

Análisis de Cannabinoides: Revisión bibliográfica de métodos cromatográficos

José Miguel Sellés Japas

Trabajo de Fin de Máster

Máster en Genética, Física y Química Forense

Tutora: Marta Calull Blanch



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Agosto de 2022, Tarragona

Resumen

El análisis de Cannabinoides es uno de los ensayos más habitualmente realizados por los laboratorios forenses. Por este motivo es importante disponer de metodologías analíticas con el objetivo de poder analizar diferentes tipos de muestras en el menor tiempo posible. Para que los resultados obtenidos tengan valor legal se necesita utilizar métodos validados que aseguren su exactitud y precisión. Existen diversas técnicas y métodos utilizados comúnmente para este tipo de análisis, ya sea con propósito identificativo o cuantificativo. Este trabajo se centra en las técnicas de cromatografía de gases y cromatografía de líquidos, analizando ventajas y problemáticas de cada una. También se comparan los posibles detectores acoplados a cada técnica cromatográfica, comúnmente el espectrómetro de masas, el detector de ionización de llama y el detector de diodos en fila.

Es importante destacar que la metodología a implementar en los análisis forenses de Cannabinoides depende en gran parte de las técnicas disponibles en el laboratorio por lo que habrá veces que no será posible utilizar el mejor método existente en la bibliografía, pero se podrá validar un método alternativo que permita obtener resultados válidos para la finalidad requerida.

Palabras Clave / Keywords: Cannabis, THC, CBD, THCA, HPLC, GC, marihuana

Abstract

Cannabinoid analysis is one of the most common tests conducted in forensic laboratories. Therefore, optimization of the available analytical techniques is an important endeavor. To ensure the results carry satisfactory legal value, it is necessary to use validated methods that ensure certainty and reproducibility. There are various techniques and methods commonly used for Cannabinoid analysis, either for identification or quantification purposes, each with its own advantages and disadvantages. This paper presents a summary and evaluation of the most common chromatographic techniques: Gases and Liquids, outlining the advantages, disadvantages and applications of each one. We also compare the

different detectors used with this chromatographies: Mass Spectrometer and Diode Array Detector/Flame Ionization Detector.

In conclusion, the way to proceed with the forensic analysis of Cannabinoids depends largely on the techniques available for the analyst. There will be times where the best method in the bibliography can't be used, but an alternate method could be validated so reproducible and valid results can be obtained.

Índice

Resumen

1. Introducción	5
1.1. Cannabis y Cannabinoides	5
1.2. Productos	7
1.3. Estabilidades	9
1.4. Marco Legal	10
2. Objetivo	11
3. Estudio bibliográfico para la determinación de cannabinoides en muestras vegetales	12
3.1. Muestreo y pretratamiento de muestra	12
3.2. Análisis de Cannabinoides	14
3.2.1. Análisis Semicuantitativo	15
3.2.2. Análisis Cuantitativo	18
3.2.2.1. Cromatografía de Gases	18
3.2.2.2. Cromatografía de Líquidos	25
3.2.2.3. Estudio comparativo entre las técnicas de cromatografía de gases y cromatografía de líquidos	30
3.2.3. Otras técnicas	32
3.2.3.1. Resonancia Magnética Nuclear	32
3.2.3.2. Espectrometría de Movilidad Iónica	36
3.2.3.3. Espectroscopia Infrarroja y Raman	37
3.2.4. Comparación general técnicas presentadas	38
4. Conclusiones	39
5. Perspectivas a futuro	40
6. Bibliografía	41
7. Anexo - Abreviaciones	48

1- Introducción

El cannabis es la droga de circulación no legal más consumida en el mundo [1] así como también en Europa, estando presente en más del 80% de las incautaciones (240.000 en 2022) [2], por lo tanto, su análisis es uno de los más frecuentes en los laboratorios forenses. Si bien esta droga fue utilizada con usos medicinales y terapéuticos desde la antigüedad, recién en los últimos años comenzaron a surgir estudios científicos analizando estas propiedades [3-9]. No todo uso del Cannabis está penalizado por la ley ya que puede aplicarse en la industria textil, alimentaria y de construcción. Esto genera que, mientras algunos países prohíben directamente la tenencia de esta droga, otros implementan un límite legal en la concentración permitida. Por este motivo los análisis a realizar dependen en gran parte de los requisitos del sistema legal: si es suficiente determinar la presencia de la droga con análisis cualitativos, mientras que en los casos donde se requiere saber la concentración de sustancia psicotrópica se necesitan análisis que permitan la cuantificación de los analitos. Cabe destacar que la cuantificación también es necesaria como análisis de control de calidad en los países donde se encuentra legalizada, para de este modo poder dosificar correctamente las dosis.

Este trabajo se realizó con el fin de recopilar diversos métodos analíticos utilizados por órganos internacionales, como el Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías (**EMCDDA**) y la Oficina de Drogas y Crímenes de las Naciones Unidas (**UNODC**), para el análisis de cannabis, compararlos y mencionar ventajas e inconvenientes de los mismos [1, 2].

1.1. Cannabis y Cannabinoides

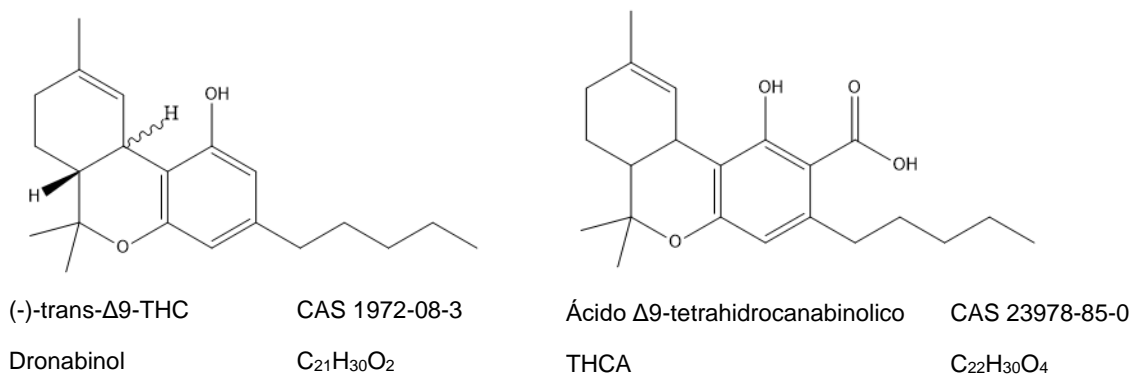
El término cannabinoides (CNBs) engloba a una familia de compuestos terpenofenólicos sintetizados naturalmente por la planta *Cannabis Sativa L.*, siendo una sustancia con actividad psicotrópica de gran interés forense por su alto consumo y tráfico. Los CNBs son “policétidos de resorcinilo isoprenilados” que pueden variar en el radical isoprenil y la cadena resorcinil, dando lugar a un gran número de diferentes combinaciones. La mayoría son quirales y son sintetizados naturalmente en la forma (-)-(R,R) [10]. El Cannabis está compuesto

por diversos componentes, de los cuales el compuesto de principal interés es el Dronabinol o Δ^9 -THC ((-)-trans- Δ^9 -tetrahidrocanabinol), que se encuentra dentro del grupo de isómeros tetrahidrocannabinoles o THC (estas siglas, contrario a su uso común son una familia de muchos isómeros, de los cuales el Δ^9 -THC es el más importante). Este es el compuesto activo psicotrópico, que produce sensación de euforia y relajación, teniendo efectos de analgésico, antiinflamatorio, estimulante de apetito y antiemético. Su uso crónico está asociado a déficits cognitivos, ansiedad, paranoia, psicosis y síndrome de abstinencia [3-7, 11-15].

Otro compuesto de interés es el Cannabidiol (CBD), otro isómero de THC, que presenta acciones terapéuticas similares al Δ^9 -THC, sin tener el efecto psicoactivo, e incluso se sugiere que podría mitigar los efectos adversos de este último [8, 9, 16, 17].

También está el ácido Δ^9 -tetrahidrocanabinolico o THCA, el cual es importante debido a que se convierte en Δ^9 -THC por descarboxilación. El Cannabigerol o CBG es otro CNB estudiado por su mayor presencia en las plantas de uso industrial.

En la Figura 1 se observan las estructuras químicas de estos compuestos mencionados.



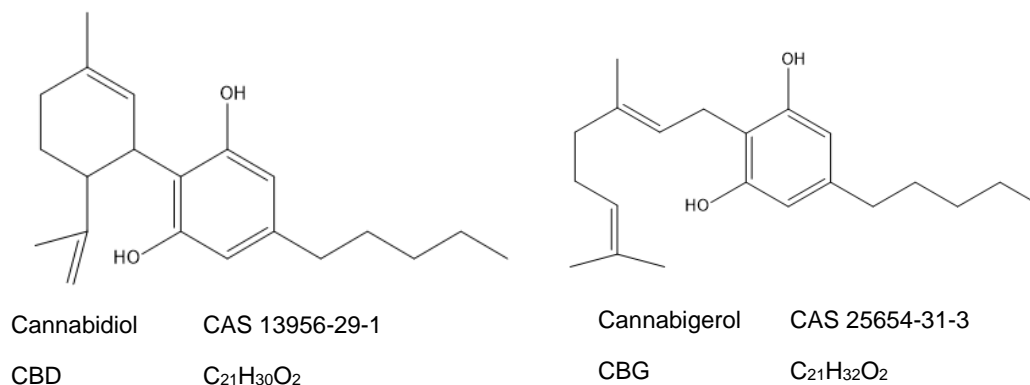


Figura 1: Estructura química de cannabinoides de interés.

Dentro de la planta de Cannabis se puede encontrar la mayor concentración de THC en el pistilo de las flores, luego una menor cantidad en las hojas y muy poco en las raíces [18]. Las hembras presentan un contenido mayor de THC que las macho y es posible aumentar estos contenidos mediante cultivo interno, ya que, al mejorar las condiciones de crecimiento, se logra obtener plantas con contenidos entre 10 y 25%, resinas de 25% y aceites de hasta 60%.

1.2. Productos

Como existen diferentes presentaciones del cannabis como, por ejemplo, flores y hojas secas (marihuana), resina (hachís), aceites, etc., es necesario tener procedimientos que permitan el análisis e identificación en todas las diferentes posibles matrices. Como es de esperar, las formas de obtención varían de acuerdo con el producto deseado.

Para el cannabis herbal (planta) se cortan las flores y hojas, pudiendo someterse a un tamizado para lograr una mejor separación. El secado de la planta es simple: colgar y secar con una corriente de aire entre 24 y 72 horas. Este producto se puede fumar directamente o almacenar, aunque se degrada con el tiempo [1, 2, 10].

El hachís o resina de cannabis se obtiene al juntar las secreciones resinosas producidas por las plantas, logrando concentraciones de THC mayores que en el herbal. Si bien existen varios métodos distintos de producción, la mayoría se

basan en romper las hojas secas (con mortero o las manos), tamizar y calentar un poco para lograr la apariencia resinosa. Debido a este tipo de purificación es que posee mayor contenido que la presentación herbal [1].

El aceite de cannabis es un concentrado oscuro y denso de las plantas o resinas y se produce mediante un reflujo con algún solvente orgánico como acetona, etanol o éter de petróleo. Se filtra y se deja evaporar hasta obtener la consistencia deseada. Es muy utilizado para facilitar el tráfico por permitir transportar la misma cantidad de cannabis en menor volumen [1].

Según un estudio realizado por la Oficina Federal de Salud Pública de Suiza [19], la mayor parte de las incautaciones de cannabis herbal poseen una composición de entre 3 y 13% de THC, las de resina entre 7 y 17% y los aceites hasta un 80%. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por M. Taschwer *et al.* [20] que obtuvieron valores entre 2 y 25% para muestras vegetales. Esta información es importante a tener en cuenta al definir el rango de trabajo al intentar cuantificar las muestras.

Una presentación de uso popular son los comestibles, que se logran al calentar el cannabis con aceite o manteca y estos productos no suelen tener un contenido de THC mayor que un 0,05% [1].

El cáñamo industrial se obtiene de cepas de *Cannabis Sativa* con bajo contenido de THC y alto contenido de CBD, teniendo gran utilidad industrial y agrícola [21]. De estas cepas se utilizan más que nada las semillas, para producir alimentos, plásticos, combustible, y las fibras, para papel, textiles y materiales de construcción. En Europa, el contenido máximo de THC en estas plantas es de 0,2%.

Por último, también hay que mencionar el uso terapéutico del cannabis. Existen productos aprobados para su uso médico como tratamientos para el dolor y la espasticidad, los cuales suelen ser en base a CBD con presentaciones de 100mg. Al Δ^9 -THC (psicoactivo) se lo utiliza en dosis de 2,5 mg para la pérdida del apetito en pacientes con SIDA, náuseas severas y vómitos por quimioterapia. Estos tipos de productos se encuentran en constante investigación y desarrollo, pudiendo encontrarse una cantidad alta de trabajos mencionando sus posibles usos y aplicaciones [3-9].

1.3. Estabilidades

Es interesante destacar que los dos cannabinoides más estudiados (Dronabinol y CBD) no son biosintetizados por las plantas, sino que las mismas producen sus análogos ácidos (THCA y CBDA respectivamente) los que se descarboxilan naturalmente debido a reacciones inducidas por el calor o la luz [22, 23, 24] la cual se debe a la limitada estabilidad de los cannabinoides ácidos. Aunque los neutros son más estables, también pueden descomponerse o interconvertirse, siendo las reacciones químicas de estabilidad más importantes a tener en cuenta las siguientes:

- Al calentar la muestra o exponerla a la luz puede producirse la descarboxilación de THCA a THC y también la oxidación de THC a cannabinoil o CBN [1].
- En medio ácido está favorecida la conversión de CBD a isómeros del THC (también en presencia de catalizadores) y también la isomerización de Δ^9 -THC a Δ^8 -THC. Resultados de niveles muy altos de Δ^8 suele ser indicativo de cannabis enriquecido con THC convertido [1].

Según un estudio presentado por O. Zoller *et al.* [25] las soluciones de Δ^9 -THC suelen ser más estables en soluciones básicas que ácidas y es posible conservar las soluciones metanólicas patrón de Δ^9 -THCA por al menos tres meses si se las almacena a menos de -20°C , mientras que las de Δ^9 -THC por al menos un año. Las muestras de Δ^9 -THCA se mantienen estables al menos dos semanas si se las guarda a $+5^{\circ}\text{C}$, mientras que las de Δ^9 -THC lo hacen como mínimo un mes. Esto también es mantenido por M. Taschwer *et al.* [20] donde afirman que si se mantiene a -25°C , la relación de THCA/ Δ^9 -THC se mantiene constante por hasta 4 meses. También mencionan que en muestras guardadas por un año a 25°C pero protegidas de la luz no se observaron cambios en esta relación. Cabe aclarar que no significa que no suceda la descarboxilación, ya que observaron un aumento considerable en la cantidad de Δ^9 -THC y disminución de THCA, pero la relación se mantiene constante. Esto es importante a tener en cuenta si se desea cuantificar Δ^9 -THC o THC total (Δ^9 -THC y THCA), también llamado THC disponible, debido a la conversión del ácido en la especie neutra en presencia de calor.

