



Universitat
de les Illes Balears

TRABAJO FIN DE GRADO

TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CANNABINOIDES A PARTIR DE LA PLANTA CANNABIS SATIVA L.

Pablo Sandiego Villaverde

Grado de Química

Facultad de Ciencias

Año Académico 2019-20

TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CANNABINOIDES A PARTIR DE LA PLANTA CANNABIS SATIVA L.

Pablo Santiago Villaverde

Trabajo de Fin de Grado

Facultad de Ciencias

Universidad de las Illes Balears

Año Académico 2019-20

Palabras clave del trabajo:

Cannabis, extracción, cannabinoides, tetrahidrocannabinol, cannabidiol, cromatografía de gases, cromatografía líquida

Nombre Tutor/Tutora del Trabajo Dr. Antoni Femenia Marroig

Se autoriza la Universidad a incluir este trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con fines exclusivamente académicos y de investigación

Autor		Tutor	
Sí	No	Sí	No
X			X

ÍNDICE

1. Introducción	7
1.1 <i>Cannabis sativa</i> L.....	7
1.1.1 Compuestos químicos presentes en <i>Cannabis sativa</i> L.....	8
1.1.2 Cultivo, procesado y almacenamiento	8
1.1.3 Taxonomía del <i>Cannabis sativa</i> L.....	9
1.1.4 Legislación del cannabis	11
1.2 Cannabinoides	11
1.2.1 Principales cannabinoides	12
1.2.2 Biosíntesis.....	12
1.2.3 Propiedades de los cannabinoides	13
2. Extracción de cannabinoides.....	14
2.1 Disolventes utilizados en la extracción de cannabinoides.....	14
2.2 Técnicas de extracción de cannabinoides.....	15
3. Caracterización de cannabinoides.....	19
3.1 Técnicas analíticas.....	19
3.2 Determinación de cannabinoides mediante GC	20
3.3 Determinación de cannabinoides mediante HPLC	23
3.4 Otras técnicas para el análisis de cannabinoides.....	27
4. Conclusiones	28
5. Anexos.....	29
6. Bibliografía.....	30

Resumen

En los últimos años, la planta *Cannabis sativa* L., a pesar de la controversia que genera, ha ido adquiriendo una notable importancia debido al potencial farmacológico que muestran algunos de los principales compuestos cannabinoides presentes en diferentes partes de la planta. Por este motivo, es de gran interés profundizar no solo en el conocimiento de las propiedades físico-químicas del *Cannabis sativa* L. sino también en el de las diferentes técnicas analíticas utilizadas tanto para la extracción como para la identificación y caracterización de los constituyentes más importantes presentes en la planta. En la actualidad, aunque la finalidad sea la obtención de estos compuestos en la mayor proporción y pureza posibles, se está haciendo un especial énfasis en la necesidad de que la metodología utilizada sea, desde un punto de vista medioambiental, lo más sostenible y económica posible.

En este contexto, en este trabajo se ha llevado a cabo un estudio bibliográfico exhaustivo basado, por una parte, en los aspectos principales de la planta *Cannabis sativa* L., y en particular, de los compuestos cannabinoides, y por otra, en una búsqueda detallada, en la literatura científica, de los diferentes métodos analíticos utilizados tanto para la extracción como para la identificación y cuantificación de los compuestos cannabinoides. En el estudio se destacan las ventajas e inconvenientes de cada tipo de metodología, con el objetivo de determinar cuáles son, actualmente, las técnicas más apropiadas.

Abstract

In recent years, *Cannabis sativa* L. plant, despite the controversy it generates, has acquired considerable importance due to the pharmacological potential shown by some of the main cannabinoids compounds present in different parts of the plant. For this reason, it is of great interest to deepen not only in the knowledge of the physicochemical properties of *Cannabis sativa* L. but also of the different analytical techniques used both for the extraction and for the identification and characterization of the most important constituents in the plant. Nowadays, although the aim is to obtain these compounds in the highest possible proportion and purity, special emphasis is being placed on the need for the methodology to be, from an environmental point of view, as sustainable and economical as possible.

In this context, an exhaustive bibliographic study has been carried out based, on the one hand, on the main aspects of the *Cannabis sativa* L. plant, in particular, on cannabinoids compounds, and on the other, on a detailed search, in the scientific literature, of the different analytical methods used both for the extraction and for the identification and quantification of cannabinoids. The study highlights the advantages and drawbacks of each type of methodology, with the aim of determining which are currently the most appropriate techniques.

1. Introducción

1.1 *Cannabis sativa* L.

Cannabis es el término usado habitualmente para referirse a la variedad de *Cannabis sativa* L. (ver Figura 1). Es una planta que crece en zonas templadas y tropicales del mundo cuyo origen se establece hace 6000 años en Asia Central⁽¹⁾. Pertenece a la familia *Cannabaceae* y puede alcanzar hasta los 6 metros de altura.

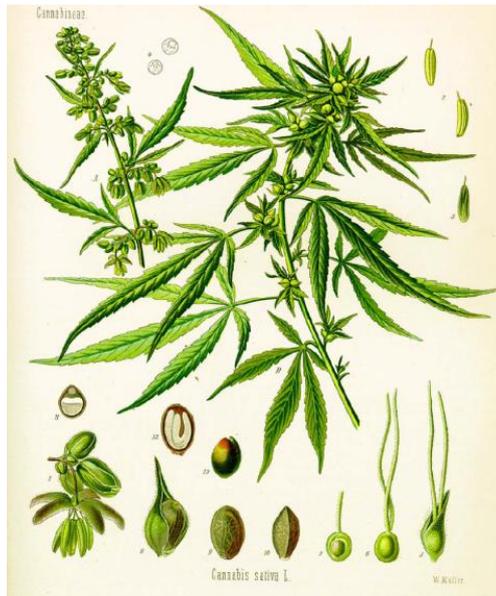


Figura 1. *Cannabis sativa* L. Köhler's Medizinal-Pflanzen (Pabst, 1887)

El *Cannabis sativa* L. es una planta florida que se presenta en formas variables, dependiendo de la variedad cultivada y de la disponibilidad de espacio para su crecimiento. Se trata de una especie generalmente dioica, lo que significa que las flores masculinas y femeninas se encuentran en plantas separadas. En las inflorescencias contienen mayormente los compuestos bioactivos del cannabis, los cuales se encuentran concentrados principalmente en los tricomas, protuberancias epidérmicas que cubren las hojas y los tallos de las plantas⁽²⁾.

La planta *Cannabis sativa* L. fue clasificada por primera vez en 1753 por Carl Linnaeus y representa una importante fuente de metabolitos secundarios, con más de 500 compuestos identificados en las diferentes partes que forman la planta⁽³⁾. Los cannabinoides son el grupo de compuestos bioactivos más importante presentes en la *Cannabis sativa* L., siendo el principal objeto de estudio y análisis de este trabajo.

Desde que se conoce la presencia de compuestos psicoactivos en el cannabis, se han utilizado diferentes formas para nombrar la planta con el objetivo de distinguir el cannabis que contiene sustancias psicoactivas y las plantas que no contienen dichos compuestos y que pueden ser utilizadas para otros fines.

En este contexto, se suele hablar de cáñamo para referirse a la planta de cannabis que no contiene compuestos psicoactivos, mientras que "marihuana" hace referencia

al cannabis que sí presenta este tipo de sustancias. No obstante, dado que estos términos no tienen una base científica como tal, en ocasiones se utiliza el término cannabis para referirse al *Cannabis sativa* L. en todas sus variedades⁽⁴⁾.

1.1.1 Compuestos químicos presentes en *Cannabis sativa* L.

La mayor parte de los componentes no cannabinoides identificados (flavonoides, terpenos, alcaloides, ésteres y pigmentos entre otros) son los constituyentes habituales de una planta; dado que estos compuestos están presentes en pequeñas cantidades, no es de esperar que contribuyan significativamente al perfil farmacológico específico del cannabis⁽²⁵⁾. No obstante, se debe tener en cuenta la importancia de estos componentes, ya que algunos presentan efectos positivos para la salud humana y, en el caso de terpenos y flavonoides, pueden llegar a contribuir de forma sinérgica con la actividad beneficiosa atribuida a los cannabinoides⁽²⁴⁾.

Los cannabinoides son los constituyentes más interesantes que se hallan en la planta. Entre estos compuestos cabe destacar el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC, o simplemente THC), por ser el compuesto psicoactivo más importante, y el cannabidiol (CBD), el cual presenta diversas propiedades siendo no psicoactivo⁽³⁹⁾.

1.1.2 Cultivo, procesado y almacenamiento

En el año 1925 se situó, a nivel mundial, a la planta *Cannabis sativa* L. en la lista de drogas establecidas. No se prohibía su utilización, pero se restringía para fines científicos⁽⁵⁾. Actualmente, en la Unión Europea el cultivo de la planta está permitido si el contenido total de Δ^9 -THC no excede el límite del 0,2% en base seca⁽⁶⁾.

En general, el cannabis es una planta muy resistente que tolera bien los cambios de clima. Si bien se conoce que la mayoría de los cannabinoides se concentran en las flores de la planta⁽⁷⁾, la concentración de éstos en las hojas también puede ser considerable. En menor concentración, también pueden hallarse tanto en los tallos como en las raíces de la planta. Sin embargo, este tipo de compuestos no están presentes en las semillas de la planta⁽⁸⁾.

La producción de cannabinoides en el *Cannabis sativa* L. puede verse afectada por factores tanto de carácter biótico como también abiótico, como la madurez de la planta, la disponibilidad de nutrientes o la intensidad de la luz natural entre otros^(9,10).

El ciclo vital que sigue el cannabis, al ser una planta anual, se basa en que germina, crece, florece y muere durante el transcurso de un año. Tanto en el procesado de la planta, donde se lleva a cabo su secado a temperatura y humedad reguladas, como durante un almacenamiento prolongado, se pueden producir variaciones importantes en el contenido de los cannabinoides presentes; por tanto el tratamiento de la planta debe estar perfectamente controlado. El secado se lleva a cabo para reducir su contenido en agua y evitar cambios en el contenido de cannabinoides de la muestra; el proceso se realiza normalmente durante una semana, con ausencia de luz, a temperatura de unos 25 °C y a una humedad relativa del 50-65 %⁽²¹⁾.

La concentración de Δ^9 -THC fácilmente puede verse alterada en función de las condiciones de almacenaje. Es un compuesto termolábil, sensible al oxígeno y a la radiación ultravioleta, por lo que puede sufrir un proceso de degradación oxidativa a cannabinol (CBN), tras un almacenamiento prolongado a temperatura ambiente, o experimentar un proceso de isomerización a Δ^8 -THC⁽¹¹⁾.

Teniendo en cuenta estos aspectos, se ha determinado que las condiciones preferidas para el almacenamiento de la planta a largo plazo son bajas temperaturas y ausencia de luz. De hecho, a partir de la concentración de CBN y Δ^9 -THC presentes en la planta tras un periodo de almacenamiento largo, su proporción puede servir como indicador de la edad de la muestra de cannabis almacenada⁽¹²⁾.

1.1.3 Taxonomía del *Cannabis sativa* L.

En 1783, Lamarck observó diferencias entre el *Cannabis sativa* L. y una planta similar procedente de la India, por lo cual denominó a este último *Cannabis indica*, mientras que en 1924 el botánico ruso Janischevsky indicó que existía una nueva especie en Asia que nombró *Cannabis ruderalis*.

Actualmente, no existe un total acuerdo sobre la clasificación de las especies del género *Cannabis* en función de su variabilidad genética. La taxonomía del cannabis continúa cambiando y la discusión a menudo hace referencia a la existencia de 2 o 3 especies (ver Figura 2), aunque hay autores que indican que lo que se consideraban tres especies en realidad son tres variedades de la especie *Cannabis sativa* L.⁽¹³⁾.

