



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO  
DIPARTIMENTO DI  
SCIENZE FARMACEUTICHE

# **TITOLAZIONE DI PREPARAZIONI A BASE DI CANNABIS MEDICINALE: DETERMINAZIONE DEI PRINCIPALI CANNABINOIDI.**

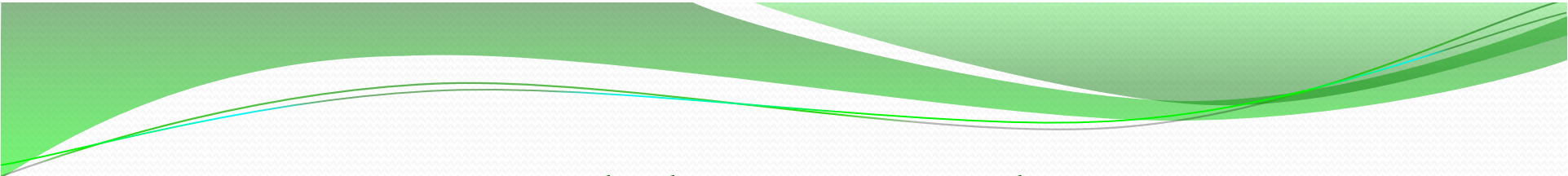
**Eleonora Casagni, Gabriella Roda**



**CANAPAFORUM 2018**  
Ricerca Innovazione Sviluppo

# Cannabis medicinale

- ✓ **Richiesta in continuo aumento.**
- ✓ **Preparazioni magistrali galeniche.**
- ✓ **Decreto del 9 novembre 2015 (GU n.279 del 30-11-2015).**
- ✓ **Decreto del 25 giugno 2018 (GU n.160 del 12-07-2018).**



# Decreto del 9 novembre 2015

## (GU n.279 del 30-11-2015)

**Il Decreto stabilisce la necessità di effettuare la  
titolazione dei P.A. per ciascuna preparazione magistrale  
a base di Cannabis medicinale.**

*«Al momento non esistono studi su eventuali effetti collaterali o tossicità acuta di preparazioni vegetali definite come «olio» o «soluzione oleosa» di cannabis , che consistono in non meglio specificati estratti di cannabis in olio e/o altri solventi. Pertanto, per assicurare la qualità del prodotto, la titolazione dell/i principio/i attivo/i deve essere effettuata per ciascuna preparazione magistrale con metodologie sensibili e specifiche quali la cromatografi a liquida o gassosa accoppiate alla spettrometria di massa ovvero il metodo di estrazione deve essere autorizzato ai sensi della normativa vigente.»*

# Varietà di Cannabis medicinale

## Contententi THC e CBD (CBD +CBDA) < 1%

- **Bedrocan®** 19-22% THC (THC +THCA)
- **Bedica®** 12-15% THC (THC +THCA)
- **Bedrobinol®** 11-14% THC (THC +THCA)
- **Pedanios** ad alto contenuto di THC 22% (THC +THCA)
- **FM1** 13-20% THC (THC +THCA)

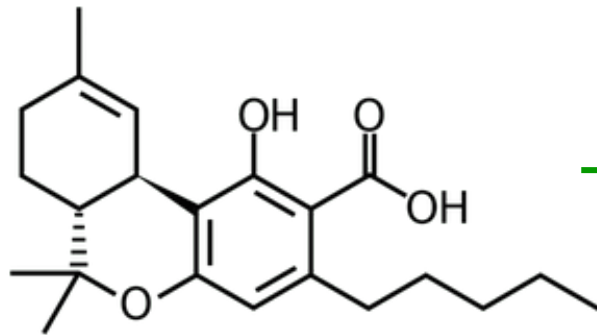
## Contententi sia THC che CBD

- **Bediol®** 5-8 % THC (THC +THCA), 6-9% CBD (CBD +CBDA)
- **FM2** 5-8% THC (THC +THCA), 9-12% CBD (CBD +CBDA)

## Contententi CBD e THC (THC +THCA) < 1%

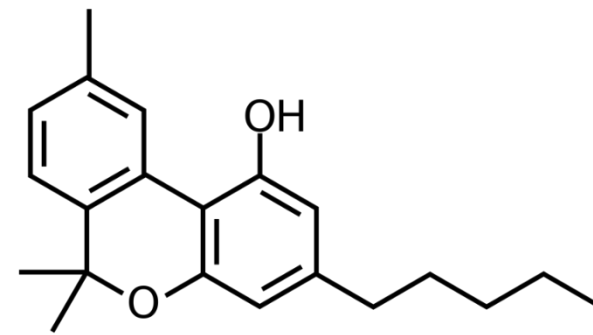
- **Bedrolite®** 7-10% CBD (CBD +CBDA)