Por todos estos motivos es importante almacenar tanto las muestras como las soluciones preparadas en un lugar oscuro y fresco, al reparo de la luz y el calor.

1.4. Marco Legal

En España el consumo y cultivo para uso personal (cantidades menores a 100 g) no se encuentran penalizados, pero cualquier forma de negocio o narcotráfico si están prohibidos [26]. También se debe tener en cuenta la existencia de licencias para plantaciones industriales de cáñamo, por lo que es necesario definir un límite en las concentraciones permitidas. Al igual que en el resto de Europa, en España este límite es de 0,2% de THC, aunque ya se aprobó una medida europea en el 2021 para que este límite aumente al 0,3% en el 2023 [27].

Por último, es interesante mencionar que en Europa el límite de tolerancia aceptado en las mediciones es 0,03%, pero S. Sgró *et al* [28] proponen argumentos en contra de este valor, ya que mencionan la falta de datos de precisión que apoyen ese número y proponen penalizar excesos al límite legal cuando excedan el 11-15% de ese límite.

Si se necesita diferenciar entre abuso y uso industrial se procede a analizar el THC total (suma de Δ 9-THC y THCA) y se compara la concentración obtenida con las de CBD, la cual es mayor en cáñamo industrial [29]. Dependiendo de la relación que haya entre ambas concentraciones existen clasificaciones como[30]:

- Δ 9-THC predominante, tipo droga con CBD/Δ 9-THC=0-0,005.
- CBD predominante, por ejemplo, cáñamo con CBD/Δ 9-THC=15-25.
- Intermedio, CBD/Δ 9-THC=0.5-3.0.

2- Objetivo

El principal objetivo del trabajo es realizar un estudio bibliográfico sobre las diferentes metodologías existentes en la bibliografía sobre el análisis cuantitativo de muestras vegetales de Cannabis mediante técnicas cromatográficas, comparando ventajas e inconvenientes comunes entre las técnicas y métodos más utilizados. Con toda esta información, se busca poder recomendar el mejor método posible.

3- Estudio bibliográfico para la determinación de cannabinoides en muestras vegetales

A lo largo de los años se han desarrollado diversos métodos analíticos para la determinación de cannabinoides en diferentes tipos de muestras, siendo las vegetales las más comunes. Lamentablemente hasta el día de hoy no existe un método aceptado globalmente para este análisis, por lo que muchas veces los resultados entre laboratorios no son siempre comparables [31]. Por este motivo se realizó una búsqueda bibliográfica de publicaciones y manuales internacionales sobre análisis de cannabis, teniendo al mismo tiempo contacto con distintos expertos en el tema, con el objetivo de analizar las ventajas e inconvenientes de los diferentes métodos.

Se comenzará analizando la técnica de muestreo y preparación de muestra más comúnmente utilizada, y luego se estudiarán los distintos métodos analíticos disponibles para el análisis cuantitativo de cannabinoides en muestras vegetales. Por último, se compararán los mismos, analizando ventajas, desventajas y situaciones donde conviene utilizar cada uno.

3.1 Muestreo y pretratamiento de muestra

Como en cualquier análisis, el muestreo es un paso fundamental para la obtención de resultados confiables, por lo que es importante conocer la distribución de cannabinoides en las muestras. Como se mencionó antes en el cannabis herbal la mayor proporción se encuentra en las flores, mientras que para las resinas es mejor tomar muestra del interior debido a la posible oxidación en el exterior del material. Por estos motivos se recomienda utilizar métodos de muestreo Bayesianos que tengan en cuenta esta información, sobre un método simplemente geométrico [32].

Es recomendable seguir siempre las guías de muestreo de drogas, ya que el muestreo requerido depende en gran parte que tipo de análisis se van a realizar (*Guidelines on Sampling of Illicit Drugs for Quantitative Analysis* de la Red Europea de Institutos de Ciencias Forenses, ENFSI) [32, 33]. Por ejemplo, si se desea realizar un análisis cualitativo de muestras herbales, es suficiente con tomar muestras de las flores y hojas, ya que ahí se encuentra la mayor cantidad

de THC, pero para un análisis cuantitativo se necesita tomar muestra representativa de toda la planta (brotes, hojas, tallos) para poder expresar los resultados en porcentaje masa-masa. La homogeneización de la muestra previa a la extracción es esencial para poder tener resultados válidos [1, 32, 33]. El contenido de agua debe ser considerado también, ya que puede variar significativamente entre muestras [34]. Esta determinación puede realizarse con una titulación por Karl Fisher sin metanol, método rápido y sencillo [35]. A continuación, se procede a secar la muestra, existiendo varios métodos, siendo los más comunes dejar a temperatura ambiente por varios días, o secar en un horno con ventilación a 35-40°C por 24h [1, 31, 36]. Luego se utiliza un mortero para moler, pudiendo utilizarse hielo seco como ayuda, y si es necesario es posible determinar tamaños de partícula mediante un tamizado. Este paso puede ser un requisito para cuantificaciones porque asegura la homogeneidad de la muestra [37]. Para las muestras de resina se utiliza un rallador para reducir el tamaño, y si se trata de una muestra pegajosa, se enfría con nitrógeno líquido y se pulveriza con mortero, de manera similar al herbal. Por último, los aceites pueden ser analizados directamente o requerir un paso previo de dilución si hay riesgo de dañar un equipo [1].

La extracción se realiza a continuación, teniendo en cuenta que los compuestos neutros (THC, CBD, etc.) pueden extraerse con hexano o éter de petróleo [38, 39], pero para los cannabinoides ácidos como el THCA y el ácido cannabidiólico (CBDA) son mejores los solventes polares como isopropanol, etanol, etc. Por este motivo las mezclas de Metanol (MeOH)- CHCl_3 o hexano 9:1 suelen ser las más utilizadas para extraer cuantitativamente todos los cannabinoides y suelen realizarse por aproximadamente 15 minutos en sonicador para mejores resultados [29, 40-46].

T. Berés *et al.* [47] comparan distintos solventes de extracción, donde mencionan que no suele haber diferencias en los mayormente utilizados (MeOH- CHCl_3 / Hexano-Acetona / Etanol), por lo que utilizan en su método etanol 96% debido a su facilidad de obtención y baja toxicidad. En ese trabajo lograron extracciones de más del 95% para CBDA, CBD y Δ^9 -THC durante la primera extracción, mientras que un poco menores (93%) para THCA. En ese estudio concluyen

también que realizar múltiples extracciones no mejora significativamente la cantidad obtenida.

Como bien se mencionó, la técnica más utilizada de extracción es la sólido-líquido asistida por ultrasonido (UAE) [29, 38-47], pero también hay trabajos donde utilizan fluidos supercríticos (SFE) [48, 49], espacio cabeza-microextracción en fase sólida (HS-SPME) [1] o extracción por reflujo Soxhlet [50]. Cada técnica tiene sus ventajas e inconvenientes, dando resultados similares y reproducibles (rendimientos entre el 90 y 110%), por lo que la elección suele ser según la disponibilidad del laboratorio.

Una vez preparadas las muestras se procede a realizar los análisis pertinentes.

3.2 Análisis de Cannabinoides

Suelen existir dos objetivos para analizar una muestra de CNBs: Identificación y cuantificación. Si solo se busca identificar la presencia de uno o más CNBs se pueden realizar análisis cualitativos, sin necesidad de cuantificar los compuestos presentes. Desde el punto de vista forense es necesario, en general, poder determinar o aproximar identidad, cantidad y concentración de los CNBs presentes en la muestra, por lo que se suelen elegir métodos que permitan tanto la identificación como la cuantificación de estos compuestos. También es importante diferenciar los análisis forenses de los de control de calidad necesarios en las industrias, los cuales cada vez son más comunes debido a la despenalización del Cannabis y la aparición de nuevos productos para comercializar. Como ya se mencionó anteriormente, la finalidad de los análisis forenses de cannabinoides es identificar y cuantificar las cantidades de CNBs presentes en las muestras, mientras que un control de calidad en una industria implica muchos más análisis, como los bromatológicos o de otros compuestos no cannabinoides que pueden tener efectos nocivos, como por ejemplo terpenoides. Este trabajo se centra en los análisis realizados por laboratorios forenses. En la figura 2 se observan las técnicas más comunes utilizadas en el análisis de CNBs:

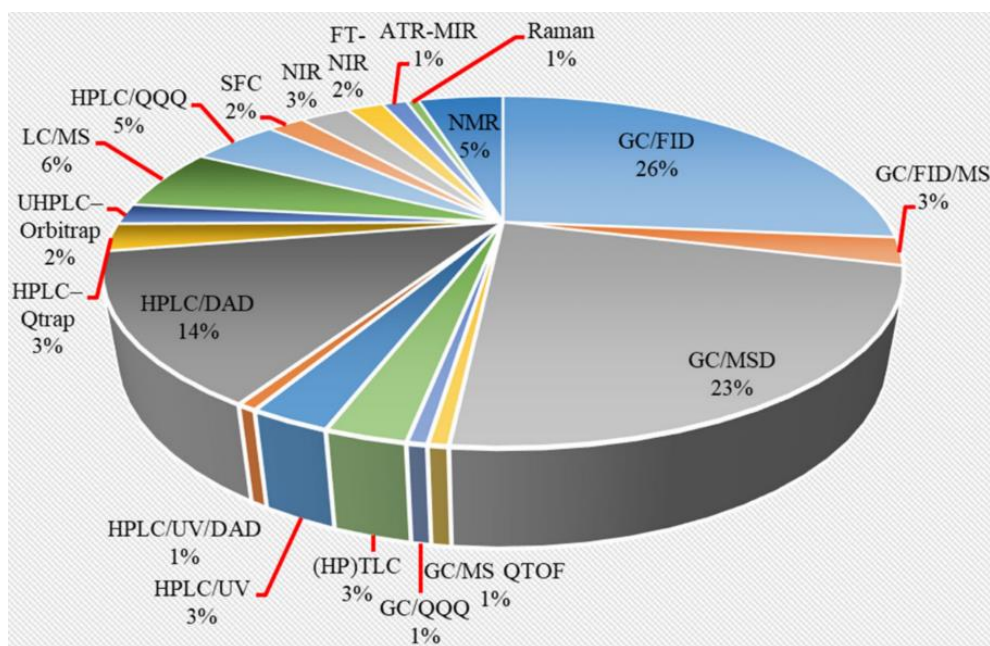


Figura 2: Proporción de las técnicas más utilizadas en el análisis de CNBs [36]

3.2.1 Análisis semicuantitativo

La técnica más utilizada para la separación de compuestos sea la cromatografía, en la misma se utiliza una fase móvil para transportar los analitos a través de una fase estacionaria. Dependiendo de las interacciones que tenga el analito con estas fases puede tardar más o menos tiempo en recorrer el camino, logrando separación entre compuestos diferentes. Según las características de las fases y los equipos utilizados existen diversas técnicas cromatográficas, siendo la Cromatografía de Capa Delgada (CCD/TLC), la Cromatografía de Líquidos (LC) y la Cromatografía de Gases (GC) las más utilizadas en los casos de análisis de cannabis y drogas de abuso. Primero se menciona la cromatografía en capa delgada ya que su utilidad es principalmente identificativa y semicuantitativa, y luego se discutirán las cromatografías de líquido y cromatografía de gases que tienen aplicaciones cuali- y cuantitativas.

La **Cromatografía en Capa Delgada** (CCD, o TLC por sus siglas en inglés), es una técnica muy utilizada para la rápida separación e identificación de compuestos por la sencillez y bajo costo del ensayo. Esta técnica se basa en sembrar (colocar) la solución incógnita en una placa con una fase estacionaria como sílica y utilizar una combinación de solventes (fase móvil) para separar los

compuestos presentes. Según la altura alcanzada, se puede calcular el factor de retención (R_f) y se puede identificar una sustancia si se compara con un estándar. El R_f es la distancia relativa recorrida por el analito en comparación con la fase móvil.

Las placas más utilizadas son de sílica gel G (0,25mm de grosor) con un indicador de fluorescencia a 254 nm que permiten visualizar compuestos sin fluorescencia [1, 31, 36]. Si se requieren sensibilidades mayores y tiempos menores existen placas de alta eficacia (HPTLC), pero los costos son mayores. Los solventes a utilizar tienen que ser preparados de manera cuantitativa si se desea comparar bibliográficamente los R_f obtenidos. También es importante permitir la saturación de la cubeta cerrada donde se realice la corrida dejando un tiempo los solventes, de esta manera se evitan evaporaciones a medida que avanza el frente y los resultados son más reproducibles.

Existen varios solventes o mezclas de solventes que pueden utilizarse para separar compuestos cannabinoides recomendados por la UNODC [1]. Por ejemplo, para separar compuestos neutros en una TLC se utiliza una mezcla de tolueno y dietilamina, mientras que si se desea separar también el THCA se pueden realizar tres HPTLC en tres cubetas con 1) Una mezcla de éter de petróleo y dietiléter; 2) Una mezcla de ciclohexano, éter isopropílico y dietilamina; 3) Una mezcla de hexano, dioxano y metanol. Otros métodos son utilizados por las Farmacopeas Europea [51] y Americana [52], donde la TLC es la técnica elegida para la identificación de los CNBs.

La UNODC también informa sobre un método comúnmente utilizado para la extracción de muestras utilizando cantidades que logren una concentración final de aproximadamente 0,5 mg/ml de los CNBs de interés [1]. Si se van a realizar análisis cuantitativos es necesario utilizar solventes polares, ya que, como se mencionó anteriormente, de no ser así la extracción del THCA resulta baja y poco reproducible. Si solo se van a realizar análisis cualitativos es posible utilizar éter de petróleo que da buenos resultados.

Como estándar de comparación se utiliza una solución 0,5 mg/ml en Metanol y como control negativo se utiliza el mismo solvente que para la extracción.

Se realiza la TLC marcando la línea de base a 2 cm del borde, dejando espacio entre siembras, y una vez finalizada se marca el frente de solvente y se deja secar para luego revelar las manchas con algunos espray, como, por ejemplo:

- Solución *Fast Blue B* 50 mg en 20 mL NaOH (0,1M)
- Solución *Fast Blue B* 50 mg 1 mL de agua y 20 mL de Metanol

Si se desea conservar el análisis por un tiempo se puede revelar con una secuencia de Dietilamina, luego con solución Fast Blue B y terminar nuevamente con Dietilamina. En estas condiciones la placa puede guardarse en una bolsa de plástico sellada posteriormente de ser secada con aire o temperatura ambiente, sin pérdida de color [1].

Una vez revelada la placa, se calculan los factores de retención comparándolos con valores bibliográficos y el estándar si se realizó uno. Como es posible la superposición de manchas, es recomendable utilizar más de una condición cromatográfica (solventes) ya que varios resultados positivos dan más certeza a las conclusiones.

Otro método de análisis por HPTLC es el presentado por Y. Liu *et al.* [53] donde logran incluso cuantificar de manera aproximada realizando una curva de calibración con un rango entre 25 y 500 ng de los CNBs.