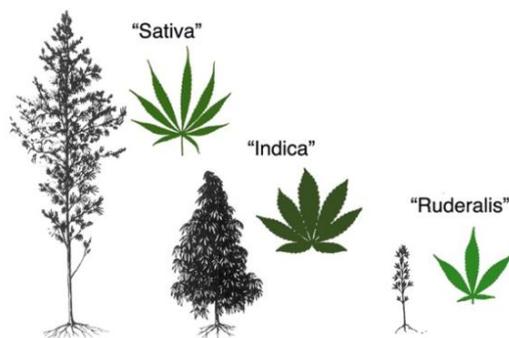


Figura 2. Taxonomía del cannabis basada en la existencia de tres especies⁽¹³⁾.

Debido a la falta de un criterio único a la hora de clasificar la planta, existen diferentes clasificaciones basadas en aspectos muy diversos:

·Clasificación biosistemática: se basa en criterios morfológicos como la altura de las plantas y el grado de ramificación⁽¹⁾. Este sistema distingue 3 especies del cannabis:

- *Cannabis sativa*: plantas altas, poco ramificadas con hojas largas.
- *Cannabis indica*: plantas pequeñas, con ramas cortas y brotes más densos.
- *Cannabis ruderalis*: plantas muy pequeñas, sin ramas y con hojas de un tamaño menor en comparación con las anteriores.

-Clasificación no-biosistemática: varios sistemas de clasificación no-biosistemática se desarrollaron para discriminar entre las diferentes variedades de cannabis, sobre todo entre las que podrían clasificarse como "tipo droga" o "tipo fibra".

La caracterización cualitativa implica la determinación de la relación THC/CBD en una planta y asignarla a un fenotipo químico o "quimiotipo"⁽¹⁴⁾. En 1971, Fetterman⁽¹⁵⁾ describió diferentes fenotipos basados en diferencias cuantitativas en el contenido de los principales cannabinoides y fue el primero en distinguir cannabis de "tipo droga" y de "tipo fibra". Small y Beckstead⁽¹⁶⁾ usaron los niveles por separado de THC y CBD de las plantas para distinguir entre los distintos quimiotipos. En cambio, otros autores como Fournier y Paris⁽¹⁷⁾ optaron por usar niveles más altos de Δ^9 -THC para discriminar entre las variedades antes mencionadas (ver Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de fenotipos químicos de la planta *Cannabis sativa* L. según Small y Beckstead⁽¹⁶⁾ y Fournier y Paris⁽¹⁷⁾.

Fenotipos	[THC] %	[CBD] %	[THC] / [CBD]	Referencias
<i>Droga</i>	> 0,3	< 0,5	-	Small y Beckstead ⁽¹⁶⁾
<i>Intermedio</i>	> 0,3	> 0,5	-	
<i>No-Droga</i>	< 0,3	> 0,5	-	
<i>Fibra</i>	< 0,5	> 0,5	< 1	Fournier y Paris ⁽¹⁷⁾
<i>Droga</i>	> 0,5	< 0,5	> 1	

Posteriormente, en 2004, Hillig y Mahlberg⁽⁹⁾ identificaron tres quimiotipos de plantas de cannabis en función de la relación THC/CBD: una relación THC/CBD > 1 es característica de las plantas clasificadas como "tipo droga" (quimiotipo I), una relación THC/CBD cercana a 1 es para plantas "tipo intermedio" (quimiotipo II) y una relación THC/CBD < 1 es característica de las plantas "tipo fibra" (quimiotipo III). Los quimiotipos son útiles a la hora de clasificar las diferentes variedades de *Cannabis sativa* L. Según la UNODC (*United Nation Office on Drugs and Crime*)⁽¹⁸⁾, para diferenciar entre cannabis "tipo droga" y "tipo fibra" se debe considerar los contenidos en Δ^9 -THC, CBD y CBN utilizando la siguiente ecuación:

$$X = \frac{[\text{THC}] + [\text{CBN}]}{[\text{CBD}]} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Dado que el Δ^9 -THC tiende a oxidarse parcialmente formando CBN después de cortar y secar el material vegetal, se usa la suma de las áreas de los picos de los compuestos Δ^9 -THC y CBN obtenidos en el cromatograma realizado y se divide por el área de CBD, lo cual permite determinar la variedad de cannabis analizada. Si se obtiene $X > 1$, la muestra de cannabis es de "tipo droga", mientras que un valor de $X < 1$ es indicativo de que el cannabis analizado es de "tipo fibra".

En la actualidad, aunque se han seleccionado y descrito otros nuevos quimiotipos de cannabis, se opta por una clasificación "monotípica", en la que se reconoce una especie, *Cannabis sativa* L., altamente polimórfica, que se clasifica en 3 quimiotipos en función del contenido en cannabinoides de la planta analizada⁽¹⁹⁾.

1.1.4 Legislación del cannabis

La legalidad referida al uso del cannabis lleva décadas causando controversia; la legislación varía significativamente de un país a otro: mientras que el cannabis está prohibido en todas sus variedades prácticamente en todo el mundo, el uso del cáñamo con fines científicos está permitido en muchos países. En el caso de la Unión Europea (UE), por ejemplo, se permite el cultivo de variedades de cáñamo con niveles de Δ^9 -THC inferiores al 0,2%⁽²⁰⁾. En la UE cabe destacar concretamente el caso de los Países Bajos, donde la venta de cannabis está permitida en locales autorizados denominados *coffee-shops*. En otros países como Uruguay y Canadá el cannabis ha sido completamente legalizado en la última década⁽²⁰⁾.

Asimismo, algunos fármacos basados en cannabinoides como el CBD han sido desarrollados y aprobados para diferentes tratamientos, pero su venta está muy restringida por las diferentes limitaciones existentes en la legislación de cada país.

1.2 Cannabinoides

Los cannabinoides son terpenofenoles definidos como un grupo de compuestos formados por 21 átomos de carbono (ver Figura 3), característicos del género *Cannabis*⁽²²⁾, entre los que se incluyen sus derivados y productos de transformación.

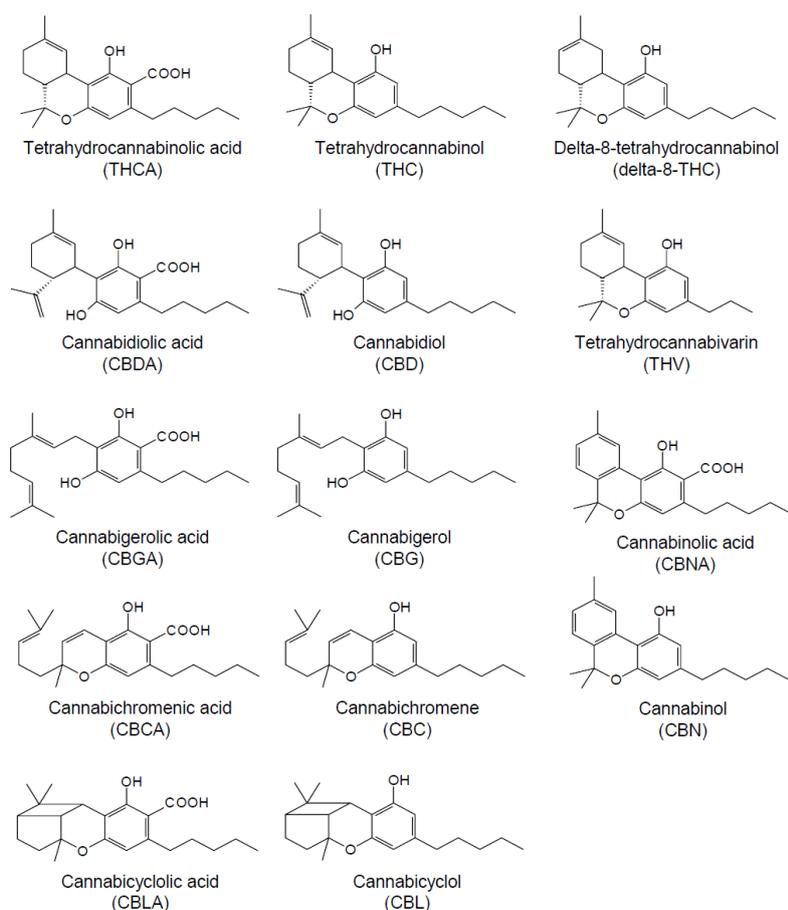


Figura 3. Estructura química de los principales cannabinoides presentes en la planta *Cannabis sativa* L.⁽⁴⁾

Actualmente se han identificado más de 100 compuestos cannabinoides⁽²³⁾, entre los cuales cabe destacar el Δ^9 -THC, el CBD y el CBN. Los demás compuestos aparecen en cantidades más reducidas y variables, siendo el cannabícromeno (CBC) y el cannabigerol (CBG) probablemente los más conocidos.

Los cannabinoides son compuestos inodoros (el olor característico del cannabis es debido a terpenos volátiles de la planta⁽²⁴⁾), que presentan generalmente un grupo carboxilo en su estructura, al cual se le atribuye, en parte, la actividad terapéutica del cannabis⁽²⁵⁾. El desarrollo de cannabinoides sintéticos y el descubrimiento de los endocannabinoides han impulsado el uso del término "fitocannabinoides" para la descripción específica de este tipo de compuestos⁽²⁶⁾. El mayor responsable de la actividad psicotrópica de la planta es el Δ^9 -THC junto con el CBN. Este último posee una ligera actividad psicoactiva, estimada en una décima parte de la actividad atribuida al Δ^9 -THC⁽²⁷⁾.

1.2.1 Principales cannabinoides

El primer compuesto aislado representativo de los cannabinoides fue el CBN, aunque su estructura química no fue caracterizada correctamente hasta 1940⁽²⁸⁾. Además, el CBD no fue aislado hasta mitad del siglo XX, mientras que la estructura del Δ^9 -THC fue desconocida hasta que fue totalmente caracterizado por Gaoni y Mechoulam⁽²⁹⁾. Por otra parte, el posterior descubrimiento del CBC por Claussen et al.⁽³⁰⁾ y por Gaoni y Mechoulam⁽³¹⁾ ocurrió casi de forma simultánea.

1.2.2 Biosíntesis

La biosíntesis de los cannabinoides de *Cannabis sativa* L. ha sido elucidada casi al completo⁽³²⁾. Los precursores de los cannabinoides se originan a partir de dos rutas biosintéticas distintas: la ruta del acetato, que da lugar a la síntesis del ácido olivetólico, y la ruta del mevalonato, que conduce a pirofosfato de geranilo (GPP)⁽³³⁾ (ver Figura 4).

La C-alkilación, catalizada por una sintasa, del ácido olivetólico con GPP conduce a la formación de ácido cannabigerólico (CBGA), precursor central de varios cannabinoides⁽³⁴⁾. A partir del CBGA, se producen diferentes procesos de ciclación oxidativa catalizados por enzimas que dan lugar al ácido tetrahidrocannabinólico (THCA), al ácido cannabidiólico (CBDA) y al ácido cannabícroménico (CBCA). Por lo tanto, se observa como los cannabinoides se biosintetizan en sus formas ácidas.

Cabe mencionar que para el compuesto THCA existe en dos formas: THCA-A y THCA-B, aunque dado que sólo se detectan trazas de este último compuesto⁽³⁵⁾, normalmente se hace referencia al compuesto como THCA. Es importante tener en cuenta que estos cannabinoides ácidos pueden sufrir una descarboxilación no enzimática en sus formas neutras que puede ser inducida tanto por el calor como por el tiempo de almacenamiento⁽¹¹⁾.

