

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia Animali Alimentari Risorse Naturali e Ambiente

Corso di laurea magistrale in Scienze e Tecnologie Alimentari

**DETERMINAZIONE DEI CANNABINOIDI NEI PRODOTTI  
ALIMENTARI A BASE DI CANAPA MEDIANTE HPLC-HRMS**

Relatore  
Prof. Paolo Carletti

Laureanda  
Lisa Ferrari

Matricola n.  
1218052

ANNO ACCADEMICO 2023 – 2024



## INDICE

INDICE	1
RIASSUNTO	3
ABSTRACT	4
1. INTRODUZIONE	5
1.1. La canapa	5
1.2. Usi alimentari	10
1.3. I cannabinoidi e il sistema endocannabinoide	13
1.4. Normativa	17
1.5. Sistema cromatografico UHPLC-HRMS	18
2. SCOPO	21
3. MATERIALI E METODI	23
3.1. Quantificazione tramite aggiunte standard	23
3.2. Reagenti e strumentazione	24
3.3. Preparazione delle soluzioni	25
3.3.1. Preparazione degli standard e soluzioni di controllo	25
3.3.2. Preparazione delle fasi mobili	25
3.4. Preparazione dei campioni	26
3.4.1. Preparazione dei campioni di olio di canapa	26
3.4.2. Preparazione dei campioni di semi e farnia di canapa	27
3.5. Condizioni cromatografiche	28
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	31
4.1. Numero estrazioni successive	31
4.2. Calcolo concentrazione degli analiti nei campioni	32
4.3. Il limite di quantificazione LOQ	33

4.4.	Recupero del metodo	34
4.5.	Precisione	36
4.6.	Verifica prestazioni strumentali	38
4.7.	Campioni reali	38
5.	CONCLUSIONI	41
6.	BIBLIOGRAFIA	43

## RIASSUNTO

La canapa, coltivata per secoli per la sua fibra ha subito un drastico calo di produzione all'inizio del XX secolo. Oggi, però, si sta rivalutando il suo impiego come materia prima di numerosi prodotti alimentari dall'ottimo valore nutrizionale. La canapa contiene però una sostanza psicoattiva; il  $\Delta$ -9-tetraidrocannabinolo ( $\Delta^9$ -THC) che deriva dell'acido  $\Delta$ -9-tetraidrocannabinolico ( $\Delta^9$ -THCA). A fronte di ciò l'unione europea, attraverso il regolamento 915/2023, ha imposto un limite alla quantità massima di  $\Delta^9$ -THC e  $\Delta^9$ -THCA che può essere presente nei prodotti alimentari derivati dalla canapa, Lo scopo di questo lavoro è quello di sviluppare un metodo analitico di estrazione e quantificazione dei due cannabinoidi per rispondere all'esigenza del laboratorio che si occupa dell'analisi di controlli ufficiali. La presente tesi si è svolta presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie. Il metodo è stato realizzato sulle tre matiche normate: olio, semi e farina di canapa. L'analisi è stata condotta utilizzando un HPLC con rivelatore che è uno spettrometro di massa di tipo quadrupolo – orbitrap. La quantificazione è stata eseguita attraverso il metodo delle aggiunte standard di cui si sono studiate le migliori condizioni di applicazione. Si sono inoltre valutati i parametri di identificazione, linearità, limite di quantificazione, recupero del metodo e precisione.

## ABSTRACT

Hemp, cultivated for centuries for its fiber, experienced a drastic decline in production at the beginning of the 20th century. However, today there is a reevaluation of its use as a raw material for numerous food products with excellent nutritional value. Hemp contains a psychoactive substance, delta-9-tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC), derived from delta-9-tetrahydrocannabinolic acid ( $\Delta^9$ -THCA). In response to this, the European Union, through Regulation 915/2023, has imposed a limit on the maximum amount of  $\Delta^9$ -THC and  $\Delta^9$ -THCA that can be present in food products derived from hemp.

The purpose of this work is to develop an analytical method for the extraction and quantification of the two cannabinoids to meet the needs of the laboratory responsible for official control analysis. This thesis was carried out at the Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie. The method was implemented on the three regulated matrices: hemp oil, seeds, and flour. The analysis was conducted using an HPLC with a detector, which is a quadrupole-orbitrap mass spectrometer. Quantification was performed using the standard addition method, and the optimal application conditions were studied. Parameters such as identification, linearity, limit of quantification, method recovery, and precision were also evaluated.

## 1. INTRODUZIONE

### 1.1. La canapa

La canapa è una pianta conosciuta ed usata da secoli per i suoi possibili diversi usi: la fibra, i semi e la sua resina narcotica. La canapa fornisce la materia prima per un gran numero di applicazioni industriali tradizionali ma anche innovative, tra le quali le industrie cosmetologica, farmacologica, bioedile, tessile e anche in quella alimentare.

Sebbene oggi la canapa sia considerata una specie cosmopolita, non è ben chiara quale sia la vera origine geografica. Sono stati proposti diversi luoghi di origine della specie, tra cui Asia centrale, orientale e meridionale (Fike, 2019). L'origine meridionale potrebbe essere esclusa dal fatto che la specie, per diffondersi, avrebbe dovuto spostarsi oltre le catene montuose dell'Himalaya e dell'Hindu Kush, mentre lo sviluppo nell'Asia centrale avrebbe facilitato la dispersione in tutta Asia ed Europa. A sostegno di ciò, secondo Erodoto (484 a.C.), gli Sciti – popolazione nomade originaria delle steppe settentrionali dell'Asia centrale – ebbero un ruolo fondamentale nella diffusione della canapa, portandola in Europa dall'Asia durante le loro migrazioni del 1500 a.C. I Teutoni, invece, ne facilitarono la diffusione della coltivazione (Amaducci et al., 2015). Anche un recente studio chemiotassonomico, avrebbe confermato che l'origine e il centro di diversità della Cannabis è l'Asia Centrale (Hillig, 2005)

Però, secondo l'agronomo Nikolaj Ivanovič Vavilov, che ebbe come obiettivo principale di tutta la sua attività l'individuazione delle zone di origine e diversificazione delle principali piante alimentari coltivate – che prendono nome di centri di Vavilov –, la canapa avrebbe tre centri di origine. Le piante a foglia larga a semi grandi, designate come Cannabis sativa sarebbero originarie della Cina; tipi narcotici a foglia stretta, denominati Cannabis indica dell'India e Pakistan (Clarke & Merlin, 2016) ed infine un terzo tipo più corta e arbustiva, Cannabis ruderalis, è stato identificato in Asia centrale. Altri esperti sostengono, invece, che Cannabis è un genere monotopico, cioè, ha una sola specie che è Cannabis sativa Linn.

Non essendoci ancora molta chiarezza per semplicità, in questo lavoro appoggerò l'ipotesi di Cannabis come genere monotopico, quindi quando si parla di canapa, o cannabis, si intendono le piante di Cannabis sativa Linn appartenente al genere Rosales e alla famiglia delle Cannabaceae.

In ogni caso, le piante di canapa hanno alcune caratteristiche comuni, tra le quali l'essere una pianta erbacea, angiosperma, annua, dioica, anemofila, composte da foglie a ventaglio da 5 o 9 o 11 foglioline lanceolate (Figura 1).

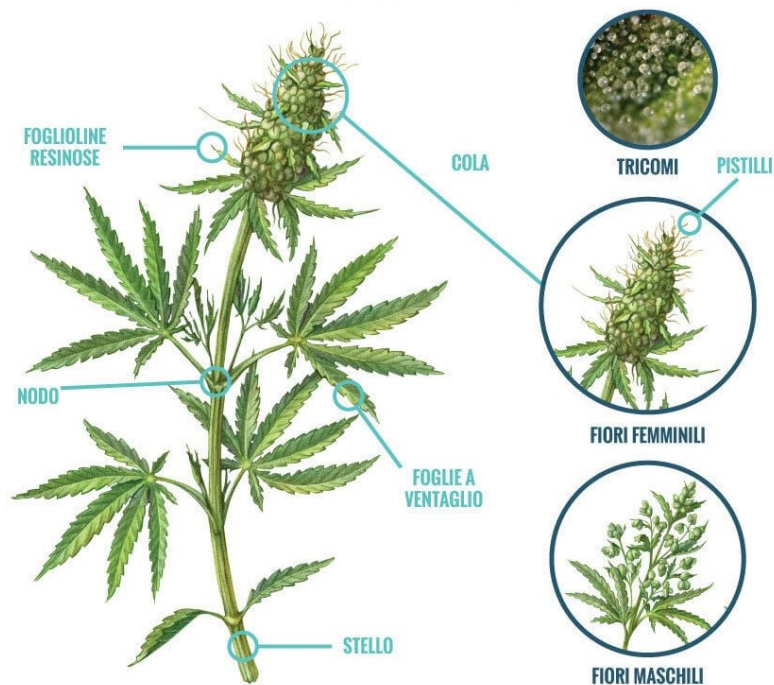


Figura 1: componenti pianta di *Cannabis sativa* Linn (MMI Agriculture, s.d.)

I fiori negli individui maschili sono disposti in piccole pannocchie contenenti il polline che andranno a fecondare gli individui femminili che invece hanno i fiori disposti in glomeruli. Dalla fecondazione, vengono sviluppati i frutti che sono degli acheni, comunemente chiamati anche semi di canapa. Gli acheni si sviluppano nelle inflorescenze, ovvero dove più fiori si uniscono a formare un'unica inflorescenza. Le inflorescenze si possono sviluppare sia nei rami inferiori, chiamate inflorescenze laterali, ma soprattutto nella cima apicale (chiamata anche cola), generalmente di dimensioni maggiori.

Nelle inflorescenze si concentrano i tricomi (Figura 2) ovvero delle ghiandole resinose che contengono cannabinoidi, terpeni e flavonoidi (Hazekamp et al., 2010), dal caratteristico forte odore che fungono da protezione per la pianta contro parassiti, animali e funghi. La presenza di cannabinoidi rappresenta un punto chiave per la canapa, per la sua coltivazione, commercializzazione e legislazione. Il  $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo ( $\Delta^9$ -THC o semplicemente THC), principio psicoattivo della cannabis, è infatti ritenuto uno stupefacente.





*Figura 2: tricomi sulla pianta di Cannabis sativa femminile*

La canapa, in Europa, è stata largamente coltivata fino alla metà del secolo scorso quando la coltivazione ha avuto un tracollo. Ciò è dovuto sia alla disponibilità di fonti di fibre tessili più convenienti, come il cotone e le fibre sintetiche, ma anche alla diffusione di cultivar con effetti psicotropi, vietate dalla legge. Pertanto, l'uso legale della Cannabis è limitato alle varietà note anche come "canapa industriale", caratterizzate da un contenuto massimo di  $\Delta^9$ -THC pari allo 0,2%. Dopo anni di oblio, negli ultimi tempi la canapa ha guadagnato una seconda vita grazie alla sua versatilità. Attualmente, il database europeo delle varietà vegetali (CVPO) comprende 100 cultivar di canapa autorizzate alla coltivazione industriale (Cattaneo et al., 2023). La sua superficie di coltivazione sta quindi progressivamente aumentando con un aumento di anche il 75% tra il quadriennio 2015-2019 e, di conseguenza, nello stesso periodo la produzione della canapa è aumentata del 62.4% (European Commission - Agriculture and Rural Development, s.d.).

Gli usi della canapa sono molteplici, in industrie anche completamente diverse tra loro, con applicazioni tradizionali e innovative. La canapa viene coltivata per tre prodotti principali: la fibra, i semi e la resina narcotica. Vediamo di seguito le applicazioni in cui i prodotti della canapa trovano impiego:

- Le fibre: il principale uso per il quale la canapa è stata coltivata, anche in Italia, è per la produzione di fibre
  - Uso tradizionale: utilizzata per vari tipi di cordame, per realizzare vele per navi, reti da pesca, ma anche per la produzione di carta, vestiti e altri prodotti tessili (Docimo et al., 2014);

- Uso innovativo: bioedilizia e bioenergia
  - Bioedilizia: le fibre di canapa hanno un buon potere isolante e si possono utilizzare per la produzione di calcestruzzo, lana e pannelli isolanti (Figura 3).
  - Uso delle fibre di canapa per la produzione di etanolo, biomasse per la combustione la produzione di bioplastiche, biocarburanti o biochar per l'arricchimento del suolo (Prade et al., 2011) e biogas (Kreuger et al., 2011).