Por último, es interesante mencionar que si bien es posible un análisis semicuantitativo [54, 55] comparando las intensidades de las manchas de la muestra con las producidas por concentraciones patrón, para esto se necesita que la siembra sea similar y reproducible (manchas grandes parecen menos concentradas que manchas pequeñas, debido a la dilución en la superficie). Se utilizan sustancias estándar, para de esta manera, poder comparar las intensidades de los mismos compuestos. También es importante mencionar que existen limitaciones en cuanto a la especificidad y sensibilidad de esta técnica si se la compara con otras técnicas cromatográficas como las que presentaremos a continuación.

3.2.2 Análisis Cuantitativo

Las técnicas más empleadas para realizar un análisis cuantitativo de CNBs en muestras herbales son la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía de líquidos (LC) acopladas a un detector espectroscópico. Estas técnicas requieren realizar una curva de calibración, preparando soluciones patrón utilizando sustancias estándar, de esta manera se puede interpolar la concentración de la muestra incógnita. Para análisis de rutina de cannabis se recomienda trabajar en rangos de concentración de los CNBs de 0,1 y 2,5% (o 0,02 mg/mL a 0,5 mg/mL), incluyendo los puntos 0,04 y 0,5 mg/mL, requeridos por la Unión Europea [1]. Debido a los problemas de estabilidad mencionados en el párrafo de “1. *Introducción - Estabilidades*”, estas soluciones estándar preparadas deben conservarse en un lugar fresco y a la sombra, pudiendo utilizarse dentro de los 4 meses.

A la hora de cuantificar, es muy importante poder informar del rango de incertidumbre de la concentración obtenida, ya que los valores obtenidos nunca son absolutos y es posible que un valor aparentemente superior al límite en realidad se encuentre debajo del mismo por los errores aleatorios de cada método. Tanto en España como en el resto de Europa hay una tolerancia sobre el valor de la concentración obtenida del 0,03%, aunque en diversos estudios se cuestiona el origen de este valor, y se recomienda utilizar valores entre 11 y 15%, dependiendo del límite legal de THC de cada lugar [56].

Al realizar una búsqueda de publicaciones en los últimos años se observa una tendencia de aumento para los métodos de LC en comparación con los de GC, pero lo cierto es que ambos métodos proveen unos análisis muy útiles a la hora de identificar y cuantificar CNBs en muestras vegetales [31].

3.2.2.1. Cromatografía de gases (GC)

La **cromatografía de gases**, como su nombre indica, utiliza gases como fase móvil, siendo los más comunes Hidrógeno, Nitrógeno y Helio. Es una técnica muy utilizada en laboratorios forenses por el poder de determinar compuestos volátiles de manera rápida y simple.

Algo para tener en cuenta con la GC es la necesidad de las altas temperaturas que se requieren en el inyector (alrededor de 200°C), lo que produce la reacción ya mencionada de descarboxilación de los ácidos cannabinoides en el propio inyector, siendo la transformación de THCA a THC la más importante desde el punto de vista analítico [57]. Esta reacción es parcial [58] por lo que se dificulta el análisis. Si se necesita obtener el contenido total de THC (suma de THCA y THC), una posible solución a este problema de estabilidad es realizar una descarboxilación previa al análisis para asegurar que el THCA pasa lo más completamente posible a THC. El problema de estos pasos es que como demostró Dussy *et al.* [59] puede haber diferencias en las descarboxilaciones que generan variaciones en los resultados. También mencionan que si se utilizan condiciones muy drásticas de tiempo y temperatura pueden suceder reacciones de apertura de anillo, perdiendo THC (descomposición a CBN y otros productos). Si se necesita cuantificar por separado cada especie, una solución al problema de descarboxilación es realizar un paso de derivatización que permita determinar la concentración de cada una. También en este caso existe el problema de obtener derivatizaciones con rendimientos inferiores al 100% como menciona A. Hazekampf *et al.* [60]. Por estos motivos los métodos analíticos y las condiciones utilizadas deben ser validados con especial cuidado para poder asegurar resultados confiables [61]. En cuanto a este problema, es importante mencionar que algunos países tienen un límite de THC, pero no especifican sobre el contenido de THCA, por lo que hay que tener cuidado con la metodología a utilizar, ya que existe la posibilidad de sobreestimar el THC por la descarboxilación del THCA.

La descarboxilación se realiza transfiriendo 500 µL del extracto realizado anteriormente en “3.1 Muestreo y pretratamiento de la muestra” a un vial de GC el cual se calienta a 150°C por 12 min para asegurar la descarboxilación total del THCA. Al evaporarse el solvente se redisuelve el residuo en 1,5 mL de etanol, se agita el vial y se puede proceder al análisis [33].

La UNODC [1] recomienda para la derivatización la utilización de agentes como N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) o N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida/trimetilclorosilano (BSTFA/TMCS) (1%), teniendo especial cuidado de evitar solventes como el etanol, ya que reaccionan

con estos agentes derivatizantes. En el caso de haber utilizado etanol para la extracción, puede ser removido con una corriente suave de nitrógeno, y el residuo redisolto en 1,5 mL de cloroformo. Por último, hay que agregar 100 µL del agente derivatizante y calentar por 30 minutos a 70°C, y desde ahí se puede proceder a analizar directamente [62] Otro posible inconveniente a tener en cuenta son las isomerizaciones y conversiones que pueden ocurrir en medio ácido, por lo que hay que evitar agentes derivatizantes ácidos [63, 64].

Los detectores más utilizados junto a un GC son de ionización por llama y espectrometría de masas, siendo el primero más simple, robusto y no necesita estándares deuterados que pueden no existir o ser de costo muy elevado [65]. Diversos autores [31, 36] afirman que los detectores de ionización por llama y los de línea de diodos (en el caso de cromatografía de líquidos) dan resultados más precisos que la espectrometría de masas, pero no proveen datos que lo respalden. Durante esta búsqueda bibliográfica se encontraron diversos ejemplos en la bibliografía donde sucede lo contrario, pero como muchas veces se comparan muestras con tratamientos distintos, las comparaciones no pueden hacerse de manera sencilla. Un trabajo a futuro debería ser comparar los resultados obtenidos con estos detectores sobre las mismas muestras. Regresando al espectrómetro de masas, hay que mencionar la mayor sensibilidad que posee y la gran capacidad de identificación, ya que incluso permite identificar y cuantificar en casos donde distintos compuestos coeluyen.

Se procede entonces a analizar y comparar estos distintos métodos encontrados en la bibliografía como se puede observar en la tabla 1, donde se presentan varios métodos de GC validados para la cuantificación de cannabinoides.

Tabla 1: Métodos validados de GC para la cuantificación de cannabinoides en muestras vegetales.

Detector	Tratamiento	Analitos	Rango (µg/mL)	R2	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)	RSD	Tiempo	Ref.
FID	EtOH 96%, Ultrasonido o Reflujo	CBD CBG	CBD 1.95–1000 CBG 4.00–5.13	0.9999	0.25 % m/m	0.75 % m/m		30 min	[66]
FID	EtOH 96%, Derivatización: BSTFA+TMS	Δ9-THC, THCA, CBD, CBN, CBDA, Δ8-THC	0.005-10	CBD 0.9905 THC 0.9998	0.006-0.012	0.02-0.03	<16%	10 min	[47]
FID 17A-Shimadzu	Soxhlet Hexano o MeOH, derivatización: BSTFA + TMCS	Δ9-THC, THCA, CBN	-	-	-	-	-	18 min	[50]
FID	Metanol y Derivatización: BSTFA-1% TMCS	Δ9-THC, THCA, CBD, CBN, CBDA, Δ8-THC, CBGA, CBG, CBC	0.1-4.0%	-	0.0003 % m/m	0.001 % m/m	-	12 min	[67]
MS	EtOH 96%, Derivatización: BSTFA+TMS	Δ9-THC, THCA, CBD, CBN, CBDA, Δ8-THC	0.005-10	0.9948	0.003-0.006	0.009-0.02	<28%	10 min	[47]
MS	MeOH-CHCL3 9:1, 20 min, Derivatización: MSTFA-TMCS	Δ9-THC, Δ8-THC, CBC, THCA, CBDA, CBGA, CBG, CBD, THCV	0.00025-25	>0.99	0.002-0.01	0.006-0.03	<10%	7 min	[68]
MS	Hexano, 10 min	Δ9-THC, CBD, CBG, CBN, CBC	-	-	-	-	-	20 min	[69]
MS	Hexano-Isopropanol 9:1, Derivatización: MSTFA-2%TMCS	Δ9-THC, CBD, CBN	0.001-0.05	>0.99	0.0003	0.001	-	21 min	[70]
QTOF Agilent 5973N	SCFE: IPA-Ciclohexano	Δ9-THC, CBD, CBG, CBN, CBDA	1-30	0.991	-	0.1	-	-	[49]

Durante la búsqueda bibliográfica se encontró una gran cantidad de métodos disponibles para la determinación de cannabinoides por GC, como tendencias se observó que la utilización de detectores de Masas da límites de cuantificación significativamente menores que los FID.

GC-FID

La utilización de un detector de **Ionización de Llama** (FID por sus siglas en inglés) es muy frecuente para los análisis de drogas debido al relativo bajo costo del mismo y gran precisión de cuantificación. En un método validado y utilizado por la policía en Suiza [62] logran buenas separaciones con corridas de 8 minutos y para la calibración de Δ 9-THC utilizan CBN como material de referencia, debido a que tienen un factor de correlación de 1,00 y es más resistente a la degradación que el Δ 9-THC. En este método toman 200 mg de muestra seca, le agregan 20 ml de un estándar interno, y proceden a la extracción seguida de descarboxilación o derivatización según sea necesario.

Casiraghi A *et al.* [67] desarrollaron un método donde logran determinar varios CNBs en un rango de 0.1-4.0% con análisis de 12 minutos, realizando el paso de derivatización con BSTFA (N,O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida) y TMCS (Trimetilclorosilano). Como equipo utilizan un Trace 2000 de Thermo Fisher, con una columna capilar de Agilent DB-5MS.

T. Berés *et al.* [47] extraen con Etanol 96%, derivatizan utilizando BSTFA+TMS y con un Agilent GC 7820 logran cuantificar 6 CNBs (Δ 9-THC, THCA, CBD, CBN, CBDA, Δ 8-THC), con límites de cuantificación entre 8 y 20 ng/mL. El tiempo de análisis es de 10 minutos obteniéndose buenas separaciones, como se puede apreciar en la figura 3. En esta figura también se puede apreciar el efecto que tiene un GC en una muestra no derivatizada. Observando la intensidad relativa de cada pico, se puede ver también que la derivatización produce un aumento en la estabilidad de los analitos.

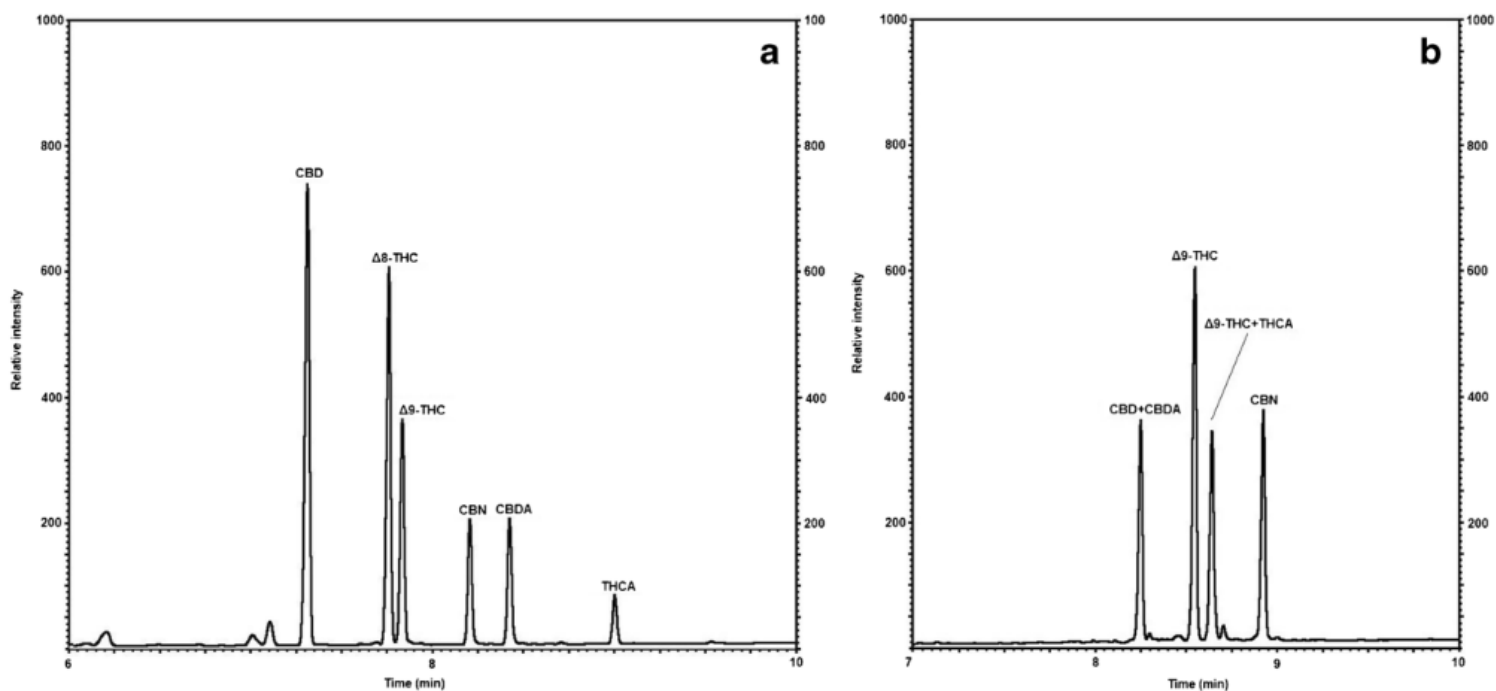


Figura 3: Cromatogramas GC-FID de CNBs derivatizados (a) y sin derivatizar (b).

GC-MS

La utilización de un detector de **Espectrometría de Masas** (MS) permite tener una especificidad excelente, y se puede determinar casi inequívocamente las sustancias analizadas. Este detector es muy útil para mezclas complejas e incluso puede utilizarse para perfilación, es decir, comparar posibles orígenes de las muestras al relacionar los espectros de impurezas obtenidos. El principal inconveniente que tiene es el costo elevado que tienen estos equipos y que según diversos autores se necesitan estándares deuterados para dar una cuantificación válida, los cuales son costosos si es que existen [31, 36, 65].

La UNODC recomienda un método [1] donde logran separaciones en tiempos de 8 minutos. En la tabla 2 se observan las masas y abundancias relativas de sus picos más característicos. Esta información puede utilizarse como referencia para comparar con las muestras de interés. Esta tabla, junto a las figuras 4 y 5, donde se observan los espectros de dos isómeros de THC, demuestra que con este método es posible diferenciar varios de los isómeros de THC que, aunque puedan superponerse en el cromatograma, se diferencian debido a los distintos espectros de masas que generan (abundancias y picos base), por ejemplo el pico base (mayoritario) para el (-)-Δ9-THC es el 299, mientras que para el (-)-Δ8-THC es el 231.

