



AUTORE

Dr.ssa Tanja Butt



Product Manager

Retsch GmbH
Retsch-Allee 1-5
42781 Haan, Germany

Telefono: +49 (0) 2104/2333-100
E-Mail: t.butt@retsch.com

www.retsch.com

Cannabis – dalla droga illegale alla panacea medica

Omogeneizzazione riproducibile del campione di cannabis e dei prodotti correlati

La cannabis è anche conosciuta come droga "leggera", in quanto non abbassa notevolmente la soglia di inibizione come accade con il consumo di droghe più "pesanti" come l'eroina o la cocaina. Nel 1925 la detenzione di cannabis è stata proibita in tutto il mondo ma, oggi, il consumo limitato è legale in molti paesi, per esempio in Canada, in Repubblica Ceca o in Israele. Nel 2013 l'Uruguay è stato il primo paese a legalizzare la vendita, la coltivazione e la distribuzione della pianta. Poiché sono stati dimostrati da diversi studi¹ i benefici della cannabis destinata alle cure mediche, molti paesi hanno avviato il processo di legalizzazione dell'uso di tale sostanza in condizioni rigorosamente controllate. Negli Stati Uniti, infatti, l'acquisto di cannabis per ragioni mediche è stato autorizzato dal 2016 in 29 stati ed un anno dopo è stato legalizzato anche in Germania.

Gli effetti benefici della cannabis sulla salute umana possono essere raggruppati in cinque gruppi: 1. dolore/sonno; 2. gastro-intestinale; 3. neurologico; 4. umore/comportamento e 5. altro.

I principali ingredienti della cannabis sono i cannabinoidi come il tetraidrocannabinolo (THC), il cannabinolo (CBN) o la tetraidrocannabinivarina (THCV), i quali possono agire come soppressori dell'appetito o come composti sedativi o psicoattivi. Questi hanno effetti benefici sui disturbi metabolici come il diabete, nel sollievo dal dolore, sui processi antinfiammatori e persino sul trattamento di batteri come l'MRSA. Inoltre, alla cannabis viene attribuita un'influenza positiva sulle malattie come il cancro, la sindrome di Tourette, l'artrite, l'HIV, l'asma, l'Alzheimer o la sclerosi multipla. Un altro ampio gruppo di principi sono i cosiddetti terpenoidi, come il Linalolo, l' α -Pinene, o il

¹ <http://www.cannabis-med.org/german/studies.htm>



Fig. 1: Mulino a taglienti SM 400 XL

D-Limonene. Un effetto dei terpenoidi è l'"effetto entourage": tali eccipienti possono migliorare/alterare l'assorbimento dei cannabinoidi nella barriera emato-encefalica. I terpenoidi, inoltre, agiscono come antiossidanti o antinfiammatori.

Le concentrazioni di cannabinoidi e terpenoidi rappresentano di fatto i punti cardine in termini di controllo di qualità dei prodotti correlati alla cannabis e, normalmente, sono rilevati attraverso l'analisi HPLC. Anche il contenuto di pesticidi è un tema di interesse. La cannabis si presenta in una varietà di forme commestibili, ad esempio in foglie macinate, concentrati o prodotti correlati come orsetti di gelatina o biscotti. Per garantire risultati analitici affidabili, il processo di preparazione del campione di cannabis deve essere adattato alla notevole complessità delle matrici, in quanto i campioni possono essere: appiccicosi, fibrosi o grassi e la quantità di campione può variare notevolmente.

Sebbene la cannabis sia sempre più utilizzata per le cure mediche, nella maggior parte dei paesi è ancora considerata una droga illegale e la sua detenzione, nonché la vendita, sono un reato penale. Pertanto, in un contesto penale, non è rilevante solo il controllo di qualità per le applicazioni mediche, ma anche per i principi attivi. Nelle prove dei reati per droga, la perizia sui componenti attivi del farmaco ha un'importanza sostanziale sulla pena; per la cannabis, ad esempio, un contenuto di oltre 7,5 g di tetraidrocannabinolo (THC) è già considerato critico. La perizia è fornita generalmente dall'ufficio locale di investigazione criminale.