*Figura 3: pannelli isolanti e mattoni di canapa (BIOmat)*

- I semi di canapa: i semi hanno un potenziale commerciale interessante in quanto contengono elevati livelli di proteine, fibre, vitamine, ma soprattutto Omega-3 e Omega-6
  - nell'industria feed i semi di canapa interi sono utilizzati come mangimi per animali
  - nell'industria alimentare i semi vengono decorticati e destinati al consumo umano. Dagli stessi si ricavano anche altri prodotti alimentari come l'olio di canapa e la farina di canapa.
- I cannabinoidi: in Italia i medici possono prescrivere preparazioni magistrali a base di cannabis contenenti sostanze psicoattive, ovvero  $\Delta^9$ -THC e cannabidiolo (CBD) sotto forma di medicinali, decotti o per inalazione con apposito vaporizzatore, per un uso terapeutico. Il  $\Delta^9$ -THC mostra la massima psicoattività e produce sensazioni di euforia e rilassamento, ma è altrettanto dimostrato che possiede proprietà analgesiche, antinfiammatorie, stimolanti dell'appetito e antiemetiche. Tuttavia, il consumo cronico di THC è stato collegato a gravi

effetti collaterali, tra cui deficit cognitivi, ansia, paranoia, psicosi cronica e dipendenza. Un altro importante cannabinoide con un grande potenziale terapeutico è il CBD, un isomero non psicoattivo del THC, che ha dimostrato di avere effetti antinfiammatori, anticonvulsivanti, ansiolitici, analgesici, neuroprotettivi, antitumorali e antiossidanti. Inoltre, gli studi suggeriscono che il CBD abbia un ruolo modulatore sulla psicoattività del THC, mitigandone così gli effetti psicologici avversi (Hädener et al., 2019).

Da dicembre 2016 è disponibile per la prescrizione medica cannabis essiccata e macinata, denominata Cannabis FM2, e, da luglio 2018, il prodotto Cannabis FM1. Le piante di cannabis vengono coltivate e prodotte nello SCFM (Stabilimento chimico farmaceutico militare di Firenze) (

Figura 4). Quello che cambia tra le due varietà è il contenuto di  $\Delta^9$ -THC e CBD:

- Cannabis FM2 contenente 5 – 8% di  $\Delta^9$ -THC e 7,5 – 12 % di CBD
- Cannabis FM1 contenente 13,0 – 20,0 % di THC e < 1% di CBD

Questi prodotti vengono prescritti per: alleviare il dolore cronico e quello associato a sclerosi multipla e a lesioni del midollo spinale; nella nausea e vomito causati da chemioterapia, radioterapia, terapie per HIV; come stimolante dell'appetito nella cachessia, anoressia, perdita dell'appetito in pazienti oncologici o affetti da AIDS e nell'anoressia nervosa; l'effetto ipotensivo nel glaucoma; la riduzione dei movimenti involontari del corpo e facciali nella sindrome di Gilles de la Tourette (Ministero della salute, 2022).



Figura 4: serra di coltivazione delle piante di canapa (sinistra) e stabilimento chimiche farmaceutiche di Firenze (destra)

La canapa è quindi una coltura multiuso, motivo per il quale negli ultimi tempi si sta rivalutando. Questo lavoro si concentrerà sui prodotti a base di canapa destinati al settore alimentare.

## 1.2. Usi alimentari

La canapa, negli ultimi tempi, sta trovando la sua rinascita partendo dall'industria alimentare. Ad oggi in commercio esistono diversi prodotti ricavati dalla canapa, molto interessanti sia per le diete vegetariane e vegane ma anche come alternative gluten free. I semi di canapa possono essere consumati interi o decorticati, oppure frantumati per la produzione di farina di canapa. Grazie alla loro ricchezza di preziosi acidi grassi, la frazione lipidica può essere recuperata dai semi spremuti a freddo e commercializzata come olio di semi di canapa. Il residuo rimanente è la "torta di canapa", considerata un tempo un sottoprodotto, è in realtà una risorsa ricca di proteine e può essere sfruttata come mangime per animali o come integratore alimentare. Si possono produrre anche altri prodotti come bevande alla canapa, tofu di semi di canapa e okara di canapa (l'okara è la polpa che resta a seguito della spremitura per ottenere il latte vegetale). (Figura 5).



*Figura 5: dall'alto a sinistra semi di canapa integrali, semi di canapa decorticati, bevanda vegetale di canapa, olio di canapa, tofu di canapa, proteine di canapa*

I prodotti della canapa risultano essere un'importante fonte proteica, variando dal circa 25% nei semi fino a circa 35% nella farina (Tabella 1: Valori nutrizionali medi di semi di canapa), trovando impiego nella preparazione di alimenti ed integratori proteici sia per l'uomo che per gli animali essendo altamente proteica (Callaway, 2004).

	Seme di canapa intero (g/100g)	Farina di canapa (g/100g)
Energia (KJ/100g)	2200	1700
Grassi	35,5	11,1
Carboidrati	27,6	42,6
Fibre totali	27,6	42,6
Fibre digeribili	5,4	16,4
Fibre non digeribili	22,2	26,2
Proteine	24,8	33,5
Umidità	6,5	5,6
Ceneri	5,6	7,2

Tabella 1: Valori nutrizionali medi di semi di canapa (Callaway, 2004)

Grazie alla scoperta dei valori nutrizionali dei semi di canapa, questi sono oggi considerati dei “superfood”. O meglio, dato un contenuto favorevole sia di acidi grassi polinsaturi omega-3 ( $\omega$ -3) e omega-6 ( $\omega$ -6), chiamati anche PUFA (Poly-Unsaturated Fatty Acids), sia di proteine di alta qualità, i semi di canapa fanno parte del numero crescente di semi “insoliti” che sono stati inclusi nella dieta umana come fonte di alimenti funzionali (Cattaneo et al., 2023). Un alimento funzionale, per definizione, è un alimento che oltre alle proprietà nutrizionali è scientificamente dimostrata la sua capacità di influire positivamente su una o più funzioni fisiologiche, contribuendo a migliorare lo stato di salute e a ridurre il rischio di insorgenza delle malattie correlate al regime alimentare.

### 1.1. Acidi grassi essenziali

Gli acidi grassi sono catene carboniose con un'estremità metilica ( $-\text{CH}_3$ ) ed una carbossilica ( $-\text{COOH}$ ) che si può legare al gruppo alcolico ( $-\text{OH}$ ) del glicerolo in forma di estere.

L'olio di canapa, ottenuto dai suoi semi, contiene oltre l'80% di PUFA ed è una ricca fonte di due acidi grassi essenziali a lunga catena (EFA: Essential Fatty Acids) in questo caso LA-18:2 (acido linoleico) e ALA-18:3 ( $\alpha$ -linolenico). Con l'aggettivo essenziale si intende l'incapacità dell'organismo animale di sintetizzare un composto che ha funzioni essenziali nell'organismo, a

partire da altri nutrienti; da qui la necessità di introdurlo con la dieta. Gli EFA presenti nell'olio di canapa sono:

- L'acido linoleico (Figura 6) è un acido grasso a 18 atomi di carbonio con due insaturazioni (LA-18:2), in posizione 9 e 12. La nomenclatura omega ( $\omega$ ) si riferisce alla posizione del primo doppio legame rispetto alla porzione metilica terminale della molecola, opposta al gruppo carbossilico. LA ha il primo doppio legame nel sesto carbonio, ed è quindi un  $\omega$ -6.

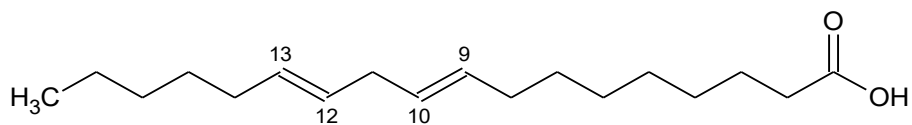


Figura 6: acido linoleico  $\omega$ -6

- L'acido  $\alpha$ -linolenico (Figura 7) è sempre un acido grasso a 18 atomi di carbonio ma con tre insaturazioni (ALA-18:3), in posizione 9, 12 e 15. ALA ha il primo doppio legame nel terzo carbonio opposto al gruppo carbossilico, ed è quindi un  $\omega$ -3

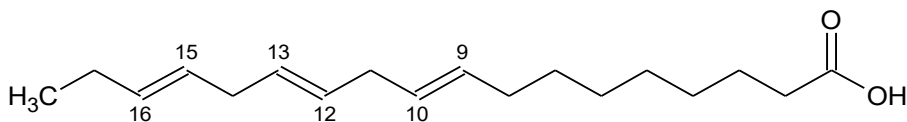


Figura 7: acido alfa-linolenico  $\omega$ -3

Sia gli acidi grassi  $\omega$ -3 che gli  $\omega$ -6 sono importanti perché componenti delle membrane cellulari e precursori di molte altre sostanze nel corpo come quelle coinvolte nella regolazione della pressione sanguigna e nelle risposte infiammatorie. Nell'olio di canapa, oltre a LA-18:2 e ALA-18:3, sono presenti anche i metaboliti biologici dei due EFA, l'acido gamma-linolenico (GLA - 18:3,  $\omega$ -6) e l'acido stearidonico (SDA-18:4,  $\omega$ -3).

Bisogna specificare che, sebbene questi acidi grassi siano importanti per la salute, bisogna comunque prestare attenzione all'assunzione. Nel corpo umano, sia LA che ALA sono metabolizzati dallo stesso enzima, il  $\Delta$ -6-desaturasi. Sono quindi in competizione, poiché un'elevata assunzione di LA può ridurre la quantità di  $\Delta$ -6-desaturasi disponibile per il metabolismo di ALA, con il conseguente aumento del rischio di malattie cardiache. Questo

aspetto è molto importante per la salute ed è quindi stato sviluppato il concetto di un rapporto "ideale" tra omega-6 e omega-3 nella dieta che deve essere inferiore a quattro (Simopoulos, 2008).

Il rapporto  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 nell'olio di semi di canapa è normalmente compreso tra 2:1 e 3:1, rapporto considerato ottimale per la salute umana.

## 1.2. Proteine

I semi di canapa sono un'eccellente fonte nutrizionale di proteine di alta qualità, facilmente digeribili che contengono quantità nutrizionalmente significative di aminoacidi essenziali, in particolare arginina. Le due principali proteine presenti nei semi di canapa sono l'edestina, una globulina che rappresenta il 60 – 80 % del contenuto proteico totale, e l'albumina circa il 13%. (Docimo et al., 2014).

Le globuline sono la classe predominante di proteine di deposito dei semi in un'ampia varietà di piante, in specie le leguminose.

I semi di canapa sono inoltre fonte di minerali come fosforo, potassio, magnesio e calcio, e di molecole ad attività antiossidante, come i tocoferoli e i derivati dei lignani.

## 1.3. I cannabinoidi e il sistema endocannabinoide

Dalla Canapa Sativa sono stati isolati più di 1600 composti chimici, tra i quali più di 180 sono cannabinoidi. I cannabinoidi possono essere costituenti biologicamente attivi della cannabis (fitocannabinoidi) o di sintesi o endogeni (endocannabinoidi), di solito aventi affinità e attività su recettori specifici (Finn et al., 2021). I più abbondanti cannabinoidi e di maggior interesse presenti nella canapa, sono il  $\Delta^9$ -THC e il cannabidiolo (CBD). A questi si aggiungono  $\Delta^8$ -trans-tetraidrocannabinolo ( $\Delta^8$ -THC), cannabicromene (CBC), cannabigerolo (CBG), cannabinodiolo (CBND), cannabinolo (CBN), cannabitriolo (CBT) ecc...

Il rapporto tra i diversi cannabinoidi presenti nella canapa è in gran parte determinato dalla sua genetica – quindi dalla varietà della pianta – ma dipende anche da fattori estrinseci, come condizioni ambientali, di coltivazione, lo stato di maturità al momento della raccolta e il metodo di raccolta stesso. La biosintesi avviene a livello dei tricomi ghiandolari femminili mentre i fiori maschili sono privi di tricomi e quindi sono poveri in cannabinoidi (Tahir et al., 2021).