Tabla 2: Masas y abundancias. TMS = Trimetilsilil [1]

Cannabinoide	Masa ion (Normalizada %)
CBD	314 (7), 246 (13), 231 (100), 193 (7), 174 (8), 121 (6)
(6aR,9S)-Δ10-THC TMS	386 (89), 371 (100), 343 (34), 330 (18), 315 (39), 303 (31)
(6aR,9R)-Δ10-THC TMS	386 (92), 371 (100), 343 (31), 330 (19), 315 (44), 303 (32)
(-)-Δ8-THC	314 (81), 299 (9), 271 (37), 258 (38), 243 (5), 231 (100)
(6aR,9R)-Δ10-THC	314 (72), 299 (100), 271 (44), 258 (24), 243 (27), 231 (45)
(-)-Δ9-THC	314 (85), 299 (100), 271 (46), 258 (23), 243 (30), 231 (70)
(-)-Δ9-THC TMS	386 (98), 371 (100), 343 (29), 330 (16), 315 (53), 303 (45)
CBN	310 (11), 295 (100), 251 (4), 238 (13), 223 (4), 165 (3)

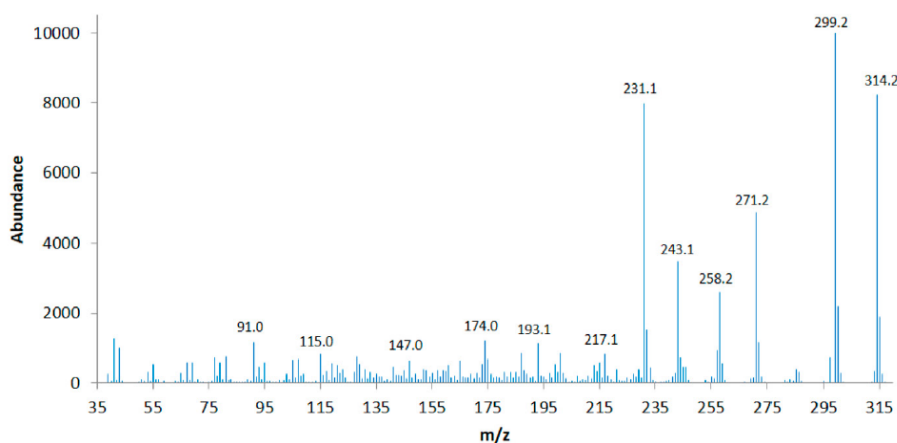


Figura 4: Espectro de Masas de (-)- Δ 9-THC [1].

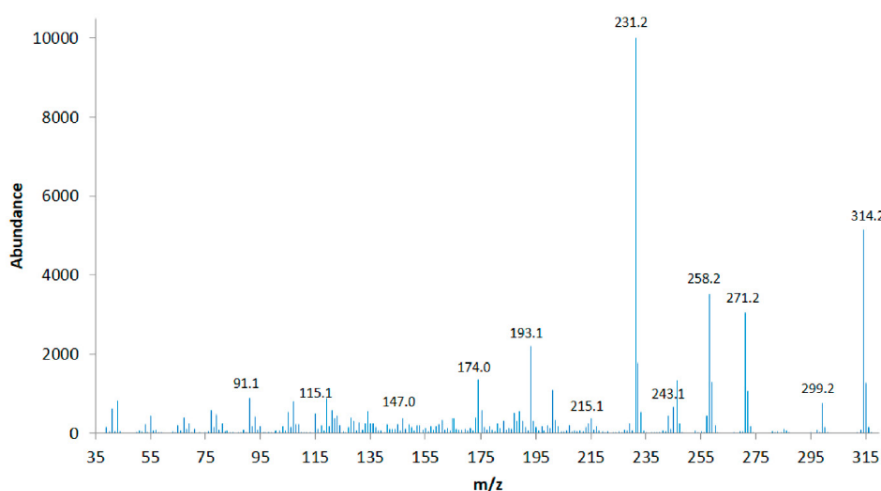


Figura 5: Espectro de Masas de (-)- Δ 8-THC [1].

También existen métodos que combinan los detectores FID y MS mediante la instalación de una unidad de separación con forma de “Y” o incluso métodos que utilizan dos masas en tándem (MS-MS), los cuales permiten obtener mejores resultados, pero con costos de equipo mucho más elevados.

3.2.2.2. Cromatografía de líquidos (LC)

A diferencia de la cromatografía de gases, la **cromatografía de líquidos**, como bien su nombre indica, utiliza solventes líquidos como fase móvil, lo que permite trabajar a temperaturas mucho menores que con GC ya que no requieren volatilización de los analitos [60]. Por este motivo es posible el análisis de sustancias termolábiles, como por ejemplo el THCA, que en esta técnica no requiere derivatización. Si bien se recomienda trabajar en medio ácido para evitar problemas con las señales del THCA (picos anchos o con cola), es necesario controlar que en este medio no haya conversión de CBD a THC [1, 71]. Lamentablemente las ventajas que ofrece la LC se ve enfrentada con los mayores costes de análisis, ya que se requieren solventes ultrapuros de mayor precio que los gases utilizados en GC.

Las fases estacionarias mayormente utilizadas son de fase reversa tal como C18 [72-76]. Los detectores más utilizados en LC para determinar Cannabinoides son el detector de arreglo de diodos (DAD) y el espectrómetro de masas (MS). Como se mencionó anteriormente, diversos autores sostienen que el detector de arreglos de diodos posee mayor precisión que el espectrómetro de masas al analizar CNBs [31, 36], pero no lo justifican con datos.

A continuación, en la tabla 3 procede a comparar distintos métodos encontrados en la bibliografía donde se puede observar que los detectores MS proveen límites de cuantificación menores a los DAD, aunque los DAD suelen ser equipos más sencillos de usar y más robustos.

Tabla 3: Métodos validados de HPLC para la cuantificación de cannabinoides en muestras vegetales.

Detector	Tratamiento	Analitos	Rango (µg/mL)	R2	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)	RSD	Tiempo	Ref.
DAD Waters 2996	MeOH-CHCL3 9:1, 20 min	THCA, Δ9-THC, CBD, CBG, CBN, CBDA, CBGA	0.375-50	>0.9917	0.06	0.188 CBD 0.125 resto	<6%	36 min	[40]
DAD G4212A	Etanol	Δ9-THC, CBD, CBG, CBN, CBDA, CBGA	16-250	1		5-8	<3%	17 min	[72]
DAD	MeOH-CHCL3 9:1, 30 min	Δ9-THC, CBD, CBG, CBN, CBGA, Δ8-THC	0.25-50.0	>0.995	0.0625	0.25	<5,5%	10 min	[77]
DAD Waters 2998	Etanol, 15 min	Δ9-THC, CBD, THCA, CBN	40 - 110	0.997	4.54	15	3,12%	5 min	[78]
QTOF o QqQ Agilent 6430	SCFE: CO2-EtOH	Δ9-THC, CBD, CBG, CBN, CBGA	0.0005-2	>0.999	0.00002	0.0002 (CBD y THCA) 0.00005 (Δ9-THC y CBN), 0.00002 (CBG)	<10%	28 min	[48]
UV/MS/HRMS	SL con Aceite de Oliva o Etanol, SCFE CO2	Δ9-THC, THCA, CBD, CBN, CBDA	0.0005-0.05	>0.998	0.00025	0.0005	<10%	10 min	[73]
QQQ-DAD	Metanol	16, entre ellos Δ9-THC, THCA, CBD, CBG, CBN, CBDA, CBC	0.1-5 neutros 0.25-10 ácidos	>0.99	0.1	0.08-0.71	<5%	8 min	[80]
DAD 3000RS	MeOH-CHCL3 9:1, 20 min	Δ9-THC, THCA, CBD, CBN, CBDA	1-100 neutros 10-500 ácidos	>0.9981	0.5	1 neutros 10 ácidos	<5%	13 min	[24]
DAD Waters 2996	MeOH-Hexano 9:1, 20 min	Δ9-THC, CBN, CBD, THCA	1-1000 neutros 10-500 THCA	>0.9991	0.001 neutros 4 ácido	0.006 neutros 0.017 THCA	<4.3%	18 min	[81]
UHPLC-MS/MS	EtOH 96%	Δ9-THC, THCA, CBD, CBN, CBDA, Δ8-THC	0.005-10	>0.997	0.0085	0.026	<13%	12,5 min	[47]
MS/MS TSQ Cuantiva	MeOH-H2O 8:2	17, entre ellos Δ9-THC, THCA, CBD, CBG, CBN, CBDA, CBC	0.01-10	>0.99		0.01	<12%	21 min	[84]

LC-DAD

El **Detector de Arreglo de Diodos** (DAD o PDA) es un detector común en equipos LC que se basa en mediciones espectrofotométricas para determinar las concentraciones de los analitos. Es de costo bajo, alta precisión y muy universal, pero la especificidad es menor que con un detector de masas, y en este caso, como con el FID, es necesario asegurar la correcta separación de los analitos.

Un método que permite analizar CBD, CBC, CBN, THC, THCA y CBDA; e incluso separar el $\Delta 9$ -THC y $\Delta 8$ -THC es el utilizado en Suiza y presentado por R. Brenneisen [82, 83]. El orden de elución para los compuestos de interés es CBD, CBN, THC y THCA. En las figuras 6 y 7 se muestran los cromatogramas obtenidos donde se observa que las separaciones son muy buenas, y que permite la separación, identificación y cuantificación de muchos compuestos cannabinoides. Ambos métodos se realizaron con en un Shimadzu Shim-pack XR-ODS II, 3.0 mm ID x 75 mm, 2.2 μ m, a 50°C, y como fases móviles se utilizaron ácido fosfórico en agua y ácido fosfórico en metanol, midiendo a 220 nm. En la Figura 6 se utiliza un método de 13 minutos, y en la Figura 7 uno de 29 minutos que permite la separación adicional de CBD y CBG.

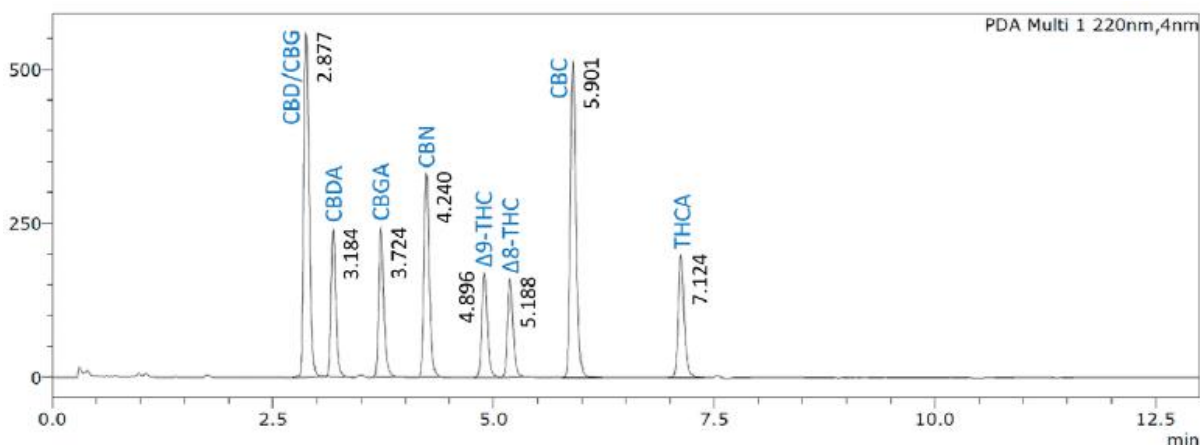


Figura 6: Cromatograma LC-DAD 1 [1]

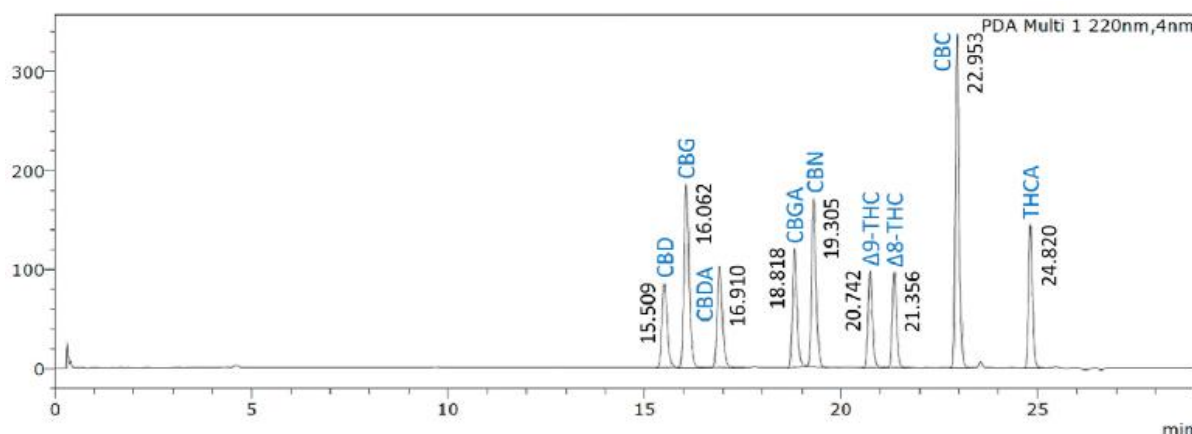


Figura 7: Cromatograma LC-DAD 2 [1]

M. Hädener *et al.* [24] desarrollaron un método de LC-DAD que permite la determinación de concentraciones de CNBs entre 0,04% y 4,00% en tiempos de 13 minutos, límites de detección (LOD) de 0,3 µg/mL y límites de cuantificación (LOQ) de 1 µg/mL con desviaciones estándar relativas (RSD) menores al 1%.

LC-MS

Como en el caso de la cromatografía de gases, también es posible acoplar un equipo de LC con un detector de masas, e incluso con dos en tándem, obteniéndose una técnica con selectividad y sensibilidad muy altas.

Un método interesante es el presentado por J. Tran *et al.* [89], donde luego de congelar, moler y extraer con metanol (recuperaciones del 97-110%) utilizan un HPLC Agilent 1290 Infinity II junto al DAD y acoplado a un triple cuadrupolo 6460. Obtienen un rango lineal entre 0,1 y 10 µg/mL para la mayoría de CNBs neutros, y valores cercanos pero variables para los ácidos, teniendo todas las curvas buenos coeficientes de correlación (>0,99). El LOD obtenido es de 0,1 µg/mL y LOQ de 0,08 a 0,71 µg/mL, dependiendo el CNBs. Por lo que es un método sencillo, rápido (8 minutos de análisis) y con buenos resultados.