Pre-taglio di canapa essiccata nel mulino a taglienti SM 400 XL

Il mulino a taglienti SM 400 XL ha un volume della camera di macinazione di 7,5 litri e può accettare campioni con una dimensione massima di 170mm x 220mm. In questo modo, grandi volumi di campioni possono essere completamente omogeneizzati in tempi molto ristretti, evitando tra l'altro il pre-taglio manuale. Grazie all'ampia apertura della tramoggia, al notevole volume della camera di macinazione e all'ampia superficie dei setacci di fondo di 240mm x 240mm, la produttività è molto più alta di quella dei modelli più piccoli. Inoltre, l'SM 400 XL può raggiungere dimensioni di macinatura fino a 1 mm, a seconda del campione e del setaccio utilizzato.

100 kg di canapa essiccata sono stati tagliati in modo discontinuo da una granulometria iniziale di 60 mm ad <20 mm in 60 minuti, utilizzando un setaccio da 20 mm. L'SM 400 XL è l'unico mulino in grado di trattare rapidamente grandi quantità di materiale fibroso senza bloccare la tramoggia con frammenti incastrati. Il campione pretagliato, quindi, può essere polverizzato (ad esempio in un mulino Ultracentrifugo ZM 300 di RETSCH).

Inoltre, l'SM 400 XL è adatto alla macinazione di tutte le parti della pianta, facilitando così la preparazione del campione secondo la modalità con la quale andrà assunta.



Fig.2: Campione iniziale di canapa (sinistra) e finale, dopo la riduzione con SM 400 XL (destra)



Fig. 3: Mulino Ultra Centrifugo ZM 300

Omogeneizzazione del campione nel mulino Ultracentrifugo ZM 300

Il mulino Ultracentrifugo ZM 300 è il mulino ideale per la polverizzazione di granuli come cereali o campioni fibrosi (ad esempio le piante di canapa). Raggiunge una velocità massima di 23,000 min⁻¹ e può essere dotato di una vasta gamma di accessori, adattandosi perfettamente ai requisiti del campione. Le forze di impatto e frizione tra rotore e setaccio anulare facilitano la riduzione delle dimensioni dei materiali fibrosi.

La canapa contiene olio, ciò la rende un materiale sensibile alle temperature. Difatti, per ridurre l'accumulo di calore durante la macinazione, si consiglia di utilizzare un setaccio distanziato: grazie ad un piccolo spazio tra il setaccio ed il rotore, l'attrito e di conseguenza il surriscaldamento vengono sensibilmente ridotti. 20 grammi di fiori di canapa pretagliati possono essere macinati con una granulometria inferiore a 0,5 mm utilizzando un setaccio distanziato di 0,5 mm ad una velocità di 23000 min⁻¹.

L'uso di un ciclone ha un effetto di raffreddamento sul campione e aiuta a scaricare in

modo efficiente ed automatico il materiale dalla camera di macinazione. Il campione polverizzato è ora pronto per l'estrazione di pesticidi con il metodo QuEChERS.



Fig. 4: Dopo il pre-taglio nell'SM 400 XL (a sinistra) il campione viene polverizzato a <0,5 mm nello ZM 300

Estrazione di pesticidi con il Vibromulino MM 400 (metodo QuEChERS)

Il cosiddetto metodo QuEChERS ("veloce (quick), facile (easy), economico (cheap), effettivo (effective), robusto (rugged) e sicuro (safe)") è stato sviluppato per rendere più efficiente la preparazione del campione per l'analisi sui pesticidi. Fondamentalmente consiste di tre passaggi: omogeneizzazione - estrazione - analisi. Durante il processo di omogeneizzazione, è necessario fare attenzione che il campione non si surriscaldi troppo poiché alcuni pesticidi sono volatili. Dopo l'omogeneizzazione, vengono estratti 10 grammi del campione di canapa polverizzato con 10ml di acetonitrile. Nella fase successiva, la parte organica viene essiccata e analizzata per i pesticidi con tecnica cromatografica. Per evitare i picchi fantasma nei cromatogrammi, il campione viene estratto in presenza di una miscela di sale (ad esempio cloruro di sodio e solfato di magnesio in un rapporto 1:2) e per trasferire i pesticidi dal campione nella fase organica, la miscela viene agitata per 1 - 3 minuti con acetonitrile e sale. La miscela può essere agitata in un mulino da laboratorio come il vibro mulino MM 400 di RETSCH, che scuote il campione in una provetta Falcon da 50 ml con una frequenza fino a 30 Hz, garantendo così una miscelazione accurata del campione migliorando l'estrazione successiva.