Concentrandoci sui principali cannabinoidi, il  $\Delta^9$ -THC e il CBD, questi vengono biosintetizzati enzimaticamente come acidi carbossilici farmacologicamente inattivi: l'acido  $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolico A ( $\Delta^9$ -THCA-A o semplicemente THCA) e l'acido cannabidiolico (CBDA) che derivano a loro volta dall'acido cannabigerolico (CBGA). Successivamente, per decarbossilazione, si formano i cannabinoidi attivi e neutri, quindi  $\Delta^9$ -THC e CBD (Figura 8). Questo processo avviene naturalmente quando la pianta invecchia, quando viene stoccata per un lungo periodo, quando subisce trasformazioni, quando viene esposta alla luce o al calore (ad esempio fumando, cuocendo al forno). Il  $\Delta^9$ -THC è sensibile sia alla temperatura che alla luce e in queste condizioni subisce una degradazione ossidativa in cannabinolo (CBN). Pertanto, il rapporto tra CBN e  $\Delta^9$ -THC può essere un indicatore dell'età del campione di cannabis conservato (Hädener et al., 2019)

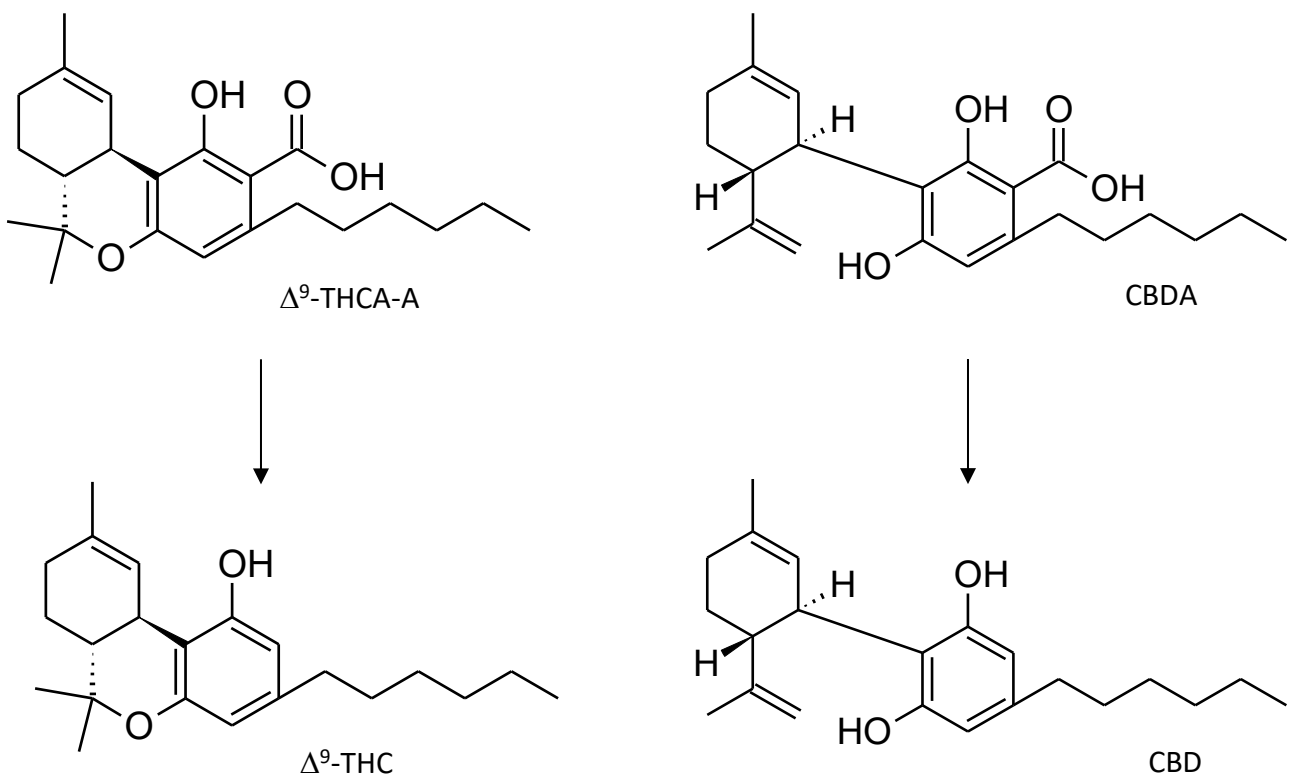


Figura 8: struttura molecolare  $\Delta^9$ -THC e CBD formata per decarbossilazione dei rispettivi acidi

Gli effetti biologici dei cannabinoidi nel nostro organismo, in particolar modo dati del  $\Delta^9$ -THC, sono regolati dal sistema endocannabinoide, detto anche ECS (Endocannabinoid System) (Lu & Mackie, 2016). I cannabinoidi esogeni interagiscono con gli stessi recettori per i cannabinoidi endogeni.

Il sistema endocannabinoide è un sistema neuromodulatore presente sia a livello del sistema nervoso centrale (SNC) sia nel resto dell'organismo che riveste un ruolo molto importante nello



sviluppo stesso dell'SNC, nella plasticità sinaptica e nella risposta allo stress causato da fattori interni o ambientali.

L'ECS ha bisogno di tre elementi per svolgere il suo ruolo: recettori, cannabinoidi ed enzimi. Nel dettaglio:

- i recettori cannabinoidi (CB) (Figura 9): esistono due principali CB.
  - CB1: codificati dal gene CNR1 fanno parte della famiglia dei recettori legati a proteina G. I CB1 dominano nel cervello e nel sistema nervoso, ma presenti anche in organi e tessuti periferici;
  - CB2: codificati dal gene CNR2 principalmente presenti nelle cellule del sistema immunitario, in particolar modo negli organi linfoidi (primari: timo; secondari: milza, anello di Wablayer)

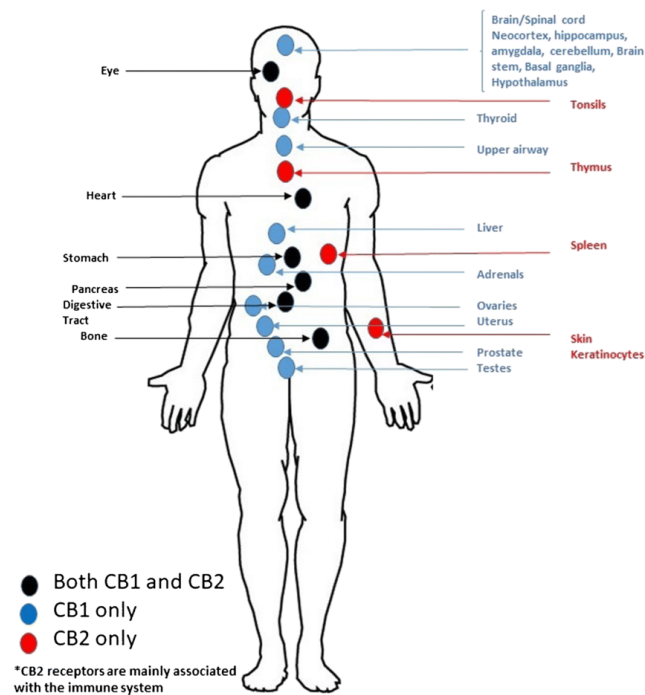


Figura 9: Posizione e distribuzione dei recettori CB1 e CB2 nel corpo umano (Reddy et al., 2019)

- i cannabinoidi endogeni (endocannabinoidi): Gli endocannabinoidi hanno natura lipidica e derivano dall'acido arachidonico, un acido grasso polinsaturo. I principali agonisti sono:
  - N-arachidonil-etanolamina o anandamide (AEA): agonista parziale ad alta affinità per CB1 mentre risulta quasi inattivo per CB2;
  - 2-arachidonil-glicerolo (2-AG): agonista completo sia per CB1 che per CB2.

Nonostante le somiglianze nella struttura chimica, 2-AG e AEA sono sintetizzati e degradati da distinte vie enzimatiche.

- enzimi responsabili della sintesi e della degradazione degli endocannabinoidi. Dopo la sintesi e l'azione su specifici recettori, gli endocannabinoidi verranno rapidamente degradati. Nelle cellule nervose gli endocannabinoidi si formano a partire da fosfolipidi di membrana:
  - AEA: la biosintesi dell'anandamide prevede la sua formazione dal precursore N-arachidonoil-fosfatidil-etanolamina (NAPE), catalizzata dall'attività idrolitica di una fosfolipasi D specifica, NAPE-PLD. L'ammide idrolasi degli acidi grassi (FAAH), situato nel reticolo endoplasmatico del neurone postsinaptico, degrada l'AEA in acido arachidonico ed etanolamina.
  - 2-AG: Il 2-arachidonoil-glicerolo è sintetizzato mediante conversione dell'1,2-diacilglicerolo in 2-AG da parte delle diacilglicerolo lipasi. Il catabolismo invece è catalizzato dal monoacilglicerolo lipasi (MGL) in acido arachidonico e glicerolo.

Solitamente i neuroni si scambiano segnali attraverso impulsi chimici, che provocano il rilascio di neurotrasmettitori. Quando un impulso raggiunge l'estremità di un neurone presinaptico, stimola il rilascio di una sostanza che attraversa la fessura sinaptica e si lega ad un recettore sulla superficie del neurone post-sinaptico. Questa è chiamata trasmissione anterograda. Per gli endocannabinoidi, la modalità di azione è esattamente il contrario. Si parla infatti di trasmissione sinaptica retrograda. Questo meccanismo prevede che un segnale di natura chimica venga rilasciato a livello postsinaptico, arrivi al neurone presinaptico e viene regolato il rilascio presinaptico. La trasmissione retrograda può inibire i neuroni presinaptici dal rilascio di neurotrasmettitori aggiuntivi, e può aiutare a controllare il livello di attività e di comunicazione tra i neuroni (Figura 10).

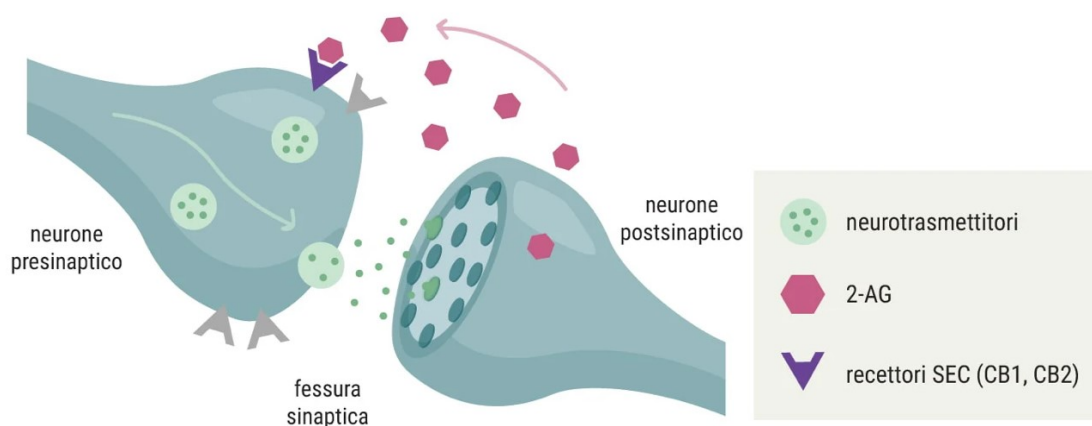


Figura 10: trasmissione retrograda degli endocannabinoidi

I recettori endocannabinoidi sono diffusi in tutto il corpo e quindi molte sue funzioni, vedono l'ECS coinvolto. L'ECS è un fattore di regolazione e controllo estremamente importante e ha un ruolo chiave per ricreare l'omeostasi. La regolazione farmacologica dei recettori cannabinoidi è stata proposta come una promettente strategia terapeutica per il dolore, l'infiammazione, l'obesità, i disturbi neurodegenerativi e il cancro.