# CANNABINOIDI

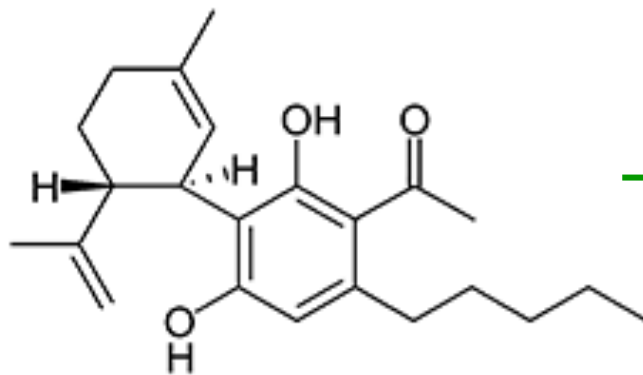


THCA

Luce, calore,  
ossigeno

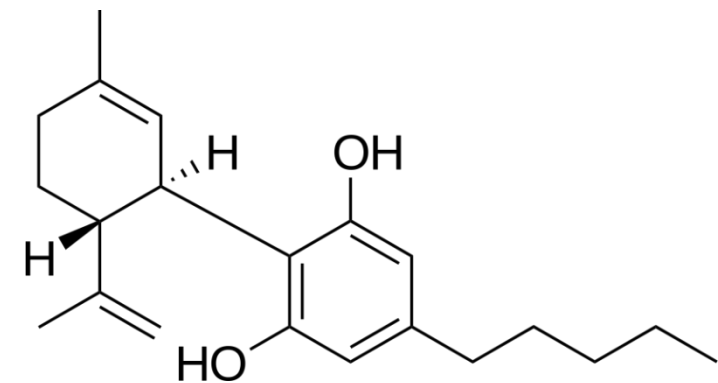


Δ<sup>9</sup>-THC



CBDA

Luce, calore,  
ossigeno



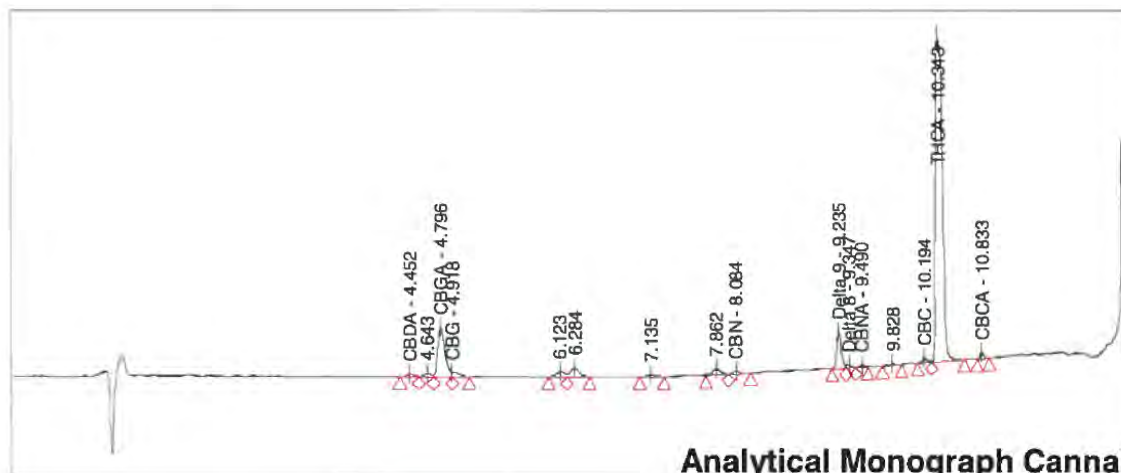
CBD

# CANNABINOIDI

$$\% \text{ THC totale} = \% \text{ THC} + \% \text{ THCA} \times 0,877$$

$$\% \text{ CBD totale} = \% \text{ CBD} + \% \text{ CBDA} \times 0,877$$

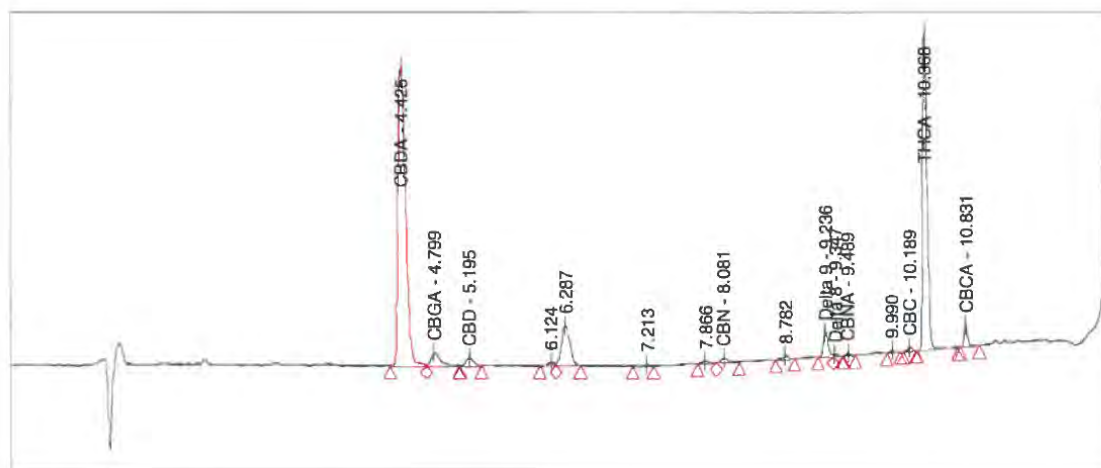




Chromatogram of Reference Extract Bedrocan

### Analytical Monograph Cannabis Flos (flowers / granulated)

OMC / Farmalyse BV Version 7.1 / November 28, 2014



Chromatogram of Reference Extract Bediol

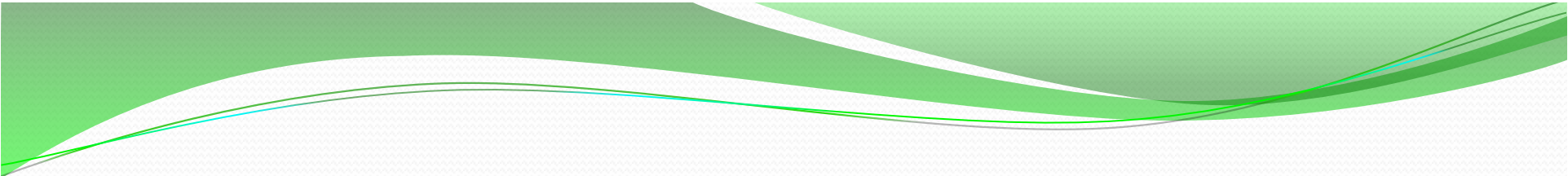


# PREPARAZIONI DI CANNABIS



- Capsule
- Decotti
- Oleoliti
- Colliri
- Resine (Estratti alcolici)

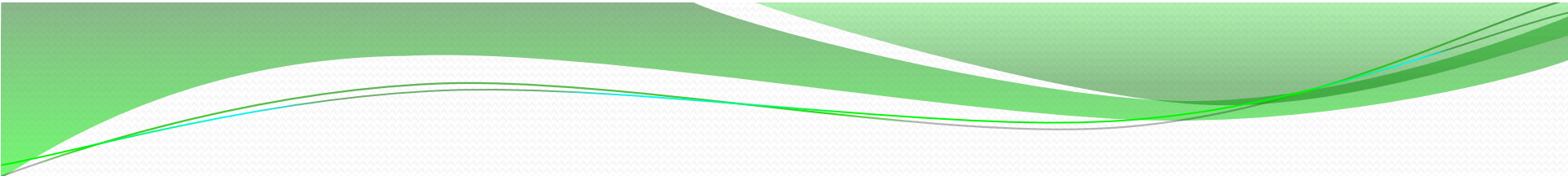




# ANALISI DEI CANNABINOIDI

*«Al momento non esistono studi su eventuali effetti collaterali o tossicità acuta di preparazioni vegetali definite come «olio» o «soluzione oleosa» di cannabis , che consistono in non meglio specificati estratti di cannabis in olio e/o altri solventi. Pertanto, per assicurare la qualità del prodotto, la titolazione dell/i principio/i attivo/i deve essere effettuata per ciascuna preparazione magistrale con metodologie sensibili e specifiche quali la cromatografia liquida o gassosa accoppiate alla spettrometria di massa ovvero il metodo di estrazione deve essere autorizzato ai sensi della normativa vigente.»*

Determinazione del contenuto di THC, CBD, CBN, THCA e CBDA nelle preparazioni di Cannabis Medicinale confrontando diversi metodi cromatografici.



