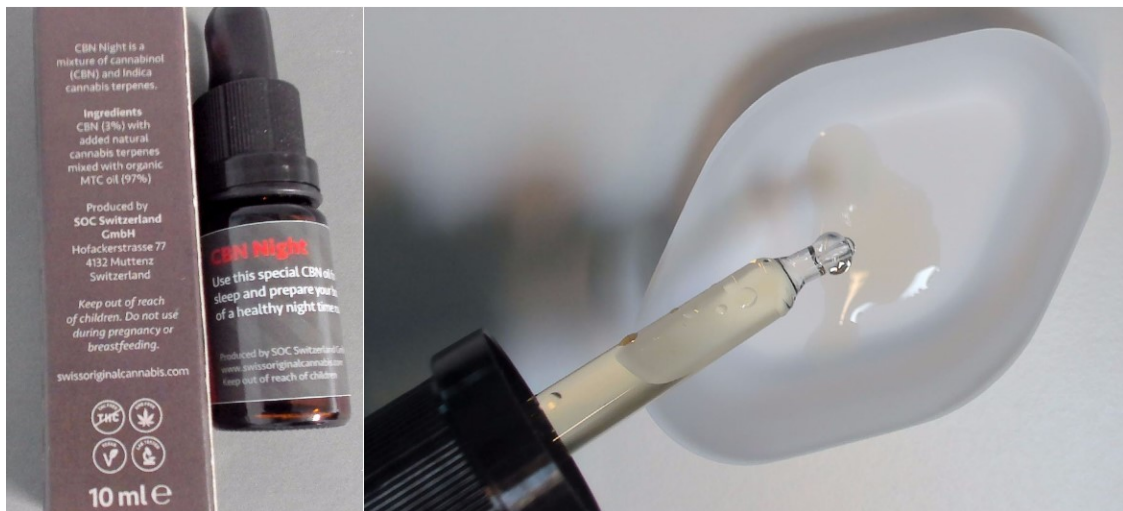


Fig.7: Integratore per uso alimentare “*CBN Night*” contenente HHC. EMCDDA 2023.

In poco tempo la produzione e la diffusione di HHC iniziò ad interessare altri paesi e, tra il 2022 e il 2023, l'Osservatorio Europeo delle Droghe e delle Tossicodipendenze (OEDT) ha ricevuto varie segnalazioni in cui l'HHC era stato identificato in una gamma di prodotti in ben 20 Stati membri dell'Unione Europea (Austria, Belgio, Bulgaria, Croazia, Cipro, Repubblica Ceca, Danimarca, Estonia, Finlandia, Francia, Germania, Grecia, Ungheria, Italia, Lituania, Polonia, Slovacchia, Slovenia, Spagna, Svezia, Svizzera e Norvegia) (Fig.8). Pertanto, è stata evidenziata la necessità di un attento monitoraggio e in alcuni paesi sono già stati effettuati cambiamenti nello *status* giuridico [67].

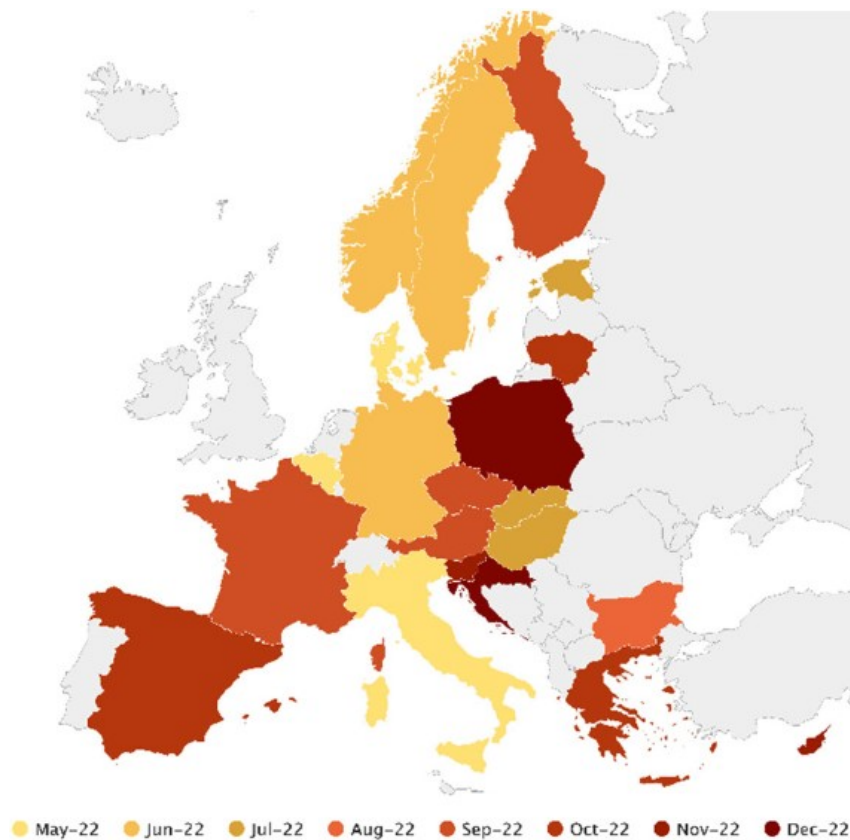


Fig.8: Paesi europei che segnalano le identificazioni di HHC all'EWS (maggio-dicembre 2022). EMCDDA 2023.

Da quando è stato ufficialmente notificato come NPS, l'OEDT ha ricevuto segnalazioni di circa una cinquantina di sequestri. I dati relativi al monitoraggio suggeriscono che la disponibilità e l'uso di HHC in Europa è molto maggiore e che esiste un'ampia gamma di prodotti sul mercato in cui è indicato sulla confezione che è contenuto HHC; inoltre alcuni di essi vengono spruzzati o miscelati con HHC anche se la loro presenza non viene segnalata (spesso fiori e resina di *Cannabis* a basso contenuto di $\Delta 9$ -THC) [68].

I prodotti a base di *Cannabis* a basso contenuto di $\Delta 9$ -THC contenenti HHC sono commercializzati in una serie di *design* sofisticati, attraenti e dai colori vivaci. I fiori di *cannabis* a basso contenuto di $\Delta 9$ -THC contenenti HHC sono anche commercializzati utilizzando i nomi di varietà di *Cannabis* popolari come “*Afghan Kush*”, “*Amnesia*”, “*BubbleGum Kush*”, “*Strawberry Kush*”, “*Express*” e “*Purple Haze*” (Fig.9), ma anche liquidi per sigarette elettroniche (Fig.10), prodotti alimentari, in

particolare dolci aromatizzati (gomme e marshmallow) (Fig.11 e Fig.12) e miscele commercializzate come integratori alimentari [69].



Fig.9: Confezione di “Purple Haze” contenente fiori di cannabis a basso contenuto di THC contenente HHC. EMCDDA 2023.



Fig.10: Confezione liquido per sigarette elettroniche contenente HHC. EMCDDA 2023.



Fig. 11: Confezione di caramelle gommose al gusto “Coca-Cola” contenenti HHC. EMCDDA 2023.



Fig.12: Confezione di marshmallows alla fragola contenenti HHC. EMCDDA 2023.

Tali confezioni sono vendute in negozi fisici specializzati nella vendita di *Cannabis light*, ma soprattutto online. Infatti, negli ultimi anni si è assistito ad un importante incremento nella diffusione e nelle vendite, in particolare tramite siti internet del *dark e deep web*.

Ciò apre il mercato a un gran numero di potenziali consumatori, oltre ai consumatori abituali di *Cannabis*, compresi nuovi consumatori come adolescenti o individui senza esperienza con droghe illecite che sono attratti dallo status legale degli HHC, poiché molti stati consentono ancora l'impiego legale.

Nonostante la mancanza di ricerche approfondite sull'attività, potenza, tossicità e sicurezza dell'HHC, questo cannabinoide viene sempre più utilizzato dall'industria dei prodotti derivati dalla *Cannabis*.

Da un punto di vista clinico, gli effetti dell'HHC sembrano risultare simili a quelli sperimentati dai consumatori di *Cannabis* e altri prodotti a base di $\Delta 9$ -THC.

Tuttavia, poiché la farmacocinetica, il metabolismo e la tossicità di questa sostanza sono attualmente sconosciuti, non possiamo escludere la possibilità che l'HHC possa avere effetti collaterali maggiori rispetto ai prodotti a base di $\Delta 9$ -THC [70].

Dall'analisi dei prodotti commercializzati emerge che tali preparazioni contengono due stereoisomeri di HHC, ovvero 9R-HHC e 9S-HHC. Secondo studi non clinici, proprietà farmacologiche simili al $\Delta 9$ -THC sono attribuibili in particolare al 9R-HHC. Gli studi effettuati in laboratorio hanno infatti dimostrato che l'epimero 9R-HHC mostra maggiore affinità per i recettori endocannabinoidi rispetto all'epimero 9S-HHC, e di conseguenza sembrerebbe determinare effetti psicoattivi simili a quelli del $\Delta 9$ -THC. L'effettivo contenuto di HHC, ed in particolare dei suoi epimeri, nei prodotti commercializzati non è regolamentato ed è molto variabile. L'HHC diffuso sul mercato è, difatti, una miscela di entrambi gli epimeri in proporzioni non sempre note, con conseguente variabilità degli effetti clinici e collaterali [69].

2.2 Nome, struttura e proprietà chimiche

L'esaidrocannabinolo, nome IUPAC 6a,7,8,9,10a-hesahydro-6,6,9-trimethyl-3-pentyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-1-ol, è un derivato idrogenato del Δ^9 -THC; è un fitocannabinoloide presente in piccolissime quantità nella *Cannabis sativa*, nonché un prodotto di sintesi derivante dall'idrogenazione della *Cannabis*. Dal punto di vista chimico, l'HHC è classificato come un derivato terpenoide triciclico con un anello benzopiranic (o come un esaidrobenzocromene). La classificazione chimica non è univoca, in quanto possono essere utilizzati diversi elementi strutturali e algoritmi di classificazione. L'HHC è classificato come un cannabinoloide semisintetico, perché l'HHC individuato sul mercato è sintetizzato a partire dal cannabidiolo (CBD), che a sua volta è estratto dalla *Cannabis* a basso contenuto di Δ^9 -THC [67], oppure prodotto direttamente dal Δ^9 -THC a seguito del processo di idrogenazione del legame C9-C10 nell'anello cicloesile (Fig.13) [71].

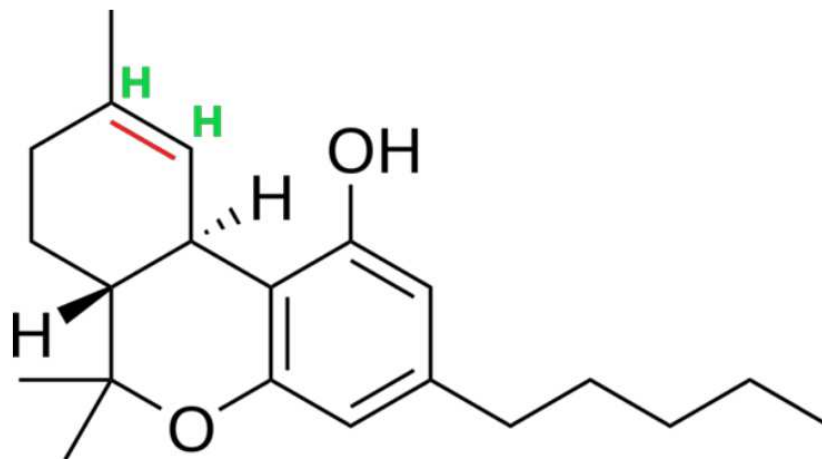


Fig.13: Struttura chimica dell'HHC: a differenza del Δ^9 -THC presenta due atomi di Idrogeno (H) (mostrati in verde) e perdita del doppio legame C9-C10 (mostrato in rosso).

L'HHC presenta tre atomi di carbonio stereogenici con otto stereoisomeri e quattro coppie di enantiomeri come riportato in letteratura di riferimento. Solo il carbonio in posizione C-9 mostra entrambi le configurazioni (6aR,9S,10aR)-HHC o 9 α -HHC ed il (6aR,9R,10aR)-HHC o 9 β -HHC, rispettivamente denominati 9S-HHC e 9R-HHC [72].

La struttura chimica e la formula molecolare dei due epimeri HHC sono riportate nella Figura 14.

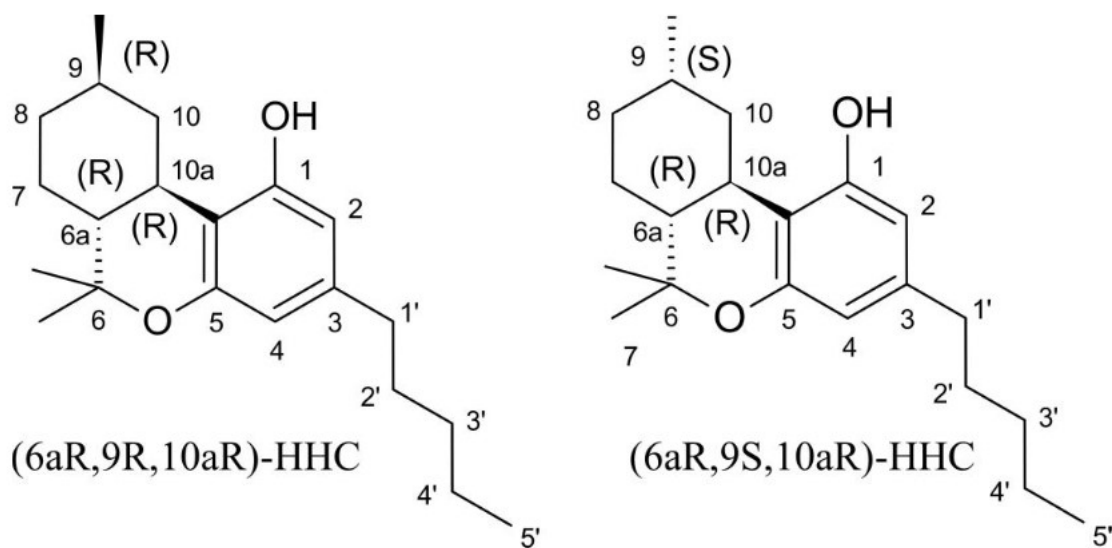


Fig.14: Struttura chimica e formula molecolare del 9R-HHC (a sinistra) e del 9S-HHC (a destra).

I due isomeri differiscono solo nella posizione spaziale del gruppo metilico C-9, che nel 9S-HHC è assiale, mentre nell'epimero 9R-HHC è equatoriale, essenzialmente nella stessa posizione del metile C-9 di Δ 9-THC (Fig.15).

Nella figura 15 è possibile apprezzare la tridimensionalità sovrapposta dei due epimeri dell'HHC e del Δ 9-THC (Fig.16).

