Determinazione del titolo di CBD in n.3 campioni di olio di canapa forniti dalla ditta BARF ITALIA srl, via Campo Rendina 1, 67017 Pizzoli (AQ), P. iva: 13573511006

Quantificazione del CBD in HPLC-DAD

- **Preparazione dei campioni**

Lo standard analitico del CBD è stato solubilizzato alla concentrazione di 1000 ppm in acetonitrile. Per l'analisi del contenuto di CBD negli oli di canapa (OTOIL CBD PLUS, OLIO DI CANAPA CON CBD 10% e OLIO DI CANAPA CON CBD 5%) è stato seguito un metodo precedentemente pubblicato, con l'applicazione di alcune modifiche (Wilson and Abdur-Rahman, 2022). La presenza di THC è stata controllata confrontando i cromatogrammi dei campioni con quelli dello standard precedentemente iniettato. A 500 mg di olio sono stati aggiunti 25 mL di metanolo (grado HPLC). Per favorire un completo recupero di CBD, i campioni sono stati posti in bagno ad ultrasuoni per 5 min, per poter poi essere centrifugati e filtrati utilizzando un filtro senza siringa da 0,2 µm.

- **Condizioni analitiche HPLC-DAD**

L'HPLC utilizzato è stato un Agilent serie 1100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), costituito da una pompa binaria per solventi, un autocampionatore, un rivelatore a matrice di fotodiodi (DAD), controllato da ChemStation (Agilent, v.01.03) (Figura 1).

Scuola di Scienze del Farmaco
e dei prodotti della Salute
Facoltà di Farmacia

www.unicam.it/farmacia

62032 Camerino (Italy)
piazza dei Costanti
tel. +39 0737 402455/56
fax +39 0737 402457
scuola.farmaco@unicam.it

Figura 1. HPLC-DAD Agilent serie 1100.

La separazione cromatografica è stata effettuata su una colonna Kinetex® C18 (4,6 x 150 mm, d.i., dimensione delle particelle 2,6 µm), acquistata da Phenomenex (Chesire, Regno Unito), operante a 35°C. L'analisi è stata condotta con una fase mobile costituita da due solventi: acqua (A) e acetonitrile/metanolo (75:25) (B) ed entrambi aggiunti con lo 0.1% di acido formico. È stato impostato un gradiente lineare a partire dall'80% di B per raggiungere il 100% di B a 10 min, mantenuto per 15,50 min e quindi la colonna è stata ricondizionata in 0,50 min e mantenuta per 15 min (Tabella 1).

Tabella 1. Gradiente di eluizione scelto per l'analisi.

	Solvente (%)	
Tempo (min)	**A (H_2O)**	**B (MeOH/ACN)**
8	20	80
10	0	100
15	0	100
25,50	0	100
26	20	80
41	20	80

Scuola di Scienze del Farmaco
e dei prodotti della Salute
Facoltà di Farmacia

www.unicam.it/farmacia

62032 Camerino (Italy)
piazza dei Costanti
tel. +39 0737 402455/56
fax +39 0737 402457
scuola.farmaco@unicam.it

Il flusso è stato impostato a 1 mL/min e il volume di iniezione a 1 µL. I cromatogrammi sono stati registrati alla lunghezza d'onda di 210 nm, 220 nm e 228 nm. In dettaglio, 210 nm è stata impiegata per la quantificazione di CBD.

- **Validazione del metodo**

Il CBD è stato confermato e quantificato utilizzando lo standard analitico e la curva di calibrazione è stata ottenuta iniettando diverse concentrazioni della soluzione standard (1, 3, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 400 µg mL^{-1}). Il metodo HPLC-DAD è stato convalidato in termini di linearità, ripetibilità, limiti di rilevamento (LOD) e limiti di quantificazione (LOQ). La riproducibilità è stata valutata determinando la deviazione standard relativa (%RSD) tra analisi consecutive (n = 3) eseguite lo stesso giorno (riproducibilità intraday) e durante tre giorni consecutivi (riproducibilità interday). Il limite di rilevamento (LOD) e il limite di quantificazione (LOQ) sono stati stimati sperimentalmente iniettando basse concentrazioni di soluzioni standard di analiti e misurando il rapporto segnale-rumore (S/N). Una concentrazione che forniva un rapporto S/N (altezza del picco/altezza del rumore) di tre è stata assegnata a LOD mentre quella di dieci era LOQ (Tabella 2).

Tabella 2. Validazione del metodo in HPLC-DAD.