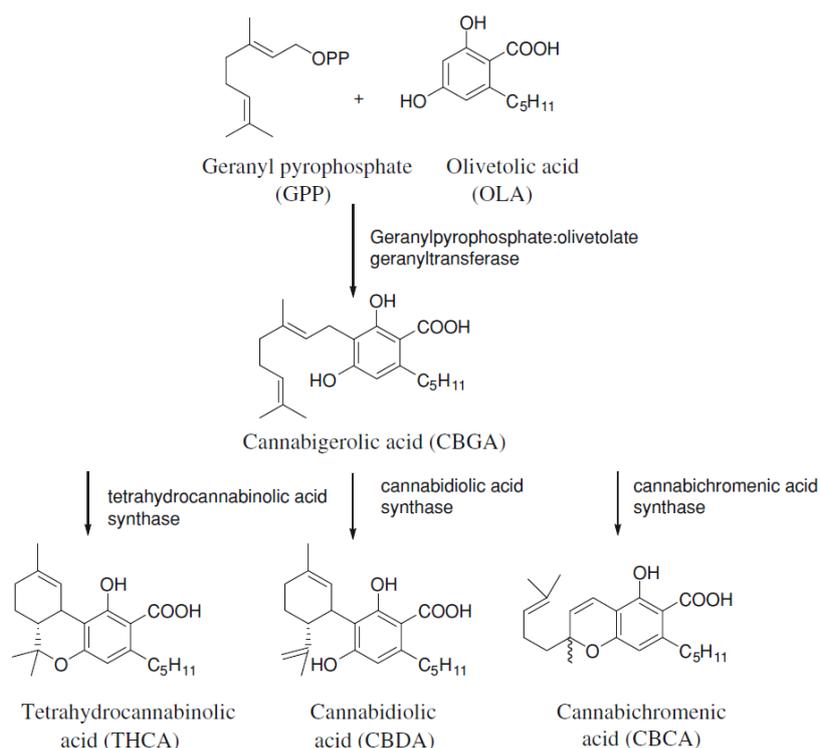


Figura 4. Ruta biosintética de los principales cannabinoides ácidos presentes en la planta *Cannabis sativa* L.

1.2.3 Propiedades de los cannabinoides

La caracterización de la estructura química y el conocimiento sobre las relaciones estructura-actividad, que dan lugar a los diversos efectos de los cannabinoides, han permitido el diseño de compuestos análogos que han sido de gran utilidad en el estudio de las propiedades farmacológicas de estos compuestos. Una característica distintiva de los cannabinoides es su marcado carácter hidrófobo, limitando su uso en algunos productos farmacéuticos debido a su baja solubilidad en agua.

Desde un punto de vista farmacéutico, el CBD es el compuesto más interesante, ya que presenta elevada actividad antioxidante y también antiinflamatoria⁽³⁶⁾, además de exhibir interesantes propiedades antibióticas, ansiolíticas y antiepilépticas⁽³⁷⁾.

Tanto el CBD como el Δ^9 -THC son capaces de interactuar con el llamado sistema endocannabinoide, compuesto por receptores de cannabinoides, endocannabinoides y enzimas responsables de su síntesis y degradación. Se trata de un sistema neuromodulador que juega un papel importante en el sistema nervioso central y en la respuesta a agresiones endógenas y ambientales⁽³⁸⁾.

El Δ^9 -THC es el cannabinoide con mayor potencia psicoactiva. Presenta propiedades hidrofóbicas por lo que es muy soluble en lípidos y, pese a ser psicoactivo, presenta propiedades muy diversas, ya que se puede emplear como antiemético^(39,40), en el tratamiento del glaucoma⁽⁴¹⁾ y reduce el dolor en personas que padecen esclerosis múltiple⁽⁴²⁾. Por otro lado, el CBC presenta actividad antiinflamatoria y antifúngica⁽⁴³⁾, mientras que el CBG exhibe actividad analgésica y antibacteriana⁽²⁾.

A medida que aumenta el interés en el uso del cannabis con fines farmacológicos, se hace necesario intensificar la investigación sobre la metodología utilizada tanto para la extracción como la cuantificación de los compuestos bioactivos, dado que pueden presentar propiedades muy interesantes para dar lugar a nuevos productos derivados del cannabis, aplicables en ámbitos muy diversos.

2. Extracción de cannabinoides

En el proceso de caracterización de cannabinoides del *Cannabis sativa* L., uno de los aspectos principales a tener en cuenta es la selección del método de extracción. En la mayoría de técnicas, los parámetros más relevantes a tener en cuenta son la temperatura, la presión, el tiempo de extracción y la naturaleza del disolvente⁽⁴⁴⁾.

Para el proceso de extracción de los principales compuestos presentes en la planta *Cannabis sativa* L., se pueden encontrar métodos muy diversos en la literatura: desde los más convencionales, como la maceración con disolventes orgánicos, hasta técnicas innovadoras como la extracción con fluidos supercríticos (SFE), que permiten minimizar de forma sustancial el impacto sobre el medioambiente.

No obstante, antes de llevar a cabo el método de extracción de cannabinoides seleccionado, las muestras de *Cannabis sativa* L. deben seguir un tratamiento adecuado. En general, la materia vegetal se seca a temperaturas inferiores a 70 °C con el objetivo de reducir su contenido en agua. Posteriormente, se eliminan tallos y semillas de más de 2 mm, se tritura y se pasa por un tamiz de 1 mm de malla^(18,45), lo cual suele repercutir en la obtención de buenos rendimientos de extracción, ya que la utilización de mayores tamaños de partícula puede aumentar el tiempo de extracción significativamente y, por otra parte, las partículas muy pequeñas pueden causar apelmazamiento.

2.1 Disolventes utilizados en la extracción de cannabinoides

El método más simple para la extracción de compuestos bioactivos a partir de plantas suele implicar la maceración en agua hasta la disolución de los constituyentes. Sin embargo, en el caso concreto de los cannabinoides es necesario usar métodos alternativos, utilizando diferentes disolventes orgánicos de baja polaridad ya que la solubilidad de los cannabinoides en agua es muy baja⁽⁴⁴⁾.

El uso de disolventes orgánicos para la extracción de compuestos bioactivos, en general, puede presentar ventajas, como su bajo coste y la facilidad de trabajar con ellos, evitando el uso de equipos sofisticados. Sin embargo, su inflamabilidad y potencial toxicidad pueden conllevar serios riesgos para la salud, además de presentar un considerable impacto medioambiental. Por otra parte, si en el procedimiento de extracción se aplican temperaturas elevadas, diferentes componentes de la planta pueden experimentar modificaciones químicas debido a su carácter termolábil⁽⁴⁶⁾.

Durante la última década, ha surgido un grupo de disolventes clasificados como verdes, por su menor impacto medioambiental, para realizar la extracción de cannabinoides. Estos son los llamados *Deep eutectic solvents* (DESs). En 2003, Abbott⁽⁴⁷⁾ introdujo este término para describir esta nueva generación de disolventes sostenibles que, cuando se mezclan en una proporción molar adecuada, tienen puntos de fusión mucho más bajos que los de cualquiera de los componentes individuales, dando lugar a un eutéctico. Su uso se está extendiendo en numerosos campos de la ciencia por sus ventajas respecto a los disolventes orgánicos: no son inflamables, presentan una toxicidad muy baja, son biodegradables y, en general, sus constituyentes tienen un bajo coste. Actualmente, la información sobre la aplicación de este tipo de disolventes para la extracción de cannabinoides es aún escasa, aunque no cabe duda que pueden ser importantes en un futuro próximo.

En un estudio reciente realizado por Cai et al.⁽⁴⁸⁾, basado en el uso de DESs, se consiguió extraer CBD a partir de *Cannabis sativa* L., obteniéndose un elevado rendimiento de extracción. En este trabajo, para optimizar el proceso de extracción, se tomaron como variables de proceso de extracción: la temperatura (entre 40 y 60 °C), el tiempo (entre 30 y 90 min), la concentración del disolvente (entre un 60 y un 80% en peso) y la proporción sólido/líquido. Aplicando la metodología de superficie de respuesta (RSM) se obtuvieron como condiciones óptimas de extracción una temperatura de 48 °C, un tiempo de 55 min, una concentración del disolvente del 68% y un ratio sólido-líquido de 1:24 (m/v).

Además, en el anterior estudio se analizaron 16 disolventes DESs representativos, y se observó como la mezcla compuesta por ChCl-DT (cloruro de colina y L(+)-dietil L-tartrato) fue la que permitió obtener el mayor rendimiento de extracción. Se pudo observar como su capacidad de extracción fue superior que la de disolventes orgánicos como el etanol o el acetato de etilo, por lo cual su uso podría ser de gran interés al ser menos nocivo para el medioambiente. Teniendo en cuenta los rendimientos obtenidos con otros disolventes tipo DESs, en el estudio se sugiere que tanto las distintas interacciones hidrofóbicas y electrostáticas, así como las fuerzas de van der Waals podrían ser las responsables de la elevada capacidad de extracción observada⁽⁴⁹⁾.

2.2 Técnicas de extracción de cannabinoides

Haciendo uso de una amplia variedad de disolventes orgánicos y también de mezclas de éstos, uno de los procesos de extracción de cannabinoides más habituales es la denominada maceración dinámica (DM), proceso en el cual la extracción sólido-líquido va acompañada de agitación para facilitar la disolución de los compuestos solubles de la muestra sólida en el disolvente. Un claro ejemplo de esta técnica es el trabajo llevado a cabo por Hazekamp et al.⁽⁴⁾, en el cual se desarrolló un procedimiento para aislar cannabinoides a gran escala, realizando la extracción a partir de la maceración de la materia vegetal seca con n-hexano

durante varias horas. En la actualidad este procedimiento, teniendo en cuenta la inflamabilidad y toxicidad del disolvente utilizado, resulta poco recomendable.

Por otra parte, la extracción asistida con ultrasonidos (UAE) consiste en un proceso de extracción sólido-líquido basado en la aplicación de ultrasonidos de potencia, una forma de energía que se genera a partir de vibraciones que se propagan en medio líquido en forma de expansiones-compresiones, las cuales facilitan la disgregación del sólido a partir de las elevadas temperaturas y altas presiones alcanzadas. Es muy habitual el uso de esta técnica ya que, en general, el tiempo de extracción requerido disminuye significativamente respecto a otras técnicas como la DM.

Otra técnica innovadora en la extracción de cannabinoides es la extracción asistida por microondas (MAE), la cual implica el uso de radiación de microondas para calentar el disolvente en contacto con la muestra, con el fin de que los analitos de la matriz de la muestra se disuelvan. La eficiencia de la MAE depende de diferentes factores como el tipo de disolvente, el tipo de muestra y, sobre todo, las constantes dieléctricas de la muestra y del disolvente, ya que cuanto mayor sea la constante dieléctrica, mayor será la cantidad de energía absorbida por las moléculas y más rápido alcanzará el sistema la temperatura de extracción deseada⁽⁵⁰⁾.

Asimismo, otro método de extracción innovador y a la vez respetuoso con el medioambiente es el basado en el uso de fluidos supercríticos (SFE) (ver Figura 5). Los fluidos supercríticos se caracterizan por presentar valores tanto de temperatura como de presión superiores a su punto crítico, lo cual les otorga una densidad similar a un fluido ordinario, siendo capaces de disolver un amplio espectro de compuestos, manteniendo las propiedades características de un gas⁽⁵¹⁾.

Los cambios de temperatura o presión cerca del punto crítico causan cambios significativos en la densidad del fluido supercrítico, lo cual facilita la separación entre el disolvente y el extracto. Normalmente se utiliza como fluido supercrítico el CO₂ por sus ventajas respecto a otros compuestos. En particular, el CO₂ destaca por ser muy abundante, no inflamable y relativamente inerte⁽⁴⁴⁾.