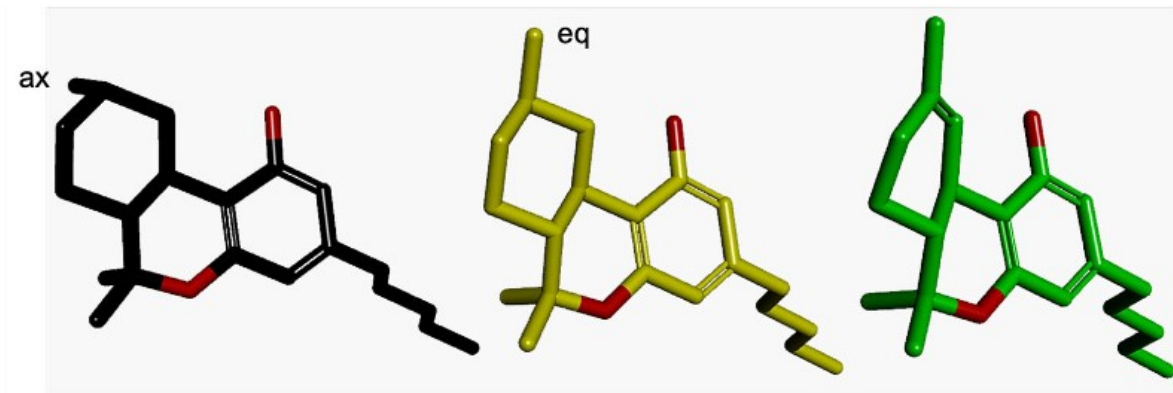


Fig.15: Struttura tridimensionale del 9S-HHC (in nero), del 9R-HHC (in giallo) e del THC (in verde).

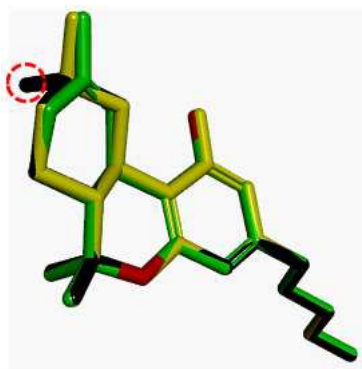


Fig.16: La sovrapposizione dei tre cannabinoidi: si può apprezzare che i due isomeri differiscono solo nella posizione spaziale del gruppo metilico C-9, che nel 9S-HHC (nero) è assiale (cerchio colore rosso), mentre nell'epimero 9R-HHC (giallo) è equator.

Come precedentemente accennato, studi *in vitro* hanno suggerito che l'epimero 9R-HHC possiede un'attività psicoattiva superiore all'epimero 9S-HHC; sembrerebbe infatti il 9R-HHC sia in grado di esercitare l'attività cannabimimetica, mentre il 9S-HHC sembrerebbe avere minore attività psicotropa [73-75]. Per quanto concerne le ricerche condotte *in vivo*, sono presenti in letteratura pochi studi e solo su animali. A tal proposito è significativo citare il lavoro condotto da *Ederly et al.* il cui obiettivo è stato quello di valutare l'attività psicotropa degli epimeri dell'HHC sulle scimmie *rhesus* dopo la somministrazione dei due singoli epimeri, tramite l'osservazione di eventuali cambiamenti somatici e comportamentali. Gli autori hanno osservato che, dopo somministrazione di 1 mg/kg di 9R-HHC, le scimmie permanevano in uno stato di grave stupore, caratterizzato da atassia, ptosi completa ed immobilità per più di tre ore, con una totale assenza di reazione anche in presenza di stimoli esterni.

Tali effetti diminuivano gradualmente a dosi minori, osservando unicamente uno stato di tranquillità a dosi 0,1 mg/kg. Di contro, l'epimero 9S-HHC induceva sonnolenza, diminuzione dell'attività motoria e, occasionalmente, ptosi parziale a dosaggi maggiori, pari a 5mg/kg [76]. In un recente studio di *Russo et al.* è stata confrontata l'attività cannabinoide dei due epimeri dell'HHC nei topi. È stato dimostrato come la somministrazione intraperitoneale di 10 mg/kg di 9R-HHC riduceva l'attività motoria spontanea ed induceva catalessi, analgesia ed ipotermia. Gli stessi effetti non venivano osservati nei topi in cui era stata somministrata la dose di 9S-HHC, in quanto non mostravano alterazioni nella locomozione, né catalessi e analgesia [77]. Questi dati suggeriscono che la presenza, nei prodotti a base di HHC, di differenti concentrazioni di un epimero rispetto all'altro, comportavano un'elevata variabilità negli effetti sia ricreazionali che collaterali [71].

Per tali ragioni diversi ricercatori ritengono che lo studio della farmacocinetica e del metabolismo degli epimeri dell'HHC nell'uomo debba essere una priorità, al fine di comprendere e valutare i possibili effetti tossici.

2.3 Sintesi dell'HHC

La canapa non biosintetizza l'HHC, tuttavia modiche tracce sono state rilevate negli estratti di canapa come prodotti di degradazione del Δ^9 -THC. Per tale ragione l'HHC è stato considerato un fitocannabinoide di origine semisintetica.

L'HHC può infatti essere prodotto sia da precursori chimici ottenuti dalla canapa, sia per mezzo di sintesi totale. I principali metodi di produzione dell'HHC prevedono la riduzione diretta del Δ^9 -THC (ma anche del Δ^8 -THC) ma può anche essere prodotto a seguito di trattamento acido e successiva idrogenazione dal cannabidiolo (CBD) [78].

L'HHC viene prodotto principalmente attraverso il processo di idrogenazione del Δ^9 -THC ovvero aggiungendo l'idrogeno pressurizzato al THC presente nell'estratto di *Cannabis*, in tal modo, come prima esposto, si spezza il doppio legame del carbonio e si legano due atomi di idrogeno, creando così un olio denso chiamato "olio di cannabis idrogenato" [79].

Quando viene sintetizzato da estratti di CBD, è necessario un primo passaggio che prevede la catalisi acida con formazione di Δ^9 -THC e Δ^8 -THC e successiva idrogenazione con formazione di due epimeri 9R-HHC e 9S-HHC (Fig.17). La reazione di riduzione, al fine di accelerare e favorire il successivo processo di idrogenazione, può essere catalizzata da diverse molecole, tra cui platino, palladio iridio [80,81]; i solventi più utilizzati per l'idrogenazione, tipicamente condotta a pressione atmosferica, sono etanolo e acido acetico.

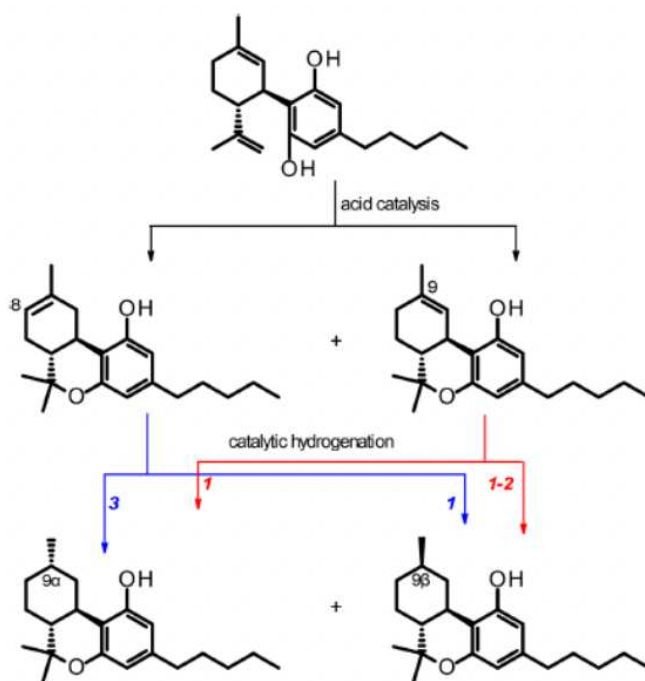


Fig.17: Schema della sintesi dell'HHC a partire dal CBD. I numeri di colore rosso e blu indicano le proporzioni approssimative degli epimeri dell'HHC prodotti dall'idrogenazione dei rispettivi isomeri del THC.

L'idrogenazione della miscela di isomeri del Δ^9 -THC fornisce gli epimeri 9R-HHC e 9S-HHC in relazione alla composizione isomerica della miscela di Δ^9 -THC iniziale ed al catalizzatore utilizzato. Ad esempio, l'idrogenazione del Δ^9 -THC utilizzando un catalizzatore al platino fornisce il 9S-HHC e il 9R-HHC in un rapporto approssimativamente di 1:2.

Di contro, l'idrogenazione del Δ^8 -THC utilizzando lo stesso catalizzatore fornisce la produzione dell'isomero 9S-HHC rispetto all'isomero 9R-HHC in rapporto 3:1 o 3:2 [82].

L'HHC semisintetico attualmente commercializzato è tipicamente una miscela degli epimeri 9S-HHC e 9R-HHC; tuttavia, l'idrogenazione su larga scala delle miscele di Δ^9 -THC o di CBD fornisce delle concentrazioni variabili dei due epimeri e pertanto sono commercializzati prodotti con percentuali tra diversi lotti [79].

CAPITOLO 3

Scopo della tesi

Le proprietà farmaco-tossicologiche e la farmacocinetica dell'HHC non sono tutt'ora note ed i soggetti che consumano HHC non sono consapevoli che tale sostanza potrebbe avere degli effetti tossici simili o addirittura maggiori del comune Δ^9 -THC. La rapida diffusione dell'HHC nel mondo, la sua somiglianza strutturale con il Δ^9 -THC, sia per quanto riguarda il *parent drug* che i suoi principali metaboliti, e i pochi dati attualmente disponibili sulla farmacocinetica, farmacodinamica, metabolismo e effetti collaterali nell'uomo, rendono essenziale uno studio completo di questa sostanza. Ad oggi, esistono pochissimi studi, alcuni dei quali *in vitro* ed altri *in vivo* su animali, sulla farmacocinetica dell'HHC e dei suoi stereoisomeri, ma nessuno di questi è stato effettuato su matrici biologiche umane.

Pertanto, l'obiettivo principale di questo lavoro è stato quello di sviluppare e validare un metodo HPLC-MS/MS per la separazione e la determinazione quantitativa dei 2 stereoisomeri dell'HHC e dei suoi metaboliti. Il secondo scopo di questo lavoro è stato quello di applicare questo metodo sviluppato e validato a campioni reali umani di sangue, urina e fluido orale al fine di studiare per la prima volta la farmacocinetica dell'HHC e dei suoi principali metaboliti nell'uomo.

CAPITOLO 4

Materiali e metodi

4.1 Sostanze chimiche e reagenti

Gli standard puri del (9R)-HHC, (9S)-HHC e dei loro metaboliti (9 β -OH-HHC, 9 α -OH-HHC, 8S-OH-9S-HHC, 8R-OH-9R-HHC, 11-OH-9S-HHC, 11-OH-9R-HHC, 11-Nor-9S-COOH-HHC, 11-Nor-9R-COOH-HHC) sono stati acquistati dall'azienda LGC Standard Ltd (Teddington, UK). THC-d₃ è stato utilizzato come standard interno deuterato (ISTD) ed è stato acquistato dall'azienda Cerilliant (Round Rock, Texas, Stati Uniti). Lo standard interno, gli standard puri e le relative soluzioni madre in metanolo, sono state conservate a -20°C fino al momento dell'analisi. È necessario specificare che per l'8-OH-HHC sono possibili altri due stereoisomeri, ovvero 8S-OH-9R-HHC e 8R-OH-9S-HHC. Tuttavia, sulla base delle nostre conoscenze, i loro standard non sono disponibili in commercio.

Acqua, metanolo, n-esano ed acetato di etile di grado LC-MS sono stati ottenuti dall'Auchem Instruments (Macerata, Italia). L'acido acetico di grado HPLC, l'ammonio formiato e l'idrossido di sodio (NaOH) sono stati acquistati dall'azienda Sigma Aldrich (Milano, Italia).

4.2 Preparazione degli standards, delle soluzioni di calibrazione e dei controlli di qualità

Due diverse aliquote (I e II) di ciascuna soluzione madre degli standard puri sono state preparate in metanolo. I calibratori sono stati preparati in metanolo a partire dall' aliquota I della soluzione madre, contenente i parent drugs e i metaboliti a 100 e 10 ng/mL rispettivamente. L' aliquota II (100 e 10 ng/mL) è stata utilizzata per preparare i controlli di qualità (QC). La soluzione madre dello standard interno deuterato è stata preparata con la stessa procedura descritta precedentemente, a concentrazioni di 100 e 1000 ng/mL e conservata in fiale di vetro a -20°C fino al momento dell'uso.

I campioni "bianchi" di sangue umano intero, urina e fluido orale sono stati forniti dal laboratorio analisi dell'Università Politecnica delle Marche (Ancona, Italia).

Sulla base di una prima analisi semiquantitativa dei campioni autentici di sangue, urina e fluido orale, sono stati preparati i seguenti calibratori: 0,25, 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5, 15, 30, 60, 120, 240 ng/mL per (9R)-

HHC e (9S)-HHC. Per i campioni di (9R)-HHC e (9S)-HHC, i QC a bassa, media e alta concentrazione contenevano rispettivamente 0,75, 96 e 192 ng/mL di analiti. Nel caso dei metaboliti dell'HHC, invece, sono stati preparati i seguenti calibratori: 1, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100 ng/mL, mentre i QC a bassa, media e alta concentrazione sono stati preparati rispettivamente a 3, 40 e 80 ng/mL.

4.3 Protocollo di somministrazione controllata di HHC

I campioni di sangue, urina e fluido orale sono stati ottenuti da 6 volontari sani (4 volontari di sesso maschile e 2 di sesso femminile di 37.0 ± 16.1 anni e 70.0 ± 10 kg). I soggetti sono stati invitati verbalmente partecipare ad un *trial* clinico.

I criteri di eleggibilità includevano l'assenza di assunzione di HHC per almeno 6 mesi, il superamento di un esame fisico generale, il consenso per analisi di laboratorio e per un elettrocardiogramma di *routine*. Tutti i soggetti hanno dato il consenso informato scritto e lo studio è stato condotto in conformità alla Dichiarazione di Helsinki e approvato dal Comitato Etico Istituzionale (IRCCS-INRCA Ancona). I soggetti hanno partecipato come pazienti ambulatoriali a una sessione sperimentale di 10 ore nella stanza dell'Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico (IRCCS-INRCA) di Ancona, attrezzata per gli studi clinici e dotata di un balcone aperto dove potevano fumare ad libitum.

Prima dell'inizio della sperimentazione, per tutti i volontari è stato eseguito uno *screening* urinario per la ricerca delle droghe d'abuso più comunemente utilizzate (oppiacei, cocaina, cannabinoidi e anfetamine), utilizzando il sistema cromatografico Dionex UltiMate 3000 accoppiato a uno spettrometro di massa Thermo Scientific (Waltham, MA, Stati Uniti) (Q Exactive - LC-HRMS/MS).