Composti	**Range di conc. (µg mL^{-1})**	**Equazione di regressione[a]**	**R^{2b}**	**LOD[c] (µg mL^{-1})**	**LOQ[d] (µg mL^{-1})**	**Riproducibilità (RSD[e] %, n=3)**	
						Intraday[f]	**Interday[g]**
CBD	1-400	*y= 6,2346x + 0,9749*	0,9999	0,565	1,833	0,87%	1,38%

[a]Equazione di regressione; [b]Coefficiente di determinazione; [c]Limite di rilevamento; [d]Limite di quantificazione; [e]Deviazione standard relativa; [f]Riproducibilità intraday; [g]Riproducibilità interday.

62032 Camerino (Italy)
piazza dei Costanti
tel. +39 0737 402455/56
fax +39 0737 402457
scuola.farmaco@unicam.it

- **Analisi dei campioni**

I campioni analizzati (OTOIL CBD PLUS, OLIO DI CANAPA CON CBD 10% e OLIO DI CANAPA CON CBD 5%) sono risultati costituiti da un contenuto di CBD pari al 4,80, 9,85 e 0,95% (Tabella 3).

Tabella 3. Contenuto di CBD (%) nei campioni analizzati.

	Contenuto di CBD (%) ± d.s.
OLIO DI CANAPA CON CBD 5%	4,80 ± 0,41
OLIO DI CANAPA CON CBD 10%	9,85 ± 0,24
OTOIL CBD PLUS	0,95 ± 0,06

d.s., deviazione standard.

In tutti i campioni analizzati non si non si è riscontrata la presenza di THC, come mostrato in Figura 2.

Scuola di Scienze del Farmaco
e dei prodotti della Salute
Facoltà di Farmacia

www.unicam.it/farmacia

62032 Camerino (Italy)
piazza dei Costanti
tel. +39 0737 402455/56
fax +39 0737 402457
scuola.farmaco@unicam.it

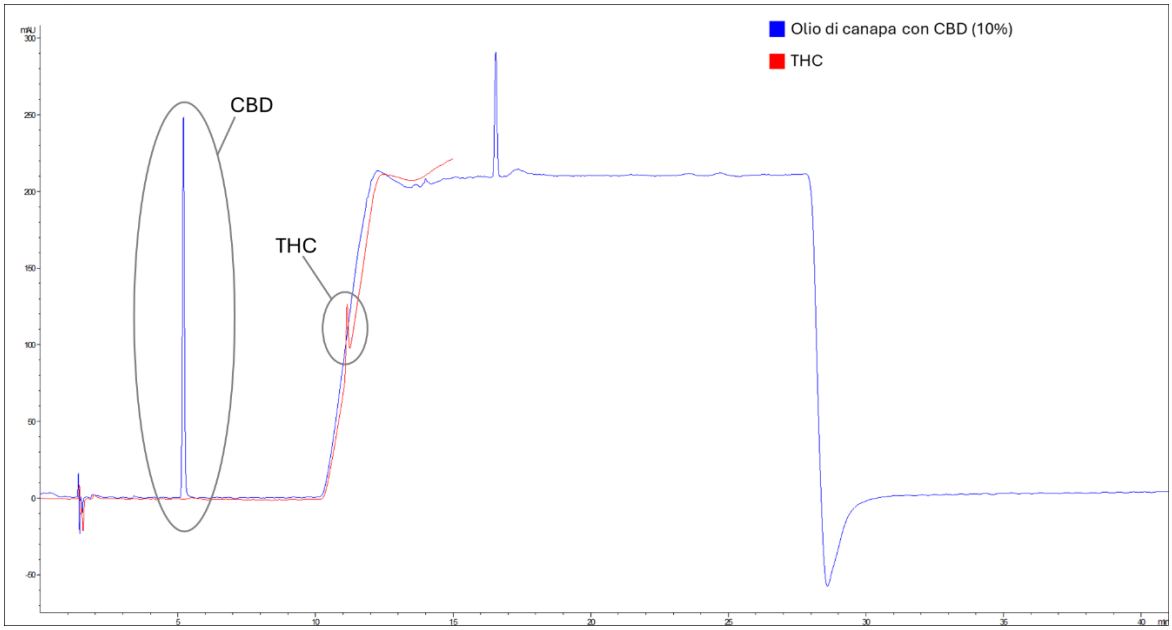

Figura 2. Sovrapposizione del cromatogramma dell'olio di canapa con CBD (10%) e dello standard del THC.

- **Referenze**

Wilson, W. B., & Abdur-Rahman, M. (2022). Determination of 11 cannabinoids in hemp plant and oils by liquid chromatography and photodiode array detection. *Chromatographia*, *85*(2), 115-125.

Distinti saluti

Filippo Maggi

Scuola di Scienze del Farmaco
e dei prodotti della Salute
Facoltà di Farmacia

www.unicam.it/farmacia

62032 Camerino (Italy)
piazza dei Costanti
tel. +39 0737 402455/56
fax +39 0737 402457
scuola.farmaco@unicam.it