#### 1.4. Normativa

Il Ministero della salute italiana ha inizialmente normato il contenuto di  $\Delta^9$ -THC con il decreto del 4 novembre 2019, pubblicato in Gazzetta ufficiale il 15 gennaio 2020. I limiti massimi di THC totale sono definiti come la somma delle concentrazioni della sostanza  $\Delta^9$ -THC (psicoattivo) e del precursore acido non attivo  $\Delta^9$ -THCA-A. Sono stati definiti gli alimenti derivati dalla canapa e i limiti massimi consentiti per questi alimenti (Tabella 2):

Alimenti	Limiti massimi THC totale (mg/Kg)
Semi (inclusi quelli triturati, spezzettati, macinati diversi dalla farina) e farina ottenuta dai semi di canapa	2,0
Olio ottenuto dai semi di canapa	5,0
Integratori contenenti alimenti derivati dalla canapa	2,0

*Tabella 2: tenori massimi di THC totale secondo Gazzetta Ufficiale*

Successivamente è entrato in vigore il Regolamento UE 2023/915 della commissione del 25 aprile 2023 relativo ai tenori massimi di alcuni contaminanti negli alimenti che abroga il regolamento (CE) n. 1881/2006. In tale regolamento il tenore massimo di THC totale viene modificato e viene anche introdotto un fattore di conversione di  $\Delta^9$ -THCA in THC. I limiti massimi ad oggi ammessi per i prodotti alimentari a base di canapa in Europa e in Italia, sono i seguenti (Tabella 3):

Alimenti	Limiti massimi THC totale (mg/Kg)
Semi di canapa	3,0
Semi di canapa macinati, semi di canapa (parzialmente) disoleati e altri prodotti trasformati dei semi di canapa	3,0
Olio di semi di canapa	7,5

*Tabella 3: tenori massimi di THC totale secondo il Reg. 915/2023*

I tenori massimi sono da intendersi come somma di  $\Delta^9$ -THC e  $\Delta^9$ -THCA, quest'ultimo corretto per il fattore 0,877 che tiene conto del gruppo carbossilico che viene perso per la sua conversione in  $\Delta^9$ -THC (Equazione 1).

In tale regolamento è stato anche specificato che per gli equivalenti di  $\Delta^9$ -THC i tenori massimi si riferiscono alle concentrazioni lower bound che sono calcolate ipotizzando che tutti i valori inferiori al limite di quantificazione siano pari a zero.

$$\Sigma_{THC} = \Delta^9 - THC + (0,877 \times \Delta^9 - THCA)$$

*Equazione 1: calcolo per determinazione THC totale*

Nel metodo sviluppato verranno analizzati i cannabinoidi previsti dal Reg. 915/2023, quindi  $\Delta^9$ -THC e  $\Delta^9$ -THCA.

### **1.5. Sistema cromatografico UHPLC-HRMS**

Gli estratti dei campioni sono stati analizzati mediante un sistema di cromatografia liquida ad altissima pressione (UHPLC) accoppiato a uno spettrometro di massa quadrupolo – orbitrap (Figura 11).

Nel sistema UHPLC, dopo l'iniezione, il campione viene trasportato per mezzo delle fasi mobili alla colonna cromatografica. Qui gli analiti vengono separati grazie alle interazioni con la fase stazionaria della colonna, arrivando al rivelatore con diversi tempi di ritenzione cromatografica. Ciascun analita arriva quindi alla sorgente dove avviene la ionizzazione, portando alla formazione dello ione primario detto anche "parent ion".

Per la ionizzazione viene utilizzata una tecnica di ionizzazione soft, cioè a bassa energia, chiamati "Electrospray Ionization" (ESI). Il flusso di ioni appena generati arriva al quadrupolo, che agendo come un filtro di massa, permette la selezione dello ione precursore, in base al rapporto massa/carica ( $m/z$ ). Da qui, gli ioni vengono indirizzati e raccolti nella C-trap che dirige gli ioni alla cella di collisione ad alta energia (HCD: Higher-energy collisional dissociation fragmentation) per la frammentazione, o all'analizzatore di massa di tipo orbitrap per il rilevamento. L'energia di collisione per la frammentazione viene decisa dall'utilizzatore e ottimizzata in base alle caratteristiche delle molecole in esame.

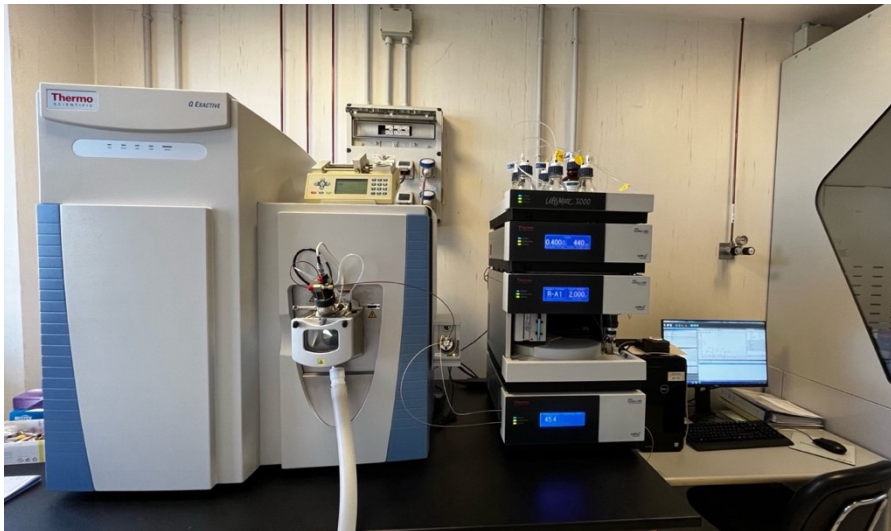


Figura 11: Sistema UHPLC "UltiMate3000" accoppiato a rivelatore quadrupolo - orbitrap "Qexactive"

L'orbitrap è un analizzatore di massa a trappola ionica che consiste in due elettrodi esterni e un elettrodo centrale a forma di fuso. Quando si genera un campo elettrostatico, gli ioni vengono intrappolati in un movimento orbitale attorno all'elettrodo centrale e oscillatorio tra gli elettrodi esterni. La frequenza di oscillazione assiale varia in funzione del rapporto  $m/z$  dello ione, quindi ioni diversi oscillano a frequenze diverse. Misurando le frequenze di oscillazione indotte dagli ioni sugli elettrodi esterni, viene generato uno spettro di frequenza che, utilizzando la trasformata di Fourier, viene convertito in uno spettro di massa (Figura 12). (Anton Kaufmann & Maciej Bromirski, s.d.)

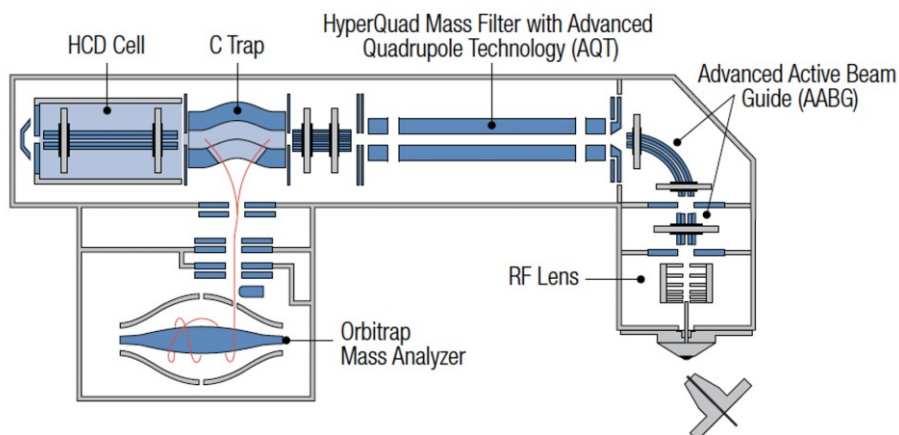


Figura 12: sistema di rilevamento Q-exactive Plus

Questo strumento ha la capacità di operare ad alta risoluzione. Per risoluzione si intende la capacità di separare due ioni di massa diversa ma molto vicini tra loro. Maggiore è la risoluzione dello strumento e maggiore è la capacità di separazione di due picchi aventi rapporti  $m/z$  simili.

In realtà, per lo sviluppo di questa procedura non era necessario disporre di uno strumento ad alta risoluzione, ma al momento della messa a punto del metodo era l'unico strumento disponibile in laboratorio, che tuttavia permette di ottenere una più elevata confidenza sulla corretta identità degli analiti sotto indagine.

## 2. SCOPO

A seguito dell'introduzione da parte dell'Unione Europea di limiti massimi ammissibili del cannabinoide psicoattivo  $\Delta^9$ -THC e del suo precursore inattivo  $\Delta^9$ -THCA in prodotti a base di canapa ad uso alimentare con il Regolamento 915/2023, si è proceduto a svilupparne un metodo di analisi quantitativa. Sono stati studiati i metodi di estrazione, cromatografico e di quantificazione. È inoltre stato valutato il limite di quantificazione (LOQ), linearità, precisione e recupero del metodo.

Lo sviluppo del metodo di analisi dei cannabinoidi  $\Delta^9$ -THC e  $\Delta^9$ -THCA, è stato eseguito all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSve – viale dell'Università, 10, 35020, Legnaro, Padova) ente che, tra i suoi compiti istituzionale, ha l'analisi di controlli ufficiali negli alimenti. L'IZSve è un'organizzazione istituita da leggi nazionali e regionali come strumento tecnico-scientifico del Servizio Sanitario Nazionale che svolge attività di controllo, ricerca e servizi negli ambiti della salute animale, dei rischi alimentari e delle zoonosi. Fa parte di una rete di dieci Istituti Zooprofilattici Sperimentali con funzioni simili distribuiti su tutto il territorio italiano.





### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1. Quantificazione tramite aggiunte standard

La prima considerazione fatta per sviluppare il metodo dei cannabinoidi è che i prodotti alimentari di interesse – semi, olio, farina di canapa – inevitabilmente contengono cannabinoidi, quindi anche  $\Delta^9$ -THC e  $\Delta^9$ -THCA. Questo ha portato alla luce il problema di non poter disporre di una matrice negativa per poter eseguire la prova del bianco e spike per il calcolo del recupero e ripetibilità della seduta di analisi e la valutazione dei parametri utili alla validazione del metodo. È stato quindi opportuno avvalersi del metodo delle aggiunte standard. Il metodo consiste nell'analizzare il campione in più aliquote, una tal quale mentre alle altre vengono aggiunti gli analiti di interesse a concentrazioni successive e note. In questo modo si crea una retta, tramite la quale si è in grado di calcolare la concentrazione di analiti nel campione tal quale, per estrapolazione. Questo metodo è una tecnica di taratura utilizzata per lo più per superare il problema degli effetti matrice in quanto si presume che la matrice influenzi tutte le aliquote dello stesso campione allo stesso modo.

È stato quindi studiato quali fossero le condizioni migliori per progettare le aggiunte standard prendendo come modello lo studio condotto da Stephen L. R. Ellison e Michael Thompson (Ellison & Thompson, 2008) dove viene paragonato il metodo di quantificazione con retta di calibrazione esterna (per interpolazione) e il metodo delle aggiunte standard (per estrapolazione). Si desume che i migliori risultati si ottengono con un singolo livello di addizionamento degli analiti di interesse (che chiameremo fortificati "FO") all'estremo più alto dell'intervallo lineare. L'aggiunta deve essere almeno quattro volte la concentrazione dell'analita nativo e possibilmente prevedere una replica di questi punti. Considerando la concentrazione critica di  $\Delta^9$ -THC e  $\Delta^9$ -THCA pari ai limiti massimi ammessi dal Reg. 915/2023 (*Tabella 3: tenori massimi di THC totale secondo il Reg. 915/2023*), si è deciso di analizzare per ciascun campione due aliquote tal quali "TQ" e due aliquote fortificate cinque volte la concentrazione critica. Per l'analisi viene utilizzato anche uno standard interno: il  $\Delta^9$ -THC-D3. Si tratta della stessa molecola di  $\Delta^9$ -THC alla quale sono stati sostituiti tre atomi di idrogeno, con tre deuteri. Il deuterio è un isotopo stabile dell'idrogeno – espresso con D o  $^2\text{H}$  – il cui nucleo è composto da un protone e un neutrone (l'atomo di idrogeno ha un solo protone), avente una massa atomica doppia rispetto all'idrogeno. Il  $\Delta^9$ -THC-D3 viene aggiunto a tutte le aliquote del campione (TQ e FO) e il suo utilizzo è dato dal fatto che permette di compensare gli errori derivanti dalla perdita di analita durante le fasi di estrazione del campione o dalla scarsa riproducibilità del

sistema di introduzione del campione nel sistema cromatografico, assumendo che lo standard interno subisca una perdita analoga a quella degli analiti.