Lo screening ha dato risultati negativi in tutti i campioni analizzati.

Tutti i volontari hanno fumato 1 sigaretta contenente 25 mg di una miscela 1:1 di (9R)-HHC e (9S)-HHC miscelati con 500 mg di tabacco.

Un campione di urina è stato raccolto prima del consumo e successivamente sono stati raccolti campioni ad intervalli di 30 minuti e 1, 2, 3, 6, 12, 24 e 48 ore dopo la somministrazione. I campioni di sangue sono stati raccolti al tempo zero (prima del consumo) e 10, 20, 30 minuti e 1, 2 e 3 ore dopo

il consumo. I campioni di fluido orale sono stati raccolti prima e 10, 20, 30 e 45 minuti e 1, 1,5, 2 e 3 ore dopo la somministrazione.

4.4 Preparazione dei campioni

Per la preparazione dei campioni reali, così come per i calibratori e QC, sono state scelte due differenti procedure in base alle differenti caratteristiche del materiale biologico utilizzato.

4.4.1 Sangue e fluido orale

Per quanto riguarda i campioni di sangue e fluido orale 10 μL di standard interno (THC-d3) alla concentrazione di 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 200 μL di H_2O e 1 mL di n-esano:acetato di etile in un rapporto 9:1 (v/v) con il 10% di acido acetico, sono stati aggiunti a 100 μL di campione reale. Le provette sono state agitate con un miscelatore a rulli per 30 minuti e centrifugate a 2800 rpm per 15 minuti. Il soprannatante ottenuto è stato posto in provette pulite ed essiccato sotto flusso di azoto a 40-50°C per 30 minuti. I campioni sono stati ricostituiti in 100 μL di metanolo e trasferiti in fiale per autocampionatore, prima dell'iniezione di 1 μL nel sistema cromatografico.

4.4.2 Urina

Per i campioni di urina, 10 μL dello standard interno (THC-d3) alla concentrazione di 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 20 μL di NaOH 5M sono stati aggiunti a 100 μL di campione. I campioni sono stati poi lasciati in stufa per l'idrolisi a 70°C per 30 minuti. Quindi sono stati aggiunti 1 ml di ammonio formiato 5 M, 20 μL di acido formico (pH 4) e 3 ml di n-esano:acetato di etile 9:1 (v/v). Le provette sono state agitate con un miscelatore a rulli per 10 minuti e centrifugate a 3500 rpm per 5 minuti. Il soprannatante ottenuto è stato posto in provette pulite ed essiccato sotto flusso di azoto a temperatura ambiente per circa 30 minuti. I campioni sono stati ricostituiti in 100 μL di metanolo e trasferiti in fiale per autocampionatore, prima dell'iniezione di 1 μL nel sistema cromatografico.

4.5 Condizioni strumentali

La separazione degli analiti è stata ottenuta tramite HPLC 1290 Infinity II (Agilent Technologies Italia S.p.a.) accoppiato ad uno spettrometro di massa in tandem (6470A Triple Quadrupole LC-MS) dotato di una sorgente di ionizzazione *elettrospray* (ESI), operante in modalità ionica positiva e negativa. I dati sono stati acquisiti con il software MassHunter® Workstation Quantitative Analysis 10.0 (Agilent). In questo studio sono state esaminate differenti colonne chirali e achirali per la separazione degli epimeri HHC e dei loro metaboliti.

Le colonne esaminate sono di seguito riportate:

- Lux Amylose-2 (amylose tris(5-chloro-2-methylphenylcarbamate),
- Lux i-Amylose-3 (amylose tris(3-chloro-5-methylphenylcarbamate) (entrambe con dimensioni di 250 x 4,6 mm e impaccate con particelle da 5 µm),
- Lux AMP con un selettore chirale brevettato (dimensioni di 150 x 4,6 mm e impaccate con particelle da 3 µm),
- 2 colonne achirali (Kinetex® biphenyl e Kinetex® phenyl-hexyl) (entrambe con dimensioni di 100 x 2,1 mm e impaccate con particelle da 2,6 µm) ed infine la colonna
- Chiralpak AY-3 (amylose tris(5-chloro-2-methylphenylcarbamate) (150 x 4,6 mm e confezionata con particelle da 3 µm).

Tutte le colonne sopra menzionate, tranne la colonna Chiralpak AY-3, sono state acquistate dalla ditta Phenenetex® (Torrance, California, Stati Uniti). La colonna Chiralpak AY-3 è stata invece acquistata dalla ditta Daicel (Tokyo, Giappone). 100% di metanolo e (in alternativa) una miscela di metanolo e acqua con un rapporto 80/20 (v/v) sono state utilizzate come fase mobile per le colonne chirali. Nel caso delle colonne achirali sono state testate due diverse fasi mobili per la separazione degli HHC e dei loro metaboliti: una fase mobile composta da 100% di metanolo e una seconda fase mobile composta da una miscela di 5 mM di ammonio formiato in acqua (pH = 3) e metanolo + 0,1% di acido formico (FA).

Sulla base dei test effettuati sulle varie colonne, la separazione degli stereoisomeri dell'HHC è stata eseguita attraverso la colonna Lux i-Amylose-3 attraverso l'eluizione isocratica con metanolo al 100%. Il tempo di analisi è stato di 11 minuti. Per la separazione dei metaboliti invece si è scelto di utilizzare la colonna chirale Lux AMP con un tempo di analisi di 16 minuti e una fase di eluizione isocratica composta da metanolo e acqua in un rapporto 80/20 (v/v). Le temperature dell'autocampionatore e del forno della colonna sono state rispettivamente di 10°C e 25°C. Lo spettrometro di massa è stato utilizzato in modalità "Acquisizione multipla di ioni" (*multiple reaction monitoring* (MRM)), con due transizioni rispettivamente utilizzate come *qualifier* e come *quantifier* per ciascun analita e standard interno. (Tabella 1).

4.6 Caratterizzazione delle molecole

La validazione del metodo prevede come step preliminare la caratterizzazione delle molecole oggetto di studio. Pertanto, le suddette molecole sono state caratterizzate, sia automaticamente attraverso lo strumento "*MassHunter Optimizer*" fornito dalla ditta Agilent® e successivamente confermate manualmente. Per la caratterizzazione, 1 µl di ogni soluzione metanolica degli standard puri (*parent drug* e metaboliti) e dello standard interno (THC-d3) alla concentrazione di 100 ng/ml, è stato iniettato singolarmente nello strumento HPLC-MS/MS, aumentando la tensione del cono e l'energia di collisione. La velocità di scansione (tempo di permanenza) è stata di 0,023 secondi. Le condizioni ESI sono state ottimizzate come segue: tensione capillare 3500 V, temperatura della sorgente 300 °C, portata del gas del cono 10 L/min, portata del gas di desolvatazione 12 L/min. La caratterizzazione è stata testata sia in modalità di ionizzazione positiva che negativa. Per quanto riguarda il (9R)-HHC e il (9S)-HHC è stata scelta la modalità di ionizzazione positiva. Per i metaboliti invece la ionizzazione negativa si è rilevata la modalità migliore. Per ogni molecola di interesse è stata quindi scelta una transizione qualitativa ed una transizione quantitativa, sulla base delle abbondanze ottenute. Le transizioni scelte ed i relativi tempi di ritenzione sono riportati nella Tabella 1.

Tabella 1: Parametri di spettrometria di massa per gli analiti e lo standard interno. Modalità di ionizzazione positiva e negativa.

Analiti	Massa molecolare (g/mol)	Ione precursore (m/z)	Ione prodotto (m/z)	Tempo di ritenzione (min)	CE (eV)	ESI
THC-d₃ (Standard Interno)	317.49	318.49	196.2	2.56	25	+
			126.1		37	
9R-HHC	316.48	317.48	193.2	7.67	28	+
			123.2		40	
9S-HHC	316.48	317.48	193.2	8.56	24	+
			123.2		36	
11-Nor-9R-COOH-HHC	346.5	345.5	301.3	9.2	24	-
			191.2		37	
11-Nor-9S-COOH-HHC	346.5	345.5	327.4	13.6	24	-
			191.2		44	
11-OH-9R-HHC	332.4	331.4	301.4	10.4	28	-
			191.2		40	
11-OH-9S-HHC	332.4	331.4	301.3	12.3	32	-
			191.2		40	
8R-OH-9R-HHC	332.4	331.4	233.3	12.3	32	-
			95.1		44	
8S-OH-9S-HHC	332.4	331.4	233.3	10.6	32	-
			95.1		44	
9α-OH-HHC	332.4	331.4	313.4	14.5	28	-
			205.2		32	
9β-OH-HHC	332.4	331.4	313.3	7.6	24	-
			205.2		32	

Abbreviazioni: THC, delta-9-tetraidrocannabinolo; HHC, esaidrocannabinolo; CE, energia di collisione; ESI, ionizzazione.

4.7 Validazione del metodo

Durante tutto il processo di validazione del metodo, in conformità con le linee guida forniti dall'Organizzazione dei Comitati di Area Scientifica (OSAC) per le Scienze Forensi, USA [83] sono stati valutati: inaccuratezza, imprecisione, limite di rilevamento (LOD), limite inferiore di quantificazione (LLOQ), linearità, trascinamento, effetto matrice (ME), recupero (RE) e integrità della diluizione.

4.7.1 Linearità

Sono state preparate cinque curve di calibrazione in cinque giorni separati con 11 calibratori (0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 15, 30, 60, 120, 240 ng/mL) per gli epimeri dell'HHC e 7 calibratori (1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 ng/mL) per i metaboliti, dal limite inferiore (LLOQ) al limite superiore di quantificazione (ULOQ) calcolato mediante regressione lineare dei minimi quadrati per ciascun analita [84].

I calibratori dovevano quantificare entro $\pm 15\%$ della concentrazione target ($\pm 20\%$ per LLOQ) e il coefficiente di determinazione doveva essere superiore o uguale a 0.99. I rapporti di quantificazione/conferma dovevano essere entro $\pm 20\%$ del rapporto medio degli ioni di transizione del calibratore.

4.7.2 Limite di rilevamento e quantificazione

Il LOD è stato testato fortificando cinque diverse pool di plasma, urina e fluido orale al LLOQ e diluendo 2, 5, 10 e 20 volte con la matrice bianca. Per ciascun analita, il LOD è stato definito come la concentrazione più bassa alla quale un picco è stato eluito entro $\pm 0,1$ minuti dal tempo di ritenzione medio del calibratore con un rapporto segnale/rumore superiore o uguale a 3 per entrambe le transizioni e un rapporto di quantificazione/conferma della transizione entro $\pm 20\%$ del rapporto medio del calibratore. LLOQ è stato testato fortificando cinque diverse fonti di matrice "blank". Per ciascun analita, il tempo di ritenzione LLOQ doveva essere entro $\pm 0,1$ minuti dal tempo di ritenzione medio del calibratore e quantificato entro $\pm 20\%$ della concentrazione *target*. Inoltre, i rapporti di transizione di quantificazione/conferma dovevano essere entro $\pm 20\%$ del rapporto medio del calibratore.

4.7.3 Trascinamento e interferenze

L'assenza di trascinamento è stata verificata analizzando un campione bianco fortificato con gli analiti ad una concentrazione maggiore di 5 volte l'ULOQ, seguito da un campione negativo. Se nessun picco veniva eluito entro $\pm 0,1$ minuti dal tempo di ritenzione medio del calibratore, con un rapporto segnale/rumore maggiore di 3 nei campioni negativi, il trascinamento era insignificante.

Per determinare le interferenze della matrice sono stati utilizzati cinque diversi campioni bianchi di sangue, urina e fluido orale. Le interferenze erano trascurabili se nessun picco veniva eluito entro $\pm 0,1$ minuti dal tempo di ritenzione medio del calibratore con un rapporto segnale/rumore superiore a 3. Inoltre, la matrice vuota è stata testata per potenziali interferenze di farmaci provenienti da fonti esterne. Per questo, i campioni di matrice fortificata sono stati arricchiti con altri cannabinoidi: 7-idrossicannabidiolo (7-OH-CBD), 7-carbossicannabidiolo (7-COOH-CBD), 6alfa-idrossicannabidiolo (6- α -OH-CBD), 6beta -idrossicannabidiolo (6- β -OH-CBD), 11-idrossi-tetraidrocannabinolo (11-OH-THC) e 11-Nor-9-carbossi- Δ^9 -tetraidrocannabinolo (THC-COOH) in 3 diverse concentrazioni (10, 50 e 100 ng/mL). Nessun rapporto segnale/rumore maggiore di 3 a $\pm 0,1$ min del periodo di ritenzione degli analiti (che variava da 4.55 a 6.32 min per la colonna i-amilosio-3 e da 3.2 a 5.35 min per la colonna Lux-AMP) negli ioni quantitativi e qualitativi era il requisito per l'accettabilità.

4.7.4 Integrità e stabilità della diluizione

L'integrità della diluizione è stata valutata in 5 repliche fortificando il campione di sangue bianco con analiti a 2 volte l'ULOQ. I campioni sono stati diluiti 2, 5, 10 e 20 volte in campioni bianchi prima dell'analisi e dovevano essere quantificati entro $\pm 20\%$ della concentrazione target con un rapporto di transizione di quantificazione/conferma entro $\pm 20\%$ del rapporto medio del calibratore.

La stabilità dell'analita è stata valutata in tutte le matrici biologiche a temperatura ambiente e a $+4^\circ\text{C}$ per 24 ore, dopo 3 cicli di congelamento/scongelamento (-20°C), e nel solvente di ricostituzione LC 24 ore dopo l'estrazione e la conservazione nell'autocampionatore ($+10^\circ\text{C}$). Gli standard interni sono stati aggiunti immediatamente prima dell'estrazione. La stabilità è stata valutata in 4 repliche alle concentrazioni QC1, QC2 e QC3. I campioni a temperatura ambiente e i campioni refrigerati sono

stati analizzati dopo 24 ore. Gli analiti sono stati considerati stabili se le concentrazioni osservate rientravano nel $\pm 20\%$ della concentrazione target con un rapporto di transizione di quantificazione/conferma entro $\pm 20\%$ del rapporto medio del calibratore del *target*. La stabilità dei campioni trattati è stata misurata estraendo campioni con QC basso e alto (n=3), combinando campioni ricostituiti, dividendoli in diverse fiale di autocampionatore e analizzandoli immediatamente sullo strumento. Le fiale con i campioni estratti sono rimaste sull'autocampionatore (4°C) e sono state re-iniettate dopo 24 ore. Infine, la stabilità a medio termine è stata valutata rianalizzando 3 replicati alle concentrazioni QC1, QC2 e QC3 dopo 1 settimana dalla preparazione e conservazione dei campioni QC a -20°C.