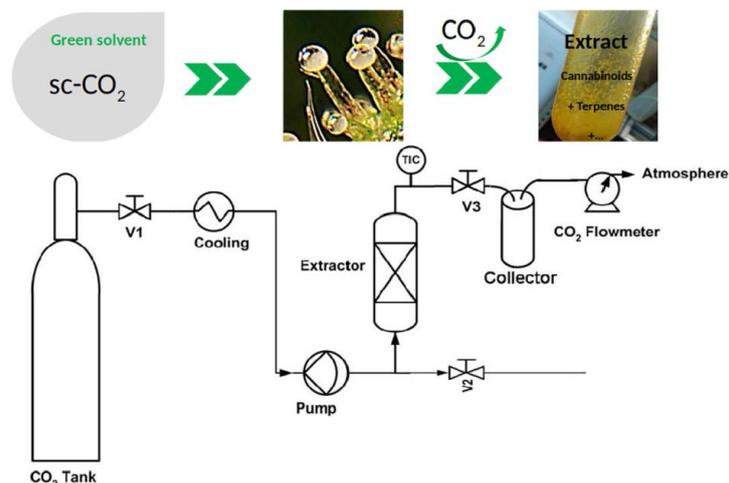


Figura 5. Diagrama esquemático de SFE⁽⁴⁴⁾.

Se han realizado diferentes estudios basados únicamente en la aplicación de fluidos supercríticos (principalmente CO₂) para la extracción de cannabinoides^(52,53,55,56), aunque el coste de este tipo de procedimientos dificulta su uso a gran escala.

En este contexto, Perrotin-Brunel et al.⁽⁵²⁾ determinaron la solubilidad de algunos cannabinoides puros (Δ^9 -THC, CBD, CBN y CBG) en SC-CO₂ a diferentes rangos de temperatura (315 a 345 K) y presión (11,3 a 25,1 MPa). La solubilidad de estos cuatro cannabinoides a 326 K siguió el siguiente orden: Δ^9 -THC <CBG <CBD <CBN. Además, se observó que el proceso de extracción dependía principalmente de la presión, en mayor medida que de otras variables, como por ejemplo la temperatura.

Por otra parte, en el trabajo de Rovetto y Aieta⁽⁵³⁾ se describen diferentes condiciones de SFE para explorar los efectos de la presión y la temperatura, así como el tiempo de extracción y el uso de etanol como cosolvente. Los experimentos, llevados a cabo a 328 K con presiones en un intervalo comprendido entre 17 y 34 MPa, permitieron comprobar cómo el rendimiento de extracción aumentaba con la presión. En el mismo estudio, se utilizó etanol como cosolvente para modificar la polaridad del disolvente y aumentar los rendimientos de extracción, ya que los datos existentes indican que la eficiencia de extracción de cannabinoides mejora dada la baja polaridad del SC-CO₂⁽⁵⁴⁾. En particular, se observó como su uso como cosolvente mejoró el rendimiento de extracción del compuesto Δ^9 -THC.

En otro estudio realizado por Moreno et al.⁽⁵⁵⁾ se utilizó SC-CO₂ para extraer cannabinoides tanto de cáñamo "descarboxilado" (previamente a la extracción la muestra se calentó a 150 °C) y de cáñamo sin descarboxilar. Se realizaron extracciones con propano licuado y dimetil éter para comparar con la extracción llevada a cabo con SC-CO₂. Se pudo observar que tanto el SC-CO₂ como el propano licuado permitieron una extracción eficiente de los cannabinoides tanto de la planta sin descarboxilar como del cáñamo "descarboxilado". Además, la descarboxilación previa a la extracción tuvo un efecto positivo en el rendimiento, ya que, en forma descarboxilada, los cannabinoides presentaron una mayor solubilidad en los disolventes no polares.

Respecto a la aplicación industrial, existen procesos patentados con la finalidad de obtener extractos ricos en Δ^9 -THC y CBD a partir de la extracción con SC-CO₂. En estos procesos industriales, se extrae Δ^9 -THC y CBD del cannabis realizando una etapa previa de calentamiento para convertir los cannabinoides ácidos en sus formas neutras, seguida de una etapa de extracción con SC-CO₂ y un paso final en el cual ocurre la precipitación etanólica de los cannabinoides a -20 °C durante 24 h, con la finalidad de eliminar la presencia de compuestos cerosos⁽⁵⁶⁾.

Las diferentes técnicas mencionadas, DM, UAE, MAE y SFE son muy habituales en diferentes procesos de extracción, motivo por el cual es habitual encontrarlas en diferentes trabajos también aplicadas a la extracción de cannabinoides^(4,57,58,59).

En un interesante estudio, Brighenti et al.⁽⁵⁷⁾ compararon las cuatro técnicas de extracción mencionadas con el fin de obtener elevados rendimientos de cannabinoides no psicoactivos a partir de *Cannabis sativa* L. En tres de los métodos se aplicó la misma proporción muestra-disolvente (m/v) y la misma cantidad de disolvente. La excepción fue la SFE, en la cual se utilizó SC-CO₂. El disolvente utilizado en la DM, la MAE y la UAE fue el etanol, ya que en un análisis inicial se observó como este disolvente era el que proporcionaba mayores rendimientos de extracción de los cannabinoides de interés. En el estudio, la DM resultó ser la mejor técnica para la obtención de elevados rendimientos de CBDA, mientras que la MAE fue la mejor técnica para la obtención de CBD (ver Figura 6), ya que la elevada temperatura alcanzada en este último método activa el proceso de descarboxilación parcial del CBDA, generándose de esta forma CBD. La conclusión, después de comparar los 4 métodos, fue que la DM, utilizando etanol como disolvente, a temperatura ambiente ($\approx 20\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 45 min, fue la técnica de extracción mediante la cual se obtuvieron los rendimientos de cannabinoides más elevados.

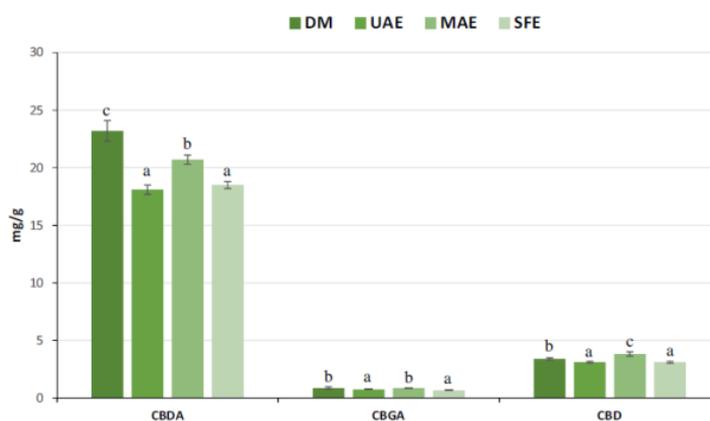


Figura 6. Gráfica comparativa del rendimiento de extracción obtenido mediante la aplicación de diferentes técnicas de extracción⁽⁵⁷⁾. (Valores con diferentes letras presentan diferencias significativas).

En otro estudio comparativo realizado por Baranauskaite et al.⁽⁵⁸⁾, se analizaron diferentes métodos de extracción también con la finalidad de obtener el mayor rendimiento de cannabinoides no psicoactivos a partir de *Cannabis sativa* L. En este caso, a diferencia del estudio anterior, se observó como la extracción mediante DM proporcionó las menores cantidades de CBD y CBG, mientras que mediante la UAE, llevada a cabo a temperatura ambiente, se obtuvieron las mayores cantidades de CBD y CBG.

Otros interesantes trabajos se han centrado en la comprobación de los parámetros que dan un mayor rendimiento de extracción mediante MAE y UAE^(57,59). Se ha observado que tanto la concentración de etanol como la proporción soluto/disolvente influyen significativamente en la MAE. Por su parte, De Vita et al.⁽⁵⁹⁾ determinaron las condiciones óptimas para la UAE de cannabinoides a partir de *Cannabis sativa* L. En concreto, en este estudio los rendimientos más elevados se obtuvieron mediante la extracción llevada a cabo a una temperatura de $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante un tiempo de 50 min.

Desde un punto de vista científico, no existe un consenso sobre el método más adecuado para la extracción de cannabinoides. De hecho, algunos de los estudios realizados presentan importantes divergencias en los resultados obtenidos, por lo cual es difícil unificar los criterios que aparecen en la literatura científica con el fin de establecer una metodología de extracción óptima.

3. Identificación y caracterización de cannabinoides

3.1 Técnicas analíticas

En las últimas décadas, se han identificado más de 100 cannabinoides en la planta *Cannabis sativa* L. Estos compuestos han sido determinados mediante diversas técnicas cromatográficas utilizando diferentes métodos de detección. En general, los métodos cromatográficos más utilizados han sido la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

La GC suele ser una técnica más simple y rápida que un método de HPLC para la detección de cannabinoides, lo que hace que en numerosas ocasiones se utilice la GC en análisis rutinarios, dada su simplicidad y, también, su elevada sensibilidad en la identificación y cuantificación de estos compuestos. Sin embargo, presenta una desventaja importante en el hecho de que los cannabinoides ácidos no pueden analizarse sin llevar a cabo una derivatización previa⁽⁶⁰⁾ mediante la cual se protege el grupo lábil carboxilo, ya que tanto en el inyector como en el detector del cromatógrafo de gases se alcanzan temperaturas muy elevadas, las cuales provocan la total o parcial descarboxilación de los cannabinoides ácidos⁽⁶¹⁾, convirtiéndose así en sus formas neutras, hecho que dificulta conocer el perfil químico real de los cannabinoides presentes en la planta.

En muchas ocasiones, dado que la derivatización es un proceso que requiere de una cantidad de tiempo importante, se opta por la técnica de HPLC, siendo el método más simple para la determinación de la composición original en cannabinoides presentes en la *Cannabis sativa* L. Haciendo uso de un detector que actúa por absorción de radiación ultravioleta (detector UV) o DAD (*Diode Array Detector*), los cannabinoides ácidos pueden analizarse eficientemente sin que se degraden los componentes de la muestra, al no haber calentamiento durante la separación⁽⁴⁾. El principal problema de esta técnica es la dificultad en la separación de los diferentes cannabinoides de interés en una sola prueba; para superarlo, el uso de un espectrómetro de masas (MS) acoplado al cromatógrafo para distinguir entre los picos cromatográficos superpuestos se está volviendo cada vez más importante⁽⁴⁾.

Otras técnicas analíticas han sido aplicadas al análisis de cannabinoides en *Cannabis sativa* L.^(4,80,81), aunque no han conseguido el alcance de las antes mencionadas.

3.2 Determinación de cannabinoides mediante GC

La GC es uno de los métodos analíticos más utilizados para el análisis de matrices biológicas y extractos de plantas. En esta técnica la muestra se volatiliza térmicamente y se inyecta en la columna (que contiene la fase estacionaria) mediante un flujo de gas inerte (normalmente He, N₂ o H₂) que es la fase móvil y actúa únicamente como gas portador.

Los principales elementos de un equipo de GC son el gas portador, el inyector, la columna, siendo las capilares de fase estacionaria apolar y pequeño diámetro las más habituales para la separación de los cannabinoides⁽⁶²⁾, y el detector (ver Figura 7). La selección de una columna y un detector adecuados son factores esenciales para conseguir la correcta caracterización de los compuestos objeto de estudio.

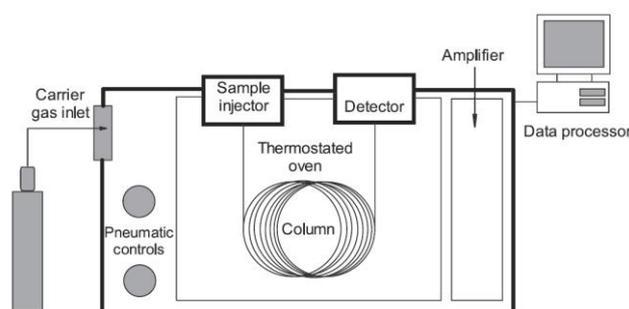


Figura 7. Diagrama de un sistema típico de cromatografía de gases⁽⁶²⁾.