**Dal 2008**

**CONVENZIONE TRA**

**LABORATORIO di  
ANALISI  
CHIMICO - TOSSICOLOGICA  
UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO**  
**Laboratorio certificato UNI-EN ISO 9001:2015**

**PROCURA della REPUBBLICA  
BUSTO ARSIZIO (VA)**  
Collaborazione con GUARDIA DI FINANZA(GdF)  
Gruppo Malpensa

**Analisi chimico-tossicologiche  
sulle sostanze stupefacenti sequestrate  
presso l' aeroporto di Milano Malpensa**

# ANALISI GAS CROMATOGRAFICA

- GC-MS: Gas-cromatografo della Hewlett Packard (HP), modello "MS-5973", equipaggiato con un rivelatore MS

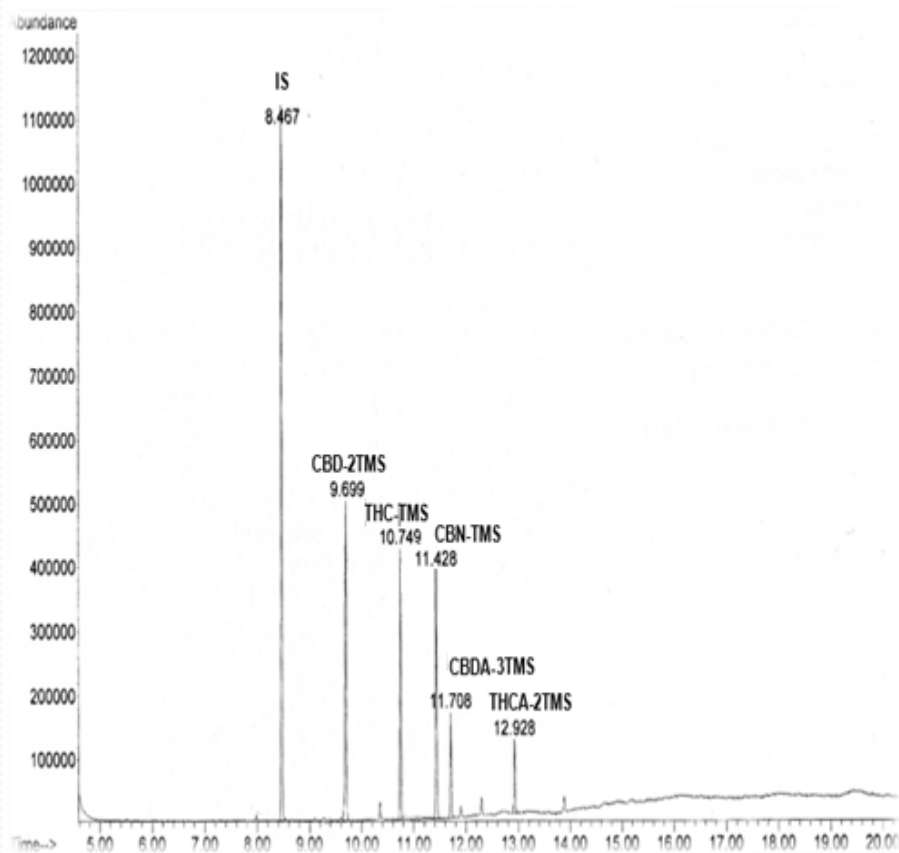
GC-FID: Thermo Electron modello "TRACE GC", equipaggiato con FID

|                      |                                                                                  |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Column</b>        | Agilent DB-5MSUI<br>L: 30m<br>ID: 0,25 mm<br>Spessore: 0,25µm                    |
| <b>Flow</b>          | 1,1 ml / min                                                                     |
| <b>Inlet</b>         | 280°C                                                                            |
| <b>Inlet mode</b>    | Split (30:1)                                                                     |
| <b>Oven</b>          | da 180°C a 300°C con<br>incremento di 10°C min e<br>isoterma finale per 6,25 min |
| <b>Solvent delay</b> | 4,5 min                                                                          |
| <b>Detector</b>      | 300°C                                                                            |
| <b>Tempo analisi</b> | 21 min                                                                           |

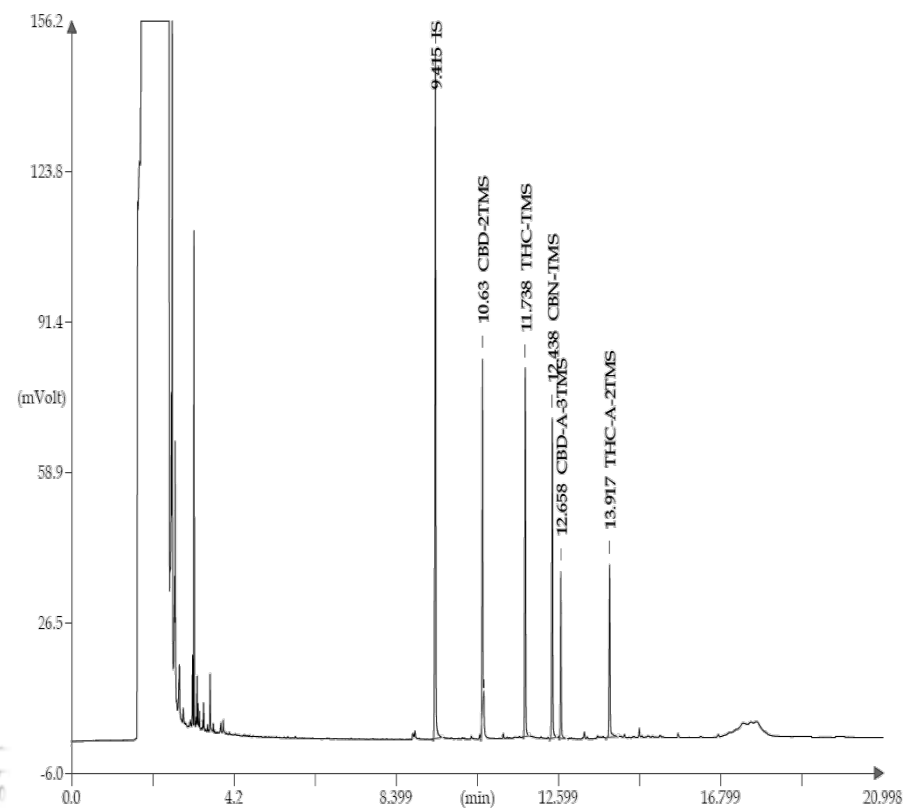
|                      |                                                                                  |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Column</b>        | Agilent DB-5MSUI<br>L: 30m<br>ID: 0,25 mm<br>Spessore: 0,25µm                    |
| <b>Flow</b>          | 1,2 ml / min                                                                     |
| <b>Inlet</b>         | 280°C                                                                            |
| <b>Inlet mode</b>    | Split                                                                            |
| <b>Oven</b>          | da 180°C a 300°C con<br>incremento di 10°C min e<br>isoterma finale per 6,25 min |
| <b>Detector</b>      | 300°C                                                                            |
| <b>Tempo analisi</b> | 21 min                                                                           |