4.7.5 Effetto matrice e recupero

Al fine di valutare l'effetto causato dalla matrice biologica ed il conseguente recupero delle sostanze in esame sono stati utilizzati campioni bianchi di sangue, urina e fluido orale provenienti da 5 diversi volontari, fortificati con gli analiti di interesse, alle concentrazioni QC1, QC2 e QC3.

Seguendo le linee guida riportate da B.K. Matuszewski et al. [85] sono stati preparati tre tipologie di campioni per ogni matrice biologica sotto esame: un campione pre-QC (A) fortificato con gli analiti prima dell'estrazione, un campione post-QC (B) estratto e fortificato con gli analiti immediatamente prima dell'evaporazione, ed infine un campione *neat* (C) ovvero senza matrice, ottenuto fortificando il solvente di ricostituzione LC con gli analiti di interesse. Per ciascun analita, la soppressione o il potenziamento ionico è stato calcolato dividendo l'area media del picco ottenuto per il campione A per l'area media del picco ottenuta dal campione B e l'area media del picco del campione B per l'area media del picco del campione C, meno 1.

Tutti gli analiti sotto esame dovevano essere quantificati entro $\pm 20\%$ della concentrazione *target*, in ogni matrice biologica. L'accuratezza e l'imprecisione sono state calcolate per ciascun tipo di matrice alle concentrazioni di QC. I criteri accettabili erano $\pm 30\%$ del target e 20% CV (Coefficiente di Variazione) rispettivamente per l'accuratezza e l'imprecisione.

CAPITOLO 5

Risultati

5.1 Sviluppo del metodo

Per la separazione e la determinazione quantitativa degli epimeri dell'HHC e dei suoi principali metaboliti commercialmente disponibili, sono state testate quattro colonne chirali a base polisaccaridica (Lux Amylose-2, Lux i-Amylose-3, Lux AMP e Chiralpak AY-3) e due colonne achirali (Kinetex® biphenyl e Kinetex® phenyl-hexyl). Le colonne sono state testate sia in metanolo puro che in differenti combinazioni di 0,1% di acido formico in metanolo (fase mobile A) e 5 mM di ammonio formiato in acqua (fase mobile B).

La colonna chirale Lux i-Amylose3 in combinazione con metanolo puro alla portata di 0.5 ml/min, si è rivelata la migliore condizione cromatografica per la separazione degli epimeri dell'HHC, permettendo la completa separazione del 9R-HHC e del 9S-HHC in tutte le matrici biologiche, con tempi di ritenzione di 7.58 e 8.05 rispettivamente (Fig. 18).

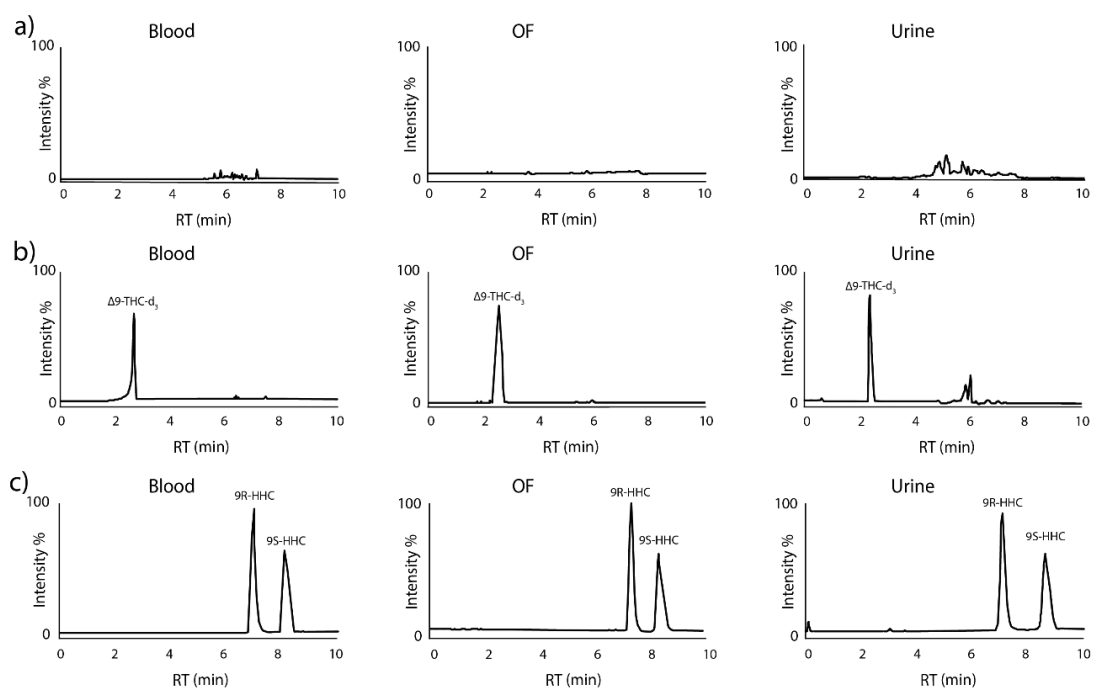


Fig.18: Cromatogrammi HPLC-MS/MS di: (a) campioni "bianchi", (b) campioni negativi di sangue, fluido orale e urina (c) campioni di sangue "bianchi", fluido orale e urina fortificati con una miscela 1:1 di 9R- and 9S-HHC al limite di quantificazione .

Nel caso dei metaboliti, invece, la colonna chirale Lux i-Amylose-3 non ha mostrato una separazione promettente degli epimeri. Si è deciso quindi di utilizzare la colonna Lux AMP, che aveva mostrato risultati deludenti nel caso degli epimeri dell'HHC. La colonna chirale Lux AMP è stata testata in diverse combinazioni di fase mobile A e fase mobile B (descritte precedentemente). L'eluizione isocratica di metanolo e acqua in un rapporto 80/20 (v/v) si è rivelata la condizione cromatografica ottimale per la migliore separazione di tutti i metaboliti dell'HHC, con una portata di 0.5 ml/min ed un tempo totale di esecuzione cromatografica di 15 minuti (Fig.19).

In queste condizioni cromatografiche è stata possibile la rilevazione di 6 picchi su 8 analiti totali in quanto alcuni di questi erano completamente sovrapposti. In particolare osservando sia il TIC (Total Ion Current = corrente ionica totale) in Figura 18 che i cromatogrammi in modalità MRM (Multiple Reaction Monitoring = monitoraggio a reazione multipla) in Figura 19, è possibile notare la completa sovrapposizione del metabolita 11-OH-9R-HHC con il metabolita 8S-OH-9S-HHC e del metabolita 8R-OH-9R-HHC con l'11-OH-9S-HHC. La completa sovrapposizione di questi metaboliti non ha rappresentato un problema in termini di identificazione e quantificazione in quanto, come accennato in precedenza, è stato possibile l'utilizzo della modalità MRM (Fig. 20).

Sulla base di questi risultati possiamo affermare che è stato sviluppato un metodo HPLC-MS/MS per la determinazione quantitativa degli epimeri 9R-HHC e 9S-HHC e dei loro metaboliti commercialmente disponibili.

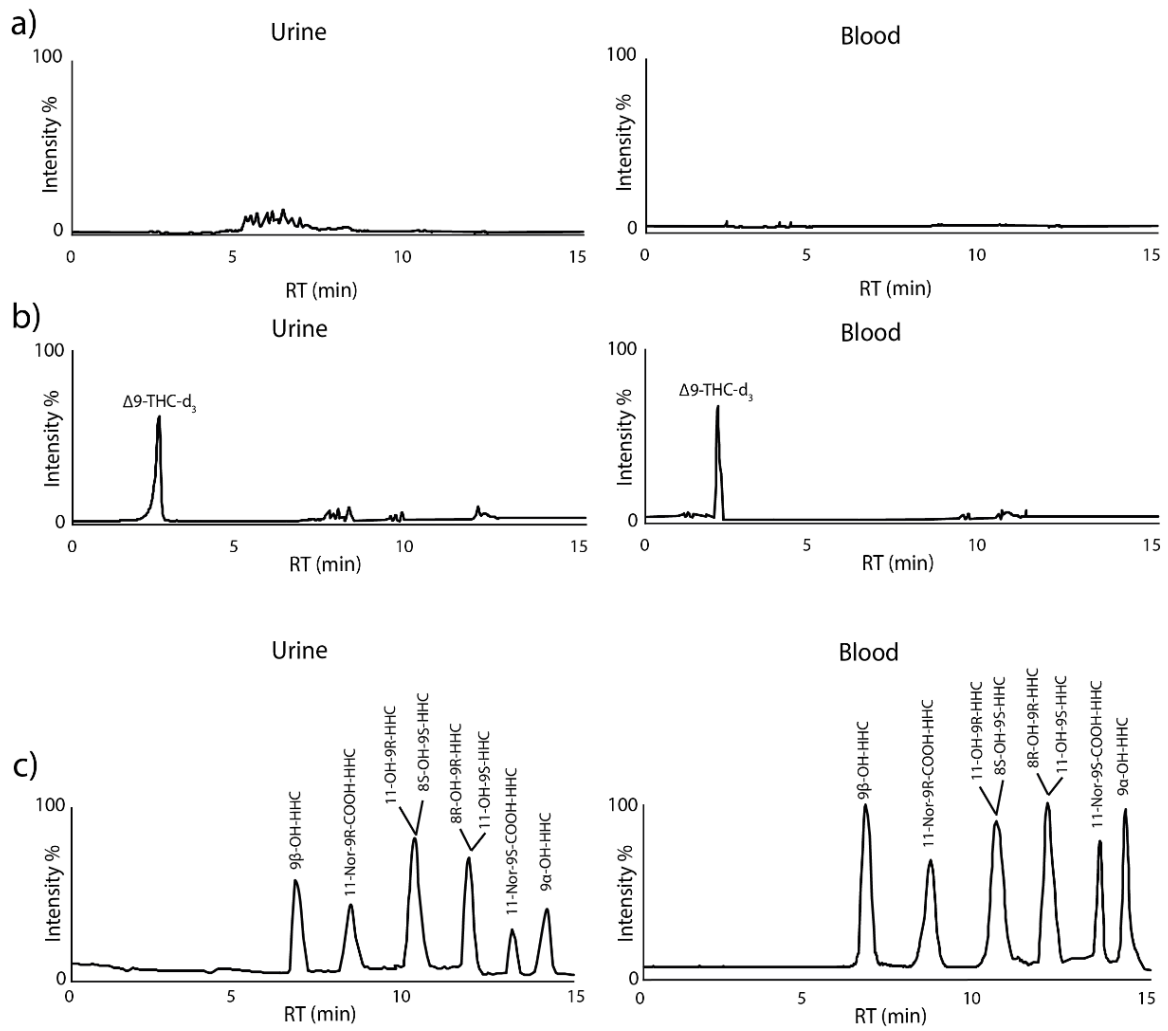


Fig. 19: Cromatogrammi HPLC-MS/MS di campioni di urina e sangue in "bianco" (a) e negativi (b). Campioni di di urina e sangue in "bianco" addizionati con un miscela 1:1 di metaboliti HHC al limite di quantificazione (c).

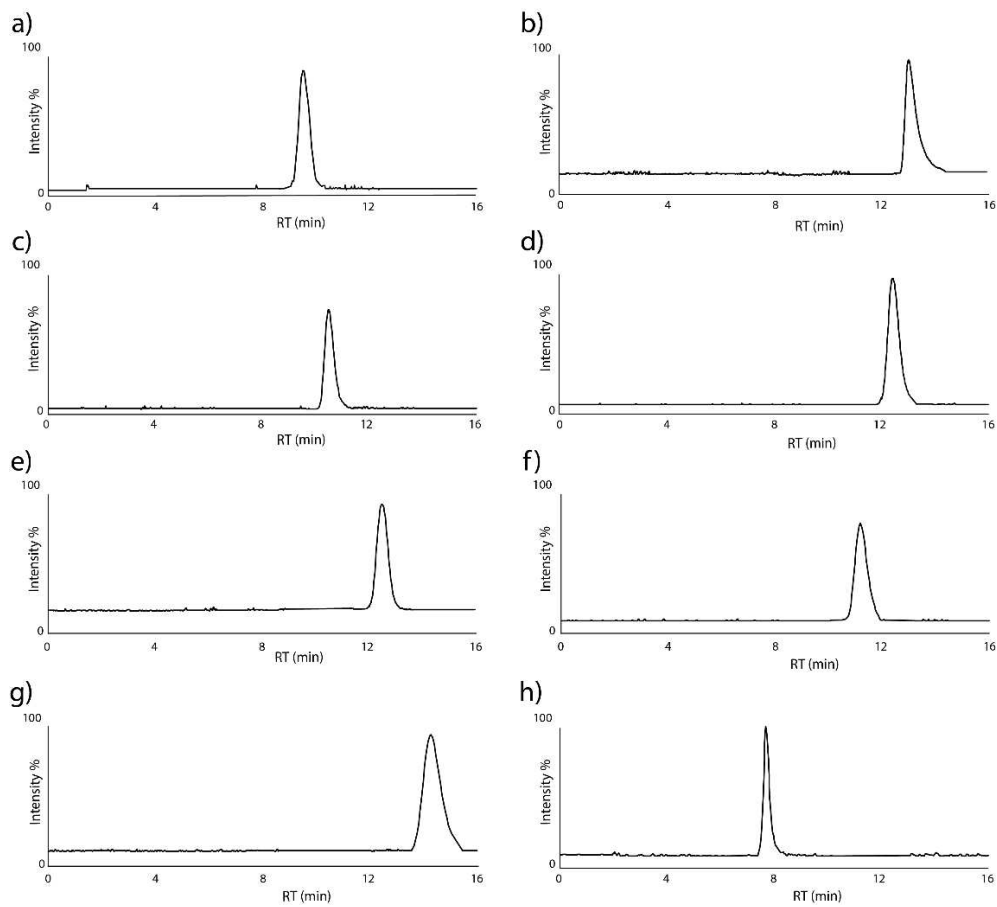


Fig. 20: Transizioni m/z dei metaboliti dell'HHC modalità ionizzazione negativa: a) 11-Nor-9R-COOH-HHC, b) 11-Nor-9S-COOH-HHC, c) 11-OH-9R-HHC, d) 11-OH-9S-HHC, e) 8R-OH-9R-HHC, f) 8S-OH-9S-HHC, g) 9 α -OH-HHC, h) 9 β -OH-HHC.

5.2 Validazione del metodo

Il metodo analitico sviluppato HPLC-MS/MS è stato validato in tutte le matrici biologiche umane sopra menzionate, per 5 giorni consecutivi, seguendo i più recenti criteri per lo sviluppo e la validazione del metodo bioanalitico [83]. Il modello di calibrazione più adatto si è rivelato un modello di regressione lineare dei minimi quadrati con ponderazione $1/x^2$, come confermato dai coefficienti del test di Mandel (valore p e F_{crit} 95%) [84]. Tutti i risultati dei coefficienti di determinazione erano maggiori o uguali a 0.99, come dimostrato dalle curve di calibrazione mostrate nelle Figure supplementari S1, S2 e S3 e nella Tabella 3 che riporta i parametri di validazione nel sangue intero, nelle urine e nel fluido orale.