McRae y J.E. Melanson [84] desarrollaron un método de LC-MS/MS que permite la cuantificación de muestras con una concentración entre 0,0002 a 20%, repetibilidad entre 1,5 y 12,4% en 21 minutos y un LOQ de 10 ng/mL. El equipo utilizado es un UPLC Agilent 1290 Infinity I con una columna C18-Amide de 3 µm y la fase móvil compuesta por Agua-ácido fórmico (100:0,1) y Acetonitrilo-ácido

fórmico (100:0,1), aplicando un gradiente de acetonitrilo en aumento. El MS utilizado es un TSQ Quantiva triple cuadrupolo de Thermo Fisher, equipado con un ionizador de electrospray (ESI) operando en modo positivo. En la figura 8 se puede observar el cromatograma que obtienen al inyectar un estándar de calibración, observándose en general una buena separación de los analitos de interés. Si bien también se observa coelución, esto no siempre es un problema al utilizar una técnica de MS.

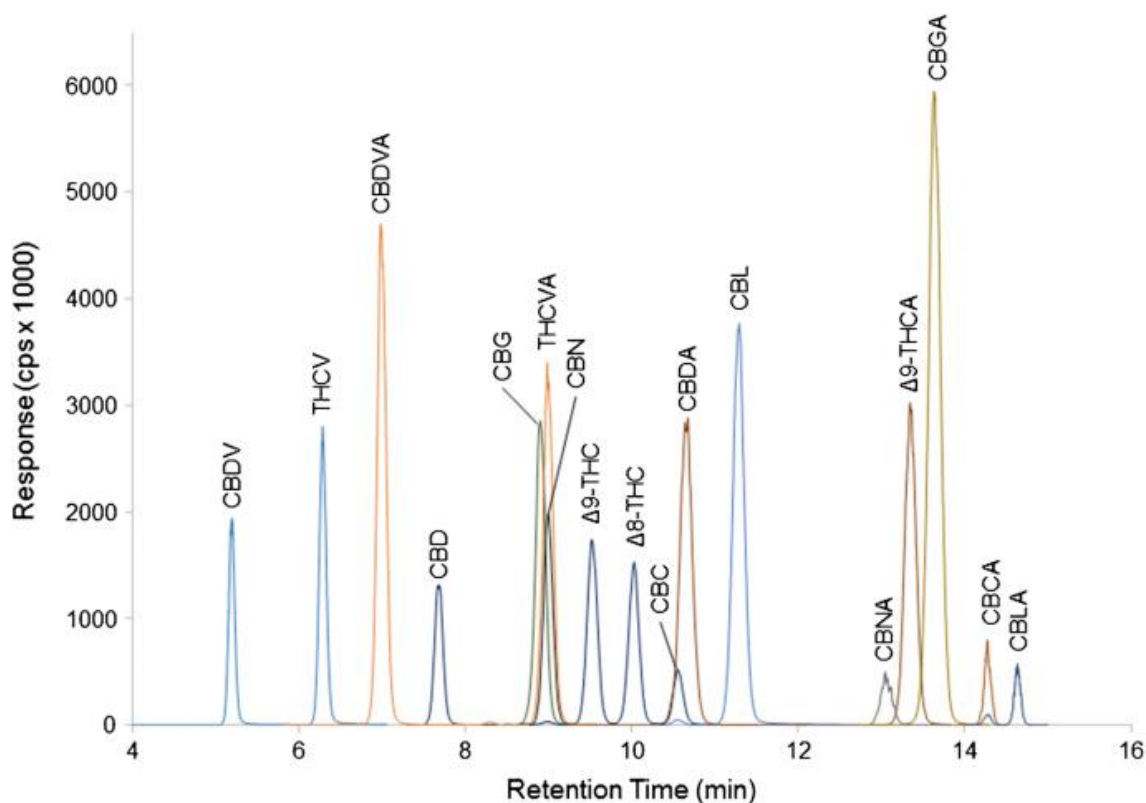


Figura 8: Cromatograma de un estándar de calibración con concentraciones de 1 $\mu\text{g/mL}$ para cada analito. LC-MS/MS [84]

Como bien se puede observar, existe una gran variedad de métodos de cromatografía de líquidos y cromatografía de gases para analizar cannabinoides en muestras herbales. Dependiendo de las disponibilidades de los laboratorios se puede intentar transferir un método, el cual debe, por supuesto, siempre ser validado.

Otras técnicas cromatográficas: Cromatografía de Fluidos Supercríticos (SFC)

Si se desean reducir aun más los tiempos de análisis y disminuir el uso de solventes tóxicos se puede utilizar la cromatografía de fluidos supercríticos (SFC), donde utilizan dióxido de carbono en estado supercrítico como fase móvil. Como es una técnica relativamente nueva (se aplicó por primera vez al análisis de CNBs en 1997 [85] no se encuentra tan desarrollada como GC y LC, pero es muy utilizada para las separaciones enantioselectivas de algunos CNBs como demuestra Mazzocanti *et al.* [10]. Wang *et al.* [86] desarrollaron un método ortogonal (en orden de elución) con respecto a los métodos LC de fase reversa donde analizan 30 CNBs (CBD, Δ 8-THC, THCV, Δ 9-THC, CBN, CBG, THCA-A, CBDA, y CBGA) mediante UHPSFC/PDA-MS, obteniendo LODs entre 1 y 3 μ g/mL y LOQs entre 5 y 10 μ g/mL y un rango lineal entre 5 y 1000 μ g/mL. Las cuantificaciones obtenidas al analizar muestras reales y compararlas con un método LC dieron dentro 13%, valor comparable con los RSD que suelen haber en un mismo método. Cabe destacar que SFC suele tener mejor selectividad que LC, pero menores sensibilidades, debido a la variación en el índice de refracción del dióxido de carbono, que resulta en ruidos mayores en las líneas de base [87]. En conclusión, SFC es una alternativa muy útil al LC debido a su ortogonalidad y versatilidad a la hora de utilizar solventes como modificadores de la fase móvil, y es posible que en el futuro sea la técnica principal de análisis de CNBs en lugar de GC y LC.

3.2.2.3 Estudio comparativo entre las técnicas y métodos de cromatografía de gases y líquidos

Teniendo en cuenta todo lo mencionado anteriormente, es evidente que la utilización de la técnica de cromatografía de líquidos es más recomendada que la cromatografía de gases, esto se debe a que no existe el problema de descarboxilación de los cannabinoides ácidos. Si bien la cromatografía de gases tiene la ventaja que los análisis tienen un costo menor debido a que no utiliza solventes ultrapuros, hay que tener en cuenta que, si se necesita derivatizar, los reactivos utilizados tienen un coste adicional.

Comparación de Detectores FID(GC)-MS-DAD(LC)

Tanto el FID como el DAD tienen una comparación similar con el MS. Muchos autores mencionan que tanto el FID como el DAD producen resultados cuantitativos más certeros [31, 36], pero el MS tiene las ventajas de ser más sensible y específico ya que no necesita una separación perfecta, por lo que puede servir para analizar incluso isómeros que coeluyan [48]. Si se compara costos, un equipo de masas es mucho más caro de comprar y mantener que los detectores FID y DAD, y además requiere patrones deuterados para poder evitar el efecto matriz y poder cuantificar [65].

Una última comparación útil entre los detectores son los límites de detección y/o cuantificación, que se resume en:

Límite de cuantificación FID: 1 µg/ml [72, 88, 89], 10 ng/mL [42, 47].

Límite de cuantificación MS: 1 ng/ml [48, 70],

Límite de cuantificación DAD: 1 µg/ml [24, 72, 73]

Si la preparación de la muestra es correcta, estos valores son más que suficientes para analizar sustancias que se encuentran en el límite legal.

En general los límites observados son mejores para el MS, sin embargo un DAD logra obtener resultados que también son válidos a la hora de analizar CNBs en laboratorios forenses.

Comparación de métodos

Comparar todos los métodos presentados es una tarea complicada, debido a que la gran variedad de condiciones y tratamientos producen resultados distintos que no pueden ser comparados de manera directa. Sin embargo, T. Béres *et al.* [47] realizan una comparación de métodos UHPLC-MS/MS, GC-MS y GC-FID, donde utilizan prácticamente los mismos pretratamientos. En este trabajo concluyen que, si bien los tres métodos dan resultados comparables, el GC-MS es el de mejor robustez, versatilidad y precisión.

Otro método sencillo y con buenos resultados es el que utiliza QQQ-DAD con análisis cortos (8 minutos) y permiten cuantificar 16 CNBs, necesitando solo un paso previo de molienda y extracción con etanol [80].

3.2.3. Otras técnicas

3.2.3.1. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La técnica de **Resonancia Magnética Nuclear (RMN)** es muy utilizada en química orgánica debido a su alto poder de identificación y es aplicable a análisis forenses de drogas, obteniéndose muy buena información cualitativa y cuantitativa de manera ortogonal a los análisis de GC o LC [42]. La cuantificación mediante RMN es especialmente útil, ya que, a diferencia de la mayoría de las técnicas, no se necesitan patrones de referencia, los cuales pueden ser difíciles de conseguir. Esto es debido a que utiliza la relación de las áreas dentro de la muestra en vez de una calibración señal-concentración. Otra ventaja adicional es que se obtiene un perfil global de la muestra, que permite analizar no solo la pureza, sino también la identidad de las impurezas y este perfil global posibilita la comparación con el objetivo de perfilado, es decir, determinar una posible relación y origen común de diferentes muestras. Para casos de muestras complejas, es beneficiosa la utilización de espectroscopía de orden difusional (DOSY), una técnica 2D que permite la separación de los espectros de cada componente de acuerdo a su coeficiente de difusión y facilita el análisis de mezclas de analitos.

Lamentablemente, las grandes desventajas de esta técnica son el gran costo de compra y mantenimiento de los equipos, y la necesidad de personal altamente capacitado. Otra desventaja que puede presentar es la superposición de señales en muestras complejas, pero se soluciona tomando alguna una señal de interés que no tenga superposición o como se mencionó antes con un DOSY.

Los espectros ¹H-RMN de los cannabinoides más comunes pueden encontrarse en la Figura 9, seguido de un espectro de un aceite de semilla de cáñamo enriquecido con CBD (Figura 10) [90].

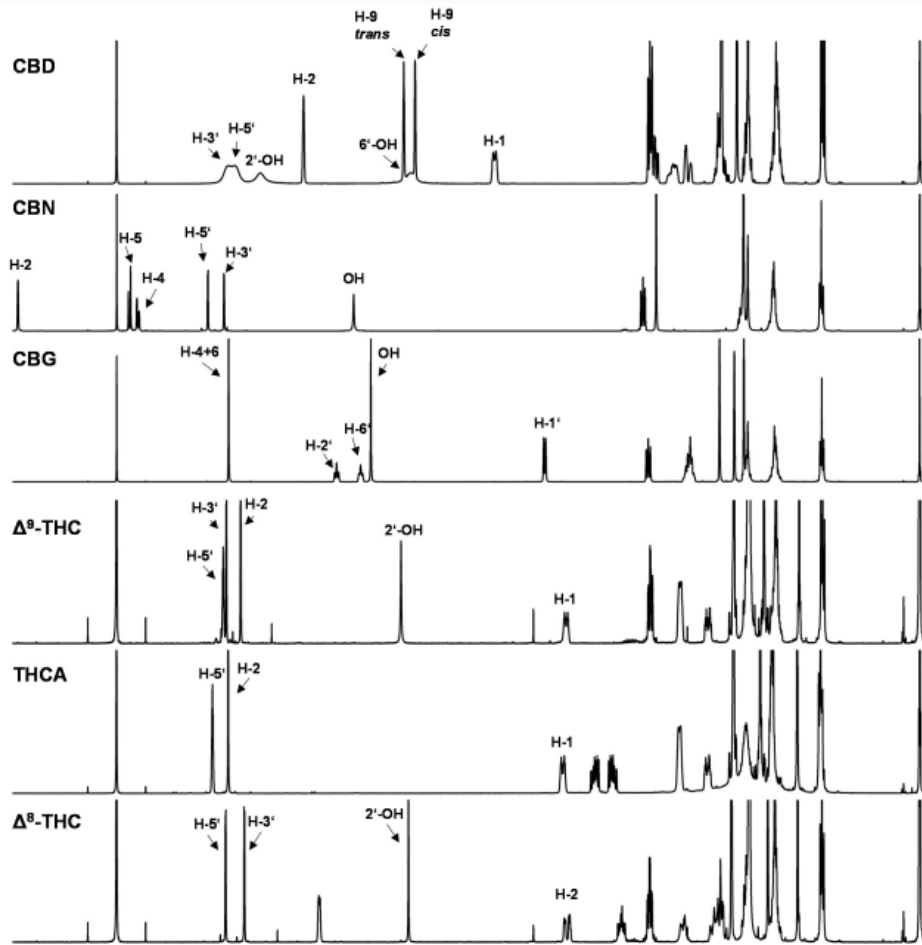


Figura 9: Espectro 1H-RMN de los Cannabinoides más comunes [90].

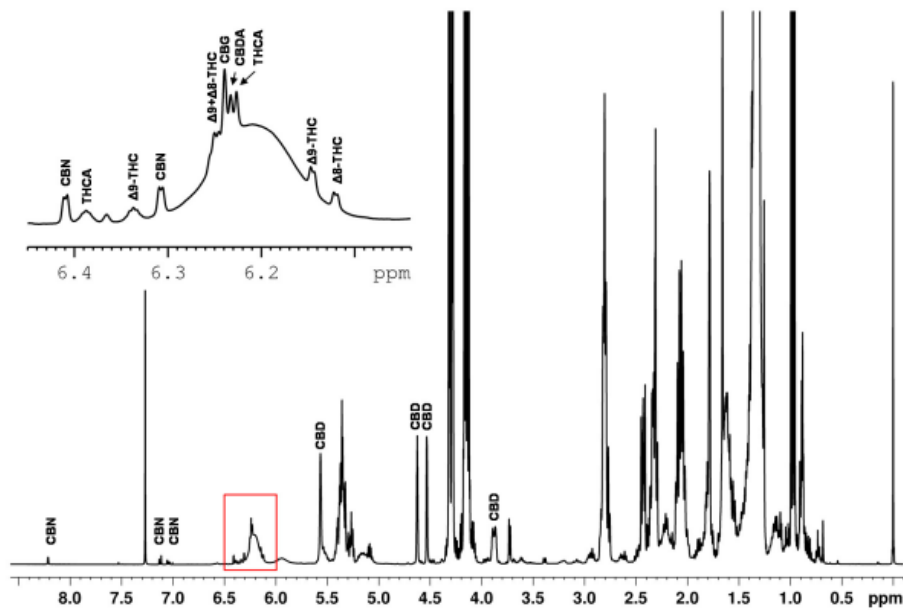


Figura 10: Espectro 1H-RMN de un aceite de semilla de cáñamo enriquecido con CBD [90].

Existe bastante bibliografía al respecto [42, 43, 91, 92]. En el trabajo presentado por A. Hazekamp *et al.* [42], presentan un método sin la necesidad de pretratar la muestra, 5 min de análisis y mencionan la utilidad de las señales a desplazamientos (δ) entre 4 y 7 y recomiendan que pico de hidrógeno utilizar para cada CNB. Si bien en el estudio realizan una curva de calibración con antraceno como estándar, mencionan que esto no es necesario para cuantificar, ya que como se explicó anteriormente se puede relacionar las integraciones de cada compuesto. Los resultados de la calibración se pueden observar en la tabla 4. Y en la Figura 11 se observan los espectros obtenidos.