Fig.5: Vibromulino MM 400 con adattatore per 8 provette coniche da centrifuga

Polverizzazione della canapa nel CryoMill per l'analisi successiva dei pesticidi

L'estrazione tramite QuEChERS può essere migliorata riducendo la granulometria a <0,5mm. A causa delle proprietà oleose e appiccicose del campione, il mulino Ultracentrifugo non è adatto a questo scopo.

L'infrangimento del campione con azoto liquido è un metodo molto efficace per fare in modo che i materiali oleosi si polverizzino facilmente. I mulini criogenici, come il CryoMill di RETSCH, sono appositamente progettati per questo tipo di applicazioni, in quanto permettono di raffreddare continuamente la giara di macinazione e, di conseguenza, il campione con LN₂. Le dimensioni di macinatura con CryoMill sono di <0,1 mm, il che significa che per il campione di canapa vengono rilevate quantità più elevate di pesticidi dopo l'estrazione rispetto, ad esempio, allo ZM 300.

In una giara di macinazione in acciaio inox da 50 ml, sono stati macinati 5g di campione di canapa con una sfera da 25 mm in acciaio inossidabile. Il campione e la sfera sono stati inseriti nella giara, bloccata nel Cryomill, ed il coperchio è stato chiuso ermeticamente. Una funzione di preraffreddamento automatico garantisce che il processo di macinazione non inizi prima che sia raggiunta e mantenuta una temperatura di -196° C. Il tempo di preraffreddamento è stato impostato a 3 minuti a 5Hz e la macinazione è stata effettuata a 30Hz per 3 minuti.

Grazie al sistema di raffreddamento automatico di CryoMill, l'utente non entra mai in contatto con l'azoto liquido e la macchina mantiene la temperatura di -196°C durante la macinazione. Il campione infragilito può essere ora macinato a granulometrie molto più piccole rispetto allo ZM 300. Per quantità di campioni più grandi, lo ZM 300 risulta essere la soluzione ottimale.



Fig. 6: CryoMill con 50l dewar

Fig. 7:
Il campione di canapa macinato nel CryoMill (a sinistra) produce una quantità di pesticidi maggiore dopo l'estrazione rispetto al campione macinato nello ZM 300 (a destra).



Omogeneizzazione di prodotti commestibili con mulini a sfere: MM 400 o CryoMill

I campioni alimentari grassi o appiccicosi possono generare problemi di impaccamento se macinati a temperatura ambiente. Pertanto, la macinazione criogenica nell'MM 400 o nel CryoMill rappresenta la migliore soluzione per evitare l'impaccamento del campione e la perdita di ingredienti volatili. I piccoli volumi di campione come ad esempio orsetti di gelatina o 1-2 biscotti vengono omogeneizzati meglio nell'MM 400. Questo mulino a sfere è perfettamente adatto all'omogeneizzazione di suddetti campioni fino a 2x20ml in meno di 1-2 minuti. È importante riempire la giara con le sfere di macinazione (s) e con il campione, per poi chiuderla saldamente prima di iniziare la macinazione. Si deve prestare attenzione che l'LN₂ non venga inserito nelle giare di macinazione, in quanto l'evaporazione di LN₂ comporterebbe un notevole aumento della pressione all'interno della giara di macinazione. Le giare di macinazione chiuse, e quindi il campione, di conseguenza vengono infragiliti immergendoli in un bagno di LN₂ per 2-3 minuti. Le giare di macinazione adatte per la macinazione criogenica sono realizzate in acciaio o PTFE. Considerando l'alta energia e il conseguente calore sviluppato, il processo di macinazione non dovrebbe richiedere più di 2 minuti, così da impedire al campione di riscaldarsi e preservarne le proprietà di rottura raggiunte proprio grazie all'infragilimento. Se si necessitano tempi di macinazione più lunghi, nell'MM 400 il processo deve essere interrotto introducendo un raffreddamento intermedio nelle giare di macinazione chiuse. Cinque orsetti di gelatina sono stati polverizzati nell'MM 400 in una giara di macinazione da 50ml utilizzando una sfera di acciaio inossidabile di 25mm. La giara chiusa è stata immersa in un bagno di azoto liquido per circa 4 minuti e, successivamente, bloccata nel mulino. Dopo 90 secondi a 30Hz, il campione è stato totalmente polverizzato ad una finezza di 0,3mm.