# ANALISI GAS CROMATOGRAFICA

## GC/MS

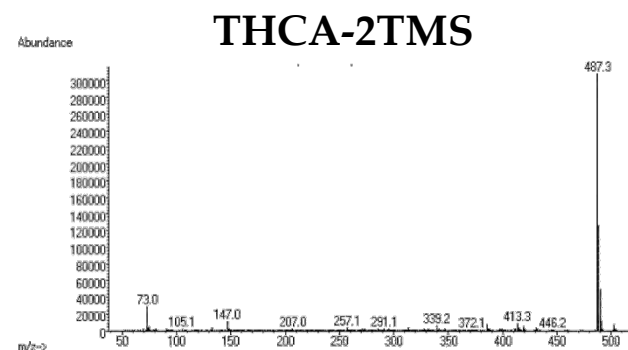
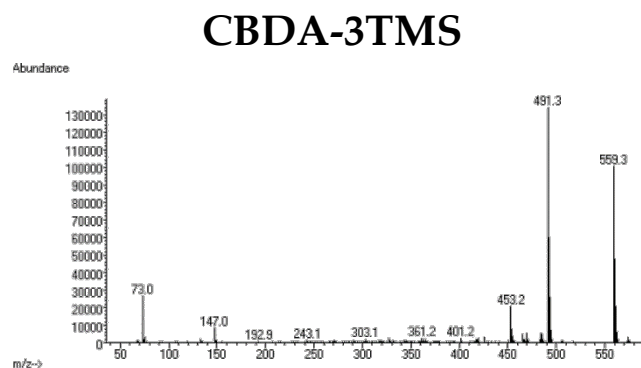
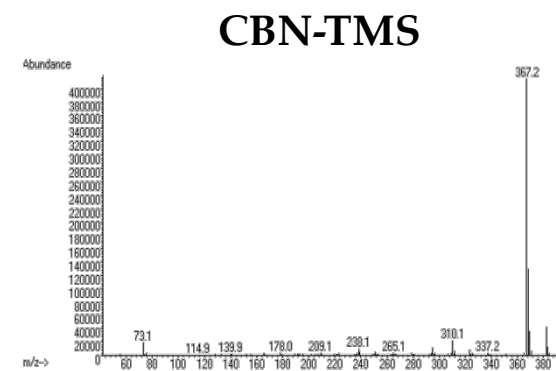
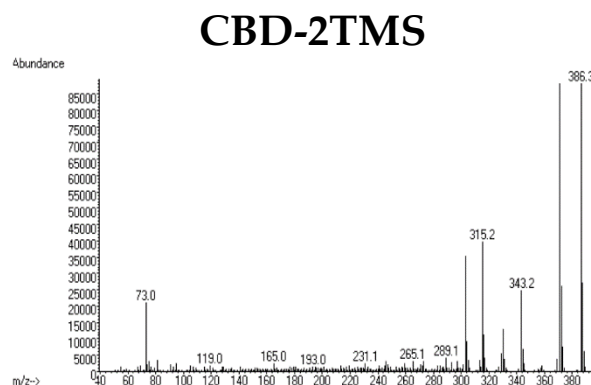
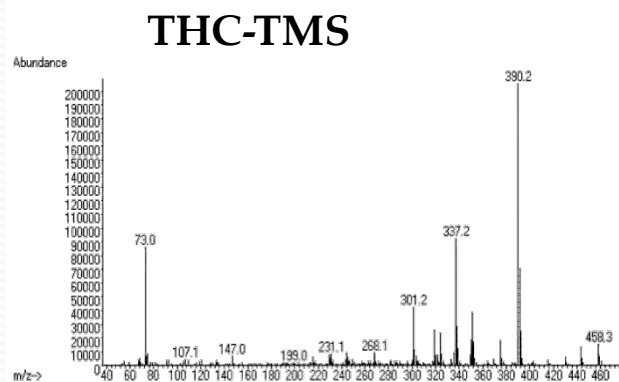


## GC/FID



# ANALISI GAS CROMATOGRAFICA

Derivatizzazione con MSTFA o BSTFA



# ANALISI LC/UV



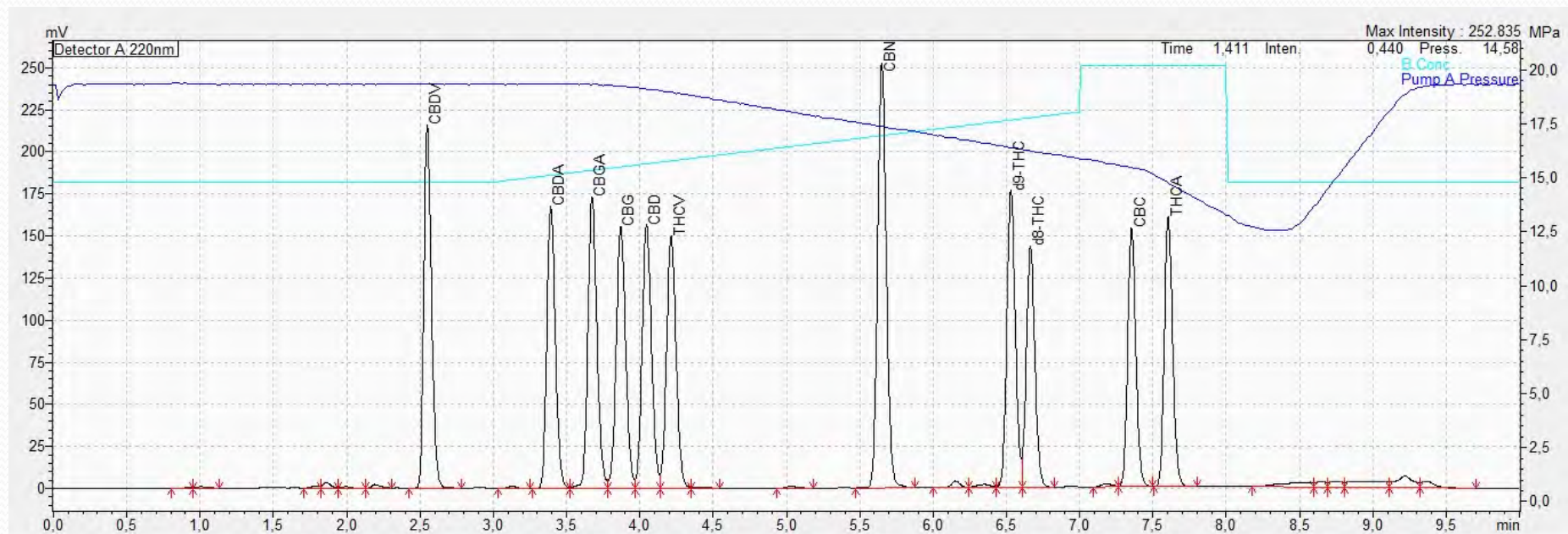
LC/UV: Prominence-i LC-2030C (Shimadzu) con autocampionatore;