Tabla 4: Método de cuantificación por $^1\text{H-RMN}$ [42]

CNBs	Rango (mg/mL)	Señal	δ ppm
CBN	0.1-1.0	H-4	6.44
THCA	0.2-4.0	H-4/H-10	6.39/6.24
THC	0.1-1.0	H-2	6.14
CBDA	0.2-4.0	H-4/H-10	6.26/5.55
CBD	0.2-4.0	H-10	5.57

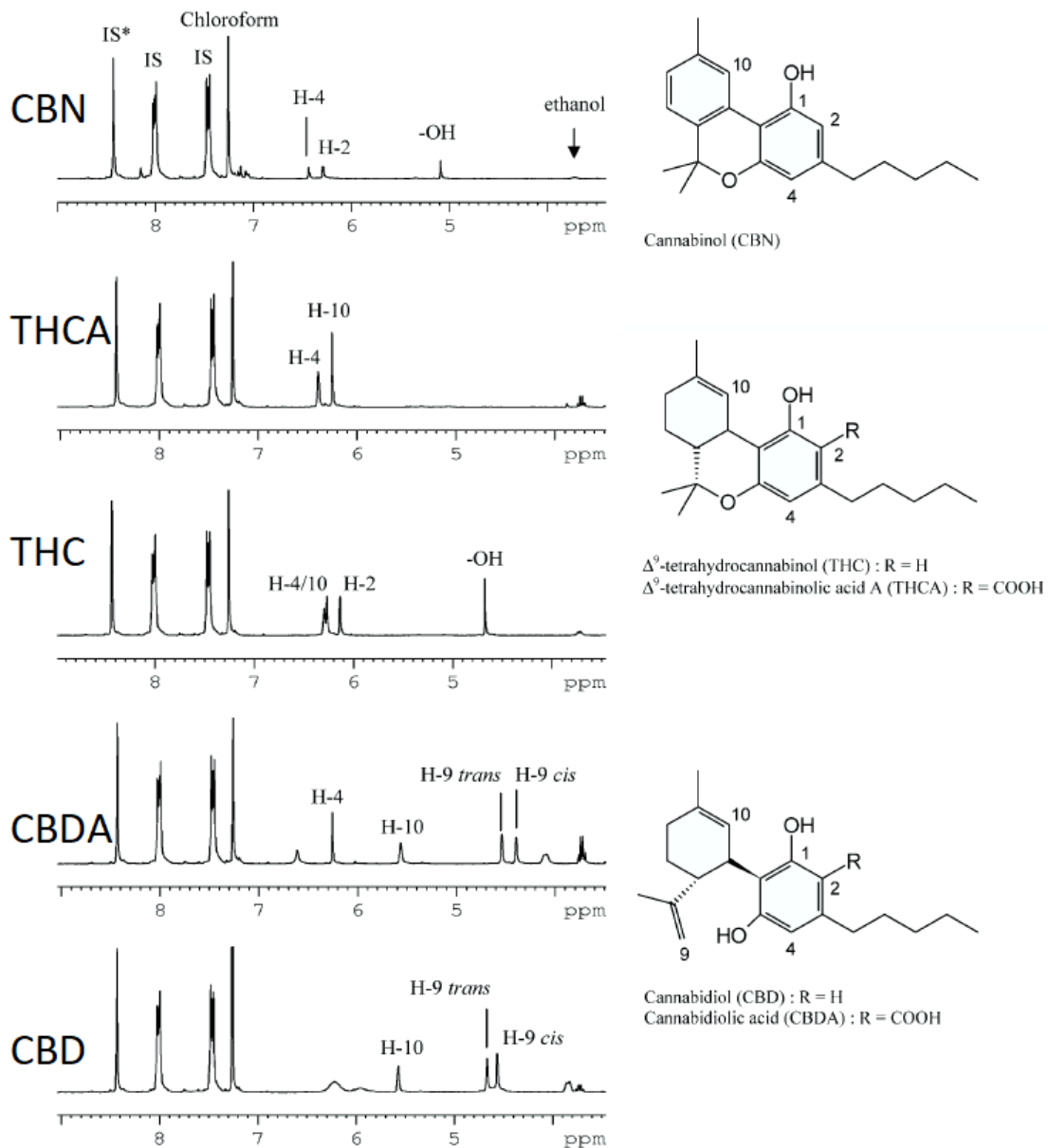


Figura 11: Espectros RMN de los CNBs junto al patrón utilizado (IS=Antraceno, IS* fue la señal utilizada para la calibración) [42]

Por último, comparan los resultados de analizar THCA en muestras reales por RMN con los de GC y se obtienen valores muy similares (179 ± 10 mg/g y 198 ± 3 mg/g), demostrando que los resultados obtenidos son válidos y comparables con las técnicas comúnmente utilizadas.

3.2.3.2. Espectrometría de Movilidad Iónica

La técnica de **Espectrometría de Movilidad Iónica (IMS)** es utilizada para separar moléculas ionizadas con una alta sensibilidad, y sus principales usos son para drogas, explosivos y armas químicas. Las ventajas principales de esta técnica son la rápida velocidad de separación (milisegundos), la portabilidad de muchos equipos, y la posibilidad de acoplarse a otras técnicas como cromatografías o espectrometría de masas. Mediante esta técnica es posible obtener cuantificaciones equivalentes a los métodos de LC, aunque la necesidad de estándares deuterados para la calibración puede suponer un problema importante. M. Hädener *et al.* [93], validaron un método donde logran resolver y cuantificar los cuatro cannabinoides de mayor interés: THC, THCA, CBD y CBDA; como se pueden observar en la Figura 12.

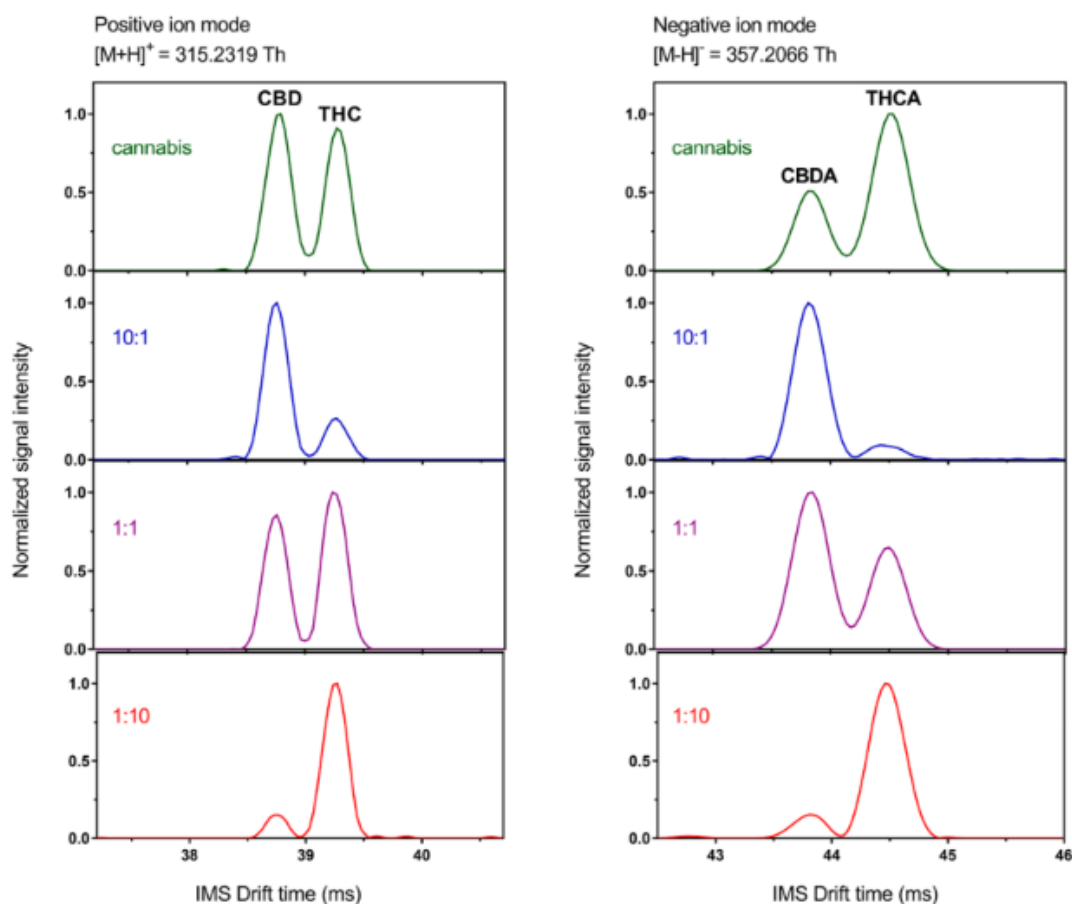


Figura 12: Espectros de movilidad iónica de cannabis y soluciones estándar. [93]

En el estudio mencionan la posibilidad de utilizar las constantes de movilidad reducida (K_0) y las secciones de colisión ($^{DT}CCS_{N_2}$) obtenidas como valores de referencia, obteniendo resultados con desviaciones estándares mucho menor que 0.1% en reproducibilidad.

Si bien en el trabajo identifican por análisis con un detector de masas, mencionan la posibilidad de identificar solo con IMS, donde aunque se observa un deterioro de la señal debido al aumento de fondo, las señales de los diferentes cannabinoides son detectables y diferenciables, (menos de 5% de desviación con la relación determinada por IMS-MS). Una investigación más profunda es necesaria para dar un mejor análisis de las limitaciones.

3.2.3.3. Espectroscopia Infrarroja y Raman

Sin entrar mucho en detalle sobre los funcionamientos de cada técnica, es importante mencionar la utilidad de la espectroscopia infrarroja (IR) y Raman como alternativas a las técnicas analíticas convencionales, ya que permiten análisis rápidos con la posibilidad de realizarse directamente en el campo, siendo sencillos y sin necesidad de personal calificado. Otra ventaja muy importante es que son técnicas no destructivas, donde no se necesita extraer o transformar las muestras. El paso limitante es la creación de bibliotecas para comparar los espectros obtenidos [94]. Un modelo de IR desarrollado y validado con buena sensibilidad y especificidad es presentado por F. Coppey et al. [95], el que permite diferenciar muestras legales e ilegales de Cannabis. Sanchez et al. [96] desarrollaron un método para diferenciar el cáñamo del cannabis herbal.

Hay que mencionar que estas técnicas son notablemente menos sensibles que las MS/DAD/FID, por lo que también tienen sus limitaciones.

3.2.4. Comparación general técnicas presentadas

Como final del trabajo se comparan los factores más importantes al elegir una técnica a utilizar, siendo estos: Sensibilidad, costo, tiempo de preparación y análisis, complejidad y ecología. La tabla 5 presenta esta comparación:

Tabla 5: Comparación de los factores importantes de las técnicas presentadas

Técnica	Sensibilidad	Costo	Tiempo	Complejidad	Ecológico
GC-FID	+++	+	+++	++	-
GC-MS	+++++	+++	+++	++	-
LC-DAD	+++	++	++	+++	- -
LC-MS	+++++	++++	++	+++	- -
RMN	++	+++++	+	++++	-
IMS	+++	+	+	+++	-
IR / Raman	+	+	+	+	

El detector de MS resulta ser la técnica más sensible a la hora de cuantificar y detectar CNBs, pero los equipos suelen ser costosos y necesitar mantenimiento. En este aspecto el RMN es el más caro, pero da resultados rápidos, y prácticamente sin necesidad de tratar previamente las muestras, aunque a veces los resultados requieran la utilización de algoritmos. La técnica de GC es la que más preparación de muestra suele necesitar debido al problema de estabilidad de los compuestos analizados, mientras que para LC y RMN no existen estos problemas. Por último, también nos parece importante mencionar que las técnicas de LC son menos ecológicas debido a que necesitan grandes cantidades de solventes. Tanto el IR, IMS y Raman tienen la gran ventaja de la portabilidad de sus equipos y la sencillez de los análisis, lo que permiten utilizar estas técnicas en los análisis de campo, como por ejemplo controles policiales.

4- Conclusiones

Como conclusiones, es importante remarcar la existencia de diversos métodos analíticos para la determinación de cannabinoides, cada uno con distintas ventajas y desventajas que permiten tener diferentes métodos alternativos de análisis en casos de encontrar problemas con una técnica utilizada o con la disponibilidad de equipos.

Teniendo en cuenta todo lo mencionado en el trabajo, el autor recomienda la utilización de cromatografía de líquidos con el fin de evitar reacciones indeseadas y acoplar un detector de acuerdo con las disponibilidades y necesidades. Considero que con los detectores la necesidad de utilizar uno en especial no es tan marcada como con las técnicas cromatográficas, en las cuales la de gases tiene una desventaja muy notoria. Existen casos en los cuales con un DAD será suficiente para detectar y cuantificar un cannabinoide, pero también existirán casos donde un MS es necesario debido a coeluciones y en general dan identificaciones inequívocas.

Por último, si se desea analizar posibles drogas nuevas o comparar la procedencia de dos muestras, la técnica de RMN es de gran utilidad, si se posee un equipo a disposición.

5- Perspectivas de futuro

- Nuevos Cannabinoides: Existen cerca de 550 compuestos identificados en cannabis, de los cuales a muy pocos se le conocen las propiedades y aplicaciones. Es casi seguro que en el futuro aparecerán nuevos descubrimientos que produzcan la necesidad de cambiar las técnicas utilizadas para poder determinar estos nuevos compuestos.
- Tolerancia: Como se mencionó anteriormente, diversos autores cuestionan el valor de tolerancia de 0,03% del valor legal, recomendando valores entre 11 y 15%. Esto es algo que se debería continuar investigando, ya que, si se toman valores de tolerancia menores a los reales, se penaliza muestras que no deberían serlo.
- El desarrollo de nuevos métodos de identificación y cuantificación de drogas de abuso es un campo en constante desarrollo debido a la constante evolución de las drogas y técnicas utilizadas para el narcotráfico.
- Desarrollar un estudio en profundidad con el mismo método donde se puedan comparar los distintos detectores, pudiendo así analizar las diferencias en las cifras de mérito obtenidas.