Le aggiunte vengono eseguite prevedendo:

- Due aliquote tal quali a cui viene aggiunto lo standard interno  $\Delta^9$ -THC-D3 ad una concentrazione pari a cinque volte la concentrazione critica. L'aggiunta si differenzia a seconda della matrice analizzata:
  - 37,5 mg/kg per olio di canapa;
  - 15 mg/kg per semi e farina di canapa.
- Due aliquote fortificate con  $\Delta^9$ -THC,  $\Delta^9$ -THCA e  $\Delta^9$ -THC-D3 ad una concentrazione pari a cinque volte la concentrazione critica. L'aggiunta si differenzia a seconda della matrice analizzata:
  - 37,5 mg/kg per olio di canapa;
  - 15 mg/kg per semi e farina di canapa.

### 3.2. Reagenti e strumentazione

Per la messa a punto del metodo, si sono usate tre tipologie di matrici a base di canapa: olio, semi decorticati e farina. Nel Reg. 915/2023 l'olio e i semi di canapa hanno un limite specifico, mentre la farina di canapa viene presa come riferimento per i prodotti trasformati dai semi. I campioni presi in esame sono stati reperiti nella grande distribuzione.

Vengono utilizzate soluzioni di riferimento di  $\Delta^9$ -THC da 1 mg/ml,  $\Delta^9$ -THCA-A da 1 mg/ml e  $\Delta^9$ -THC-D3 da 1 mg/ml (*Merck*, Germania), tutte conservate in congelatore a -20°C. Tali soluzioni vengono utilizzate per la preparazione dei fortificati e delle soluzioni di controllo analisi (vedi paragrafo 3.3.1). Per l'analisi cromatografica viene usato un cromatografo liquido UHPLC UltiMate 3000 accoppiato ad analizzatore di massa quadrupolo – orbitrap Q-Exactive (*Thermo Fisher Scientific Inc.*, USA). La separazione cromatografica viene eseguita per mezzo di una colonna cromatografica UPLC Acquity HSS T3, 100 Å, 1.8  $\mu$ m, 2.1 mm x 100 mm (*Waters*, USA).

L'acqua utilizzata viene purificata e deionizzata per mezzo di un sistema di sanitizzazione (*Sartorius*, *Stedim Biotech*, Francia); acetone, metanolo, acido formico e acetonitrile devono essere tutti adatti in termini di purezza per l'analisi HPLC (*Sigma Aldrich*, Italia). Ammonio formiato viene utilizzato per la preparazione della fase mobile (*Sigma Aldrich*, Italia).

### 3.3. Preparazione delle soluzioni

#### 3.3.1. Preparazione degli standard e soluzioni di controllo

Le soluzioni di riferimento madre di  $\Delta^9$ -THC,  $\Delta^9$ -THCA-A e  $\Delta^9$ -THC-D3 hanno una concentrazione di 1 mg/ml e vengono conservate in congelatore (-20°C) come riportato nel certificato di analisi. Da queste soluzioni, vengono eseguite delle diluizioni in matraccio per ottenere:

- soluzioni di miscele dei due cannabinoidi e dello standard interno usate per le aggiunte alle aliquote:
  - Soluzione mix  $\Delta^9$ -THC +  $\Delta^9$ -THCA da 100 mg/l;
  - Soluzione  $\Delta^9$ -THC-D3 da 100 mg/l.
- Soluzioni di controllo delle prestazioni strumentali di giornata. Le soluzioni vengono diversificate a seconda della matrice, in quanto le matrici analizzate in un batch analitico possono essere diverse e quindi le soluzioni di controllo devono essere in linea con l'aggiunta al fortificato che viene eseguita, per avere un dato paragonabile. Le soluzioni di controllo sono composte dai due cannabinoidi di interesse e dallo standard interno:
  - Soluzione di controllo "*semi e farina di canapa*" con concentrazione di 375  $\mu$ g/l;
  - Soluzione di controllo "*olio di canapa*" con concentrazione 180  $\mu$ g/l.

#### 3.3.2. Preparazione delle fasi mobili

- La fase mobile acquosa è una soluzione di ammonio formiato 5mM acidificata con acido formico al 0,1%. Per la preparazione si è prima preparata una soluzione di ammonio formiato 1,0 M, sciogliendo 0,63 g di ammonio formiato puro con acqua in un matraccio da 10 ml. Successivamente, in un matraccio da 500 ml vengono miscelati 2,5 ml di ammonio formiato 1,0 M, 500  $\mu$ l di acido formico (>99%), portando a volume con acqua.
- La fase mobile organica è composta da acetonitrile acidificato con acido formico al 0,1%. In 500 ml di acetonitrile vengono miscelati 500  $\mu$ l di acido formico (>99%).

È importante considerare che, qualora sia necessario ai fini della cromatografia prevedere modificati organici (acido formico in questo caso), è ideale che entrambe le fasi mobili li abbiano, soprattutto quando si lavora in gradiente di eluizione. Se entrambe le fasi mobili hanno il modificatore organico alla stessa concentrazione, il pH dell'eluente sarà costante durante tutta

la corsa; nel caso contrario in ogni istante della corsa il pH sarà diverso, e questo potrebbe influenzare la separazione degli analiti.

### 3.4. Preparazione dei campioni

Per lo sviluppo del metodo sono state divise due categorie di alimenti, raggruppabili per similitudine di matrice e limiti massimi ammessi: olio di canapa da una parte mentre semi e farina dall'altra.

Per tutte le matrici, per ogni campione sono state pesate quattro aliquote per eseguire le aggiunte standard (due aliquote TQ e due FO).

#### 3.4.1. Preparazione dei campioni di olio di canapa

Prima di procedere con il prelievo dell'olio, la confezione viene opportunamente agitata in modo da rendere il campione omogeneo. A questo punto, si versa una quantità d'olio in una provetta da 15 ml, in modo da facilitare il prelievo per la pesata.

Per lo sviluppo del metodo di estrazione dei cannabinoidi nell'olio, si è preso come spunto l'applicazione note di Shimadzu (Yuan, 2018), adattandola alla strumentazione per l'analisi cromatografica a disposizione. È stato mantenuto lo stesso rapporto di diluizione (10 µL: 800 µL), aumentandone però i volumi di lavoro.

Per ogni campione si sono pesati circa 60 mg di olio in quattro matracci tarati da 5 ml, annotandone il valore. Si procede ad eseguire le aggiunte tarate seguendo lo schema sotto riportato (Tabella 4), tenendo conto che il deuterato viene aggiunto a tutte e quattro le aliquote. L'aggiunta viene fatta ad una concentrazione pari a 5 volte il limite, sia per gli analiti che per lo standard interno, come spiegato nel paragrafo 3.1, quindi per l'olio il fortificato sarà:

$$C_{FO\ olio} = 5 \times 7,5\ mg\ kg^{-1} = 37,5\ mg\ kg^{-1}$$

	$\Delta^9$ -THC-D3 da 100 mg/l Da aggiungere a tutte le aliquote	mix $\Delta^9$ -THC + $\Delta^9$ -THCA da 100 mg/l Da aggiungere ai fortificati
60 mg di olio di canapa	22,5 µl	22,5 µl

Tabella 4: preparazione delle aggiunte standard per olio di canapa

Dopo l'aggiunta i campioni vengono fatti riposare 30 minuti.

La procedura di riferimento prevede la diluizione del campione con isopropanolo. L'isopropanolo è stato sostituito con metanolo leggermente acidificato con acido formico, in quanto solvente più adatto per la cromatografia liquida. Il metanolo però è un solvente apolare ma l'olio e i cannabinoidi sono lipofili. Quindi serve un solvente che sia in grado di sciogliere l'olio ma che sia compatibile e miscibile anche con il metanolo. Per questo motivo è stato scelto l'acetone. Vengono quindi aggiunti 2 ml di acetone e i matracci vengono agitati, in modo da sciogliere l'olio nell'acetone. A questo punto viene portato a volume con metanolo acidificato. Per procedere all'analisi strumentale è doveroso eseguire un'ulteriore diluizione. Si prelevano quindi 200 µl di campione e si trasferiscono in una vial autofiltrante da 500 µl con 300 µl di metanolo 0,1% acido formico. A questo punto il campione è pronto per l'analisi strumentale.

### 3.4.2. Preparazione dei campioni di semi e farina di canapa

La farina di canapa è un prodotto che non necessita di macinazione. Il contenuto della confezione viene opportunamente miscelato. I semi di canapa decorticati vengono omogenati con Osterizer. Per entrambe le matrici, viene poi eseguito il prelievo di 1 g di campione in falcon da 50 ml per quattro aliquote.

Prendendo come spunto la procedura per l'olio, si è sviluppato il metodo per semi e farina di canapa. In questo caso però la matrice è solida, quindi si procederà ad una estrazione solido – liquido. Si procede con l'aggiunta dagli standard seguendo la tabella seguente (*Tabella 5*), considerando anche in questo caso che il fortificato avrà una concentrazione pari a cinque volte il limite:

$$C_{FO \text{ semi e farina}} = 5 \times 3 \text{ mg kg}^{-1} = 150 \text{ mg kg}^{-1}$$

	$\Delta^9$ -THC-D3 da 100 mg/l Da aggiungere a tutte le aliquote	mix $\Delta^9$ -THC + $\Delta^9$ -THCA da 100 mg/l Da aggiungere ai fortificati
1 g di semi o farina di canapa	150 µl	150 µl

*Tabella 5: preparazione delle aggiunte standard per semi e farina di canapa*

Si aggiungono 2 ml di acetone e si agita per 5 minuti su oscillatore orizzontale, così da solubilizzare i cannabinoidi. Si continua l'estrazione aggiungendo 6 ml di metanolo 0,1% acido formico, sonicando per 15 minuti e agitando per 10 minuti. Si centrifugano le provette su centrifuga a 3300 g per 5

minuti. Il surnatante viene raccolto su una nuova provetta da 50 ml. Il precipitato solido rimasto viene nuovamente estratto aggiungendo 8 ml di metanolo 0,1% acido formico, seguendo le stesse condizioni precedenti. Il surnatante ottenuto, viene aggiunto al primo e miscelato. Della soluzione ottenuta si diluiscono 200 µl con 300 µl di metanolo 0,1% acido formico. Il campione è pronto per l'analisi strumentale

### 3.5. Condizioni cromatografiche

Per lo sviluppo del metodo cromatografico ci si è ispirati al metodo proposto dal laboratorio WFSR Wageningen University & Research, adattando i vari parametri al sistema cromatografico a disposizione (EURL mycotoxins and plant toxins, 2022). Visti i risultati soddisfacenti, si è deciso di applicare le seguenti condizioni.

Per l'eluizione vengono usate due fasi mobili, una acquosa composta da una soluzione di ammonio formiato 5mM acidificato allo 0,1% con acido formico (solvente A) e una organica composta da metanolo acidificato allo 0,1 % con acido formico (solvente B). Il flusso è pari a 0,400 ml/minuto e segue un gradiente di eluizione, come segue nella Tabella 6:

Tempo (min)	% solvente A	% solvente B
0	50	50
1	50	50
6	0	100
9	0	100
9,5	50	50
12	50	50

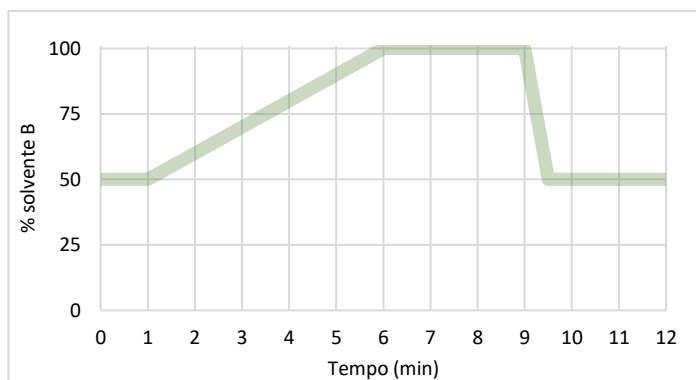


Tabella 6: gradiente di eluizione cromatografico

Viene utilizzata una colonna per UPLC Acquity HSS T3, 100 A, 1.8 µm, 2.1 mm x 100 mm (Waters). La fase stazionaria di questa colonna cromatografica è composta da particelle HSS T3, ovvero High Strength Silica (silice ad alta resistenza) e gruppi funzionali T3. La fase legata è in grado di sopportare le alte pressioni delle condizioni cromatografiche UPLC (fino a 15000 psi/1000 bar) mentre i gruppi funzionali T3 hanno la funzione di trattenere e separare i composti organici polari. La contropressione generata dall'eluizione della fase mobile nella colonna cromatografica viene

misurata da un apposito sensore. Quando si inizia l'analisi strumentale, dopo il condizionamento e raggiunte le condizioni iniziali, la contropressione viene controllata e paragonata alle sedute precedenti; il valore deve essere circa 380 bar. Il volume di iniezione è pari a 5  $\mu$ l, temperatura dell'autocampionatore 10 °C e temperatura della colonna 40 °C.