Sono state costruite curve di calibrazione separate per gli stereoisomeri HHC nell'intervallo di concentrazione di 0,25-240 ng/ml nel sangue, nelle urine e nel fluido orale. Anche per i metaboliti sono state costruite curve di calibrazione separate e nell'intervallo di concentrazione di 1-100 ng/ml nelle urine e 2,5-100 nel sangue. Il limite inferiore di quantificazione (LLOQ) è stato impostato come il calibratore diverso da zero più basso per ciascun analita. Il LLOQ era 0,25 ng/mL in tutte le matrici biologiche per gli epimeri HHC, mentre per i suoi metaboliti è risultato pari a 1 ng/mL e 2,5 ng/mL nelle urine e nel sangue, rispettivamente. L'accuratezza e l'imprecisione sono state calcolate alle seguenti tre concentrazioni di QC ($n = 3$): 0,75, 96 e 192 ng/ml per 9R e 9S HHC. Per i metaboliti dell'HHC le concentrazioni del QC erano 3, 40 e 80 ng/ml nelle urine e 7,5, 40 e 80 ng/mL nei campioni di sangue. Il *bias* era <20% del target. L'approccio ANOVA definito dalle linee guida OSAC [83] ha determinato l'imprecisione complessiva *intra* e *inter* analisi e tutti i valori CV sono risultati inferiori al 20%, come mostrato nella Tabella 3. Non è stato osservato alcun trascinarsi (*carry-over*) con nessuno degli analiti in esame e non sono stati riscontrati picchi interferenti in nessuna delle matrici biologiche analizzate. L'integrità della diluizione è stata valutata estraendo campioni di sangue, urina e fluido orale con concentrazioni pari a due volte l'ULOQ e diluendo i campioni 2, 5, 10 e 20 volte in campioni bianchi di sangue, urina e fluido orale. Le concentrazioni delle repliche ($n = 5$) per i campioni diluiti rientravano nel $\pm 20\%$ del target per tutti i composti. La

stabilità del composto nel sangue, nelle urine e nel fluido orale è stata valutata mediante analisi ripetute di cinque replicati dei tre campioni QC. Tutti gli analiti sono risultati stabili a temperatura ambiente, a 4 °C, nel campionatore automatico (+10 °C) e a -20 °C per 24 ore, dopo tre cicli di congelamento/scongelo e, se conservati a -20 °C, fino a una settimana dopo la preparazione del campione QC (differenze di concentrazione inferiori al 20% rispetto al tempo zero di risposta).

Il metodo sviluppato ha raggiunto una buona selettività e specificità e consentono la quantificazione di 9R-HHC e 9S-HHC e dei suoi metaboliti, dopo una preparazione del campione di circa 1 ora, utilizzando un volume di campione basso (100 µL). Questi risultati dimostrano l'applicabilità del metodo validato per le analisi di routine in un laboratorio ad alta produttività.

Gli effetti della matrice sono stati valutati rispettivamente a dosi basse (0.75 ng/mL), medie (96 ng/mL) e alte (192 ng/mL) per gli epimeri HHC in tutte le matrici biologiche, mentre per i metaboliti sono stati valutati a 3, 40 e 80 ng/mL nelle urine e a 7,5, 40 e 80 ng/mL nel sangue. Le concentrazioni e il metodo di aggiunta post-estrazione hanno determinato la soppressione della ionizzazione (valore negativo) o il potenziamento della ionizzazione (valore positivo) entro $\pm 20\%$ per tutti gli analiti, in tutte le matrici biologiche testate (Tabella 3).

Tabella 3: Parametri del metodo di valutazione mandel's fitting test (p-value and Fcrit 95%) per gli analiti in esame.

Matrice	Analita	Range di linearità ng/mL	r ²	p-value	F _{crit95%}	LOD ng/mL	LOQ ng/mL	QC ng/mL			Accuratezza ng/mL			Precisione intra-day CV (%)			Precisione inter-day CV (%)			Recupero (%)			Effetto matrice (%)		
								L	M	H	L	M	H	L	M	H	L	M	H	L	M	H	L	M	H
Urine	9R-HHC	0.25-240	0.9983	0.125	0.500	0.1	0.25	0.75	96	192	101	98.8	117	1.8	1.9	2.9	3.6	3.9	7.1	103	98	96	5.2	-3.2	-6.1
	9S-HHC	0.25-240	0.9996	0.321	0.456	0.1	0.25	0.75	96	192	108	105	101	2.5	4.0	6.1	3.7	5.9	1.1	119	102	105	7.3	-4.0	-8.5
	11-Nor-9R-COOH-HHC	1-100	0.9995	0.552	0.128	0.5	1	3	40	80	93.0	93.5	98.6	1.7	3.9	1.7	2.2	4.6	2.2	113	102	103	1.5	-1.8	1.2
	11-Nor-9S-COOH-HHC	1-100	0.9992	0.125	0.046	0.5	1	3	40	80	113	96.7	105	1.4	6.5	3.8	3.3	5.8	3.7	99.1	104	94.2	0.5	2.5	-7.0
	11-OH-9R-HHC	1-100	0.9947	0.032	0.036	0.5	1	3	40	80	110	98.8	117	2.7	6.5	3.8	3.3	5.9	3.9	101	102	96	5.2	-2.1	1.6
	11-OH-9S-HHC	1-100	0.9921	0.249	0.134	0.5	1	3	40	80	102	96.5	101	2.5	4.0	6.1	2.1	7.1	2.2	111	105	107	3.1	-6.0	0.6
	8R-OH-9R-HHC	1-100	0.9953	0.665	0.168	0.5	1	3	40	80	109	113	95.3	2.4	4.1	5.9	1.2	6.7	3.8	106	97.3	113	4.0	5.1	4.7
	8R-OH-9S-HHC	1-100	0.9986	0.741	0.096	0.5	1	3	40	80	108	105	101	1.3	2.1	1.9	3.6	7.1	3.2	103	103	107	3.1	-6.0	0.6
	9α-OH-HHC	1-100	0.9953	0.215	0.0875	0.5	1	3	40	80	120	95.8	117	1.4	3.5	5.0	3.7	5.9	3.9	112	103	96	7.3	-5.2	1.9
	9β-OH-HHC	1-100	0.9923	0.857	0.365	0.5	1	3	40	80	108	106	98.4	3.8	4.6	3.8	7.1	6.5	2.5	107	95.9	98	8.1	2.9	-1.6
Fluido Orale	9R-HHC	0.25-240	0.9983	0.256	0.325	0.1	0.25	0.75	96	192	99.2	93.9	112	1.9	5.8	0.9	3.0	5.7	2.7	119	102	99.4	-4.0	-2.1	-3.8
	9S-HHC	0.25-240	0.9993	0.152	0.485	0.1	0.25	0.75	96	192	105	101	103	2.2	4.6	2.2	6.5	3.8	3.3	112	93.8	107	2.5	4.0	6.1
Sangue	9R-HHC	0.25-240	0.9993	0.752	0.695	0.1	0.25	0.75	96	192	98.2	94.6	91.8	6.1	1.7	3.3	6.7	3.9	1.9	105	97.4	109	-5.7	2.9	3.4
	9S-HHC	0.25-240	0.9994	0.365	0.785	0.1	0.25	0.75	96	192	98.2	94.2	94.8	1.8	1.9	2.9	4.7	3.2	1.7	101	98	103	2.4	-2.5	3.2
	11-Nor-9R-COOH-HHC	2.5-100	0.9998	0.737	0.763	1	2.5	7.5	40	80	107	104	98	5.4	4.0	9.7	0.6	7.1	1.1	109	101	97.4	6.4	2.4	6.1
	11-Nor-9S-COOH-HHC	2.5-100	0.9955	0.514	0.148	1	2.5	7.5	40	80	93.6	93.5	102	3.7	2.5	8.0	2.7	5.5	0.7	106	93.9	98	9.9	1.7	-8.5
	11-OH-9R-HHC	2.5-100	0.9939	0.852	0.047	1	2.5	7.5	40	80	98.7	105	102	7.8	3.7	1.2	0.2	1.2	9.6	107	106	96	1.2	-4.2	1.2
	11-OH-9S-HHC	2.5-100	0.9945	0.366	0.165	1	2.5	7.5	40	80	98.1	114	104	0.5	2.4	6.0	1.9	7.1	0.8	93.8	105	10	9.8	7.9	7.4
	8R-OH-9R-HHC	2.5-100	0.9996	0.037	0.034	1	2.5	7.5	40	80	99.6	103	102	5.6	2.8	1.6	1.6	1.3	9.4	102	114	103	7.4	6.5	1.6
	8R-OH-9S-HHC	2.5-100	0.9987	0.492	0.068	1	2.5	7.5	40	80	104	109	97.3	3.1	6.7	0.6	8.1	0.6	1.4	106.1	94.1	94.1	9.0	3.4	0.1
	9α-OH-HHC	2.5-100	0.9983	0.785	0.096	1	2.5	7.5	40	80	105	112	103	4.3	5.1	1.5	6.0	4.8	0.9	115	99.8	96.8	4.7	-4.0	7.5
	9β-OH-HHC	2.5-100	0.9993	0.241	0.597	1	2.5	7.5	40	80	106	92.9	103	8.4	2.9	8.5	3.4	0.6	8.3	110	93.5	106	8.3	4.4	0.6

Abbreviazioni: LOD, Limite di detenzione; LOQ, Limite di quantificazione; L, Controllo di qualità basso; M, Controllo di qualità medio; H, Controllo di qualità alto; CV, coefficiente di variazione.

5.3 Applicazione del metodo a campioni reali

Come già detto in precedenza il secondo scopo di questo studio è stato quello di applicare il metodo sviluppato e validato a campioni reali umani di sangue, urina e fluido orale, al fine di dimostrare l' idoneità del metodo e soprattutto al fine di studiare per la prima volta la farmacocinetica degli epimeri dell'HHC e dei suoi principali metaboliti nell'uomo.

Tutti i partecipanti reclutati, 4 maschi e 2 donne, hanno completato lo studio.

I soggetti di sesso maschile avevano un'età media di $35,7 \pm 7,8$ anni (range 26-45 anni), peso medio di $81,7 \pm 5,3$ kg (range 75-87 kg) e altezza media di $182,0 \pm 1,8$ cm (range 180-184 cm). Mentre le 2 femmine presentavano un'età media di $27,0 \pm 0,0$ anni (range 27 anni); peso medio di $69,5 \pm 9,5$ kg (range 60-79 kg) e altezza media di $167,7 \pm 1,1$ cm (range 167-169 cm). Sebbene tutti i soggetti avessero una storia di uso occasionale di cannabis e/o cannabis light almeno una volta nella vita, nessuno di loro è un consumatore regolare di cannabinoidi, come confermato dallo screening tossicologico effettuato prima dello studio. Per quanto riguarda le abitudini di fumo e il consumo di alcol, tutti i partecipanti erano consumatori sociali di alcol, mentre il 50% dei partecipanti fumava regolarmente tabacco, anche in associazione al consumo di alcol.

Ai soggetti è stato chiesto di fumare una sigaretta intera arrotolata manualmente con 500 mg di tabacco e 25 mg di estratto puro di HHC, composto da 9(R)-HHC:9(S)-HHC in un rapporto 1:1, v:v.

La raccolta dei campioni biologici di sangue, urina e fluido orale è iniziata dopo che i soggetti avevano terminato la sigaretta.

L'eguale contenuto di entrambi gli epimeri HHC nella miscela somministrata è stato dimostrato tramite una semplice estrazione in metanolo e analisi del soprannatante mediante HPLC-MS/MS utilizzando il metodo precedentemente validato (colonna Lux i-Amylose-3 e metanolo puro come fase mobile). Come mostrato nella Figura 21 i picchi dei due stereoisomeri presentano la stessa area, dimostrando che la miscela utilizzata per il trial clinico conteneva i due epimeri in un rapporto di 1:1.

L'utilizzo di una miscela racemica dei due epimeri è fondamentale al fine di dimostrare che qualsiasi differenza di concentrazione tra il 9R-HHC ed il 9S-HHC, così come qualsiasi differenza tra gli

epimeri dei metaboliti, non è derivata da una diversa concentrazione assunta ma dipende esclusivamente dal metabolismo stereoselettivo che potrebbe avvenire nel corpo umano.

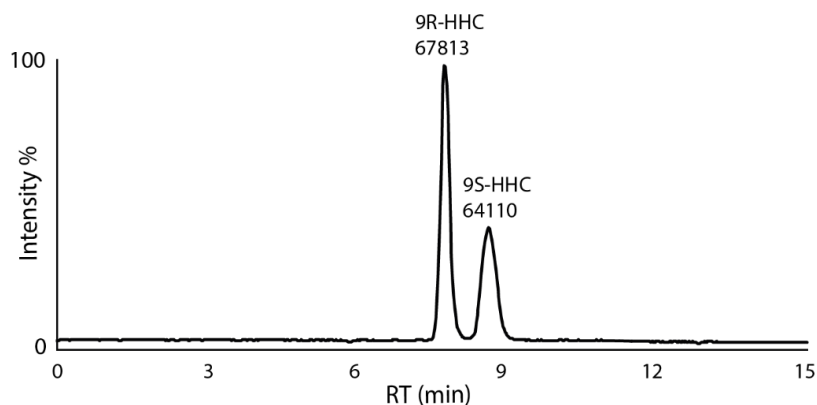


Fig. 21: Separazione degli epimeri HHC estratti da una miscela di resina di HHC e tabacco mediante colonna Lux i-Amylose-3.

Sebbene il comportamento delle colonne chirali selezionate (Lux i-Amylose-3 e Lux AMP) sia abbastanza complementare, nessuna delle due colonne è stata in grado di separare tutte le coppie di stereoisomeri in un'unica corsa cromatografica. Pertanto, si è deciso di studiare la separazione degli epimeri HHC e degli epimeri dei loro metaboliti in campioni reali utilizzando due colonne chirali alternative. I cromatogrammi della separazione degli epimeri HHC e dei suoi metaboliti in campioni umani reali sono riportati nella Figura 22.