Existen varios tipos de detectores, aunque el más utilizado para el análisis de cannabinoides es el detector de ionización de llama (FID). La espectrometría de masas acoplada al cromatógrafo de gases (GC-MS) también se suele utilizar, aunque la MS, más que un detector, se suele considerar como una técnica de análisis acoplada a la GC. En GC-MS, la ionización por impacto de electrones (EI) es la más habitual para la caracterización de cannabinoides, aunque hay técnicas de ionización más suaves, como la ionización química a presión atmosférica (APCI), la cual también se utiliza con frecuencia⁽⁶²⁾.

Varias técnicas analíticas basadas en GC han adquirido relevancia en el análisis de cannabinoides del *Cannabis sativa* L. En la Tabla 2 se presentan, de forma resumida, diferentes estudios basados en el análisis de cannabinoides mediante GC.

La técnica de GC fue aplicada ya en 1963 por Davis et al.⁽⁶³⁾ para la separación de cannabinoides, aunque la resolución obtenida no fuera la más adecuada. Durante esa época, ya se observó como las altas temperaturas conducían a la pérdida del grupo carboxilo de los cannabinoides ácidos, por lo tanto no era posible separar las formas neutras y ácidas a menos que se realizara una derivatización previa⁽⁶⁰⁾.

En la actualidad, el método de GC es utilizado por las autoridades a nivel europeo para cuantificar Δ^9 -THC en las diferentes variedades de cáñamo⁽⁴⁵⁾. Esta técnica presenta ciertos inconvenientes, además de la utilización de hexano como disolvente

de extracción. En general, este método sólo se utiliza para cuantificar Δ^9 -THC, no permite la identificación de las formas ácidas de los cannabinoides sin una derivatización previa, siendo la conversión de THCA a Δ^9 -THC incompleta.

En el análisis de cannabinoides, es muy habitual el uso de un detector FID. Por ejemplo, Hazekamp et al.⁽⁴⁾ estudiaron la posibilidad de aislar algunos de los cannabinoides más importantes del *Cannabis sativa* L. para posteriormente poder llevar a cabo el procedimiento a gran escala. Mediante GC-FID, pudieron identificar y separar adecuadamente Δ^9 -THC, CBD, CBG y CBN. Por otra parte, en el estudio de Gallo-Molina et al.⁽⁶⁴⁾, basado en la extracción, caracterización y posterior purificación de Δ^9 -THC, también se utilizó GC-FID para la cuantificación de su contenido y la verificación de la pureza de diferentes muestras de *Cannabis sativa* L.

Recientemente, un método GC-FID ha sido desarrollado por Ibrahim et al.⁽⁶⁵⁾ para la determinación y cuantificación de cannabinoides ácidos y neutros, concretamente CBD, Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, CBG, CBN, CBDA, CBGA y THCA. Este método implica la siliación de los extractos y presenta una sensibilidad y reproducibilidad elevadas, por lo que podría ser adecuado para la caracterización de este tipo de compuestos.

Además, cabe destacar también la publicación reciente de Baranauskaite et al.⁽⁵⁸⁾, basada en un método GC-FID, mediante el cual no se requiere la derivatización previa. No obstante, presenta ciertas desventajas, como la duración del cromatograma (se obtiene en unos 30 min), así como la cuantificación únicamente de los compuestos CBD y CBG.

En GC la derivatización juega un papel fundamental. Dado que muchos de los compuestos cannabinoides no son volátiles, el proceso de derivatización permite que lo sean para el análisis. En este contexto, Fodor y Molnar-Perl⁽⁶⁶⁾ estudiaron el papel de la derivatización en el análisis de cannabinoides mediante GC-MS. Estos autores observaron como el proceso de derivatización que ofreció mayores ventajas fue la siliación con grupos trimetilsililo; también se pudo observar como la alquilsililación con reactivos como el BSTFA (N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida) permitió la obtención de resultados aceptables.

Por su parte, Omar et al.⁽⁵⁴⁾ realizaron un estudio basado en la identificación y cuantificación de cannabinoides por GC-MS, previa extracción con CO₂ supercrítico. La SFE se realizó con el fin de eliminar terpenos y otros componentes volátiles de las muestras, lo cual facilitó el análisis de la mezcla de cannabinoides.

Recientemente, Cardenia et al.⁽⁶⁷⁾ desarrollaron y validaron un método de GC-MS para el análisis de cannabinoides del *Cannabis sativa* L., en el cual probaron diferentes métodos de derivatización con el objetivo de evitar la descarboxilación de los cannabinoides principales de la planta. De esta forma, pudieron detectar y cuantificar diferentes cannabinoides como CBN, CBD, CBDA, CBGA, CBG, THCA, Δ^9 -THC y Δ^8 -THC. También, cabe destacar que se consiguió un análisis completo de los cannabinoides en menos de 7 min, con buena sensibilidad y robustez.

Tabla 2. Análisis de cannabinoides en *Cannabis sativa* L. mediante cromatografía de gases.

Método de extracción	Condiciones de análisis	Técnica de determinación	Derivatización	Cannabinoides analizados
Extracción con n-hexano asistida por ultrasonidos	Temperatura del horno de 260 °C y del inyector y el detector de 300 °C. Volumen inyectado: 1 µL	GC-FID	-	Δ^9 -THC ⁽⁴⁵⁾
Extracción con SC-CO ₂	Temperatura inicial del horno de 60 °C alcanzando los 300 °C. Volumen inyectado: 2 µL a 300 °C. Gas portador: H ₂	GC-MS	-	Δ^9 -THC, CBD, CBN ⁽⁵⁴⁾
Extracción con metanol/cloroformo (9:1, v/v) asistida por ultrasonidos	Temperatura inicial del horno de 180 °C alcanzando los 350 °C. Volumen inyectado: 1µL a 300 °C. Gas portador: He	GC-MS	Sililación y esterificación	CBC, CBN, CBD, CBDA, CBGA, CBG, THCA, Δ^9 -THC, Δ^8 -THC ⁽⁶⁷⁾
Extracción con SC-CO ₂	Temperatura inicial de 200 °C y temperatura final de 260 °C. Volumen inyectado: 1 µL	GC-FID	-	Δ^9 -THC ⁽⁶⁴⁾
Extracción con n-hexano por maceración, seguida de 5 min de sonicación	Temperatura inicial de 100 °C y temperatura final de 280 °C. Temperatura del detector de 290 °C y del inyector de 280 °C. Gas portador: N ₂	GC-FID	-	Δ^9 -THC, CBD, CBG, CBN ⁽⁴⁾
Extracción con etanol	Temperatura inicial de 80 °C y temperatura final de 310 °C. Volumen inyectado: 1 µL a 290 °C. Gas portador: He	GC-FID	-	CBD, CBG ⁽⁵⁸⁾
Extracción con etanol asistida por ultrasonidos	Temperatura inicial de 200 °C y temperatura final de 260 °C. Volumen inyectado: 1 µL	GC-FID	-	Δ^9 -THC, CBD, CBN ⁽¹⁸⁾

Asimismo, cabe mencionar que el manual preparado por la UNODC para el análisis del cannabis y sus derivados describe un método de GC-FID para el análisis de CBD, Δ^9 -THC y CBN utilizando una columna con fase estacionaria apolar, utilizando como patrón interno, tribencilamina. Este método permite obtener el cromatograma en menos de 10 min. No obstante, en el caso de requerir la determinación de THCA, los extractos deben ser sometidos a un proceso de derivatización previo⁽¹⁸⁾.

Como se puede observar, para el análisis de cannabinoides, existe en la literatura científica una gran variedad de métodos basados en GC utilizando diferentes tipos de detección. Este hecho constata que se trata de una de las técnicas que permite obtener mejores resultados. No obstante, la necesidad de la derivatización para poder cuantificar las formas ácidas de los cannabinoides, ha dado lugar a la publicación de una gran cantidad de trabajos basados en la cromatografía líquida.

3.3 Determinación de cannabinoides mediante HPLC

La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) es una herramienta de gran utilidad para la determinación tanto de los cannabinoides ácidos como neutros que se encuentran presentes en la planta *Cannabis sativa* L. Se trata de una técnica analítica caracterizada por el hecho de que tanto la fase móvil como la estacionaria están en estado líquido. En HPLC, la separación se basa principalmente en las diferencias de solubilidad de los componentes en las dos fases. En este método, la fase estacionaria puede clasificarse como fase inversa (fase estacionaria menos polar que fase móvil) o fase normal (fase estacionaria más polar que fase móvil).

Al contrario que pasa en GC, donde la fase móvil únicamente tiene una función transportadora, en HPLC los solutos interactúan con las 2 fases, por lo tanto hay que tener en cuenta las polaridades tanto de las fases móvil y estacionaria, como de los analitos, con el objetivo de seleccionar las fases más adecuadas que permitan una correcta separación. La selección del tipo de columna y del detector apropiados también son fundamentales para la obtención de buenos resultados⁽⁶⁸⁾.

Actualmente, algunos estudios utilizan una técnica de cromatografía líquida avanzada denominada UHPLC (cromatografía líquida de ultra eficacia). Este método tiene la ventaja de presentar un tiempo de análisis más reducido y de ofrecer una alta eficacia en la separación y resolución de las diferentes mezclas de analitos⁽⁶⁸⁾.

La separación mediante UHPLC permite la detección de analitos a concentraciones muy bajas y requiere de volúmenes de inyección menores que en HPLC⁽⁶⁸⁾. No obstante, en el caso particular del análisis de cannabinoides, los estudios basados en la utilización de UHPLC son escasos, probablemente debido a que la utilización de elevadas presiones reduce de forma significativa la vida de la columna.

En los últimos años, se ha publicado una importante cantidad de literatura científica sobre el uso de métodos basados en HPLC (y algunos en UHPLC) para el análisis de cannabinoides naturales, lo cual demuestra la gran importancia de estas técnicas.

En la Tabla 3 se presentan algunos de los estudios más interesantes basados en la caracterización de cannabinoides en *Cannabis sativa* L. mediante HPLC y UHPLC.

Hazekamp et al.⁽⁴⁾ desarrollaron un método HPLC-DAD para el análisis de los principales cannabinoides del *Cannabis sativa* L. Además, en este estudio se realizó un segundo análisis mediante GC para cuantificar completamente los diferentes cannabinoides, dado que únicamente mediante HPLC no pudieron separar de forma completa los picos de CBGA y CBN y tampoco los de CBD y CBG. Para el HPLC, se utilizó una columna C18 y la fase móvil estaba compuesta por metanol y agua acidificada con ácido fórmico (HCOOH). Con este método, el tiempo requerido para obtener un cromatograma completo fue de 32 min.

Por otra parte, De Backer et al.⁽⁶⁹⁾ utilizaron HPLC y un detector DAD para la identificación y cuantificación de las formas neutras y ácidas de los cannabinoides principales en plantas de cannabis tanto de "tipo droga" como de "tipo fibra". Para ello, utilizaron una columna C18 y una fase móvil metanol/agua con formiato de amonio (HCOONH_4) 50 mM ajustada a pH 5,2. El método se optimizó para obtener las condiciones analíticas adecuadas, dado que la selectividad de los compuestos se modifica ajustando el pH del eluyente y, además, los tiempos de retención de los cannabinoides ácidos se ven afectados por cambios de pH. En general, se pudo obtener una buena separación de todos los cannabinoides, excepto en el caso de THCA y CBG donde hubo cierta superposición de los picos. Este método permite obtener un cromatograma completo en 36 min.

Un estudio más reciente realizado por Patel et al.⁽⁷⁰⁾ trató de mejorar las condiciones analíticas establecidas en el estudio de De Backer. En este estudio se utilizó como patrón interno ibuprofeno y la fase móvil consistió inicialmente en una mezcla metanol/agua con HCOONH_4 25 mM ajustada a pH 5,2, aunque posteriormente se sustituyó el HCOONH_4 por acetato de amonio ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) y se ajustó a pH 4,75, consiguiendo así evitar la co-elución de THCA y CBG que causaba serios problemas en el método de De Backer. La elución de los cannabinoides se llevó a cabo mediante un gradiente en la concentración de metanol; en concreto se aumentó el porcentaje de metanol desde un 68% hasta el 100% durante los primeros 9 min de análisis. Con este método se pudo obtener un cromatograma en menos de 10 min.