6- Bibliografía

- [1] UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME, “**Recommended Methods for the Identification and Analysis of Cannabis and Cannabis Products**”, Vienna 2022.
- [2] EMCDDA, **European Drug Report, Trends and Developments**, 2022
- [3] B.S. Koppel, J.C.M. Brust, T. Fife, J. Bronstein, S. Yousof, G. Gronseth, D. Gloss, **Systematic review: efficacy and safety of medical marijuana in selected neurologic disorders: report of the Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology**, *Neurology* 82 (2014) 1556–1563, <http://dx.doi.org/10.1212/WNL.0000000000000363>.
- [4] L.M. Borgelt, K.L. Franson, A.M. Nussbaum, G.S. Wang, **The pharmacologic and clinical effects of medical cannabis**, *Pharmacotherapy* 33 (2013) 195–209, <http://dx.doi.org/10.1002/phar.1187>.
- [5] D.R. Blake, P. Robson, M. Ho, R.W. Jubb, C.S. McCabe, **Preliminary assessment of the efficacy, tolerability and safety of a cannabis-based medicine (Sativex) in the treatment of pain caused by rheumatoid arthritis**, *Rheumatology* 45 (2006) 50–52, <http://dx.doi.org/10.1093/rheumatology/kei183>.
- [6] P.F. Whiting, R.F. Wolff, S. Deshpande, M. Di Nisio, S. Duffy, A.V. Hernandez, J.C. Keurentjes, S. Lang, K. Misso, S. Ryder, S. Schmidkofer, M. Westwood, J. Kleijnen, **Cannabinoids for medical use a systematic review and meta-analysis**, *JAMA* 313 (2015) 2456, <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2015.6358>.
- [7] E.P. Baron, **Comprehensive review of medicinal marijuana, cannabinoids, and therapeutic implications in medicine and headache: what a long strange trip it’s been**, *Headache* (2000) 885–916. <https://doi.org/10.1111/head.12570>
- [8] E.B. Russo, **Cannabinoids in the management of difficult to treat pain**, *Ther. Clin. Risk Manag.* 4 (2008) 245–259. DOI: 10.3238/arztebl.2012.0495
- [9] F. Grotenhermen, K. Müller-Vahl, **Das therapeutische potenzial von cannabis und cannabinoiden**, *Dtsch. Arztebl. Int.* 109 (2012) 495–501, <http://dx.doi.org/10.3238/arztebl.2012.0495>.
- [10] G. Mazzocanti, O.H. Ismail, I. D’Acquarica, C. Villani, C. Manzo, M. Wilcox, A. Cavazzini, F. Gasparini, **Cannabis through the looking glass: chemo- and enantio-selective separation of phytocannabinoids by enantioselective ultra high performance supercritical fluid chromatography**, *Chem. Commun.* 53 (2017) 12262e12265. DOI <https://doi.org/10.1039/C7CC06999E>
- [11] B. Costa, **On the pharmacological properties of Delta9 tetrahydrocannabinol (THC)**, *Chem. Biodivers.* 4 (2007) 1664–1677, doi: <http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.200790146>.
- [12] D. Freeman, G. Dunn, R.M. Murray, N. Evans, R. Lister, A. Antley, M. Slater, B. Godlewska, R. Cornish, J. Williams, M. Di Simplicio, A. Igoumenou, R. Brenneisen, E.M. Tunbridge, P.J. Harrison, C.J. Harmer, P. Cowen, P.D. Morrison, **How cannabis causes paranoia: using the intravenous administration of 9-tetrahydrocannabinol (THC) to identify key cognitive mechanisms leading to paranoia**, *Schizophr. Bull.* 41 (2015) 391–399, doi:<http://dx.doi.org/10.1093/schbul/sbu098>.
- [13] P.D. Morrison, V. Zois, D.A. McKeown, T.D. Lee, D.W. Holt, J.F. Powell, S. Kapur, R. M. Murray, **The acute effects of synthetic intravenous Delta9-tetrahydrocannabinol on psychosis, mood and cognitive functioning**, *Psychol. Med. (Paris)* 39 (2009) 1607–1616, doi:<http://dx.doi.org/10.1017/S0033291709005522>.
- [14] T.P. Freeman, A.R. Winstock, **Examining the profile of high-potency cannabis and its association with severity of cannabis dependence**, *Psychol. Med.* 45 (2015) 3181–3189, doi:<http://dx.doi.org/10.1017/S0033291715001178>.

- [15] A. Ohlsson, J.E. Lindgren, A. Wahlen, S. Agurell, L.E. Hollister, H.K. Gillespie, **Plasma delta-9 tetrahydrocannabinol concentrations and clinical effects after oral and intravenous administration and smoking**, Clin. Pharmacol. Ther. 28 (1980) 409–416, doi:<http://dx.doi.org/10.1038/clpt.1980.181>.
- [16] K. Iffland, F. Grotenhermen, **An update on safety and side effects of cannabidiol: a review of clinical data and relevant animal studies**, Cannabis Cannabinoid Res. 2 (2017) 139–154, doi:<http://dx.doi.org/10.1089/can.2016.0034>.
- [17] S. Pisanti, A.M. Malfitano, E. Ciaglia, A. Lamberti, R. Ranieri, G. Cuomo, M. Abate, G. Faggiana, M.C. Proto, D. Fiore, C. Laezza, M. Bifulco, **Cannabidiol: state of the art and new challenges for therapeutic applications**, Pharmacol. Ther. 175 (2017) 133–150, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.041>
- [18] D.J. Potter, K. Hammond, S. Tuffnell, C. Walker, M. Di Forti, **Potency of Delta(9)-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids in cannabis in England in 2016: implications for public health and pharmacology**, Drug Test. Anal. 10 (2018) 628–635, doi:<http://dx.doi.org/10.1002/dta.2368>.
- [19] Swiss Federal Office of Public Health, 2020. **THC Statistics**, Acceso: 18 de Julio, 2022. https://sgrm.ch/inhalte/Forensische-Chemie-und-Toxikologie/Fachgruppe_Chemie/Statistiken/THC/THC_2020_Neu.pdf
- [20] M. Taschwer, M. G. Schmid, **Determination of the relative percentage distribution of THCA and D9-THC in herbal cannabis seized in Austria – 42emperatu different storage 42emperaturas on stability**, Forensic Science International 254 (2015) 167–171, <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.07.019>
- [21] E.R. Service, **Industrial Hemp in the United States: Status and Market Potential**. www.ers.usda.gov/publications/pub-details/?pubid=41757 Acceso, 15 de Agosto 2022.
- [22] M. Wang, Y.H. Wang, B. Avula, M.M. Radwan, A.S. Wanas, J. van Antwerp, J.F. Parcher, M.A. ElSohly, I.A. Khan, **Decarboxylation study of acidic cannabinoids: a novel approach using ultra-high-performance supercritical fluid chromatography/photodiode array-mass spectrometry**, Cannabis Cannabinoid Res. 1 (2016) 262–271, doi:<http://dx.doi.org/10.1089/can.2016.0020>.
- [23] L.O. Hanus, S.M. Meyer, E. Munoz, O. Tagliatalata-Scafati, G. Appendino, **Phytocannabinoids: a unified critical inventory**, Nat. Prod. Rep. 33 (2016) 1357–1392, doi:<http://dx.doi.org/10.1039/C6NP00074F>.
- [24] Marianne Hädener, Stefan König, Wolfgang Weinmann, **“Quantitative determination of CBD and THC and their acid precursors in confiscated cannabis samples by HPLC-DAD”**, Forensic Science International 299 (2019) 142–150.
- [25] O. Zoller, P. Rhy, and B. Zimmerli, Journal of Chromatography A, vol. 872, no. 1, 101–110, 2000, doi: 10.1016/S0021-9673(99)01287-X.
- [26] Ministerio de Sanidad, España, **Plan Nacional sobre Drogas**, Acceso: 10 de Junio 2022. <https://pnsd.sanidad.gob.es/ciudadanos/legislacion/delitos/home.htm>
[Portal Plan Nacional sobre Drogas - Cannabis \(sanidad.gob.es\)](https://pnsd.sanidad.gob.es/ciudadanos/legislacion/delitos/home.htm)
- [27] REGLAMENTO (UE) 2021/2115 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 2 de diciembre de 2021
- [28] Sgrò, S., Lavezzi, B., Caprari, C. *et al.* **Delta9-THC determination by the EU official method: evaluation of measurement uncertainty and compliance assessment of hemp samples**. Anal Bioanal Chem 413, (2021), 3399–3410. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03283-x>
- [29] L. Hanuš, D. Šubova, **The amount of main cannabinoid substances in hemp, cultivated for industrial fibre production and their changes in the course of one vegetation period**, Acta Univ. Palacki. Olomuc. Fac. Med. 122 (1989) 11–23.

- [30] B. Fernandez, E., Peterseil, V., Hackl, G., Menges, S., de Meijer, E. and Staginuss, C. **Distribution of Chemical Phenotypes (Chemotypes) in European Agricultural Hemp (*Cannabis sativa* L.) Cultivars.** *J Forensic Sci*, 65: (2020), 715-721. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.14242>
- [31] Riccardo Deidda, Amandine Dispas, Charlotte De Bleye, Philippe Hubert, Éric Ziemons, **Critical review on recent trends in cannabinoid determination on cannabis herbal samples: From chromatographic to vibrational spectroscopic techniques,** *Analytica Chimica Acta*, Volume 1209, 2022, 339184, ISSN 0003-2670, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339184>.
- [32] Drugs Working Group of the European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI) and UNODC, **“Guidelines on representative sampling (ST/NAR/38)”**. (2009). www.unodc.org/unodc/en/scientists/guidelines-on-representative-drug-sampling_new.html
- [33] European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI), **“Guidelines on Sampling of Illicit Drugs for Quantitative Analysis”**. (2016). http://enfsi.eu/wp-content/uploads/2016/09/guidelines_quant_sampling_dwg_printing_vf4.pdf
- [34] A. Beadle, **Testing the Water: The Top Techniques for Moisture Content Analysis In Cannabis.** <https://www.analyticalcannabis.com/articles/testing-the-water-the-top-techniques-for-moisture-content-analysis-in-cannabis-311811> (Acceso 22 de Agosto, 2022).
- [35] Anita Piper, **Determination of Water in Cannabis & Hemp by Karl Fischer Titration,** <https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/technical-documents/protocol/analytical-chemistry/titration-and-karl-fischer/determination-water-content-in-cannabis-hemp> (Acceso 14 de Agosto 2022)
- [36] Stefkov, G.; Cvetkovikj Karanfilova, I.; Stoilkovska Gjorgievska, V.; Trajkovska, A.; Geskovski, N.; Karapandzova, M.; Kulevanova, S. **Analytical Techniques for Phytocannabinoid Profiling of Cannabis and Cannabis-Based Products—A Comprehensive Review.** *Molecules* 2022, 27, 975. <https://doi.org/10.3390/molecules27030975>
- [37] C. Citti, D. Braghiroli, M. A. Vandelli, G. Cannazza, **Pharmaceutical and biomedical analysis of cannabinoids: A critical review,** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2018), Volume 147, Pages 565-579, ISSN 0731-7085, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.06.003>.
- [38] United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), **Recommended methods for the identification and analysis of cannabis and cannabis products,** (2009) . (Acceso 10 de Junio 2022) https://www.unodc.org/documents/scientific/ST-NAR-40-Ebook_1.pdf.
- [39] R.N. Smith, C.G. Vaughan, **The decomposition of acidic and neutral cannabinoids in organic solvents,** *J. Pharm. Pharmacol.* 29 (1977) 286–290, [doi:http://dx.doi.org/10.1111/j.2042-7158.1977.tb11313.x](http://dx.doi.org/10.1111/j.2042-7158.1977.tb11313.x).
- [40] B. De Backer, B. Debrus, P. Lebrun, L. Theunis, N. Dubois, L. Decock, A. Verstraete, P. Hubert, C. Charlier, **Innovative development and validation of an HPLC/DAD method for the qualitative and quantitative determination of major cannabinoids in cannabis plant material,** *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 877 (2009) 4115–4124, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.11.004>.
- [41] A.A.M. Stolker, J. Van Schoonhoven, A.J. De Vries, I. Bobeldijk-Pastorova, W.H.J. Vaes, R. Van Den Berg, **Determination of cannabinoids in cannabis products using liquid chromatography-ion trap mass spectrometry,** *J. Chromatogr. A.* 1058 (2004) 143–151, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.089>.
- [42] A. Hazekamp, Y.H. Choi, R. Verpoorte, **Quantitative analysis of cannabinoids from Cannabis sativa using ¹H-NMR,** *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).* 52 (2004) 718–721, <http://dx.doi.org/10.1248/cpb.52.718>.
- [43] Y.H. Choi, A. Hazekamp, A.M.G. Peltenburg-Looman, M. Frédérich, C. Erkelens, A.W.M. Lefeber, R. Verpoorte, **NMR assignments of the major cannabinoids and cannabiflavonoids**

- isolated from flowers of Cannabis sativa**, *Phytochem. Anal.* 15 (2004) 345–354, <http://dx.doi.org/10.1002/pca.787>.
- [44] F.E. Dussy, C. Hamberg, M. Luginbuhl, T. Schwerzmann, T.A. Briellmann, **Isolation of Delta9-THCA-A from hemp and analytical aspects concerning the determination of Delta9-THC in cannabis products**, *Forensic Sci. Int.* 149 (2005) 3–10, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.05.015>.
- [45] E.M. Mudge, S.J. Murch, P.N. Brown, **Leaner and greener analysis of cannabinoids**, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 3153–3163, doi:<http://dx.doi.org/10.1007/s00216-017-0256-3>.
- [46] W. Gul, S.W. Gul, M.M. Radwan, A.S. Wanas, Z. Mehmedic, I.I. Khan, M.H. Sharaf, M. A. ElSohly, **Determination of 11 cannabinoids in biomass and extracts of different varieties of cannabis using high-performance liquid chromatography**, *J. AOAC Int.* 98 (2015) 1523–1528, doi:<http://dx.doi.org/10.5740/jaoacint.15-095>.
- [47] Béres, T., Černochová, L., Čavar Zeljković, S. et al. **Intralaboratory comparison of analytical methods for quantification of major phytocannabinoids**. *Anal Bioanal Chem* 411, 3069–3079 (2019). <https://doi-org.sabidi.urv.cat/10.1007/s00216-019-01760-y>
- [48] O. Aizpurua-Olaizola, J. Omar, P. Navarro, M. Olivares, N. Etxebarria, A. Usobiaga, **Identification and quantification of cannabinoids in Cannabis sativa L. plants by high performance liquid chromatography-mass spectrometry**, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 7549–7560, <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-014-8177-x>.
- [49] J. Omar, M. Olivares, M. Alzaga, N. Etxebarria, **Optimisation and characterisation of marihuana extracts obtained by supercritical fluid extraction and focused ultrasound extraction and retention time locking GC–MS**, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 1397–1404, <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201201103>.
- [50] D. Wianowska, A.L. Dawidowicz, M. Kowalczyk, **Transformations of Tetrahydrocannabinol, tetrahydrocannabinolic acid and cannabinol during their extraction from Cannabis sativa L**, *J. Anal. Chem.* 70 (2015) 920–925, <http://dx.doi.org/10.1134/S1061934815080183>.
- [51] Council of Europe. **Cannabis flos Monograph N° 3028**. In *European Pharmacopoeia*, 10th ed.; Council of Europe: Strasbourg, France, 2020
- [52] Upton, R.; Craker, L.; ElSohly, M.; Romm, A.; Russo, E.; Sexton, M. **American Herbal Pharmacopoeia, Cannabis Inflorescence: Cannabis spp.; Standards of Identity, Analysis, and Quality Control**; American Herbal Pharmacopoeia: Scotts Valley, CA, USA, 2013.
- [53] Yifan Liu, Thomas A. Brettell, Justin Victoria, Matthew R. Wood, Marianne E. Staretz, **High performance thin-layer chromatography (HPTLC) analysis of cannabinoids in cannabis extracts**, *Forensic Chemistry*, Volume 19, (2020) 100249, ISSN 2468-1709, <https://doi.org/10.1016/j.forc.2020.100249>.
- [54] J.T. Fishedick, R. Glas, A. Hazekamp, R. Verpoorte, **A qualitative and quantitative HPTLC densitometry method for the analysis of cannabinoids in Cannabis sativa L**, *Phytochem. Anal.* 20 (2009) 421–426, <http://dx.doi.org/10.1002/pca.1143>.
- [55] F. Institute, for D. and M. (BfArM) Devices German Cannabis Monograph Draft EN, 2016, pp. 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.06.003>
- [56] Salvatore Sgrò, Benedicita Lavezzi, Cristian Caprari, **“Delta9-THC determination by the EU official method: evaluation of measurement uncertainty and compliance assessment of hemp samples”**, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2021) 413, 3399–3410.
- [57] S. Sirikantaramas, S. Morimoto, Y. Shoyama, Y. Ishikawa, Y. Wada, Y. Shoyama and F. Taura, **The gene controlling marijuana psychoactivity: molecular cloning and heterologous expression of Delta1-tetrahydrocannabinolic acid synthase from Cannabis sativa L**, *Journal of Biological Chemistry* (2004), vol. 279, n° 38, 39767–39774, doi: 10.1074/jbc.M403693200.