Fasi mobili	A: soluzione di ammonio formiato 5 mM 0,1% HCOOH B: metanolo 0,1% HCOOH
Pressione	380 bar
Volume di iniezione	5 $\mu$ l
Temperatura autocampionatore	10 °C
Temperatura colonna	40 °C
Durata	12 minuti
Colonna	UPLC Acquity HSS T3, 100 A, 1.8 $\mu$ m, 2.1 mm x 100 mm

Tabella 7: Condizioni per la separazione cromatografica

L'analisi viene eseguita sia in ESI positivo, per  $\Delta^9$ -THC e rispettivo deuterato, che in ESI negativo per il  $\Delta^9$ -THCA. Per ESI si intende ElectroSpray Ionization, cioè la tecnica di ionizzazione dello spettrometro di massa. Gli analiti ionizzabili, in base al solvente in cui sono sciolti e alle fasi mobili con cui vengono eluiti nel sistema cromatografico, possono acquisire o perdere elettroni. Si formano quindi delle specie anioniche (cariche negativamente) o cationiche (cariche positivamente). In base all'analita si può impostare lo strumento con una polarità positiva (ESI positivo) o negativa (ESI negativo), in modo generare rispettivamente, ioni ionizzabili positivamente o negativamente.

Per la frammentazione viene impostata un'energia di collisione (N)CE pari a 55 eV.

Per la quantificazione di  $\Delta^9$ -THC e  $\Delta^9$ -THCA vengono utilizzati gli ioni prodotto 1 della frammentazione mentre il  $\Delta^9$ -THC-D3 viene quantificato con lo ione precursore. Nella tabella successiva vengono riassunti i parametri di frammentazione:

Molecola	ione precursore (m/z)	ione prodotto 1 (m/z)	(N)CE (eV)	Polarità	Tempo di ritenzione (min)
$\Delta^9$ -THC	315,23186	123,04423	55	Positiva	5,97
$\Delta^9$ -THCA-A	357,20713	245,15470	55	Negativa	6,25
$\Delta^9$ -THC-D3	318,25069			Positiva	5,96

Tabella 8: Parametri di frammentazione e tempi di ritenzione

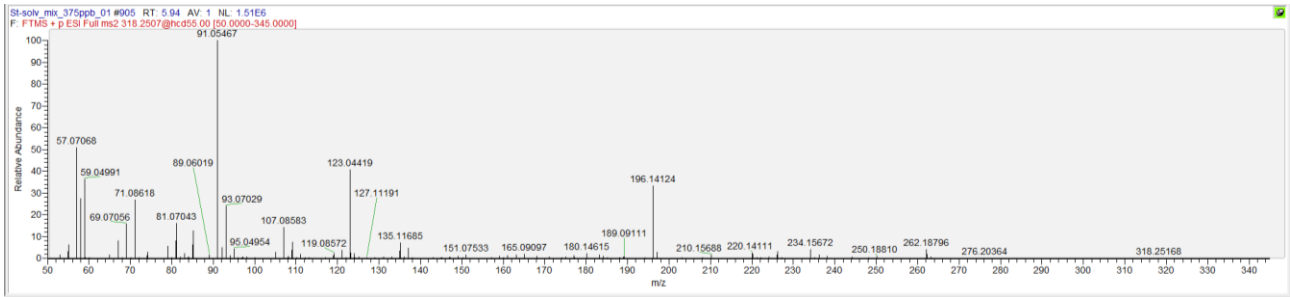
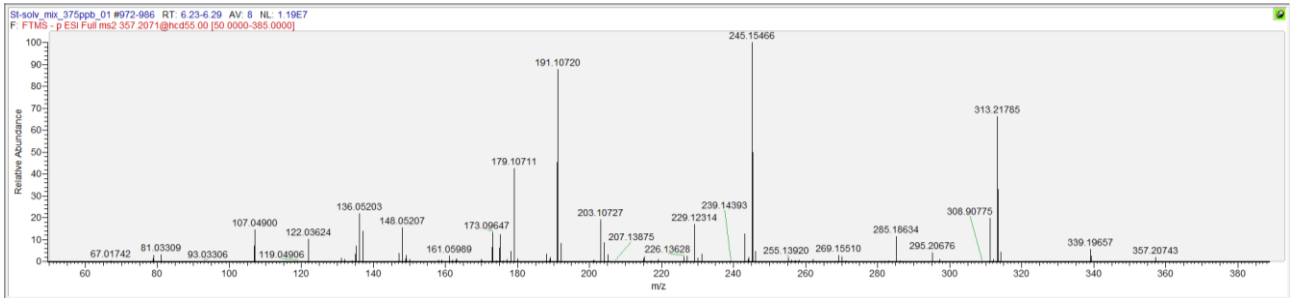
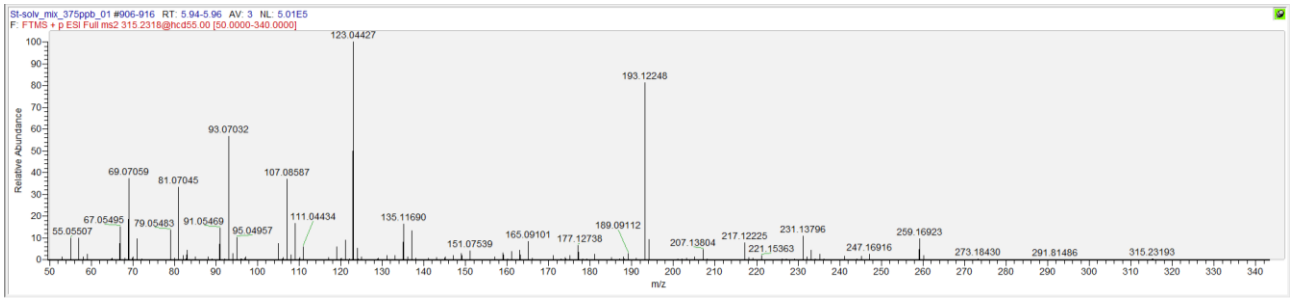


Figura 13: dall'alto spettri di frammentazione di  $\Delta^9$ -THC,  $\Delta^9$ -THCA e  $\Delta^9$ -THC-D3



## 4. RISULTATI E DISCUSSIONE

### 4.1. Numero estrazioni successive

La procedura per l'estrazione solido - liquido dei cannabinoidi dai semi e farina di canapa, prevede due estrazioni successive, con acetone e metanolo acidificato 0,1% con acido formico. La decisione di eseguirne due è stata presa facendo delle prove di estrazioni successive. In particolare, si sono analizzati gli estratti di cinque estrazioni successive, sia per farina che per semi di canapa. Nei grafici successivi si mette in relazione la concentrazione ottenuta per ogni analita (in mg/Kg) in ognuna delle cinque estrazioni successive.



Figura 14: Concentrazioni medie di  $\Delta^9$ -THC e  $\Delta^9$ -THCA in cinque estrazioni successive per l'estrazione di semi e farina di canapa e relative deviazioni standard.

Considerando la somma di tutte e cinque le estrazioni il 100%, si può osservare in Tabella 9 come le prime due estrazioni risultano essere quantitative, rendendo quindi trascurabili le successive tre.

Matrice	Analiti	Prima estrazione	Seconda estrazione	Terza estrazione	Quarta estrazione	Quinta estrazione	Somma
Farina di canapa	$\Delta^9$ -THCA	77%	15%	5%	2%	1%	100%
	$\Delta^9$ -THC	76%	20%	3%	1%	0%	100%
Semi di canapa	$\Delta^9$ -THCA	80%	13%	4%	2%	1%	100%
	$\Delta^9$ -THC	81%	12%	6%	1%	0%	100%

Tabella 9: Recupero di  $\Delta^9$ -THC e  $\Delta^9$ -THCA in semi e farina di canapa, nelle cinque estrazioni successive

#### 4.2. Calcolo concentrazione degli analiti nei campioni

A seguito dell'analisi strumentale i segnali registrati vengono visualizzati come dei picchi in un cromatogramma. Per il calcolo della concentrazione, si è interessati all'area che sottende il picco cromatografico dell'analita d'interesse. Il picco cromatografico relativo all'analita viene identificato in base al rapporto  $m/z$  e al tempo di ritenzione.

Le aree ottenute vengono corrette con la pesata realmente effettuata delle quattro aliquote di ogni campione analizzato, attraverso una proporzione. Successivamente le aree degli analiti,  $\Delta^9$ -THC e  $\Delta^9$ -THCA, vengono rapportate all'area dello standard interno  $\Delta^9$ -THC-D3. Con questi dati si costruiscono due grafici separati, uno per ogni analita. In ogni grafico viene riportato nell'asse delle ascisse i rapporti analita/standard interno e nelle ordinate le concentrazioni aggiunte ai fortificati (per i TQ la concentrazione sarà pari a 0 mg/Kg). Si ottiene una retta, avente formula generale  $y=mx+q$ . Per ottenere la concentrazione del campione incognito del cannabinoide analizzato, viene valutata l'intersezione di tale retta con l'asse delle ascisse nel campo negativo, ponendo il valore di  $y$  pari a 0. Il valore ottenuto, cambiato di segno, corrisponde alla concentrazione dell'analita nel campione (Figura 15).

Matematicamente la concentrazione del cannabinoide ( $C_{\Delta^9-THC}$  e  $C_{\Delta^9-THCA}$ ) è ottenuta rapportando l'intercetta, con il valore della pendenza, in valore assoluto:

$$C_{\Delta^9-THC \text{ o } \Delta^9-THCA} = \left| \frac{-q}{m} \right|$$

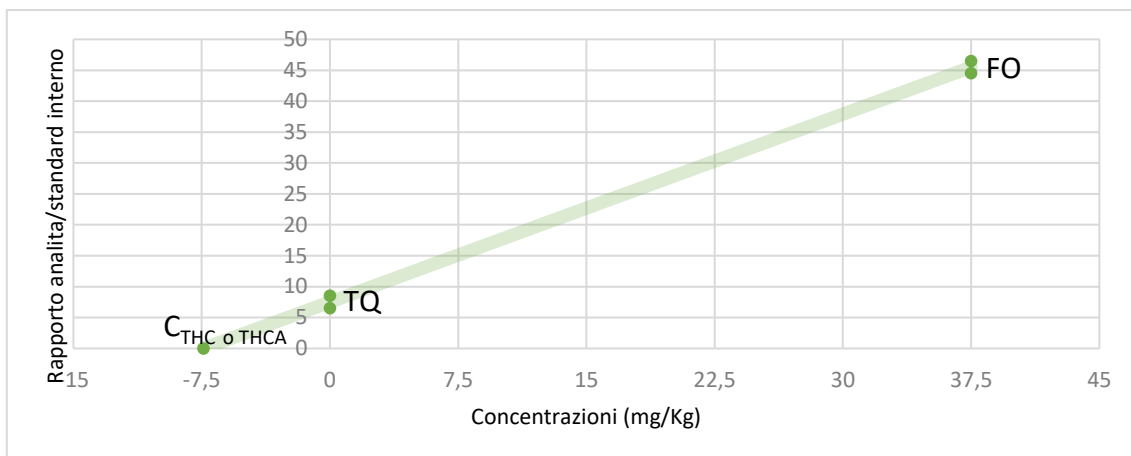


Figura 15: Esempio di grafico aggiunta standard

Come da regolamento, il risultato deve essere espresso come THC totale, ovvero sommano la concentrazione di  $\Delta^9$ -THC e  $\Delta^9$ -THCA applicando a quest'ultima un fattore di conversione pari a 0,877:

$$\Sigma_{THC} = C_{\Delta^9-THC} + (0,877 \times C_{\Delta^9-THCA})$$

Nello studio della tecnica di quantificazione delle aggiunte standard si è evidenziato che a basse concentrazioni di analita, anche piccole oscillazioni della linearità possono dar luogo a gravi distorsioni. Per questo motivo si è verificato la linearità, effettuando l'analisi di rette di taratura in solvente nel campo di applicazione del metodo. In ogni caso questa criticità si verifica anche con la tecnica di quantificazione della calibrazione esterna.