## HIGH SENSITIVITY

|                      |                                                                                           |    |    |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|----|----|
| <b>Flow</b>          | 1.6 mL / min                                                                              |    |    |
| <b>Injection</b>     | 5 µL                                                                                      |    |    |
| <b>Column</b>        | SH-SPP C18LPH<br>2,7 µm 4,6x150 mm (Restek) a 35° C;<br>pre-column: 5 x 4,5 mm (Shimadzu) |    |    |
| <b>Detection</b>     | 220 nm                                                                                    |    |    |
| <b>Mobile phase</b>  | A: acido ortofosforico 0,085% in acqua;<br>B: acido ortofosforico 0,085% in acetonitrile  |    |    |
| <b>Gradient</b>      | Minuti                                                                                    | %A | %B |
|                      | 3.00                                                                                      | 30 | 70 |
|                      | 7.00                                                                                      | 15 | 85 |
|                      | 7.01                                                                                      | 5  | 95 |
|                      | 8.00                                                                                      | 5  | 95 |
|                      | 8.01                                                                                      | 30 | 70 |
| <b>Tempo analisi</b> | 10 min                                                                                    |    |    |



# ANALISI LC/UV



# CONFRONTO GC vs LC

## PREPARAZIONE CAMPIONE

- Pesare 0,050 g di campione;
- Aggiungere 5 mL di MeOH;
- Vorteggiare per 1 min 3 volte;
- Centrifugare per 5 min;
- Solo per le resine: diluire 1:10

- Silanizzazione a 70°C per 30 min



GC



LC

# CONFRONTO

## GC/MS vs GC/FID vs LC/UV

n campioni = 30

% cannabinoide GC/FID =  $\Delta$  \* % cannabinoide GC/MS  $\Delta = 0,02-0,03\%$

% cannabinoide LC/UV =  $\Delta$  \* % cannabinoide GC/FID  $\Delta = 0,02-0,03\%$

% cannabinoide LC/UV =  $\Delta$  \* % cannabinoide GC/MS  $\Delta = 0,01-0,04\%$

Le differenze fra le medie osservate non sono significative per  $p < 0,05$ .

# PREPARAZIONI DI CANNABIS



Da gennaio a giugno 2018:

1062 campioni analizzati

da 55 farmacie

(1300 campioni analizzati nel 2017)