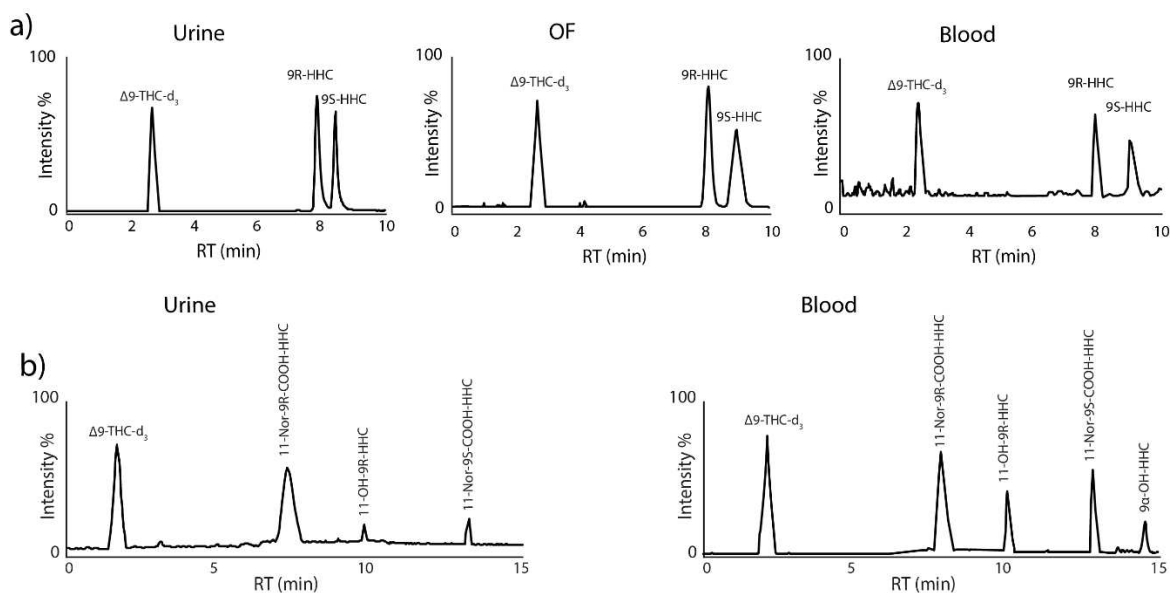


Fig. 22: Cromatogrammi della separazione degli epimeri HHC (a) e loro metabolite (b) in campioni biologici umani di urine, fluido orale e sangue.

5.3.1 Dati farmacocinetici

Gli intervalli delle concentrazioni di 9R-HHC e 9S-HHC nel sangue sono risultati rispettivamente 2,8-25,7 e 2,2-11,1 ng/mL. La massima concentrazione (C_{max}) media riscontrata per il 9R-HHC nei campioni reali di sangue è risultata pari a 7,9 ng/mL e viene raggiunta intorno a 10 minuti dopo la somministrazione (T_{max}). Per quanto riguarda il 9S-HHC la C_{max} media è risultata pari a 2,3 ng/mL, raggiunta dopo 1 ora post somministrazione. In ogni campione di sangue prelevato il 9R-HHC è stato riscontrato a concentrazioni maggiori rispetto al suo epimero indicando un metabolismo stereoselettivo per l'HHC. Ne consegue che anche l'area sotto la curva concentrazione-tempo (AUC_{0-3}) differisce per gli epimeri, essendo più alta per il 9(R)-HHC. Seguendo il profilo delle concentrazioni, anche la $T_{1/2}$ (emivita) e la C_{last} (ultima concentrazione quantificabile nel campione dopo 3 ore dalla somministrazione) sono risultate diverse per i due epimeri dell'HHC. L'emivita degli analiti nel sangue è risultata infatti 1,3 ($\pm 10,8$, SD) ore e 1.6 ($\pm 2,0$, SD) ore circa per 9R- e 9S-HHC rispettivamente, indicando che il 9(S)-HHC viene eliminato più rapidamente dal corpo rispetto al suo epimero. L'ultima concentrazione quantificabile riscontrata nei campioni prelevati dopo 3 ore dalla somministrazione risulta circa 2,2 e 0,2 ng/mL rispettivamente per il 9(S)-HHC ed il 9(R)-HHC.

Il decorso temporale delle concentrazioni medie di 9(R)-HHC e 9(S)-HHC nel sangue è riportato in Figura 23.

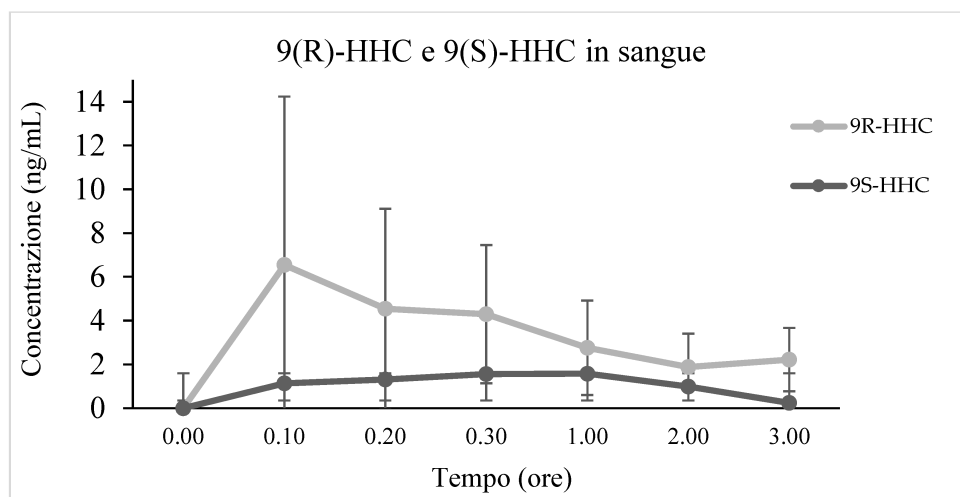


Fig. 23: Decorso temporale delle concentrazioni medie di 9(R)-HHC e 9(S)-HHC nel sangue dopo la somministrazione di 25 mg di una miscela di 9(R)-HHC:9(S)-HHC 1:1, v:v in 500 mg di tabacco.

Per quanto riguarda i campioni biologici di urine, entrambi gli epimeri HHC sono stati escreti fino a 48 ore come coniugati dell'acido glucuronico. Come mostrato nella Figura 24, il 9(R)-HHC è stato significativamente l'epimero HHC più escreti nelle urine di 6 ore (2737 ng totali), con un accumulo simile tra 0-2 e 2-6 ore. Invece, la quantità totale di 9(S)-HHC escreti nelle urine di 6h è di 715 ng/mL, con una variazione significativa tra i due intervalli di tempo considerati.

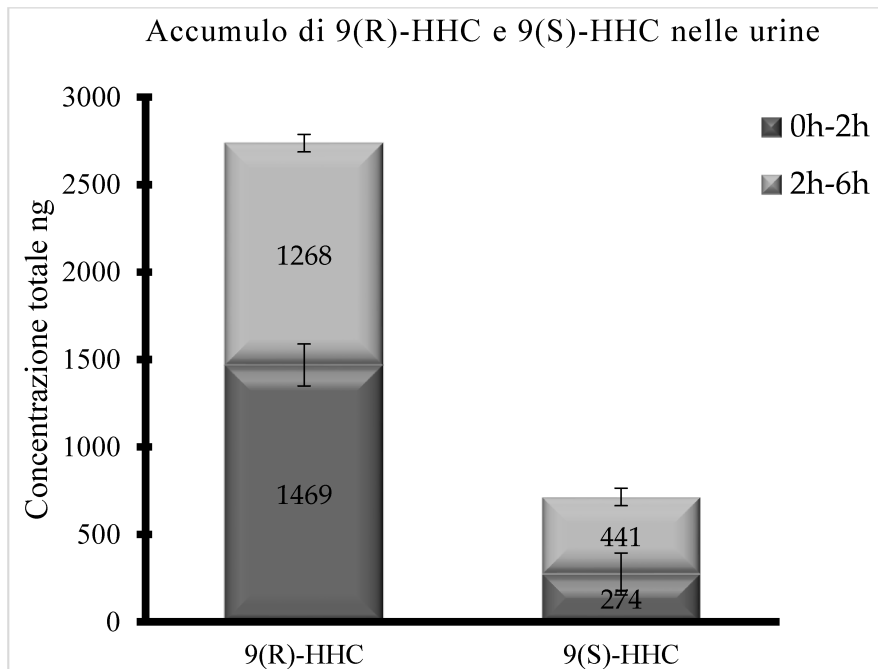


Fig. 24: Accumulo totale (ng) del 9(R)-HHC e 9(S)-HHC tra 0-2 ore e 2-6 ore dopo la somministrazione di 25 mg di una miscela contenente 9(R)-HHC:9(S)-HHC 1:1, v:v in 500 mg di tabacco.

Il decorso temporale delle concentrazioni medie di 9(R)-HHC e 9(S)-HHC nel fluido orale è mostrato in Figura 25.

Come nel sangue, la concentrazione di 9(R)-HHC è risultata superiore a quella di 9(S)-HHC in tutti i campioni di fluido orale, con una C_{max} media di 62,9 e 24,4 rispettivamente ed un intervallo di concentrazione di 0,2-110,8 e 1,9-85,1 ng/mL rispettivamente per 9R- e 9S-HHC. Dalle concentrazioni più elevate del 9(R)-HHC ne consegue una AUC_{0-3} maggiore di quella di 9(S)-HHC indicando ancora una volta un metabolismo enantioselettivo. Tuttavia, i tempi di picco dei due epimeri sono comparabili (circa 45 minuti). Entrambi gli epimeri possono essere ancora quantificati nei campioni prelevati 3 ore dopo la somministrazione con concentrazioni di 12,6 e 7,5 ng/mL per 9R- e 9S-HHC rispettivamente.

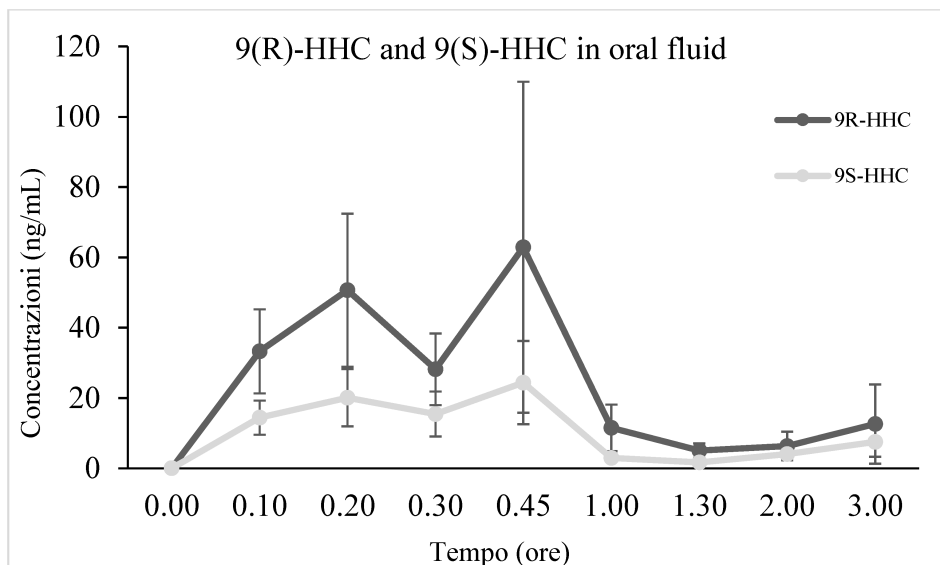


Fig. 25: Decorso temporale delle concentrazioni medie di 9(R)-HHC e 9(S)-HHC nel fluido orale dopo la somministrazione di 25 mg di una miscela di 9(R)-HHC:9(S)-HHC 1:1, v:v in 500 mg di tabacco.

Nel caso dei metaboliti dell'HHC è stato possibile rilevare e quantificare solo 4 metaboliti su 8 totali nei campioni reali di urina. I metaboliti rilevati erano 11-Nor-9R-COOH-HHC, 11-Nor-9S-COOH-HHC, 11-OH-9R-HHC e 9 α -OH-HHC, con 11-Nor-9R-COOH-HHC che rappresentava il metabolita più abbondante, raggiungendo la massima concentrazione di 18,59 ng/mL, e il 9 α -OH-HHC come metabolita con la concentrazione più bassa (2,24 ng/mL). Per gli altri metaboliti (11-Nor-9S-COOH-HHC e 11-OH-9R-HHC) le concentrazioni massime sono risultate rispettivamente 6,04 ng/ml e 3,51 ng/ml. La T_{max} per tutti i metaboliti riscontrati e quantificati nelle urine è risultata intorno alle 5 ore post somministrazione, con un $range$ di $T_{1/2}$ di 9,26-17,70 ore. 48 ore dopo la somministrazione è stato ancora possibile quantificare tutti e 4 i metaboliti che mostravano un $range$ di concentrazioni di 0,56- 4,61 ng/mL.

Solo 3 metaboliti su 8 sono stati rilevati nei campioni di sangue reali, ovvero l'11-Nor-9R-COOH-HHC, l'11-Nor-9S-COOH-HHC e l'11-OH-9R-HHC. Solo la rilevazione è stata possibile per i metaboliti 11-Nor-9S-COOH-HHC e 11-OH-9R-HHC in quanto le loro concentrazioni sono risultate inferiori al limite di quantificazione (< 2,5 ng/mL). Al contrario sono state possibili sia la rilevazione che la quantificazione per il metabolita 11-Nor-9R-COOH-HHC, la cui concentrazione massima

risultava 11,6 ng/mL riscontrata 1 ora dopo la somministrazione. I metaboliti 8-OH dell'HHC non sono stati rilevati in nessuno dei fluidi biologici studiati.

Tutti i dati farmacocinetici relativi ai metaboliti dell'HHC nei campioni biologici umani sono mostrati nelle Tabelle 4 e 5.

Tabella 4: Dati farmacocinetici per i metaboliti del 9R- ed il 9S-HHC nei campioni di urina.

URINE			
Metaboliti	T max, ore	11-NOR-9R-HHC	5.33
		11-NOR-9S-HHC	5.50
		11-OH-9R-HHC	3.17
		9 α -OH-HHC	5.50
	Cmax, ng/ml	11-NOR-9R-HHC	23.84
		11-NOR-9S-HHC	6.23
		11-OH-9R-HHC	4.99
		9 α -OH-HHC	2.68
	Clast, ng/ml	11-NOR-9R-HHC	4.61
		11-NOR-9S-HHC	1.14
		11-OH-9R-HHC	0.56
		9 α -OH-HHC	0.78
	T1/2, ore	11-NOR-9R-HHC	10.97
		11-NOR-9S-HHC	10.59
		11-OH-9R-HHC	9.26
		9 α -OH-HHC	17.70
	AUC, ore \times ng/mL	11-NOR-9R-HHC	546.28
		11-NOR-9S-HHC	137.05
		11-OH-9R-HHC	78.45
		9 α -OH-HHC	65.38

Abbreviazioni: HHC, esaidrocannabinolo; T_{max}, tempo in cui viene raggiunta la massima concentrazione; C_{max}, massima concentrazione riscontrata; C_{last}, ultima concentrazione quantificabile; T_{1/2}, emivita; AUC, area sottesa alla curva.

Tabella 5: Dati farmacocinetici per il metabolita 11-NOR-9R-HHC nei campioni di sangue.