Fig. 8: Orsetti di gelatina prima (sinistra) e dopo la macinazione criogenica nel Vibromulino MM400

La macinazione criogenica nel CryoMill offre il vantaggio di un raffreddamento in continuo della giara di macinazione con LN₂. La temperatura costante è garantita anche per lunghi tempi di macinazione senza dover effettuare pause intermedie di raffreddamento. Per la macinazione senza metalli pesanti è necessario utilizzare una giara di macinazione in ossido di zirconio. Persino la liquirizia, una pralina di cioccolato o campioni simili possono essere polverizzati in CryoMill.



Fig. 9: Mulino a coltelli GRINDOMIX GM 200

Omogeneizzazione di biscotti nel mulino a coltelli GM 200

Il mulino a coltelli GM 200 è progettato per l'omogeneizzazione completa di campioni con contenuti elevati di acqua, olio, zucchero o grassi, accettando anche volumi di campione fino a 700ml. Grazie al potente motore da 1000 W, il mulino può omogeneizzare difficili campioni in modo molto rapido ed efficiente senza occlusioni o la necessità di effettuare più di due passaggi di macinazione. L'innovativa funzione "Boost" consente un aumento temporaneo della velocità a 14.000 min⁻¹, fornendo una potenza extra per l'omogeneizzazione di campioni difficili in un tempo molto breve. Il mulino può essere utilizzato in tre diverse modalità: modalità standard = taglio, modalità inversa = impatto, modalità intervallo = migliore miscelazione campione, per ottimizzare il processo di omogeneizzazione in relazione alle proprietà del materiale. È possibile memorizzare fino a 8 programmi per applicazioni di routine. La possibilità di salvare 4 sequenze di programmi è utile quando si combinano due fasi di macinazione, ad esempio pre-frantumazione in modalità di impatto seguita da macinazione in modalità di taglio, o se sono richieste due velocità diverse.

La polverizzazione di 8 biscotti è stata eseguita in due fasi. Nella fase di pre-macinazione a 4000 min⁻¹, la modalità intervallo è stata utilizzata per 10 secondi per migliorare la miscelazione del campione. L'uso del coperchio standard garantisce che il campione possa muoversi liberamente nel contenitore, riducendo così lo sviluppo del calore (ed il successivo rilascio di grassi). Nella fase di omogeneizzazione, che richiede 35 secondi a 10.000 min⁻¹, è preferibile l'uso del coperchio di riduzione di 0,5l per forzare il campione verso le lame e aumentare così l'efficienza di macinazione. In questo modo, il campione completo è stato omogeneizzato a <0,5mm.



Fig. 10: Biscotti prima (sinistra) e dopo la polverizzazione nel mulino a coltelli GM 200 (destra)

Esperienze sul campo

Omogeneizzazione di grandi volumi di campioni di cannabis nel mulino a coltelli GM 300 presso l'Ufficio di Investigazione Criminale di Dresda, Germania.

Nel laboratorio dell'ufficio regionale di Dresda, le piante di cannabis sono state prima ridotte di dimensioni e successivamente suddivise in diversi campioni del materiale macinato. Gli estratti vengono poi analizzati attraverso la gascromatografia.

"Di solito ci occupiamo di grandi volumi di campioni", spiega Thomas Paulick, Responsabile di laboratorio dell'Ufficio Regionale di Investigazione Criminale di Dresda. "Pertanto, è essenziale disporre di una quantità rappresentativa dell'intero campione per garantire una quantificazione affidabile della componente attiva. Il GM 300 soddisfa questo requisito: da un massimo di 4 litri di materiale vegetale si ricava un campione omogeneo e sufficientemente rappresentativo dal quale possiamo prelevare circa 0,5 g per ulteriori analisi. Lavoriamo le foglie con resti di ramoscelli sottili e fiori altamente resinosi senza raffreddamento - il che non è un problema per il mulino a coltelli. Il tempo e la velocità di macinazione sono selezionati in base alle proprietà della pianta. Il design chiuso e il contenitore di macinazione rimovibile contribuiscono a ridurre la formazione di polvere durante l'omogeneizzazione. In conclusione, il nuovo GM 300 è risultato altamente adatto alle nostre esigenze."



Conclusioni

Con l'uso crescente della cannabis nel settore medico, il controllo qualità è diventato un problema importante. Per garantire risultati affidabili e significativi delle analisi, una corretta e professionale omogeneizzazione del campione è una fase fondamentale. RETSCH offre una gamma di diversi mulini da laboratorio adatti ad una preparazione del campione efficiente, efficace e riproducibile.

Per saperne di più:

www.retsch.com