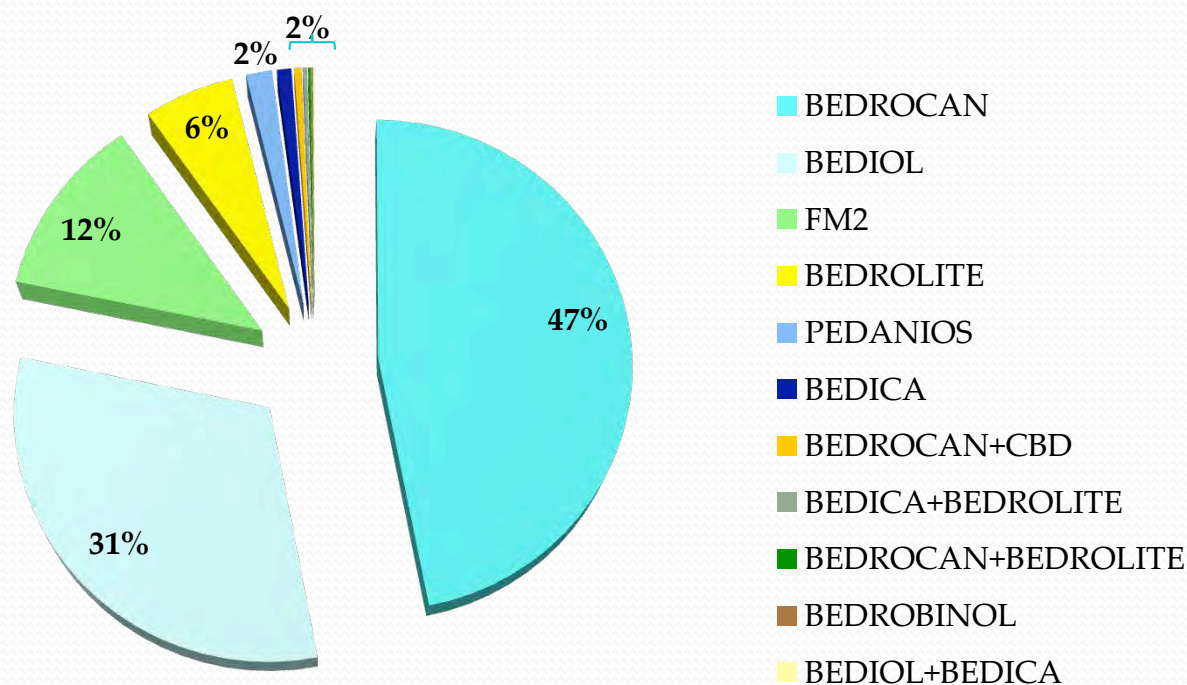
Oleoliti: 1026

Resine: 35

Colliri: 1

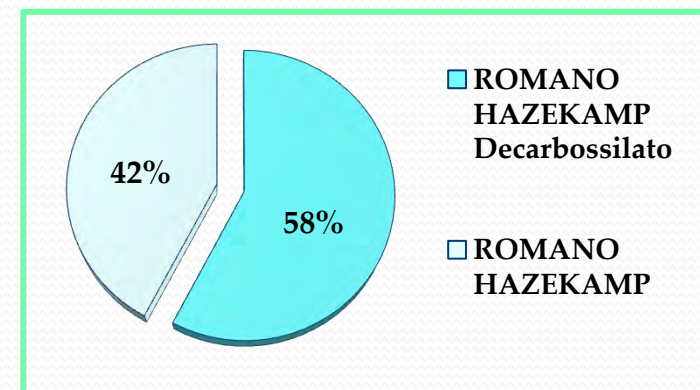
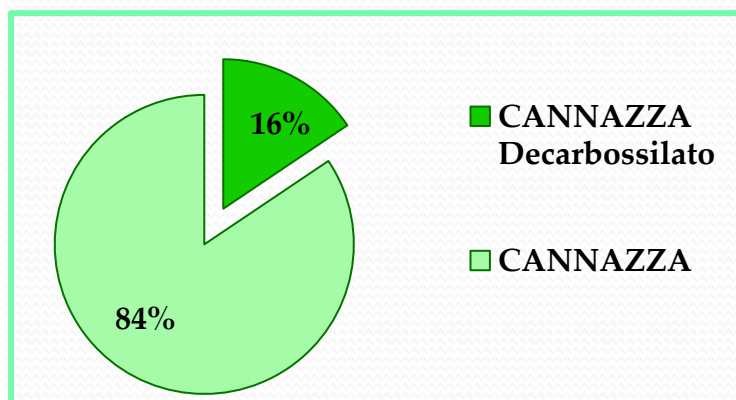
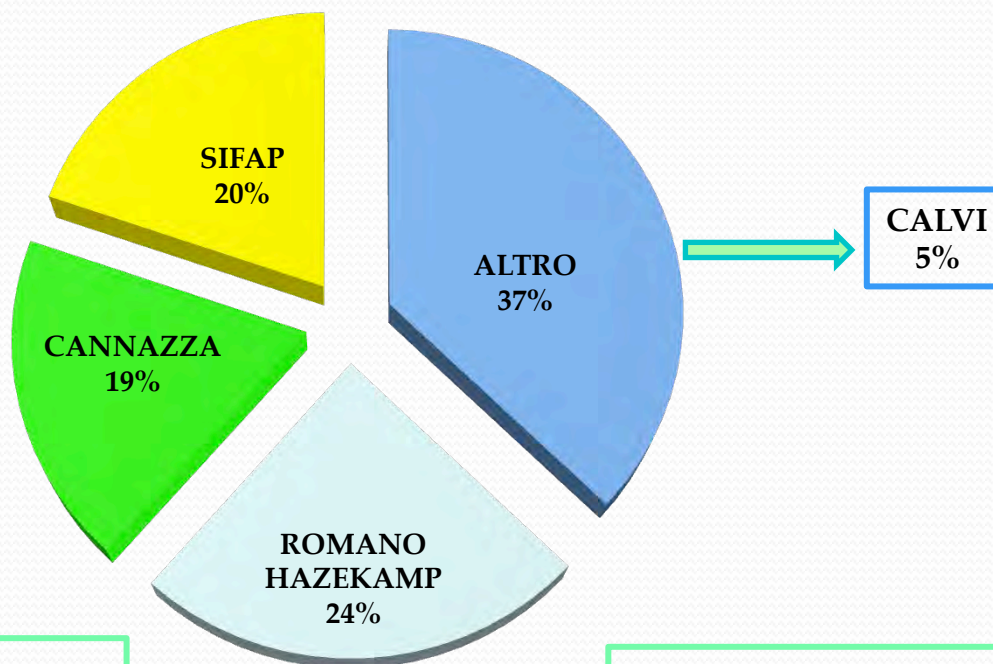
# PREPARAZIONI DI CANNABIS

Distribuzione percentuale in base alla varietà di Cannabis



# PREPARAZIONI DI CANNABIS

Distribuzione percentuale in base alla metodica di estrazione





# PREPARAZIONI DI CANNABIS

- Con decarbossilazione della Cannabis

- **SIFAP (Società Italiana Farmacisti Preparatori)**

Sminuzzare le infiorescenze e porre in contenitore di vetro chiuso  
Porre in stufa a secco a 115°C per 40 min  
Lasciar raffreddare con contenitore chiuso  
Porre in olio e mescolare con opportune strumentazioni  
Scaldare a b.m. a 100°C per 40 min con agitazione continua  
Recuperare l'olio ancora caldo filtrando  
Aggiungere  $\alpha$ -tocoferolo 0,05% V/V e agitare

- **ROMANO-HAZEKAMP modificata**

Cannabis sminuzzata in becher ricorperto di stagnola.  
Porre in stufa preriscaldata a 145°C per 30 min o 115° per 40 min.  
Raffreddare nel contenitore coperto.  
Porre nell'olio d'oliva.  
Scaldare a b.m. (~98°C) per 120 min  
Filtrare pressando il materiale vegetale.

- Senza decarbossilazione della Cannabis

- **CANNAZZA**

*Olio e estrazione con ricadere*

Prelevare la Cannabis finemente macinata.  
Aggiungere all'inflorescenza finemente macinata l'olio di oliva in un pallone munito di ricadere.  
Scaldare a 110°C a refluxo per 2 ore sotto agitazione magnetica.  
Raffreddare gradualmente per almeno 2 ore a temperatura ambiente.  
Filtrare con filtro di carta.

- **ROMANO-HAZEKAMP**

Sminuzzare la Cannabis e unire all'olio d'oliva in un contenitore di vetro.  
Scaldare a bagnomaria (~98°C) per 120 min.  
Lasciar raffreddare.  
Filtrare pressando il materiale vegetale.  
Raccogliere l'olio.



# OLEOLITI DI CANNABIS

- Oleoliti;
- Bedrocan, FM2 e Bediol;
- Sifap, Cannazza e Romano Hazekamp (con e senza decarbossilazione);
- rapporto matrice : oleolita = 1 : 10.

**422** campioni rispondono ai requisiti scelti

# OLEOLITI DI CANNABIS

BEDROCAN

THC 19-22%

|       | n  | %CBD | %THC        | %CBD-A | %THC-A      | % THC tot | % CBD tot |
|-------|----|------|-------------|--------|-------------|-----------|-----------|
| SIFAP | 45 | <0,1 | 1,61 ± 0,21 | <0,1   | 0,10 ± 0,10 | 1,57±0,31 | <0,1      |
| RH ND | 40 | <0,1 | 0,207±0,12  | <0,1   | 1,43±0,28   | 1,46±0,21 | <0,1      |
| RH D  | 66 | <0,1 | 1,41±0,28   | <0,1   | 0,10 ± 0,15 | 1,48±0,24 | <0,1      |
| CAN   | 78 | <0,1 | 0,77±0,45   | <0,1   | 0,86±0,44   | 1,52±0,27 | <0,1      |

# OLEOLITI DI CANNABIS

BEDIOL

THC 6-7%; CBD 7-9%

|       | n  | %CBD      | %THC      | %CBD-A    | %THC-A    | % tot THC  | % tot CBD  |
|-------|----|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|
| SIFAP | 22 | 0,41±0,12 | 0,39±0,11 | 0,20±0,22 | <0,1      | 0,43±0,112 | 0,58±0,131 |
| RH ND | 19 | <0,1      | 0,11±0,03 | 0,66±0,15 | 0,35±0,06 | 0,41±0,061 | 0,59±0,079 |
| RH D  | 33 | 0,42±0,10 | 0,39±0,06 | <0,1      | <0,1      | 0,42±0,05  | 0,48±0,07  |
| CAN   | 57 | 0,20±0,14 | 0,24±0,10 | 0,44±0,24 | 0,21±0,12 | 0,44±0,104 | 0,58±0,123 |