### 4.3. Il limite di quantificazione LOQ

Il limite di quantificazione (LOQ) identifica il limite inferiore di concentrazione sotto il quale il campione non può essere quantificato con sufficiente probabilità statistica.

Nel nuovo regolamento in prossima approvazione recante le modalità di campionamento e analisi per il controllo delle tossine vegetali negli alimenti che va ad abrogare il regolamento 705/2015, viene specificato che per limite inferiore si intende il livello più basso convalidato con successo. Ciò significa che per la concentrazione più bassa testata di analita in un campione, va dimostrato che i criteri di recupero, precisione e identificazione siano soddisfatti. Viene stabilito che il LOQ dovrebbe essere minore o uguale a metà del limite massimo (LM) e preferibilmente minore o uguale al valore

pari a  $0,2 \times LM$ . Per il metodo sviluppato si è deciso di fissare un LOQ pari a un decimo della concentrazione critica, come riportato nella tabella successiva:

Matrice	LOQ (mg/Kg)
Farina di canapa	0,30
Semi di canapa	0,30
Olio di canapa	0,75

Tabella 10: Limiti di quantificazione delle diverse matrici in esame

Sono stati studiati i criteri a cui il LOQ scelto deve rispondere. Per il recupero si rimanda al paragrafo 4.4 mentre per la precisione al paragrafo 0. L'ultimo criterio, l'identificazione, è verificato grazie all'individuazione dello ione molecolare (precursore) e di uno ione prodotto specifico per tutti gli analiti analizzati.

Da precisare che il LOQ viene applicato ai singoli analiti, quindi sia  $\Delta^9$ -THC che  $\Delta^9$ -THCA, anche se il risultato viene espresso come somma. Inoltre, per il calcolo di tale somma, viene applicato il metodo lower bound come espresso nel Reg. 915/2023, ovvero che i valori inferiori al limite di quantificazione devono essere considerati pari a zero.

#### 4.4. Recupero del metodo

Per il calcolo del recupero si è analizzato un campione reperito nella grande distribuzione per ognuna delle tre matrici prese in esame: semi, farina e olio di canapa. Di ogni matrice si è calcolato la concentrazione di cannabinoidi nativa ( $C_{nativa}$ ), replicando la misura otto volte. Si ottiene che i valori medi sono:

- Farina di canapa 0,6 mg/kg  $\Delta^9$ -THC e 1,1 mg/kg  $\Delta^9$ -THCA;
- Semi di canapa 0,4 mg/kg  $\Delta^9$ -THC e 0,6 mg/kg  $\Delta^9$ -THCA;
- Olio di canapa 3,4 mg/kg  $\Delta^9$ -THC e 3,9 mg/kg  $\Delta^9$ -THCA.

Gli stessi campioni sono stati poi analizzati con lo stesso metodo, aggiungendo le aliquote tal quali alla concentrazione critica ( $C_{spike}$ ): 3 mg/Kg per semi e farina; 7,5 mg/Kg per olio. Questa prova viene eseguita facendo otto ripetute per ogni matrice. Si ottiene che i valori medi sono:

- Farina di canapa 3,5 mg/kg  $\Delta^9$ -THC e 4,4 mg/kg  $\Delta^9$ -THCA;

- Semi di canapa 3,1 mg/kg  $\Delta^9$ -THC e 3,9 mg/kg  $\Delta^9$ -THCA;
- Olio di canapa 11,1 mg/kg  $\Delta^9$ -THC e 11,5 mg/kg  $\Delta^9$ -THCA.

Si consideri che la concentrazione finale appena ottenuta è costituita dalla concentrazione dei cannabinoidi nativi e dalla concentrazione di analiti aggiunti attraverso lo spike. Per ogni campione appena analizzato viene quindi sottratta la concentrazione media di cannabinoide nativo:

$$C_{finale} = C_{spike+nativa} - C_{nativa}$$

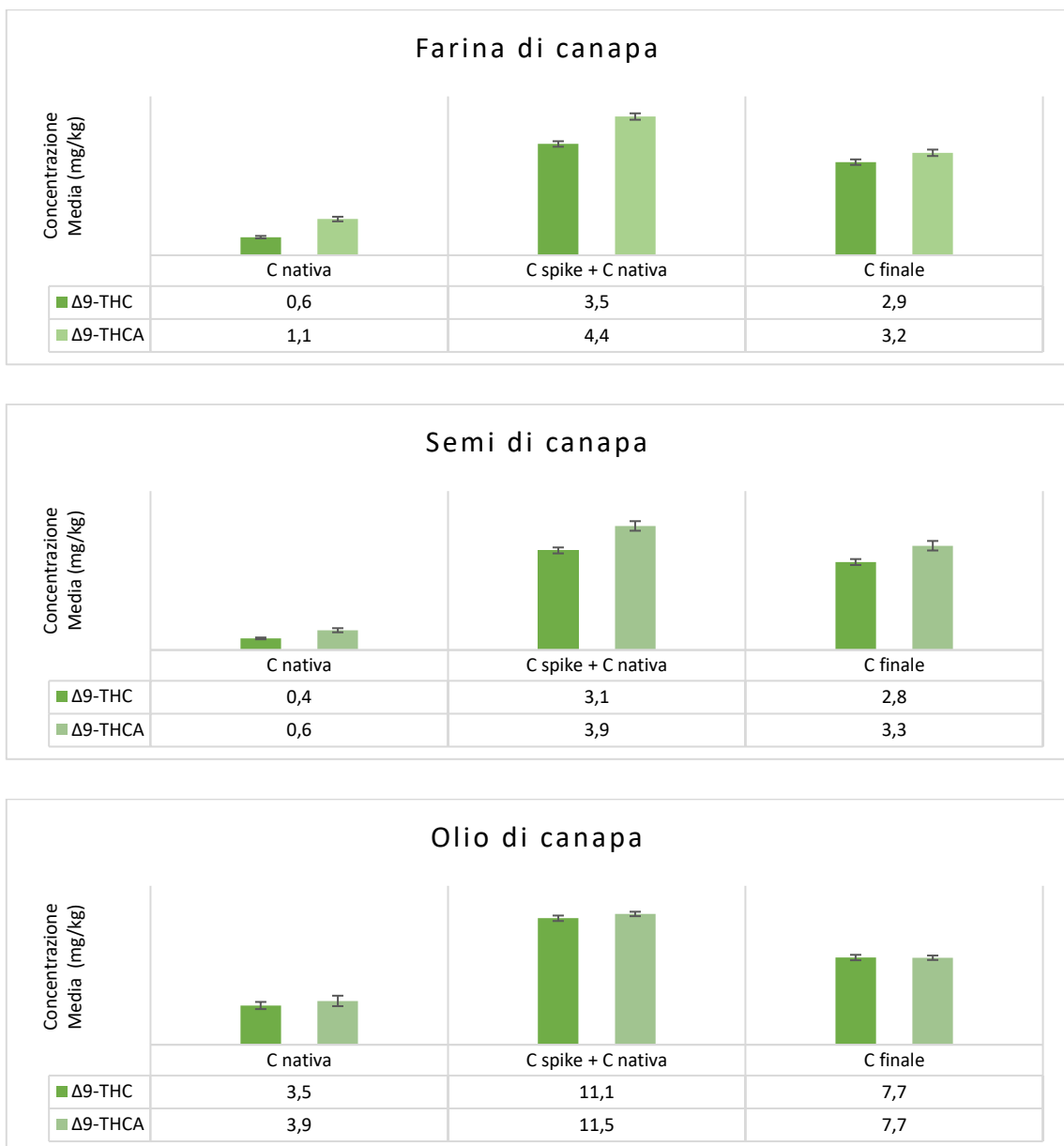


Figura 16: Concentrazioni medie e deviazioni standard di  $\Delta^9$ -THC e  $\Delta^9$ -THCA in semi, farina e olio di canapa nei campioni nativi, addizionati alla concentrazione critica e alla concentrazione finale

Viene quindi calcolato il recupero percentuale del metodo rapportando la concentrazione finale appena calcolata, con la concentrazione critica aggiunta:

$$Rec_{\%} = \frac{C_{finale}}{C_{spike}} \times 10$$

Da queste prove, riassunte in

Tabella 11, si può determinare che il recupero risulta essere compreso tra il 90% e il 110%, per tutte e tre le matrici. Inoltre, tutte le aliquote dello stesso campione vengono estratte in ugual modo quindi eventuali perdite dovute al processo di estrazione saranno tutte rapportate. Per questi motivi il recupero del metodo può essere considerato del 100% e non occorre correggere il valore della concentrazione incognita ottenuta per il fattore di recupero.

	Analiti	1	2	3	4	5	6	7	8	Recupero medio
Olio di canapa	$\Delta^9$ -THC	95%	106%	109%	106%	106%	101%	95%	106%	104%
	$\Delta^9$ -THCA	102%	101%	98%	99%	105%	100%	102%	101%	103%
Semi di canapa	$\Delta^9$ -THC	89%	89%	95%	97%	92%	90%	96%	90%	92%
	$\Delta^9$ -THCA	98%	110%	109%	113%	107%	111%	112%	115%	109%
Farina di canapa	$\Delta^9$ -THC	96%	100%	97%	97%	102%	98%	99%	92%	98%
	$\Delta^9$ -THCA	106%	105%	110%	106%	109%	110%	110%	101%	107%

Tabella 11: Recupero percentuale di cannabinoidi nelle diverse matrici prese in esame

#### 4.5. Precisione

La precisione è il grado di concordanza tra misure replicate, effettuate sul medesimo campione. L'imprecisione è dovuta all'errore casuale che provoca, occasionalmente, che i valori analitici replicati risultano superiori o inferiori al valore vero. La precisione viene misurata in termini di ripetibilità relativa alla deviazione standard, identificata con il coefficiente di variazione percentuale

(CV%). Come descritto nel nuovo regolamento in prossima approvazione recante le modalità di campionamento e analisi per il controllo delle tossine vegetali negli alimenti, il metodo per essere preciso deve avere una ripetibilità relativa alla deviazione standard, minore o uguale al 20%.

Gli stessi campioni analizzati per valutare il recupero del metodo, sono stati utilizzati per dimostrarne la precisione. In questo caso non sono state fatte delle aggiunte poiché era già stata verificata la presenza nativa dei cannabinoidi. Per ogni matrice in esame, si sono eseguite otto repliche.