En otro interesante estudio, Giese et al.⁽⁷¹⁾ analizaron muestras de *Cannabis sativa* L. procedentes de 5 cultivares diferentes mediante HPLC-DAD, utilizando un método en el cual la separación de los cannabinoides se obtuvo en una columna C18 de 150 mm de longitud. Se utilizó como patrón interno el compuesto ibuprofeno y se realizó la cuantificación de todos los cannabinoides a 214 nm. Además, la fase móvil consistió en un 0,1% de HCOOH en agua (disolvente A) y en acetonitrilo (ACN) (disolvente B). La elución comenzó con una elución isocrática (66% en B) durante 8 min, seguida de un gradiente lineal hasta llegar al 95% de B (fase móvil). La robustez y la repetibilidad del método fueron aceptables, y el cromatograma se obtuvo en 17 min.

El manual preparado por la UNODC⁽¹⁸⁾ también describe un método de HPLC-DAD para el análisis de CBD, CBN, Δ^9 -THC y THCA en cannabis tras extracción con metanol/cloroformo, usando una columna C8 y una fase móvil compuesta por ACN y agua. En este caso, el tiempo para obtener el cromatograma completo es de 8 min.

Otro método HPLC-DAD, desarrollado por Peschel y Politi⁽⁷²⁾, fue utilizado para la separación y cuantificación de los siguientes cannabinoides: CBD, CBDA, CBG, CBGA, CBN, Δ^9 -THC y THCA. La fase móvil estaba compuesta por agua acidificada (A) y ACN (B), y se aplicó una elución en gradiente, aumentando gradualmente el porcentaje de B durante el análisis. Se utilizó un detector UV-DAD ajustado a 214 nm y una columna C18 para la cuantificación. Los resultados obtenidos fueron aceptables y se pudo determinar el siguiente orden de elución, según los tiempos de retención de cada compuesto: CBDA <CBGA <CBG <CBD <CBN < Δ^9 -THC <THCA.

En otro estudio reciente realizado por Hadener et al.⁽⁷³⁾ se usó la técnica HPLC/DAD para cuantificar los cannabinoides CBD, CBDA, CBN, Δ^9 -THC y THCA en muestras confiscadas de cannabis. En este estudio, se usó una fase móvil de agua (A)-ACN (B) (ambos con 0,1% de HCOOH). Se aplicó un gradiente que se inició con un 50 % del disolvente B, aumentando durante 7 min hasta el 65%, y disminuyendo finalmente hasta el 50% en 3 min. Este método podría aplicarse en análisis rutinarios de extractos de cannabis, ya que los cromatogramas se obtienen en 13 min.

Burnier et al.⁽⁷⁴⁾ han publicado un método de HPLC-DAD muy similar al anterior, aunque en lugar del gradiente con una fase móvil agua-ACN, la elución fue isocrática, siendo posible la detección de CBD, CBN, Δ^9 -THC y THCA en 5 min.

Asimismo, dos estudios realizados por Brighenti et al.⁽⁵⁷⁾ y Pellati et al.⁽⁷⁵⁾ respectivamente, basados en la utilización de la técnica HPLC-UV/DAD, utilizando como fase móvil agua (A)-ACN (B) (ambos con 0,1% de HCOOH), fueron utilizados recientemente con éxito para el análisis de inflorescencias de la planta *Cannabis sativa* L. El gradiente de elución se inició con un 60% de ACN, seguido por un aumento gradual hasta el 90%. Ambos métodos permitieron obtener un cromatograma completo en un tiempo próximo a los 30 min y demostraron ser una herramienta muy útil para el análisis de cannabinoides extraídos de la planta.

También es interesante destacar el método publicado por Gallo-Molina et al.⁽⁶⁴⁾ basado en la técnica HPLC-UV, en el cual se utilizó una columna C18 y ACN-agua como fase móvil, aplicando un gradiente lineal en el que aumenta la proporción de ACN, con el objetivo de determinar Δ^9 -THC en extractos de *Cannabis sativa* L.

La técnica de HPLC en tándem con espectrometría de masas (HPLC-MS/MS) fue aplicada por Aizpurua-Olaizola et al.⁽⁷⁶⁾ para el análisis de diferentes extractos de cannabis. Los cannabinoides fueron identificados tras ser aislados previamente mediante SFE. Para la separación de los cannabinoides se utilizó una columna C18, y la fase móvil consistió en un 0,1% de HCOOH, tanto en agua como en metanol. Con este método se consiguió registrar un cromatograma completo en 30 min.

Tabla 3. Análisis de cannabinoides en *Cannabis sativa* L. mediante HPLC y UHPLC.

Columna	Fase móvil	Detección	Cannabinoides analizados
GraceVydac C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm)	Gradiente metanol/agua con HCOOH 25 mM; caudal 1,5 mL/min; volumen inyección 10 µL; temperatura columna 30 °C	UV-DAD escanea a 200-400 nm, fijado a 228 nm	CBDA, THCA, Δ ⁹ -THC, Δ ⁸ -THC, CBCA, CBC ⁽⁴⁾
Waters XTerra® MS C18 (250 mm x 2,1 mm x 5 µm)	Metanol/agua con formiato de amonio 50 mM ajustado a pH 5,19 en modo gradiente. Caudal 0,3 mL/min, volumen de inyección de 30 µL y temperatura de columna 30 °C	UV-DAD escanea a 200-400 nm	CBD, CBDA, CBG, CBGA, Δ ⁹ -THC, THCA, CBN ⁽⁶⁹⁾
Chromolith C18	Gradiente ACN/agua, 5 a 100% de ACN. Caudal: 2 mL/min	Detector UV a 210 nm	Δ ⁹ -THC ⁽⁶⁴⁾
Poroshell 120 EC-C18 (150 mm x 2,1 mm x 2,7 µm)	0,1% HCOOH en agua (A) y ACN (B). 0-8 min elución isocrática, 8-12 min gradiente. Caudal 0,5 mL/min	UV-DAD escanea a 200-400 nm, fijado a 214 nm	CBD, CBDA, CBG, CBGA, Δ ⁹ -THC, THCA ⁽⁷¹⁾
Agilent Zorbax RX-C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm)	Temperatura columna: 25 °C. Caudal: 0,9 mL/min. Volumen inyección: 10 µL. A es una mezcla agua/ACN (65:35) con TFA al 0,1% y B es ACN. Elución en gradiente	UV-DAD ajustado a 214 nm	CBD, CBDA, CBG, CBGA, CBN, Δ ⁹ -THC, THCA ⁽⁷²⁾
Nucleodur® C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm)	0,1% de HCOOH en agua (A) y ACN (B). Elución isocrática con 80% de B en A. Caudal de 1-3 mL/min	UV-DAD ajustado a 211 nm	CBD, CBN, Δ ⁹ -THC, THCA ⁽⁷⁴⁾
Ascentis Express C18 (150 mm x 3 mm x 2,7 µm)	Gradiente agua/ACN, con 0,1% HCOOH. Caudal 0,4 mL/min, temperatura de columna 30 °C y volumen de inyección 3 µL	UV-DAD ajustado a 220 nm	CBD, CBDA, CBG, CBGA ^(57,75)
LiChrospher® RP-8 (250 mm x 4 mm x 5 µm)	ACN/agua, elución isocrática. Caudal 1 mL/min, volumen de inyección 10 µL y temperatura de columna 30 °C	DAD ajustado a 220 y 240 nm	CBD, CBN, Δ ⁹ -THC, THCA ⁽¹⁸⁾
Kinetex C18 (150 mm x 3 mm x 2,6 µm)	0,1% HCOOH en agua (A) y en metanol (B) en gradiente. Caudal 0,25 mL/min y volumen de inyección de 10 µL	ESI-MS	CBD, CBG, CBN, Δ ⁹ -THC, THCA ⁽⁷⁶⁾
Acquity UHPLC BEH C18 (50 mm x 2,1 mm x 1,6 µm)	Gradiente del 45% al 100% de ACN (B) en etanol (A), con un caudal 0,35 mL/min y temperatura de columna 45 °C	UV-DAD-MS	CBC, CBDA, CBG, CBGA, CBN, Δ ⁹ -THC, THCA ⁽⁷⁷⁾
Waters Cortec UHPLC C18 (100 mm x 2,1 mm x 1,6 µm)	Elución en gradiente con HCOOH al 0,05% en agua (A) y en ACN (B). Caudal de 0,25 mL/min	UV-DAD-MS	CBC, CBD, CBDA, CBG, CBGA, CBN, Δ ⁸ -THC, Δ ⁹ -THC, THCA ⁽⁷⁸⁾
Acquity UHPLC HSS C18 (100 mm x 2,1 mm x 1,8 µm)	Elución en gradiente de metanol (A) y 0,1% HCOOH en agua (B). Caudal 0,35 mL/min, temperatura de columna 45 °C	DAD ajustado a 211 y 220 nm	Δ ⁹ -THC, THCA, CBD, CBDA, CBG, CBGA ⁽⁷⁹⁾

En los últimos años, el uso de UHPLC en el análisis de cannabinoides está siendo cada vez más habitual. Recientemente, dos estudios publicados por Fekete et al.⁽⁷⁷⁾ y Wang et al.⁽⁷⁸⁾, ambos basados en UHPLC-DAD-MS para el análisis de cannabinoides, permitieron la correcta caracterización de cannabinoides como CBD, CBDA, CBG, CBGA, CBN, Δ^8 -THC, Δ^9 -THC y THCA en *Cannabis sativa* L.

Asimismo, aún más reciente es el estudio de Deville et al.⁽⁷⁹⁾, el cual describe un método basado en la técnica UHPLC-DAD que permite caracterizar Δ^9 -THC, THCA, CBD, CBDA, CBG, CBGA y CBN en diferentes muestras de cannabis. En este estudio, el patrón interno utilizado fue prazepam y la fase móvil consistió en metanol (A) y HCOOH al 0,1% en agua (B), aplicando un gradiente de elución desde el 65% de fase móvil A, aumentando linealmente hasta el 78%, llegando posteriormente hasta el 95% de A. Este método permite obtener un cromatograma en unos 16 min.

Durante estos últimos años, los métodos analíticos basados en HPLC y UHPLC han sido muy habituales y efectivos para la detección y cuantificación de cannabinoides naturales. Sin embargo, el uso de UHPLC está adquiriendo mayor notoriedad debido a su mayor precisión y su menor tiempo de ejecución.

3.4 Otras técnicas para el análisis de cannabinoides

Un método alternativo para el análisis de cannabinoides es la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN). La RMN es una técnica precisa y reproducible con un tiempo de análisis relativamente corto⁽⁴⁴⁾. Además, la principal ventaja de esta técnica es su falta de sensibilidad hacia muchas de las impurezas presentes en el material vegetal, tales como la clorofila y los diferentes compuestos lipídicos.

Hazekamp et al.⁽⁴⁾ desarrollaron un método para analizar cuantitativamente CBN, CBD, CBDA, Δ^9 -THC y THCA utilizando ^1H -RMN. El experimento se llevó a cabo mediante el análisis de singletes en el rango de 4 a 7 ppm en el espectro ^1H -RMN, en el cual se hallan las señales distinguibles de cada cannabinoide.

En otro estudio realizado por Marchetti et al.⁽⁸⁰⁾, para caracterizar los principales cannabinoides no psicoactivos en *Cannabis sativa* L., mediante RMN cuantitativa de ^{13}C (^{13}C -qRMN), también se obtuvieron resultados precisos, aunque el tiempo requerido para la obtención del espectro fue de 47 min.