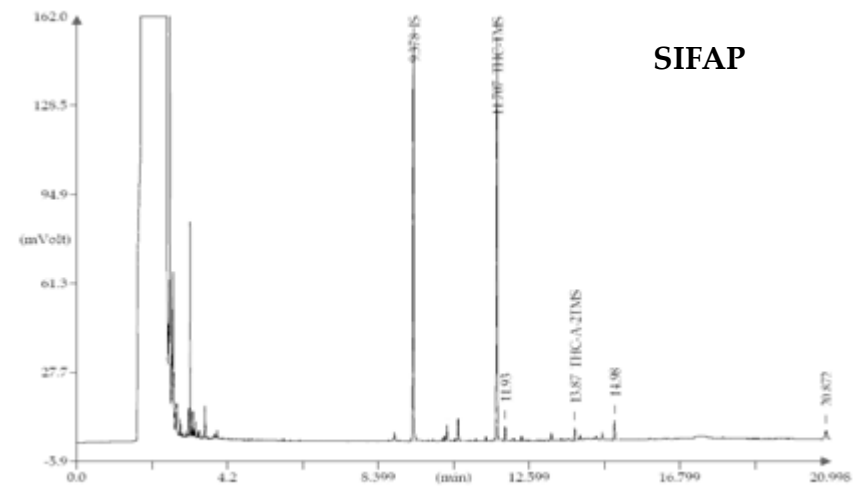
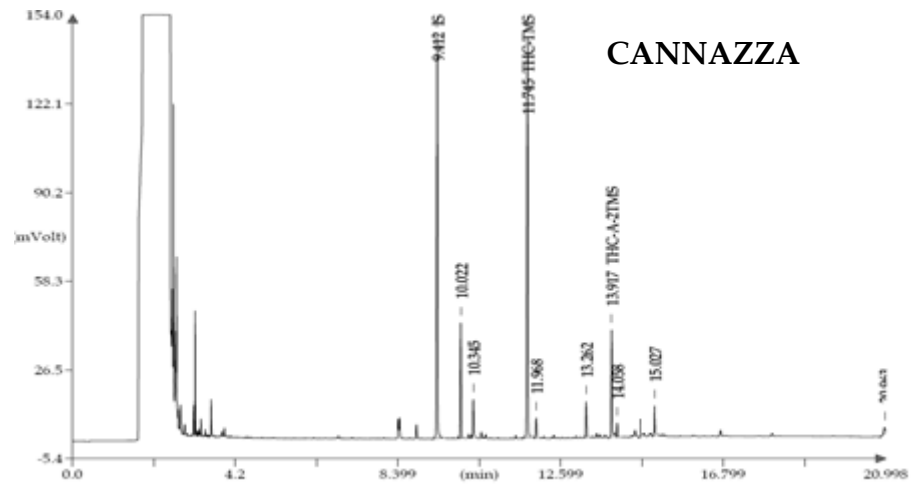
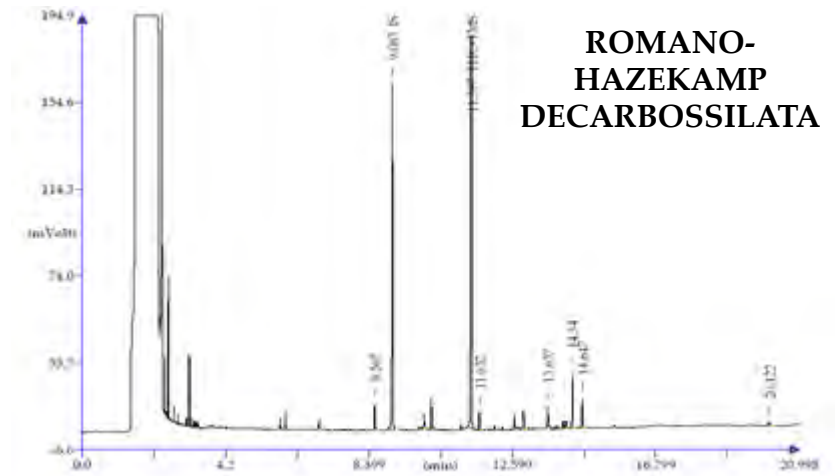
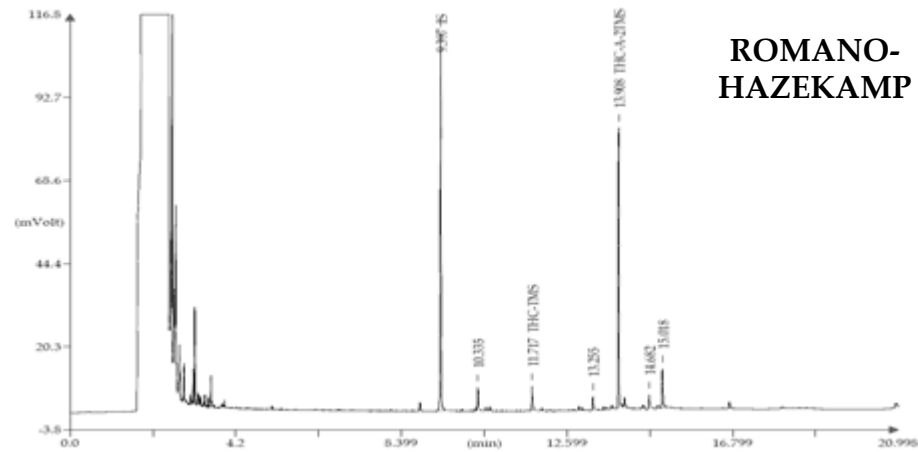
# OLEOLITI DI CANNABIS