- [58] F.E. Dussy, C. Hamberg, M. Luginbühl, T. Schwerzmann, T.A. Briellmann, **Isolation of 9-THCA-A from hemp and analytical aspects concerning the determination of 9-THC in cannabis products**, *Forensic Sci. Int.* 149 (2005) 3–10, <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.05.015>.
- [59] F.E. Dussy, C. Hamberg, M. Luginbühl, T. Schwerzmann, T.A. Briellmann, **Isolation of d9-THCA-A from hemp and analytical aspects concerning the determination of d9-THC in cannabis products**, *Forensic Sci. Int.* 149 (2005) 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.05.015>
- [60] A. Hazekamp, A. Peltenburg, R. Verpoorte, C. Giroud, **Chromatographic and spectroscopic data of cannabinoids from cannabis sativa L**, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 28 (2005) 2361–2382, <http://dx.doi.org/10.1080/10826070500187558>.
- [61] F.E. Dussy, C. Hamberg, M. Luginbühl, T. Schwerzmann, and T.A. Briellmann, **Isolation of Δ9-THCA-A from hemp and analytical aspects concerning the determination of Δ9-THC in cannabis products**, *Forensic Science International* (2005), vol. 149, n^o 1, 3–10, doi: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.05.015>.
- [62] Wissenschaftlicher Dienst, Stadtpolizei Zürich, Switzerland, validated method (2007).
- [63] J.M. Holler, M.L. Smith, S.N. Paul, M.R. Past, and B.D. Paul, **Isomerization of delta-9-THC to delta-8-THC when tested as trifluoroacetyl-, pentafluoropropionyl-, or heptafluorobutyryl- derivatives**, *Journal of Mass Spectrometry* (2008), vol. 43, no. 5, , 674–679, doi: 10.1002/jms.1375.
- [64] R. Andrews and S. Paterson, **Production of identical retention times and mass spectra for {delta}9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol following derivatization with trifluoroacetic anhydride with 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol**, *Journal of Analytical Toxicology* (2012), vol. 36, no. 1, , 61–65, doi: 10.1093/jat/bkr017.
- [65] E. Stokvis, H. Rosing, J. H. Beijnen, **Stable isotopically labeled internal standards in quantitative bioanalysis using liquid chromatography/mass spectrometry: necessity or not?**, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* (2005), 19: 401-407, <https://doi.org/10.1002/rcm.1790>
- [66] Baranauskaite J, Marksa M, Ivanauskas L, Vitkevicius K, Liaudanskas M, Skyrius V, Baranauskas A. **Development of extraction technique and GC/FID method for the analysis of cannabinoids in Cannabis sativa L. spp. sativa (hemp)**. *Phytochem Anal.* (2020) Jul;31(4):516-521. doi:10.1002/pca.2915
- [67] Casiraghi A, Roda G, Casagni E, Cristina C, Musazzi UM, Franzè S, Rocco P, Giuliani C, Fico G, Minghetti P, Gambaro V. **Extraction Method and Analysis of Cannabinoids in Cannabis Olive Oil Preparations**. *Planta Med.* 2018 Mar;84(4):242-249. doi: 10.1055/s-0043-123074. Epub 2017 Dec 4. PMID: 29202510.
- [68] Cardenia V, Toschi TG, Scappini S, Rubino RC, Rodriguez-Estrada MT. **Development and validation of a fast gas chromatography/mass spectrometry method for the determination of cannabinoids in Cannabis sativa L**. *J Food Drug Anal* 26:1283–1292. (2018). <https://doi-org.sabidi.urv.cat/10.1016/j.jfda.2018.06.001>
- [69] K. de C. Mariotti, M.C.A. Marcelo, R.S. Ortiz, B.T. Borille, M. dos Reis, M.S. Fett, M.F. Ferro, R.P. Limberger, **Seized cannabis seeds cultivated in greenhouse: a chemical study by gas chromatography-mass spectrometry and chemometric analysis**, *Sci. Justice* 56 (2016) 35–41, <http://dx.doi.org/10.1016/j.scijus.2015.09.002>.
- [70] M. Pellegrini, E. Marchei, R. Pacifici, S. Pichini, **A rapid and simple procedure for the determination of cannabinoids in hemp food products by gas chromatography-mass spectrometry**, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2005) 939–946, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2004.07.035>.

- [71] K. Tsujikawa, Y. Okada, H. Segawa, T. Yamamuro, K. Kuwayama, T. Kanamori, Y.T. Iwata, **Thermal decomposition of CBD to Δ 9-THC during GC-MS analysis: A potential cause of Δ 9-THC misidentification**, Forensic Science International, Volume 337, (2022), 111366, ISSN 0379-0738, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2022.111366>
- [72] M.W. Giese, M.A. Lewis, L. Giese, K.M. Smith, **Development and validation of a reliable and robust method for the analysis of cannabinoids and terpenes in cannabis**, J. AOAC Int. 98 (2015) 1503–1522, <http://dx.doi.org/10.5740/jaoacint.15-116>.
- [73] C. Citti, G. Ciccarella, D. Braghiroli, C. Parenti, Vandelli M.A.M.A, G. Cannazza, **Medicinal Cannabis: principal cannabinoids concentration and their stability evaluated by a high performance liquid chromatography coupled to diode array and quadrupole time of flight mass spectrometry method**, J. Pharm. Biomed. Anal. 128 (2016) 201–209, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2016.05.033>.
- [74] C. Citti, U.M. Battisti, G. Ciccarella, V. Maiorano, G. Gigli, S. Abbate, G. Mazzeo, E. Castiglioni, G. Longhi, G. Cannazza, **Analytical and preparative enantioseparation and main chiroptical properties of Iridium(III) bis(4, 6-difluorophenylpyridinato)picolinato**, J. Chromatogr. A. 2016 (1467) 335–346, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.05.059>.
- [75] J.N. Fairchild, K. Horvath, J.R. Gooding, S.R. Campagna, G. Guiochon, **Two-dimensional liquid chromatography/mass spectrometry/mass spectrometry separation of water-soluble metabolites**, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 8161–8166, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.068>.
- [76] V. Brighenti, S.F. Groothuis, F.P. Prencipe, R. Amir, S. Benvenuti, F. Pellati, **Metabolite fingerprinting of Punica granatum L. (pomegranate) polyphenols by means of high-performance liquid chromatography with diode array and electrospray ionization-mass spectrometry detection**, J. Chromatogr. A 2017 (1480) 20–31, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.12.017>.
- [77] Patel B, Wene D, Fan Z **Qualitative and quantitative measurement of cannabinoids in cannabis using modified HPLC/DAD method**. J Pharm Biomed Anal 146:15–23. (2017). <https://doi-org.sabidi.urv.cat/10.1016/j.jpba.2017.07.021>
- [78] C. Burnier, P. Esseiva, C. Roussel, **Quantification of THC in Cannabis plants by fast-HPLC-DAD: A promising method for routine analyses**, Talanta. 192 (2019) 135–141. doi:<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.09.012>.
- [79] AOAC SMPR® 2017.019 **Standard Method Performance Requirements (SMPRs®) for Quantitation of Cannabinoids in Edible Chocolate**. Acceso: Agosto 2022. www.aoac.org/wp-content/uploads/2020/11/SMPR202017_019.pdf
- [80] Tran, J.; Elkins, A.C.; Spangenberg, G.C.; Rochfort, S.J. **High-Throughput Quantitation of Cannabinoids by Liquid Chromatography Triple-Quadrupole Mass Spectrometry**. Molecules (2022), 27, 742. <https://doi.org/10.3390/molecules27030742>
- [81] L. Ambach, F. Penitschka, A. Broillet, S. König, W. Weinmann, W. Bernhard, **Simultaneous quantification of delta-9-THC, THC-acid A, CBN and CBD in seized drugs using HPLC-DAD**, Forensic Science International 243 (2014) 107–111, <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.06.008>
- [82] Institute of Legal Medicine, St Gall, Switzerland, validated method (2005).
- [83] R. Brenneisen, **Psychotropic drugs. II. Determination of cannabinoids in Cannabis sativa L. and in cannabis products with high pressure liquid chromatography (HPLC)**, Pharmaceutica Acta Helvetiae (1984), vol. 59, no. 9–10, 247–259.
- [84] G. McRae and J.E. Melanson, **Quantitative determination and validation of 17 cannabinoids in cannabis and hemp using liquid chromatography-tandem mass spectrometry**, Analytical and Bioanalytical Chemistry (2020), vol. 412, no. 27, 7381–7393, doi: 10.1007/s00216-020-02862-8.

- [85] B. Backstrom, M.D. Cole, D.C. Jones, G. Davidson, K. Coleman, **A preliminary study of the analysis of Cannabis by supercritical fluid chromatography with atmospheric pressure chemical ionisation mass spectroscopic detection**, *Sci. Justice* 37 (2) (1997) 91e97. [https://doi.org/10.1016/S1355-0306\(97\)72153-1](https://doi.org/10.1016/S1355-0306(97)72153-1)
- [86] M. Wang, Y.-H. Wang, B. Avula, M.M. Radwan, A.S. Wanas, Z. Mehmedic, J. van Antwerp, M.A. ElSohly, I.A. Khan, **Quantitative determination of cannabinoids in cannabis and cannabis products using ultra-high-performance supercritical fluid chromatography and diode array/mass spectrometric detection**, *J. Forensic Sci.* 62 (2017) 602e611. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.13341>
- [87] Deidda, R, Schelling, C, Roussel, J-M, et al. **The analysis of cannabinoids in cannabis samples by supercritical fluid chromatography and ultra-high-performance liquid chromatography: A comparison study**. *Anal Sci Adv.* (2021) 2: 2– 14. <https://doi.org/10.1002/ansa.202000091>
- [88] J.T. Fishedick, A. Hazekamp, T. Erkelens, Y.H. Choi, R. Verpoorte, **Metabolic fingerprinting of Cannabis sativa L., cannabinoids and terpenoids for chemotaxonomic and drug standardization purposes**, *Phytochemistry* 71 (2010) 2058–2073, <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.10.001>.
- [89] V. Gambaro, L. Dell'Acqua, F. Farè, R. Froidi, E. Saligari, G. Tassoni, **Determination of primary active constituents in Cannabis preparations by high-resolution gas chromatography/flame ionization detection and high-performance liquid chromatography/UV detection**, *Anal. Chim. Acta.* 468 (2002) 245–254, [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00660-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00660-8).
- [90] Barthlott, I.; Scharinger, A.; Golombek, P.; Kuballa, T.; Lachenmeier, D.W. **A Quantitative 1H NMR Method for Screening Cannabinoids in CBD Oils**. *Toxics* (2021), 9, 136. <https://doi.org/10.3390/toxics9060136>
- [91] W. Peschel, M. Politi, **1H NMR and HPLC/DAD for Cannabis sativa L. chemotype distinction, extract profiling and specification**, *Talanta* 140 (2015) 150–165, <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.02.040>.
- [92] N. Happyana, S. Agnolet, R. Muntendam, A. Van Dam, B. Schneider, O. Kayser, **Analysis of cannabinoids in laser-microdissected trichomes of medicinal Cannabis sativa using LCMS and cryogenic NMR**, *Phytochemistry* 87 (2013) 51–59, <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.11.001>.
- [93] M. Hädener, M. Z. Kamrath, W. Weinmann, and M. Groessl, **High-Resolution Ion Mobility Spectrometry for Rapid Cannabis Potency Testing**, *Analytical Chemistry* (2018) 90 (15), 8764-8768, doi:10.1021/acs.analchem.8b02180
- [94] B. Igne, G. McGeorge, Z. Shi, Method development, in: Y. Ozaki, C.W. Huck, S. Tsuchikawa, S.B. Engelsen (Eds.), **Near-Infrared Spectroscopy**, Springer Nature Singapore Pte Ltd, Singapore, 2021, pp. 277e294. https://doi.org/10.1007/978-981-15-8648-4_12
- [95] F. Coppey, A. Bécue, P. Sacré, E. M. Ziemons, P. Hubert, P. Esseiva, **Providing illicit drugs results in five seconds using ultra-portable NIR technology: An opportunity for forensic laboratories to cope with the trend toward the decentralization of forensic capabilities**, *Forensic Science International*, Volume 317 (2020), 110498, ISSN 0379-0738, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110498>
- [96] L. Sanchez, C. Filter, D. Baltensperger, D. Kurouski, **Confirmatory non-invasive and non-destructive differentiation between hemp and cannabis using a hand-held Raman spectrometer**, *RSC Adv.* 10 (2020) 3212. <https://doi.org/10.1039/C9RA08225E>

Anexo - Abreviaciones

- Δ -9THC - Δ -9-Tetrahydrocannabinol (grupo de isómeros)
BSTFA - N,O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida
CCD - Cromatografía en Capa Delgada
CBD – *Cannabidiol*
CBN - *Cannabinodiol*
CNBs – Cannabinoides
DAD - *Diode Array Detector*
DOSY – *Difusión Ordered Spectroscopy* – Espectroscopia de orden difusional
FID - *Flame Ionization Detector*, Detector de Ionización de Llama
GC - Cromatografía de Gases
HPLC - *High Pressure Liquid Chromatography*, Cromatografía líquida de alta presión
IMS - *Ion Mobility Spectrometry* - Espectrometría de Movilidad Iónica
IPA – Isopropanol
LC - Cromatografía de Líquidos
MeOH – Metanol
MS - Espectrometría de Masas
MSTFA - N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida
THCA - Ácido Δ -9-Tetrahydrocannabinóico
TLC - *Thin Layer Chromatography*
TMCS – Trimetilclorosilano
PDA - *Photometric Diode Array*
RMN - Resonancia Magnética Nuclear