Finalmente cabe mencionar la publicación de un reciente estudio basado en el análisis cualitativo y cuantitativo de cannabinoides mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). En concreto, en el trabajo realizado por Sánchez-Carnerero Callado et al.⁽⁸¹⁾ se pudieron cuantificar los compuestos CBD, CBC, Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, CBG y CBN mediante espectroscopía del infrarrojo cercano (NIR). A partir de diferentes modelos matemáticos, se consiguió obtener un método simple y preciso que podría ser adecuado en un futuro próximo para la caracterización de diferentes muestras de *Cannabis sativa* L.

4. Conclusiones

A partir de lo que se ha expuesto en el presente trabajo, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- En la actualidad, a pesar de la controversia existente relacionada con el cultivo y el uso de la planta *Cannabis sativa* L. debida principalmente a las propiedades psicoactivas de los cannabinoides, la presencia de componentes no psicoactivos ha generado, desde un punto de vista científico, un enorme interés.
- La literatura científica revisada muestra con los años una tendencia clara a adoptar técnicas de extracción menos nocivas para la salud y el medioambiente. Si bien es cierto que los métodos convencionales son eficaces para obtener elevados rendimientos de extracción y que las condiciones de extracción son relativamente fáciles de alcanzar, con temperaturas y presiones cercanas a los valores ambientales, la toxicidad de los disolventes empleados hace que, hoy en día, su utilización no sea la más adecuada.
- Los procesos de extracción asistidos con tecnologías innovadoras en este campo, como los fluidos supercríticos o los ultrasonidos de potencia, están reemplazando gradualmente a los métodos convencionales. Se trata de tecnologías benignas con el medio ambiente que generan nuevos protocolos para el análisis de los compuestos cannabinoides presentes en el cannabis.
- De las diferentes técnicas publicadas, tanto la cromatografía de gases (GC) como la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC/UHPLC) son las que, actualmente, han demostrado ser las más eficaces para el análisis cualitativo y cuantitativo de los cannabinoides presentes en la planta *Cannabis sativa* L.
- Los métodos basados en HPLC, a pesar de su mayor complejidad técnica, presentan la ventaja ante la GC de que no requieren del paso previo de la derivatización de la muestra, por lo cual pueden determinarse los cannabinoides tanto en sus formas ácidas como neutras, es decir, tal como se encuentran en la planta.
- Además de los métodos cromatográficos, se han publicado recientemente nuevas metodologías analíticas para la identificación y caracterización de los cannabinoides presentes en *Cannabis sativa* L. No obstante, la estandarización de protocolos para estos nuevos métodos aún se encuentra en fase de desarrollo, por lo cual es complicado valorar su rendimiento y eficacia para que puedan ser utilizados en un laboratorio de forma rutinaria.

5. Anexos

Anexo I. Abreviaturas utilizadas en la memoria.

Abreviatura	Significado
Δ^8 -THC	Δ^8 -tetrahidrocannabinol
Δ^9 -THC	Δ^9 -tetrahidrocannabinol
ACN	Acetonitrilo
APCI	Ionización química a presión atmosférica
BSTFA	N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
CBC	Cannabicromeno
CBCA	Ácido cannabicroménico
CBD	Cannabidiol
CBDA	Ácido cannabidiólico
CBG	Cannabigerol
CBGA	Ácido cannabigerólico
CBN	Cannabinol
DESs	<i>Deep eutectic solvents</i>
DM	Maceración dinámica
EI	Ionización por impacto de electrones
ESI-MS	Espectrometría de masas con ionización por electrospray
FT-IR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
GC	Cromatografía de gases
GC-FID	Cromatografía de gases con detector de ionización de llama
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada con espectrómetro de masas
GPP	Pirofosfato de geranilo
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HPLC-DAD	Cromatografía líquida de alta eficacia con detección con <i>Diode Array Detector</i>
HPLC-MS/MS	Cromatografía líquida de alta eficacia acoplada con espectrómetro de masas
HPLC-UV	Cromatografía líquida de alta eficacia con espectroscopía ultravioleta
MAE	Extracción asistida por microondas
RMN	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear
RSM	Metodología de superficie de respuesta
SC-CO ₂	CO ₂ supercrítico
SFE	Extracción con fluido supercrítico
THCA	Ácido tetrahidrocannabinólico
UAE	Extracción asistida por ultrasonidos
UHPLC	Cromatografía líquida de ultra eficacia
UHPLC-DAD-MS	Cromatografía líquida de ultra eficacia con un <i>Diode Array Detector</i> y espectrometría de masas tándem
UNODC	<i>United Nation Office on Drugs and Crime</i>

6. Bibliografía

- (1) Schultes, R.E. Random thoughts and queries on the botany of Cannabis. The Botany & Chemistry of Cannabis. J. & A. Churchill-London. **1970**, 49-55.
- (2) Andre, C. M., Hausman, J. F., Guerriero, G. *Cannabis sativa*: The Plant of the Thousand and One Molecules. *Front. Plant Sci.* **2016**, 7, 19.
- (3) Hanuš, L. O., Meyer, S. M., Muñoz, E., Tagliatatela-Scafati, O., Appendino, G. Phytocannabinoids: a unified critical inventory. *Nat. Prod. Rep.* **2016**, 33(12), 1357-1392.
- (4) Hazekamp, A. Cannabis; extracting the medicine. PhD thesis, Universiteit Leiden, **2007**.
- (5) Plan Nacional sobre Drogas.
<https://pnsd.sanidad.gob.es/pnsd/legislacion/pdfestatal/i2.pdf> (acceso: día 14 de julio de 2020)
- (6) **Reglamento (UE) Nº 1307/2013** del Parlamento Europeo y del Consejo de 17 de diciembre de 2013 por el que se establecen normas aplicables a los pagos directos a los agricultores en virtud de los regímenes de ayuda incluidos en el marco de la Política Agrícola Común y por el que se derogan los Reglamentos (CE) nº 637/2008 y (CE) nº 73/2009 del Consejo.
- (7) Hemphill, J. K., Turner, J. C., Mahlberg, P. G. Cannabinoid content of individual plant organs from different geographical strains of *Cannabis sativa* L. *J. Natural Prod.* **1980**, 43, 112-122.
- (8) Russo, E. B., Marcu, J. Cannabis Pharmacology: The Usual Suspects and a Few Promising Leads. *Adv. Pharmacol.* **2017**, 80, 67-134.
- (9) Hillig, K. W., Mahlberg, P. G. A chemotaxonomic analysis of cannabinoid variation in Cannabis (Cannabaceae). *Am. J. Bot.* **2004**, 91(6), 966-975.
- (10) Khan, B., Warner, P., Wang, H. Antibacterial properties of hemp and other natural fibre plants: a review. *Bioresources.* **2015**, 9, 3642-3659.
- (11) Glivar, T., Eržen, J., Kreft, S., Zagožen, M., Čerenak, A., Čeh, B., Tavčar Benković, E. Cannabinoid content in industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) varieties grown in Slovenia. *Ind. Crop. Prod.* **2020**, 145, 112082.
- (12) Ross, S. A., ElSohly, M. A. CBN and Δ^9 -THC concentration ratio as an indicator of the age of stored marijuana samples. *Bull. Narc.* **1997**, 49, 139-147.
- (13) McPartland, J. M. Cannabis Systematics at the Levels of Family, Genus, and Species. *Cannabis Cannabinoid Res.* **2018**, 3(1), 203-212.
- (14) Small, E., Beckstead, H. D., Chan, A. The evolution of cannabinoid phenotypes in Cannabis. *Economic Botany.* **1975**, 29, 219-232.
- (15) Fetterman, P. S., Keith, E. S., Waller, C. W., Guerrero, O., Doorenbos, N. J., Quimby, M. W. Mississippi-grown *Cannabis sativa* L: preliminary observation on chemical definition of phenotype and variations in tetrahydrocannabinol content versus age, sex, and plant part. *J. Pharm. Sci.* **1971**, 60(8), 1246-1249.
- (16) Small, E., Beckstead, H. D. Cannabinoid phenotypes in *Cannabis sativa*. *Nature.* **1973**, 245(5421), 147-148.
- (17) Fournier, G. Paris, M. R. Le chanvre papetier (*Cannabis sativa* L.) cultivé en France: Le point sur les constituants. *Plant Med. Phytother.* **1979**, 13, 116-121.
- (18) United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). Recommended methods for the identification and analysis of cannabis and cannabis products.
https://www.unodc.org/documents/scientific/ST-NAR-40-Ebook_1.pdf (acceso: 30 de julio de 2020)
- (19) Aizpurua-Olaizola, O., Soydaner, U., Öztürk, E., Schibano, D., Simsir, Y., Navarro, P., Etxebarria, N., Usobiaga, A. Evolution of the Cannabinoid and

- Terpene Content during the Growth of Cannabis sativa Plants from Different Chemotypes. *J. Nat. Prod.* **2016**, 79(2), 324-331.
- (20) European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). Cannabis legislation in Europe: An overview. <https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/4135/TD0217210ENN.pdf> (acceso: 14 de julio de 2020)
- (21) Potter, D. J. Cannabis Horticulture. En: *Handbook of Cannabis*. **2014**, 82-83.
- (22) Mechoulam, R., Gaoni, Y. Recent advances in the chemistry of hashish. *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* **1967**, 25, 175-213.
- (23) Radwan, M. M., Elsohly, M. A., Slade, D., Ahmed, S. A., Khan, I. A., Ross, S. A. Biologically active cannabinoids from high-potency Cannabis sativa. *J. Nat. Prod.* **2009**, 72(5), 906-911.
- (24) Russo, E. B. Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *Br. J. Pharmacol.* **2011**, 163(7), 1344-1364.
- (25) Flores-Sanchez, I. J., Verpoorte, R. Secondary metabolism in cannabis. *Phytochem. Rev.* **2008**, 7, 615-639.
- (26) Pate, D. Chemical ecology of cannabis. *J. Int. Hemp Assoc.* **1994**, 2, 32-7.
- (27) Gonzalez, R., Carey, C., Grant, I. Nonacute (residual) neuropsychological effects of cannabis use: a qualitative analysis and systematic review. *J. Clin. Pharmacol.* **2002**, 42(S1), 48S-57S.
- (28) Bow, E. W., Rimoldi, J. M. The Structure-Function Relationships of Classical Cannabinoids: CB1/CB2 Modulation. *Perspect. Medicin. Chem.* **2016**, 8, 17-39.
- (29) Gaoni, Y., Mechoulam, R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 8, 1646-1647.
- (30) Claussen, U., von Spulak, F., Korte, F. Zur chemischen klassifizierung von pflanzen-XXXI, haschisch-X: Cannabichromen, ein neuer haschisch-inhalts-stoff. *Tetrahedron.* **1966**, 22(4), 1477-1479.
- (31) Gaoni, Y., Mechoulam, R. Cannabichromene, a new active principle in hashish. *Chem. Commun.* 1966, 20-21.
- (32) Raharjo, T. J., Chang, W. T., Choi, Y. H., Peltenburg-Looman, A. M. G., Verpoorte, R. Olivetol as product of a polyketide synthase in *Cannabis sativa* L. *Plant Sci.* **2004**, 166, 381-385.
- (33) Sirikantaramas, S., Taura, F., Morimoto, S., Shoyama, Y. Recent advances in Cannabis sativa research: biosynthetic studies and its potential in biotechnology. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2007**, 8(4), 237-243.
- (34) Fellermeier, M., Zenk, M. H. Prenylation of olivetolate by a hemp transferase yields cannabigerolic acid, the precursor of tetrahydrocannabinol. *FEBS letters.* **1998**, 427(2), 283-285.
- (35) Lehmann, T., Brenneisen, R. High Performance Liquid Chromatographic Profiling of Cannabis Products. *J. Liq. Chromatogr.* **1995**, 18(4), 689-700.
- (36) Iffland, K., Grotenhermen, F. An Update on Safety and Side Effects of Cannabidiol: A Review of Clinical Data and Relevant Animal Studies. *Cannabis Cannabinoid Res.* **2017**, 2(1), 139-154.
- (37) Lim, K., See, Y. M., Lee, J. A Systematic Review of the Effectiveness of Medical Cannabis for Psychiatric, Movement and Neurodegenerative Disorders. *Clin. Psychopharmacol. Neurosci.* **2017**, 15(4), 301-312.
- (38) Lu, H. C., Mackie, K. An Introduction to the Endogenous Cannabinoid System. *Biol. Psychiatry.* **2016**, 79(7), 516-525.
- (39) Pertwee, R. G. The diverse CB₁ and CB₂ receptor pharmacology of three plant cannabinoids: Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabivarin. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, 153(2), 199-215.