Sangue		
11-NOR-9R-HHC	Tmax, ore	0.65
	Cmax, ng/ml	8.99
	Clast, ng/ml	0.89
	T1/2, ore	9.00
	AUC, ore × ng/mL	13.44

Abbreviazioni: HHC, *esaidrocannabinolo*; Tmax, tempo in cui viene raggiunta la massima concentrazione; Cmax, massima concentrazione riscontrata; Clast, ultima concentrazione quantificabile; T1/2, emivita; AUC, area sottesa alla curva.

CAPITOLO 6

Discussione

Questo lavoro rappresenta il primo studio di separazione e quantificazione degli epimeri dell'HHC e dei suoi principali metaboliti commercialmente disponibili in matrici biologiche umane.

Fino ad oggi il potenziale dannoso dell'HHC non era stato descritto nell'uomo, sia perché ha attirato l'attenzione dei consumatori solo di recente, sia probabilmente a causa della mancanza di metodi analitici efficaci per la rilevazione di questa sostanza nelle matrici biologiche.

L'HHC rappresenta un'alternativa più economica e di più facile disponibilità rispetto al Δ^9 -THC, poiché la sua produzione è relativamente semplice e può essere ottenuta da fonti naturali. Come precedentemente esposto nel dettaglio, è possibile ottenere l'HHC attraverso una semplice reazione di idrossilazione del Δ^9 -THC o, con una reazione di catalisi acida, ottenere il Δ^9 -THC e il Δ^8 -THC a partire dal CBD legalmente commercializzato procedendo all'idrossilazione in HHC [78].

In sintesi, poiché sia il Δ^8 -THC che il Δ^9 -THC sono sostanze controllate, attraverso la loro idrossilazione con riduzione del doppio legame, si può produrre l'HHC semi-sintetico che, ancora in molti paesi, rappresenta un'alternativa legale al THC [65].

A causa della mancanza di studi approfonditi su questa molecola, molti paesi dell'UE hanno deciso di vietare l'HHC. In particolare, Austria, Finlandia ed Estonia sono stati i primi paesi europei ad imporre divieti sulla produzione, sulla vendita e l'utilizzo di HHC, anche come liquido nelle sigarette elettroniche; hanno seguito Svezia, Belgio, Danimarca, Regno Unito e Francia. Dal 13 luglio 2023, l'HHC è stato inserito nella Tabella I delle sostanze stupefacenti (Decreto 309/90 del Ministero della Salute), e quindi annoverato tra le sostanze illecite anche in Italia. Attualmente l'HHC risulta legale Croazia, Slovenia, Portogallo, Spagna, Malta, Grecia, Cipro, Irlanda, Lussemburgo, Moldavia e Romania [65].

I pochi studi eseguiti hanno confermato che l'HHC mostra gli effetti tipici dei cannabinoidi sia *in vivo* che *in vitro*, anche se sembrerebbe meno potente del suo analogo [76]. Inoltre, l'affinità *in vitro* verso i recettori dei cannabinoidi risulta diversa per il 9S-HHC e 9R-HHC. Diversi autori indicano,

infatti, che l'epimero R ha un'affinità maggiore per il recettore CB1, mentre l'epimero S presenta una minore affinità recettoriale [76, 77]. Ciò suggerisce che le diverse miscele epimeriche, ottenute mediante il procedimento semi-sintetico, possono determinare effetti clinici variabili [69].

Attualmente, la potenza, l'efficacia e gli effetti avversi dell'HHC sono in gran parte sconosciuti e, pertanto, potenzialmente pericolosi per la salute e la sicurezza pubblica. Inoltre, l'HHC non è comunemente indagato nei test tossicologici di routine e la conoscenza degli effetti sull'uomo è limitata a rapporti aneddotici giunti all'attenzione dei sanitari per casi di intossicazione.

Partendo da questi presupposti, il principale scopo di questa tesi è stato quello di sviluppare e validare un metodo analitico in cromatografia liquida ad alta prestazione accoppiata alla spettrometria di massa tandem (HPLC-MS/MS) per la simultanea determinazione e quantificazione degli stereoisomeri dell'HHC, nonché degli stereoisomeri dei suoi principali metaboliti in matrici biologiche. Il metodo sviluppato ha mostrato buona selettività e specificità; inoltre, la semplice e rapida preparazione del campione rende il metodo adatto ad essere impiegato come analisi di routine. Tale metodo, sviluppato e validato, è successivamente stato applicato a campioni reali prelevati da 6 soggetti sani a cui è stata somministrata una miscela 1:1, (v/v) di 9(R)-HHC e 9(S)-HHC, senza altre sostanze psicoattive o cannabinoidi, come Δ^9 -THC o CBD, per valutare la disposizione delle due droghe senza alcuna possibile interferenza. L'applicazione del metodo ai campioni biologici umani (sangue, urina e fluido orale) ha mostrato che il picco della concentrazione plasmatica dell'HHC viene raggiunto già 10 minuti dopo l'assunzione per l'epimero 9R-HHC e dopo circa un ora per il 9S-HHC. La media della concentrazione massima risultava di 7,9 ng/mL per il 9R-HHC e di 2,3 ng/mL per il 9S-HHC.

Le differenze nella farmacocinetica degli epimeri studiati sono state osservate anche nelle urine, dove la quantità di 9(S)-HHC escreta in 6 ore era quasi doppia rispetto a quella di 9(R)-HHC, nonostante la dose somministrata fosse la stessa. Si può ipotizzare un meccanismo stereoselettivo di eliminazione a causa della stereoselettività della glucuronidazione, già descritta per diversi altri farmaci [86, 87].

Come previsto, gli epimeri HHC hanno mostrato un profilo simile nel fluido orale e nel sangue, raggiungendo una concentrazione massima superiore a 60 e 20 ng/ml, rispettivamente per il 9(R)-HHC e 9(S)-HHC in circa 45 minuti. Di conseguenza, il fluido orale è apparso come una promettente matrice biologica alternativa per il monitoraggio e l'analisi tossicologica, come già osservato per altri fitocannabinoidi e cannabinoidi sintetici [88, 89]. I dati farmacocinetici e le concentrazioni rilevate per gli epimeri del *parent drug* confermano una certa stereoselettività nel metabolismo dell'HHC anche nel fluido orale, con il 9R-HHC ritrovato a concentrazioni più alte rispetto al suo stereoisomero. Per quanto concerne i metaboliti, solo il 11-NOR-9R-HHC è stato rilevato e quantificato nei campioni di sangue con il picco delle concentrazioni plasmatiche riscontrato intorno a 1 ora *post* somministrazione. Lo stesso metabolita è risultato essere il metabolita più abbondante nelle urine. In questo caso però è stato possibile quantificare anche l'isomero l'11-NOR-9S- HHC, l'11-OH-9R-HHC e il 9 α -OH-HHC. Il 11-NOR-9R-HHC, ovvero il metabolita maggiormente prodotto, presentava una massima concentrazione urinaria dopo 6 h dall'assunzione di HHC. Come ipotizzato, e similmente alla sostanza originaria, anche l'epimero 9R- di questo metabolita è stato sistematicamente rilevato a concentrazioni più elevate rispetto al 9S- in tutti i campioni urinari analizzati.

La discriminazione analitica tra 9(R)-HHC e 9(S)-HHC e i loro metaboliti epimerici ha permesso di studiare nell'uomo le possibili differenze dei due epimeri dal punto di vista farmacocinetico, differenze già osservate nei modelli animali [17, 71]. In effetti, la diversa farmacocinetica del 9(R)-HHC rispetto al suo epimero, potrebbe contribuire ad una maggiore potenza farmacologica, anche questa già riportata in precedenza in modelli animali [17, 71]. A questo proposito, il 9(R)-HHC ha mostrato una maggiore biodisponibilità e un picco di concentrazione più elevato, con un'eliminazione più lenta, mentre entrambi gli epimeri presentano una rapida insorgenza nel sangue. Dai risultati tossicologici ottenuti, è possibile quindi affermare che in tutti i campioni biologici analizzati, l'epimero 9R- è stato rilevato sempre a concentrazioni maggiori rispetto all'isomero 9S-HHC, suggerendo una spiccata stereoselettività nel metabolismo e nella farmacocinetica di questo

cannabinoide. Ciò consente di avvalorare quanto già ipotizzato nella letteratura di merito, ovvero che proprio l'isomero 9R-HHC sia quello maggiormente responsabile dell'attività cannabinomimetica e quindi degli effetti clinici riportati.

Nel nostro studio è stato infatti osservato che il 9R-HHC, oltre ad essere rilevato sistematicamente a concentrazioni maggiori rispetto al suo epimero, presentava concentrazioni ancor più elevate in tutte le matrici biologiche dei soggetti che hanno presentato una sintomatologia più grave rispetto a coloro che sviluppavano sintomi più lievi (dati non mostrati). Questi dati dimostrano una potenza dell'HHC variabile e comunque ben diversa da quanto ipotizzato all'inizio della sua diffusione, quando era commercializzato come "*cannabis light*".

Sulla scorta dei dati ottenuti sono doverose alcune considerazioni relative ai prodotti a base di HHC disponibili sul mercato e alle possibili conseguenze secondarie al loro utilizzo. Come già descritto, i prodotti commercializzati a base di HHC non specificano le quantità dei due isomeri contenuti nelle diverse miscele. Risulta pertanto ovvio che i prodotti con un quantitativo maggiore di 9R-HHC determineranno effetti clinici più gravi con possibile tossicità acuta. Ne consegue che, anche i consumatori abituali di HHC possono sviluppare sintomi clinici di gravità variabile nelle diverse assunzioni, riconducibili ad una incostante concentrazione dei due epimeri nei vari prodotti acquistati.

CAPITOLO 7

Conclusioni

Il monitoraggio dell'HHC rappresenta una sfida cruciale per i tossicologi clinici e forensi.

Tenendo in considerazione la sua grande diffusione, le evidenze riportate nella letteratura di riferimento e sulla scorta dei dati acquisiti dal presente lavoro, è possibile affermare che il consumo di HHC e di altri SSC potrebbe determinare rischi per la salute individuale e per la salute pubblica.

Si rende pertanto necessario acquisire ulteriori informazioni relative ai *clusters* di utilizzo, al mercato illecito, oltreché indagare nel dettaglio i percorsi metabolici, la tossicità acuta e cronica e la potenziale interazione con altre sostanze d'abuso.

La disponibilità di HHC e di altri cannabinoidi nel *dark web* rappresenta un grave problema dal punto di vista sanitario poiché le sostanze psicoattive, così liberamente messe a disposizione, espongono i consumatori ad un alto rischio di intossicazioni acute. I pochi dati disponibili riguardo gli effetti di questa sostanza ed il fatto che venga pubblicizzata e venduta come sostituto legale del THC con gli stessi effetti rende il suo consumo pericoloso. Inoltre, in caso di intossicazione, la mancanza di informazioni dettagliate relative ai principi attivi contenuti nei prodotti acquistati online, e nel caso specifico alle concentrazioni dei due epimeri dell'HHC, rende difficile per il personale sanitario formulare una diagnosi precisa e, quindi, provvedere ad un soccorso immediato del paziente.

A tal proposito è fondamentale, sia da un punto di vista forense che clinico, introdurre nella pratica clinica e negli *screening* effettuati in caso di intossicazione acuta, metodi per la determinazione e la quantificazione dell'HHC e dei suoi metaboliti.

Il metodo sviluppato e pienamente validato in questo lavoro ha mostrato una buona selettività e specificità, consentendo la quantificazione del 9R-HHC, 9S-HHC e dei loro principali metaboliti, dopo una preparazione del campione di circa 1 ora, utilizzando un ridotto volume di campione (100 μ L). Questi risultati dimostrano l'applicabilità del metodo per le analisi di routine in un laboratorio ad alta produttività (*high throughput laboratory*).

È pertanto fondamentale mantenere alta l'attenzione sull'HHC nonostante il recente cambiamento del suo *status* come sostanza illecita. È altresì necessario continuare un attento monitoraggio dei nuovi cannabinoidi al fine di intercettarli tempestivamente ed evitare le possibili dannose conseguenze del loro utilizzo sia sulla salute individuale che pubblica.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Hanus LO, Meyer SM, Munoz E, Tagliabue S, Scafati O, Appendino G. Phytocannabinoids: a unified critical inventory. *Nat Prod Rep*. 2016, 1357:1392.
- [2] Brunetti P, Pichini S, Pacifici R, Busardò FP, Del Rio A. Herbal Preparations of Medical Cannabis: A Vademecum for Prescribing Doctors. *Medicina (Kaunas)*. 2020, 56:237.
- [3] Verga M. Cannabis: La "Droga" e il "Farmaco". Una rassegna della letteratura dal 1970 ad oggi. Centro Interuniversitario per le ricerche sulla Sociologia del Diritto e delle Istituzioni Giuridiche - C.I.R.S.D.I.G. 2007.
- [4] Mead A. Legal and Regulatory Issues Governing Cannabis and Cannabis-Derived Products in the United States. *Front Plant Sci*. 2019, 10:697.
- [5] World Drug Report 2022. United Nations publication, Sales No. 2022.
- [6] Brenneisen, R. Chemistry and Analysis of Phytocannabinoids and Other Cannabis Constituents. In *Marijuana and the Cannabinoids*; ElSohly, M.A., Ed.; Forensic Science And Medicine; Humana Press: Totowa, NJ. 2007, 17:49.
- [7] Sirikantaramas S, Taura F. Cannabinoids: Biosynthesis and Biotechnological Applications. In *Cannabis sativa L. - Botany and Biotechnology*; Chandra, S., Lata, H., ElSohly, M.A., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2017, 183:206.
- [8] Bonini SA, Premoli M, Tambaro S, Kumar A, Maccarinelli G, Memo M, Mastinu A. Cannabis sativa: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. *J. Ethnopharmacol*. 2018, 300:315.
- [9] Di Forti M, et al. The contribution of cannabis use to variation in the incidence of psychotic disorder across Europe (EU-GEI): a multicentre case-control study. *Lancet Psychiatry*. 2019, 427:436.
- [10] Pertwee RG. The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabivarin. *Br. J. Pharmacol*. 2008, 199:215.
- [11] Izzo AA, Borrelli F, Capasso R, Marzo VD, Mechoulam R. Non-psychoactive plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends Pharmacol. Sci*. 2009, 515:527.
- [12] Gannon BM, Baumann MH, Walther D, Jimenez-Morigosa C, Sulima A, Rice KC, Collins GT. The abuse-related effects of pyrrolidine-containing cathinones are related to their potency and selectivity to inhibit the dopamine transporter. *Neuropsychopharmacol*. 2018, 2399:2407.
- [13] Vari MR, Mannocchi G, Tittarelli R, Campanozzi LL, Nittari G, Feola A, Ronchi FU, Ricci G. New Psychoactive Substances: Evolution in the Exchange of Information and Innovative Legal Responses in the European Union. *Int J Environ Res Public Health*. 2020, 17(22):8704.
- [14] Simonato P, Corazza O, Schifano F. Rapporto sulla Prima Conferenza Internazionale sulle Nuove Sostanze Psicoattive (NPS). "The Ever-Changing World of Psychactive Drugs". 2012.