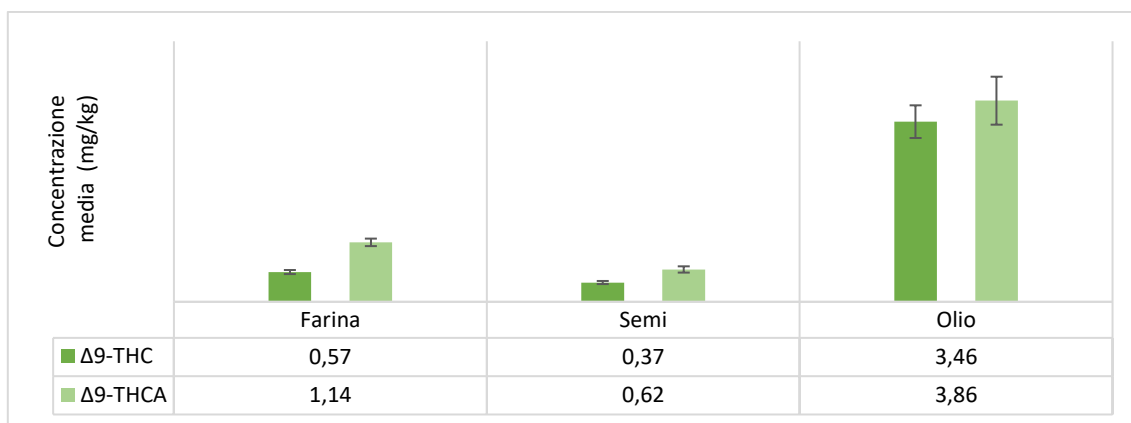


Figura 17: Media e deviazione standard delle repliche delle tre matrici a base di canapa degli analiti  $\Delta^9$ -THC e  $\Delta^9$ -THCA

Si ottengono i dati in

Tabella 12, recanti valori di:

- concentrazione media di analita per ogni matrice;
- deviazione standard di analita per ogni matrice
- coefficiente di variazione percentuale, che viene ottenuto mettendo a rapporto la deviazione standard ( $\sigma$ ) con la concentrazione media, moltiplicando per 100

$$CV\% = \frac{\sigma}{Conc.media} \times 100.$$

Analita	Farina di canapa			Semi di canapa			Olio di canapa		
	Conc. Media (mg/Kg)	$\sigma$ (mg/Kg)	CV%	Conc. Media (mg/Kg)	$\sigma$ (mg/Kg)	CV%	Conc. Media (mg/Kg)	$\sigma$ (mg/Kg)	CV%
$\Delta^9$ -THC	0,57	0,04	7%	0,37	0,03	8%	3,46	0,32	9%
$\Delta^9$ -THCA	1,14	0,08	7%	0,62	0,07	10%	3,89	0,49	13%

Tabella 12: Concentrazioni medie di  $\Delta^9$ -THC e  $\Delta^9$ -THCA nelle matrici in esame con rispettiva deviazione standard

Il coefficiente di variazione percentuale risulta essere minore del 10%, quindi il metodo può essere considerato preciso.

#### 4.6. Verifica prestazioni strumentali

Per verificare le prestazioni di giornata dello strumento cromatografico, nel batch analitico prima e dopo l'analisi delle quattro aliquote (due TQ e due FO), vengono analizzate delle soluzioni standard di  $\Delta^9$ -THC,  $\Delta^9$ -THCA e  $\Delta^9$ -THC-D3. Sulla base delle buone pratiche del laboratorio, affinché le prestazioni di giornata siano considerate accettabili, si è impostato che la differenza tra le due misurazioni degli standard, non deve discostarsi per più del 20%.

Le soluzioni di controllo avranno la stessa concentrazione del fortificato, rapportate con il fattore di diluizione. Il fattore di diluizione è 208 per i campioni di olio di canapa, mentre 40 per i campioni di semi e farina. Le concentrazioni delle soluzioni di controllo saranno quindi:

- 180  $\mu\text{g}/\text{kg}$  per l'olio di canapa;
- 375  $\mu\text{g}/\text{kg}$  per semi e farina di canapa.

#### 4.7. Campioni reali

Successivamente alla messa a punto del metodo, si sono analizzati alcuni campioni di semi, farina e olio di canapa, presenti nel mercato. Si sono analizzati (

Figura 18):

- 14 campioni di semi di canapa  
I campioni di semi di canapa analizzati hanno una concentrazione di  $\Delta^9$ -THC che varia in un range tra 0 mg/kg a 1,3 g/kg, con una media di 0,2 mg/kg, il  $\Delta^9$ -THCA invece varia da 0,7 mg/kg a 2,2 mg/kg, con una media di 1,1 mg/kg.
- 5 campioni di farina di canapa  
I campioni di farina di canapa analizzati hanno una concentrazione di  $\Delta^9$ -THC che varia in un range tra 0 mg/kg e 1,3 mg/kg con una media di 0,4 mg/kg, il  $\Delta^9$ -THCA invece varia da 0,4 mg/kg a 2,3 mg/kg con una media di 1,3 mg/kg.
- 10 campioni di olio di canapa,



I campioni di olio di canapa analizzati hanno una concentrazione di  $\Delta^9$ -THC che varia in un range tra 0 mg/kg e 1,7 mg/kg con una media di 0,6 mg/kg, il  $\Delta^9$ -THCA invece varia da 1,3 mg/kg a 4,4 mg/kg con una media di 2,4 mg/kg.



Figura 18: Media e deviazione standard concentrazione di cannabinoidi in prodotti reperiti sul mercato

Dai risultati ottenuti si evidenzia che in tutte le matrici prevale il precursore acido rispetto al cannabinoide attivo  $\Delta^9$ -THC, che risulta spesso inferiore al limite di quantificazione. I risultati, ai fini

di possibili controlli ufficiali, risultano tutti entro i limiti previsto dal Regolamento 915/2023 ad oggi in vigore.

## 5. CONCLUSIONI

I prodotti alimentari a base di canapa quali semi, farina e olio, risultano essere molto interessanti dal punto di vista nutrizionale e negli ultimi tempi si stanno diffondendo sempre più nel mercato della grande distribuzione.

A causa del contenuto in tali prodotti del cannabinoide con effetti psicoattivi  $\Delta^9$ -THC e del suo precursore acido  $\Delta^9$ -THCA, l'unione europea ha stabilito dei limiti massimi ammessi per queste due sostanze.

L'IZSve, ente incaricato per l'analisi dei controlli ufficiali, ha dovuto sviluppare un metodo di quantificazione per i cannabinoidi normati nei prodotti alimentari a base di canapa.

Il metodo sviluppato consiste in una diluizione per quanto riguarda la matrice olio, e un'estrazione solido-liquido per le matrici semi e farina. È stato sviluppato il metodo cromatografico per il rilevamento degli analiti in esame, individuando le condizioni migliori di frammentazione degli analiti e selezionando gli ioni molecolari e prodotti più significativi.

Nel corso dello studio si è valutata l'efficienza di estrazione, che risulta quantitativa effettuando due estrazioni successive. A causa della natura delle matrici, si è scelta la tecnica di quantificazione delle aggiunte standard, utilizzando le aree degli analiti rapportate con l'area dello standard interno  $\Delta^9$ -THCA-D3. Le migliori condizioni sono risultate essere l'aggiunta ad un solo livello pari a cinque volte la concentrazione critica, replicando due volte sia il punto tal quale incognito, che il punto fortificato. Si è impostato il limite di quantificazione LOQ pari a un decimo della concentrazione critica, che risulta essere 0,3 mg/kg per semi e farina mentre 0,75 mg/kg per l'olio di canapa. Il metodo sviluppato soddisfa i criteri necessari alla validazione compresi a) l'identificazione degli analiti in esame; b) la linearità nell'intervallo nel campo di applicazione; c) il recupero che viene considerato pari al 100%; d) la precisione con un coefficiente di variazione inferiore al 20%.

Infine, tramite questo metodo sono stati analizzati dei campioni di semi, farine e olio procurati nella grande distribuzione: i risultati evidenziano la prevalenza del precursore acido sul cannabinoide psicoattivo, con entrambi i composti sempre nei limiti imposti dalla normativa vigente.



## 6. BIBLIOGRAFIA

- Amaducci, S., Scordia, D., Liu, F. H., Zhang, Q., Guo, H., Testa, G., & Cosentino, S. L. (2015). Key cultivation techniques for hemp in Europe and China. *Industrial Crops and Products*, 68, 2–16. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.06.041>
- Anton Kaufmann, K. Z. S., & Maciej Bromirski, T. F. S. S. J. C. U. (s.d.). Selecting the best Q Exactive Orbitrap mass spectrometer scan mode for your application. Thermo Scientific.
- Callaway, J. C. (2004). Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica*, 140(1), 65–72. <https://doi.org/10.1007/s10681-004-4811-6>
- Cattaneo, C., Givonetti, A., & Cavaletto, M. (2023). Protein Mass Fingerprinting and Antioxidant Power of Hemp Seeds in Relation to Plant Cultivar and Environment. *Plants*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/plants12040782>
- Clarke, R., & Merlin, M. (2016). *Cannabis: evolution and ethnobotany*. Univ of California Press.
- Docimo, T., Caruso, I., Ponzoni, E., Mattana, M., & Galasso, I. (2014). Molecular characterization of edestin gene family in *Cannabis sativa* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, 84, 142–148. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.09.011>
- Ellison, S. L. R., & Thompson, M. (2008). Standard additions: myth and reality. *Analyst*, 133(8), 992–997. <https://doi.org/10.1039/B717660K>
- EURL mycotoxins and plant toxins, W. W. U. & R. (2022). EURLMP-method\_009 v1, Determination of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol and  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinolic acid in hemp seed and hemp seed products by LC-MS/MS.
- European Commission - Agriculture and Rural Development. (s.d.). Hemp. [https://agriculture.ec.europa.eu/farming/crop-productions-and-plant-based-products/hemp\\_it](https://agriculture.ec.europa.eu/farming/crop-productions-and-plant-based-products/hemp_it).
- Fike, J. (2019). The history of hemp. *Industrial hemp as a modern commodity crop, industrialhemp*, 1–25.
- Finn, D. P., Haroutounian, S., Hohmann, A. G., Krane, E., Soliman, N., & Rice, A. S. C. (2021). Cannabinoids, the endocannabinoid system, and pain: a review of preclinical studies. *PAIN*, 162. [https://journals.lww.com/pain/fulltext/2021/07001/cannabinoids,\\_the\\_endocannabinoid\\_system,\\_and.3.aspx](https://journals.lww.com/pain/fulltext/2021/07001/cannabinoids,_the_endocannabinoid_system,_and.3.aspx)

- Hädener, M., König, S., & Weinmann, W. (2019). Quantitative determination of CBD and THC and their acid precursors in confiscated cannabis samples by HPLC-DAD. *Forensic Science International*, 299, 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.03.046>
- Hillig, K. W. (2005). Genetic evidence for speciation in *Cannabis* (Cannabaceae). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52(2), 161–180. <https://doi.org/10.1007/s10722-003-4452-y>
- Kreuger, E., Prade, T., Escobar, F., Svensson, S.-E., Englund, J.-E., & Björnsson, L. (2011). Anaerobic digestion of industrial hemp—Effect of harvest time on methane energy yield per hectare. *Biomass and Bioenergy*, 35(2), 893–900. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.11.005>
- Lu, H.-C., & Mackie, K. (2016). An Introduction to the Endogenous Cannabinoid System. *Biological Psychiatry*, 79(7), 516–525. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.07.028>
- Ministero della salute. (2022, giugno 30). Uso medico della cannabis. <https://www.salute.gov.it/portale/medicinaliStupefacenti/dettaglioContenutiMedicinaliStupefacenti.jsp?lingua=italiano&id=4587&area=sostanzeStupefacenti&menu=vuoto>.
- MMI Agriculture. (s.d.). Cannabis Plant Anatomy: Essential Parts That Make up a Cannabis Plant. <https://mmiagriculture.com/category/plant-anatomy/>.
- Prade, T., Svensson, S.-E., Andersson, A., & Mattsson, J. E. (2011). Biomass and energy yield of industrial hemp grown for biogas and solid fuel. *Biomass and Bioenergy*, 35(7), 3040–3049. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.04.006>
- Reddy, P., Maurya, N., & Velmurugan, B. K. (2019). Medicinal Use of Synthetic Cannabinoids—a Mini Review. *Current Pharmacology Reports*. <https://doi.org/10.1007/s40495-018-0165-y>
- Simopoulos, A. (2008). The Importance of the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio in Cardiovascular Disease and Other Chronic Diseases. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.), 233, 674–688. <https://doi.org/10.3181/0711-MR-311>
- Tahir, M. N., Shahbazi, F., Rondeau-Gagné, S., & Trant, J. F. (2021). The biosynthesis of the cannabinoids. *Journal of Cannabis Research*, 3(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s42238-021-00062-4>
- Yuan, L. (2018). Analysis of THC and CBD Content in Hemp Oil Using GC-FID and Hydrogen Carrier Gas. [https://www.shimadzu.com/an/sites/shimadzu.com.an/files/pim/pim\\_document\\_file/technical/technical\\_reports/13590/sic119018.pdf](https://www.shimadzu.com/an/sites/shimadzu.com.an/files/pim/pim_document_file/technical/technical_reports/13590/sic119018.pdf)