- (40) Darmani, N. A. Antiemetic action of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and synthetic cannabinoids in chemotherapy-induced nausea and vomiting. En: *Biology of Marijuana: From Gene to Behavior*. **2002**, 356-389.
- (41) Tomida, I., Pertwee, R. G., Azuara-Blanco, A. Cannabinoids and glaucoma. *Br. J. Ophthalmol.* **2004**, 88(5), 708-713.
- (42) Zajicek, J., Fox, P., Sanders, H., Wright, D., Vickery, J., Nunn, A., Thompson, A., UK MS Research Group. Cannabinoids for treatment of spasticity and other symptoms related to multiple sclerosis (CAMS study): multicentre randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. **2003**, 362(9395), 1517-1526.
- (43) Citti, C., Braghiroli, D., Vandelli, M. A., Cannazza, G. Pharmaceutical and biomedical analysis of cannabinoids: A critical review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2018**, 147, 565-579.
- (44) Lujan Ramirez, C., Fanovich, M. A., Churio, M. S. Cannabinoids: Extraction Methods, Analysis, and Physicochemical Characterization. En: *Studies in Natural Products Chemistry*. **2019**, (61), 143-173.
- (45) **Reglamento (CE) Nº 1177/2000** de la comisión de 31 de mayo de 2000 por el que se modifica el Reglamento (CEE) nº 1164/89 relativo a las disposiciones de aplicación de la ayuda para el lino textil y el cáñamo.
- (46) T. Veress, T., Szanto, J. I., Leisztner, L. Determination of cannabinoid acids by high-performance liquid chromatography of their neutral derivatives formed by thermal decarboxylation: I. Study of the decarboxylation process in open reactors. *J. Chromatogr.* **1990**, 520, 339-347.
- (47) Abbott, A. P., Capper, G., Davies, D. L., Rasheed, R. K., Tambyrajah, V. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chem. Commun. (Camb)*. **2003**, (1), 70-71.
- (48) Cai, C., Yu, W., Wang, C., Liu, L., Li, F., Tan, Z. Green extraction of cannabidiol from industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) using deep eutectic solvents coupled with further enrichment and recovery by macroporous resin. *J. Mol. Liq.* **2019**, 287, 110957.
- (49) Tang, B., Zhang, H., Row, K. H. Application of deep eutectic solvents in the extraction and separation of target compounds from various samples. *J. Sep. Sci.* **2015**, 38(6), 1053-1064.
- (50) Duarte, K., Justino, C. I. L., Gomes, A. M., Rocha-Santos, T., Duarte, A. C. Green Analytical Methodologies for Preparation of Extracts and Analysis of Bioactive Compounds. En: *Comprehensive Analytical Chemistry*. **2014**, (65), 59-78.
- (51) Khaw, K. Y., Parat, M. O., Shaw, P. N., & Falconer, J. R. Solvent Supercritical Fluid Technologies to Extract Bioactive Compounds from Natural Sources: A Review. *Molecules*. **2017**, 22(7), 1186.
- (52) Perrotin-Brunel, H., Kroon, M. C., van Roosmalen, M. J. E., van Spronsen, J., Peters, C. J., Witkamp, G. Solubility of non-psychoactive cannabinoids in supercritical carbon dioxide and comparison with psychoactive cannabinoids. *J. Supercrit. Fluids*. **2010**, 55, 603-608.
- (53) Rovetto, L. J., Aieta, N. V. Supercritical carbon dioxide extraction of cannabinoids from *Cannabis sativa* L. *J. Supercrit. Fluids*. **2017**, 129, 16-27.
- (54) Omar, J., Olivares, M., Alzaga, M., Etxebarria, N. Optimisation and characterisation of marijuana extracts obtained by supercritical fluid extraction and focused ultrasound extraction and retention time locking GC-MS. *J. Sep. Sci.* **2013**, 36(8), 1397-1404.
- (55) Moreno, T., Montanes, F., Tallon, S. J., Fenton, T., King, J. W. Extraction of cannabinoids from hemp (*Cannabis sativa* L.) using high pressure solvents: An overview of different processing options. *J. Supercrit. Fluids*. **2020**, 161, 104850.

- (56) Whittle, B., Hill, C. A., Flockhart, I. R., Downs, D. V., Gibson, P., Wheatley, G. W., US 7344736B2 Patent, **2008**.
- (57) Brighenti, V., Pellati, F., Steinbach, M., Maran, D., Benvenuti, S. Development of a new extraction technique and HPLC method for the analysis of non-psychoactive cannabinoids in fibre-type *Cannabis sativa* L. (hemp). *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2017**, 143, 228-236.
- (58) 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. *santicha* (hemp). *Phytochem. Analysis.* **2020**, 31, 516-521.
- (59) De Vita, D., Madia, V. N., Tudino, V., Saccoliti, F., De Leo, A., Messore, A., Roscilli, P., Botto, A., Pindinello, I., Santilli, G., Scipione, L., Costi, R., Di Santo, R. Comparison of different methods for the extraction of cannabinoids from cannabis. *Nat. Prod. Res.* **2019**, 1-7.
- (60) Lercker, G., Bocci, F., Frega, N., Bortolomeazzi, R. Cannabinoid acids analysis. *Farmaco.* **1992**, 47(3), 367-378.
- (61) Dussy, F. E., Hamberg, C., Luginbühl, M., Schwerzmann, T., Briellmann, T. A. Isolation of Δ^9 -THCA-A from hemp and analytical aspects concerning the determination of Δ^9 -THC in cannabis products. *Forensic. Sci. Int.* **2005**, 149(1), 3-10.
- (62) Nahar, L., Guo, M., Sarker, S. D. Gas chromatographic analysis of naturally occurring cannabinoids: A review of literature published during the past decade. *Phytochem. Anal.* **2020**, 31, 135-146.
- (63) Davis, T. W. M., Farmilo, C. G., Osadchuk, M. Identification and Origin Determinations of Cannabis by Gas and Paper Chromatography. *Anal. Chem.* **1963**, 35, 6, 751-755.
- (64) Gallo-Molina, A. C., Castro-Vargas, H. I., Garzón-Méndez, W. F., Martínez Ramírez, J. A., Rivera Monroy, Z. J., King, J. W., Parada-Alfonso, F. Extraction, isolation and purification of tetrahydrocannabinol from the *Cannabis sativa* L. plant using supercritical fluid extraction and solid phase extraction. *J. Supercrit. Fluids.* **2019**, 146, 208-216.
- (65) Ibrahim, E. A., Gul, W., Gul, S. W., Stamper, B. J., Hadad, G. M., Abdel Salam, R. A., Ibrahim, A. K., Ahmed, S. A., Chandra, S., Lata, H., Radwan, M. M., ElSohly, M. A. Determination of Acid and Neutral Cannabinoids in Extracts of Different Strains of Cannabis sativa Using GC-FID. *Planta med.* **2018**, 84(4), 250-259.
- (66) Fodor, B., Molnar-Perl, I. The role of derivatization techniques in the analysis of plant cannabinoids by gas chromatography mass spectrometry. *TrAC-Trends Anal. Chem.* **2017**, 95, 149-158.
- (67) Cardenia, V., Gallina Toschi, T., Scappini, S., Rubino, R. C., Rodriguez-Estrada, M. T. Development and validation of a Fast gas chromatography/mass spectrometry method for the determination of cannabinoids in *Cannabis sativa* L. *J. Food Drug Anal.* **2018**, 26(4), 1283-1292.
- (68) Nahar, L., Onder, A., Sarker, S. D. A review on the recent advances in HPLC, UHPLC and UPLC analyses of naturally occurring cannabinoids (2010-2019). *Phytochem. Anal.* **2020**, 31, 413-457.
- (69) De Backer, B., Debrus, B., Lebrun, P., Theunis, L., Dubois, N., Decock, L., Verstraete, A., Hubert, P., Charlier, C. 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 Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2009**, 877(32), 4115-4124.
- (70) Patel, B., Wene, D., Fan, Z. Qualitative and quantitative measurement of cannabinoids in cannabis using modified HPLC/DAD method. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2017**, 146, 15-23.

- (71) Giese, M. W., Lewis, M. A., Giese, L., Smith, K. M. Development and Validation of a Reliable and Robust Method for the Analysis of Cannabinoids and Terpenes in Cannabis. *J. AOAC Int.* **2015**, 98(6), 1503-1522.
- (72) Peschel, W., Politi, M. ¹H NMR and HPLC/DAD for *Cannabis sativa* L. chemotype distinction, extract profiling and specification. *Talanta.* **2015**, 140, 150-165.
- (73) Hädener, M., König, S., Weinmann, W. Quantitative determination of CBD and THC and their acid precursors in confiscated cannabis samples by HPLC-DAD. *Forensic. Sci. Int.* **2019**, 299, 142-150.
- (74) Burnier, C., Esseiva, P., Roussel, C. Quantification of THC in cannabis plants by fast-HPLC-DAD: A promising method for routine analyses. *Talanta.* **2019**, 192, 135-141.
- (75) Pellati, F., Brighenti, V., Sperlea, J., Marchetti, L., Bertelli, D., Benvenuti, S. New methods for the comprehensive analysis of bioactive compounds in *Cannabis sativa* L. (hemp). *Molecules.* **2018**, 23(10), 2639.
- (76) Aizpurua-Olaizola, O., Omar, J., Navarro, P., Olivares, M., Etxebarria, N., Usobiaga, A. Identification and quantification of cannabinoids in *Cannabis sativa* L. plants by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, 406(29), 7549-7560.
- (77) Fekete, S., Sadat-Noorbakhsh, V., Schelling, C., Molnár, I., Guillaume, D., Rudaz, S., Veuthey, J. L. Implementation of a generic liquid chromatographic method development workflow: Application to the analysis of phytocannabinoids and Cannabis sativa extracts. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2018**, 155, 116-124.
- (78) Wang, Y. H., Avula, B., ElSohly, M. A., Radwan, M. M., Wang, M., Wanas, A. S., Mehmedic, Z., Khan, I. A. Quantitative determination of THC, CBG, CBD, their acid precursors and five other neutral cannabinoids by UHPLC-UV-MS. *Planta med.* **2018**, 84(4), 260-266.
- (79) Deville, M., Dubois, N., Denooz, R., Charlier, C. Validation of an UHPLC/DAD method for the determination of cannabinoids in seized materials: Analysis of 213 samples sold in Belgian CBD shops. *Forensic. Sci. Int.* **2020**, 310, 110234.
- (80) Marchetti, L., Brighenti, V., Rossi, M. C., Sperlea, J., Pellati, F., Bertelli, D. Use of ¹³C-qNMR Spectroscopy for the Analysis of Non-Psychoactive Cannabinoids in Fibre-Type *Cannabis sativa* L. *Molecules.* **2019**, 24(6), 1138.
- (81) Sánchez-Carnerero Callado, C., Núñez-Sánchez, N., Casano, S., Ferreira-Vera, C. The potential of near infrared spectroscopy to estimate the content of cannabinoids in *Cannabis sativa* L.: A comparative study. *Talanta.* **2018**, 190, 147-157.