- [15] Pichini S, Pacifici R. Smart Drugs III edition. 2015. https://www.iss.it/documents/20126/2344091/Smart_Drugs.pdf/96a7029d-d1ef-4fb0-4c81-f5b34619d868?t=1575737099067 (Accessed 4 January 2024).
- [16] Dipartimento per le politiche antidroga, Nuove Sostanze Psicoattive (NSP): schede tecniche relative alle molecole registrate dal Sistema Nazionale di Allerta Precoce. <https://www.politicheantidroga.gov.it/it/attivita/attivita-e-progetti/le-pubblicazioni/nuove-sostanze-psicoattive-nsp-schede-tecniche-relative-alle-molecole-registrate-dal-sistema-nazionale-di-allerta-precoce/nuove-sostanze-psicoattive-nsp/> (Accessed 4 January 2024).
- [17] Ujváry I. Hexahydrocannabinol and closely related semi-synthetic cannabinoids: A comprehensive review. *Drug Test Anal.* 2023.
- [18] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, Lisbon. 2022.
- [19] O'Malley GF, O'Malley R. Manuale MSD, Versione per i professionisti. La fonte attendibile per eccellenza per le informazioni sanitarie. 2022. <https://www.msmanuals.com/it-it/professionale> (Accessed 4 January 2024).
- [20] Fattore L, Fratta W. Beyond THC: The New Generation of Cannabinoid Designer Drugs. *Front Behav Neurosci.* 2011, 5:60.
- [21] UNODC. Early warning advisory (EWA) on new psychoactive substances (NPS). (United Nations Office on Drugs and Crime. 2017.
- [22] Musselman ME, Hampton JP. "Not for human consumption": a review of emerging designer drugs. *Pharmacotherapy.* 2014, 745:57.
- [23] Banister SD, Stuart J, Kevin RC, Edington A, Longworth M, Wilkinson SM, Beinat C, Buchanan AS, Hibbs DE, Glass M, Connor M, McGregor IS, Kassiou M. Effects of bioisosteric fluorine in synthetic cannabinoid designer drugs JWH-018, AM-2201, UR-144, XLR-11, PB-22, 5F-PB-22, APICA, and STS-135. *ACS Chem Neurosci.* 2015, 1445:58.
- [24] Brunt TM, Bossong MG. The neuropharmacology of cannabinoid receptor ligands in central signaling pathways. *Eur J Neurosci.* 2022, 909:921.
- [25] G. Montefrancesco. Insostanza. <https://www.insostanza.it/dipendenza/nuove-droghe-nps/cannabinoidi-sintetici/> (Accessed 4 January 2024).
- [26] Lu HC, Mackie K. Review of the Endocannabinoid System. *Biol Psychiatry Cogn Neurosci Neuroimaging.* 2021, 607:615.
- [27] Hui-Chen Lu, Ken Mackie, Review of the Endocannabinoid System, *Biological Psychiatry: Cogn Neurosci Neuroimaging.* 2021, 607:615.
- [28] Van der Stelt M, Di Marzo V. Cannabinoid receptors and their role in neuroprotection. *Neuromolecular Med.* 2005, 37:50.
- [29] Ye L, Cao Z, Wang W, Zhou N. New Insights in Cannabinoid Receptor Structure and Signaling. *Curr Mol Pharmacol.* 2019, 239:248.

- [30] Amin MR, Ali DW. Pharmacology of Medical Cannabis. *Adv Exp Med Biol.* 2019, 151:165.
- [31] Devane WA, Dysarz FA 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol.* 1988, 605:13.
- [32] Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature.* 1990, 561:4.
- [33] Gérard CM, Mollereau C, Vassart G, Parmentier M. Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem J.* 1991, 1:279.
- [34] Turu G, Hunyady L. Signal transduction of the CB1 cannabinoid receptor. *J Mol Endocrinol.* 2010, 75:85.
- [35] Biegón A, Kerman IA. *Autoradiographic study of pre- and postnatal distribution of cannabinoid receptors in human brain.* *Neuroimage.* 2001;14:1463-8.
- [36] Bellamoli E, Seri C, Rimondo C, Serpelloni G, Schifano F. Il sistema endocannabinoide e le sue funzioni. <https://it.scribd.com/document/329333966/10-Cannabis-Sistema-Endocannabinoide> (Accessed 4 January 2024).
- [37] Hohmann AG, Briley EM, Herkenham M. Pre- and postsynaptic distribution of cannabinoid and mu opioid receptors in rat spinal cord. *Brain Res.* 1999, 17:25.
- [38] Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature.* 1993, 61:5.
- [39] Lutz B. Neurobiology of cannabinoid receptor signaling. *Dialogues Clin Neurosci.* 2020, 207:222.
- [40] Staiano RI, Loffredo S, Borriello F, Iannotti FA, Piscitelli F, Orlando P, Secondo A, Granata F, Lepore MT, Fiorelli A, Varricchi G, Santini M, Triggiani M, Di Marzo V, Marone G. Human lung-resident macrophages express CB1 and CB2 receptors whose activation inhibits the release of angiogenic and lymphangiogenic factors. *J Leukoc Biol.* 2016, 531:40.
- [41] Annuzzi G, Piscitelli F, Di Marino L, Patti L, Giacco R, Costabile G, Bozzetto L, Riccardi G, Verde R, Petrosino S, Rivellese AA, Di Marzo V. Differential alterations of the concentrations of endocannabinoids and related lipids in the subcutaneous adipose tissue of obese diabetic patients. *Lipids Health Dis.* 2010, 9:43.
- [42] Galli JA, Sawaya RA, FriedenberG FK. Cannabinoid hyperemesis syndrome. *Curr Drug Abuse Rev.* 2011, 241:9.
- [43] Stella N. Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas. *Glia.* 2010, 1017:1030.
- [44] Xi ZX, Peng XQ, Li X, Song R, Zhang HY, Liu QR, Yang HJ, Bi GH, Li J, Gardner EL. Brain cannabinoid CB2 receptors modulate cocaine's actions in mice. *Nat Neurosci.* 2011, 1160:6.
- [45] Malfitano AM, et al. What we know and do not know about the cannabinoid receptor 2 (CB2). *Seminars in immunology.* 2014, 369:79.

- [46] Demuth DG, Molleman A. Cannabinoid signalling. *Life Sci.* 2006, 549:63.
- [47] Krishna Kumar K, Shalev-Benami M, Robertson MJ, Hu H, Banister SD, Hollingsworth SA, Latorraca NR, Kato HE, Hilger D, Maeda S, Weis WI, Farrens DL, Dror RO, Malhotra SV, Kobilka BK, Skiniotis G. Structure of a Signaling Cannabinoid Receptor 1-G Protein Complex. *Cell.* 2019, 448:458.
- [48] Howlett AC, Abood ME. CB1 and CB2 Receptor Pharmacology. *Adv Pharmacol.* 2017, 169:206.
- [49] Lauckner JE, Jensen JB, Chen HY, Lu HC, Hille B, Mackie K. GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008, 2699:704.
- [50] Iannotti FA, Hill CL, Leo A, Alhusaini A, Soubrane C, Mazzarella E, Russo E, Whalley BJ, Di Marzo V, Stephens GJ. Nonpsychotropic plant cannabinoids, cannabidivarin (CBDV) and cannabidiol (CBD), activate and desensitize transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channels in vitro: potential for the treatment of neuronal hyperexcitability. *ACS Chem Neurosci.* 2014, 1131:41.
- [51] de Almeida DL, Devi LA. Diversity of molecular targets and signaling pathways for CBD. *Pharmacol Res Perspect.* 2020.
- [52] 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.* 1992, 1946:9.
- [53] Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol.* 1995, 83:90.
- [54] Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I, Mechoulam R. 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001, 3662:5.
- [55] Lu HC, Mackie K. An Introduction to the Endogenous Cannabinoid System. *Biol Psychiatry.* 2016, 516:25.
- [56] Fezza F, Bari M, Florio R, Talamonti E, Feole M, Maccarrone M. Endocannabinoids, related compounds and their metabolic routes. *Molecules.* 2014,17078:17106.
- [57] Verbanck P. Short-term and long-term effects of cannabis use. *Rev Med Brux.* 2018, 246:249.
- [58] Cohen K, Weizman A, Weinstein A. Positive and Negative Effects of Cannabis and Cannabinoids on Health. *Clin Pharmacol Ther.* 2019,1139:1147.
- [59] Adams R. US 2419937 - Marihuana Active Compounds. 1947.
- [60] Adams R, Pease D, Cain C, Clark J. Structure of cannabidiol. VI. Isomerization of cannabidiol to tetrahydrocannabinol, a physiologically active product. Conversion of cannabidiol to cannabinol. *J. Am. Chem. Soc.* 1940, 2402:2405.

- [61] TODD AR. Hashish [Hashish]. *Experientia*. 1946, 55:60.
- [62] U.S. Public Law. Agriculture improvement act of 2018. Public Law. 2018, 115:334.
- [63] Geci M, Scialdone M, Tishler J. The dark side of cannabidiol: the unanticipated social and clinical implications of synthetic Δ 8-THC. *Cannabis Cannabinoid Res.* 2023, 270:28222.
- [64] Erickson BE. Delta-8-THC craze concerns chemists. *Chem Eng News*. 2021, 24:28.
- [65] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. Technical Report. Hexahydrocannabinol (HHC) and Related Substances 2023. Publications Office of the European Union. 2023.
- [66] Basas-Jaumandreu J, de Las Heras FX. GC-MS Metabolite Profile and Identification of Unusual Homologous Cannabinoids in High Potency Cannabis sativa. *Planta Medica*. 2020, 338:347.
- [67] Focella A, Teitel S, Bross, A. A simple and practical synthesis of olivetol. *J. Org. Chem.* 1977, 3456:3457
- [68] Franco C, Protti S, Porta A, Pollastro F, Profumo A, Mannucci B, Merli D. Stability of cannabidiol (CBD) in solvents and formulations: A GC-MS approach. *Results Chem.* 2022, 100465
- [69] Ibrahim EA, Gul W, Gul SW, Stamper BJ, Hadad GM, Abdel Salam RA, Ibrahim AK, Ahmed SA, Chandra S, Lata H, Radwan MM, ElSohly MA. Determination of Acid and Neutral Cannabinoids in Extracts of Different Strains of Cannabis sativa Using GC-FID. *Planta Med.* 2018, 250_259.
- [70] Stone E. Meet THCP and CBDP: Study reveals the identification of two new cannabinoids. *Leafly*. 2020.
- [71] Graziano S, Vari MR, Pichini S, Busardo FP, Cassano T, Di Trana A. Hexahydrocannabinol Pharmacology, Toxicology, and Analysis: The First Evidence for a Recent New Psychoactive Substance. *Curr Neuropharmacol.* 2023, 2424:2430.
- [72] Archer RA, Boyd DB, Demarco PV, Tyminski IJ, Allinger NL. Structural studies of cannabinoids. Theoretical and proton magnetic resonance analysis. *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 5200:5206.
- [73] Reggio PH, Greer KV, Cox SM. The importance of the orientation of the C9 substituent to cannabinoid activity. *J Med Chem.* 1989, 1630:1635.
- [74] Casati S, Rota P, Bergamaschi RF, Palmisano E, La Rocca P, Ravelli A, Angeli I, Minoli M, Roda G, Orioli M. Hexahydrocannabinol on the Light Cannabis Market: The Latest "New" Entry. *Cannabis Cannabinoid Res.* 2022.
- [75] Edery H, Grunfeld Y, Ben-Zvi Z, Mechoulam R. Structural requirements for cannabinoid activity. *Ann N Y Acad Sci.* 1971, 40:53.
- [76] Russo F, Vandelli MA, Biagini G, et al. The semisynthetic cannabinoid hexahydrocannabinol (HHC). Preprint. *Research Square*. 2023.
- [77] Cannabis Chemistry Subdivision of the American Chemical Society. 2021.

- [78] Perez-Reyes M, Lipton MA, Timmons MC, Wall ME, Brine DR, Davis KH. Pharmacology of orally administered 9 -tetrahydrocannabinol. *Clin Pharmacol Ther.* 1973, 48:55.
- [79] Collins A, Ramirez G, Tesfatsion T, Ray KP, Caudill S, Cruces W. Synthesis and characterization of the diastereomers of HHC and H4CBD. *Nat Prod Commun.* 2023.
- [80] Harvey DJ, Brown NK. A method based on catalytic hydrogenation for the identification of monohydroxy metabolites of isomeric tetrahydrocannabinols. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 1990, 67:68.
- [81] Nahler G, Grotenhermen F, Zuardi AW, Crippa JAS. A Conversion of Oral Cannabidiol to Delta9-Tetrahydrocannabinol Seems Not to Occur in Humans. *Cannabis Cannabinoid Res.* 2017, 81:86.
- [82] Nasrallah DJ, Garg NK. Studies Pertaining to the Emerging Cannabinoid Hexahydrocannabinol (HHC). *ACS Chem Biol.* 2023, 2023:2029.
- [83] Yang KM. Organization of Scientific Area Committees (OSAC) for Forensic Science Standard Practices for Method Development. <https://www.nist.gov/osac>.
- [84] Mandel J. The statistical analysis of experimental data. *Biom. J.* 231:279.
- [85] 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, 3019:3030.
- [86] Milani N, Qiu NH, Fowler S. Contribution of UGT Enzymes to Human Drug Metabolism Stereoselectivity: A Case Study of Medetomidine, RO5263397, Propranolol, and Testosterone. *Drug Metab Dispos* 2023, 306:317.
- [87] Kröner P, Heinkele G, Kerb R, Igel S, Schwab M, Mürdter TE. Stereoselective Quantification of Phase 1 and 2 Metabolites of Clomiphene in Human Plasma and Urine. *Talanta* 2021, 121658.
- [88] Busardò FP, Pilar Pérez-Acevedo A, Pacifici R, Mannocchi G, Gottardi M, Papaseit E, Pérez-Mañá C, Martin S, Poyatos L, Pichini S, et al. Disposition of Phytocannabinoids, Their Acidic Precursors and Their Metabolites in Biological Matrices of Healthy Individuals Treated with Vaporized Medical Cannabis. 2021.
- [89] Pérez-Acevedo AP, Pacifici R, Mannocchi G, Gottardi M, Poyatos L, Papaseit E, Pérez-Mañá C, Martin S, Busardò FP, Pichini S, et al. Disposition of Cannabinoids and Their Metabolites in Serum, Oral Fluid, Sweat Patch and Urine from Healthy Individuals Treated with Pharmaceutical Preparations of Medical Cannabis. *Phytotherapy Research.* 2021.