FM2

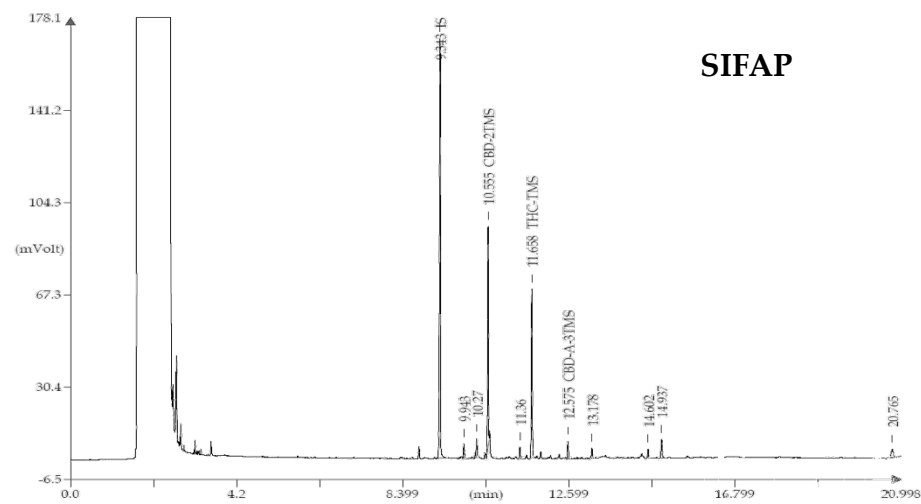
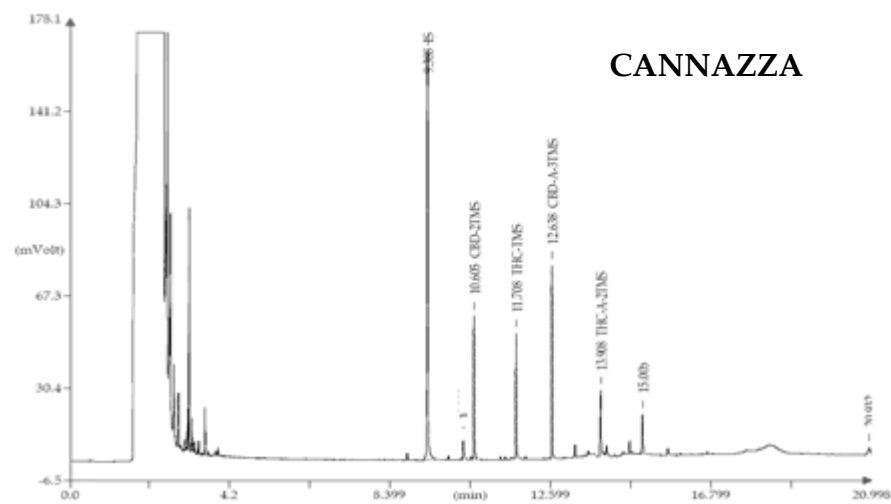
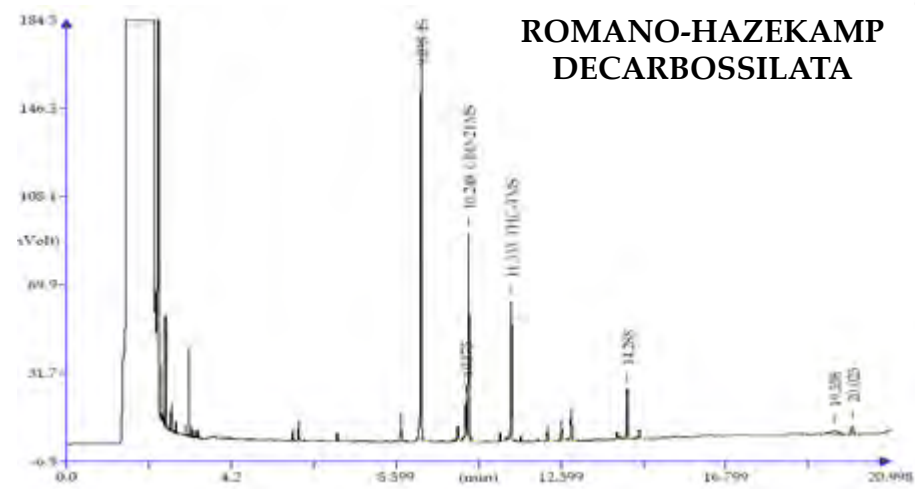
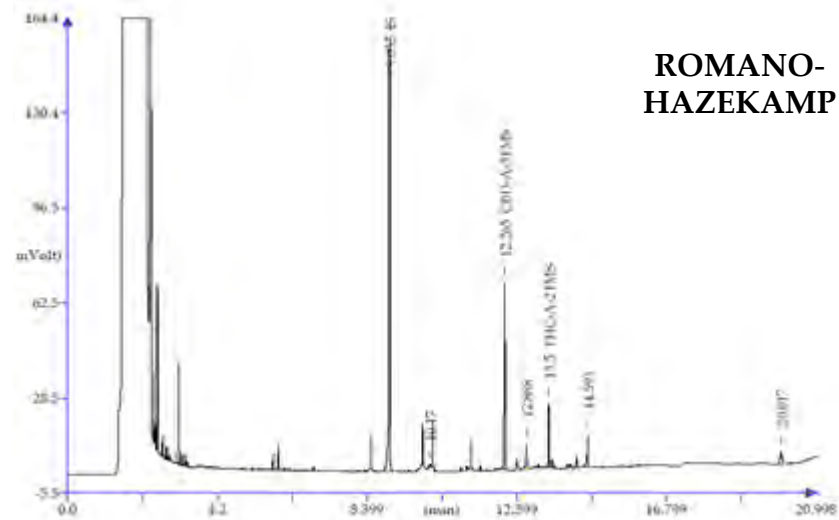
THC 5-8%; CBD 9-12%

|       | n  | %CBD      | %THC      | %CBD-A    | %THC-A    | % THC tot | % CBD tot |
|-------|----|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| SIFAP | 12 | 0,61±0,14 | 0,49±0,10 | 0,15±0,14 | <0,1      | 0,50±0,09 | 0,74±0,15 |
| RH ND | 14 | <0,1      | <0,1      | 1,05±0,16 | 0,62±0,13 | 0,58±0,09 | 0,96±0,14 |
| RH D  | 20 | 0,64±0,20 | 0,48±0,12 | 0,11±0,22 | <0,1      | 0,53±0,10 | 0,74±0,23 |
| CAN   | 16 | 0,42±0,31 | 0,35±0,35 | 0,49±0,46 | 0,26±0,26 | 0,58±0,06 | 0,84±0,11 |

# BEDROCAN



# BEDIOL





| <b>BEDROCAN</b> |            |            |
|-----------------|------------|------------|
|                 | tot THC %  | tot CBD %  |
| <b>RH ND</b>    | 1,46±0,21  | <0,1       |
| <b>RH D</b>     | 1,48±0,24  | <0,1       |
| <b>CAN ND</b>   | 1,52±0,27  | <0,1       |
| <b>SIFAP</b>    | 1,57±0,31  | <0,1       |
| <b>FM2</b>      |            |            |
| <b>RH ND</b>    | 0,58±0,09  | 0,96±0,14  |
| <b>RH D</b>     | 0,53±0,10  | 0,74±0,23  |
| <b>CAN ND</b>   | 0,58±0,06  | 0,84±0,11  |
| <b>SIFAP</b>    | 0,50±0,09  | 0,74±0,15  |
| <b>BEDIOL</b>   |            |            |
| <b>RH ND</b>    | 0,41±0,061 | 0,59±0,079 |
| <b>RH D</b>     | 0,42±0,05  | 0,48±0,07  |
| <b>CAN ND</b>   | 0,44±0,104 | 0,58±0,123 |
| <b>SIFAP</b>    | 0,43±0,112 | 0,58±0,131 |



# RINGRAZIAMENTI

**Anna Saccardo  
Francesca Ferri**

*Grazie per l'attenzione*