



**Universidad de Valladolid**

Facultad de Ciencias

## **TRABAJO FIN DE MÁSTER**

**Máster en Técnicas Avanzadas en Química. Análisis y  
Control de Calidad Químicos**

**Estudio para la determinación de cannabidiol (CBD).  
Aplicación a su determinación en plantas de cannabis**

***Autor: Paola Ibáñez García***

***Tutor: Dr. Luis Deban Miguel***

***Dpto. Química Analítica***

***Cotutor: Dr. Jesús M. Tejedor Muñoz***

***Delegación del Gobierno en Castilla y León***



## Resumen

El cannabidiol (CBD) es uno de los cannabinoides más importantes, junto con el  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol (THC), de la planta *Cannabis sativa*. En los últimos años, el interés por el CBD ha aumentado por su potencial terapéutico, ya que posee efectos antiinflamatorios, antioxidantes, antieméticos y ansiolíticos. Además, de que no es psicotrópico.

Al no ser posible distinguir la proporción de CBD y THC en el cannabis en base a su apariencia, se necesitan métodos de análisis para caracterizar y cuantificar estos compuestos. Los métodos utilizados para la determinación de CBD son cromatografía de líquidos HPLC y cromatografía de gases. En HPLC, con un detector de UV-Visible a 206 nm, la fase móvil utilizada en los extractos de la planta de cannabis es 60% metanol, 30% acetonitrilo y 10% agua. El pico de CBD se obtiene en torno a los 3 min.

En el caso de GC, las condiciones son: temperatura del inyector 290 °C; temperatura inicial del horno 200 °C (1.5 min), rampa de 40 °C/min hasta 270 °C (2 min); temperatura del detector 350 °C. En estas condiciones el CBD se determina a 4.3 min. Además de los extractos de la planta de cannabis, se ha estudiado la posibilidad de determinar el CBD mediante HPLC y GC en muestras adulteradas.

## Abstract

Cannabidiol (CBD) is one of the most important cannabinoids of *Cannabis sativa*, along with  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol (THC). In recent years, interest in CBD has increased due to its possibilities as a medicine with anti-inflammatory, antioxidant, antiemetic and antianxiety effects. In addition, CBD is not a psychotropic substance.

As it is not possible to distinguish the ratio of CBD and THC in cannabis based on its appearance, analytical methods are needed to characterize and quantify these compounds. The techniques used for the determination of CBD are HPLC and gas chromatography. In HPLC, using a UV-VIS detector set to 206 nm, the mobile phase used in the extracts of cannabis is formed by 60% methanol, 30% acetonitrile and 10% water. The characteristic peak of CBD is obtained around 3 min.

Using GC, the initial temperature of the oven is 200 °C for 1.5 min. Then, ramping at a rate of 40 °C/min until 270 °C. The oven is kept at this temperature for 2 min. The injector temperature is 290 °C and the detector temperature is 350 °C. Under these conditions, CBD is determined at 4.3 min. In addition to extracts from cannabis, the possibility of determining CBD by HPLC and GC in adulterated samples has been studied.



## Índice

<b>1. Introducción</b> .....	11
1.1. Introducción.....	11
1.2. Justificación del trabajo.....	12
1.3. Características físico-químicas de compuestos analizados en el trabajo.....	14
1.4. Objetivos del trabajo.....	16
<b>2. Técnicas utilizadas</b> .....	17
2.1. Espectroscopia de absorción molecular UV-VIS.....	17
2.2. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).....	17
2.3. Cromatografía de gases (GC).....	17
<b>3. Antecedentes bibliográficos</b> .....	19
<b>4. Reactivos y equipos empleados</b> .....	22
<b>5. Cannabidiol (CBD). Parte experimental y resultados</b> .....	24
5.1. Espectroscopia UV-VIS.....	24
5.1.1. Influencia de la concentración.....	24
5.1.2. Estudio con respecto al tiempo.....	26
5.2. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).....	26
5.2.1. Estudio de la fase móvil y calibrados.....	26
5.3. Cromatografía de gases (GC).....	31
<b>6. Cannabidiol (CBD) en muestras adulteradas. Parte experimental y resultados</b> .....	33
6.1. Preparación de muestras.....	33
6.2. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).....	33
6.2.1. Estudio de la influencia de la longitud de onda.....	33
6.2.2. Estudio de la fase móvil en determinaciones conjuntas de adulterantes y CBD.....	35
6.3. Cromatografía de gases (GC).....	38
6.3.1. Estudio de otras condiciones.....	39
<b>7. Determinación de CBD en extracciones de plantas de cannabis. Parte experimental y resultados</b> .....	41
7.1. Tiempo de extracción.....	41
7.1.1. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).....	41
7.1.2. Cromatografía de gases (GC).....	43
7.2. Estudio con respecto al procedimiento de extracción.....	44
7.2.1. Cromatografía de gases (GC).....	45
7.2.2. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).....	46

7.3. Estudio de posibles interferencias de otros compuestos presentes en la planta de cannabis.....	47
7.3.1. Absorción UV-VIS.....	48
7.3.2. Cromatografía de gases (GC).....	50
7.3.3. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).....	50
<b>8. Conclusiones.....</b>	<b>52</b>
<b>9. Anexo.....</b>	<b>53</b>
9.1. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).....	53
9.1.1. Estudio de la fase móvil y calibrados.....	53
9.1.2. Estudio de la fase móvil en determinaciones conjuntas de adulterantes y CBD.....	56
9.1.3. Determinación de CBD en extracciones de plantas de cannabis.....	58
9.1.4. Estudio de posibles interferencias de otros compuestos presentes en la planta de cannabis.....	61
9.2. Cromatografía de gases (GC).....	63
9.2.1. Calibrado.....	63
9.2.2. Estudio de otras condiciones (adulterantes).....	64
9.2.3. Determinación de CBD en extracciones de plantas de cannabis.....	65
9.2.4. Estudio de posibles interferencias de otros compuestos presentes en la planta de cannabis.....	66
<b>10. Bibliografía.....</b>	<b>68</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1.1</b>	Estructura química del CBD.....	11
<b>Figura 1.2</b>	Epidiolex® .....	12
<b>Figura 5.1</b>	Espectro de CBD (10.0 ppm).....	24
<b>Figura 5.2</b>	Espectro de CBD (20.0 ppm).....	24
<b>Figura 5.3</b>	Espectro del calibrado de CBD.....	25
<b>Figura 5.4</b>	Representación gráfica de la absorbancia frente a la concentración (206 nm).....	25
<b>Figura 5.5</b>	Representación gráfica de la absorbancia frente a la concentración (280 nm).....	25
<b>Figura 5.6</b>	Comparación de patrones (4.0 ppm).....	26
<b>Figura 5.7</b>	Cromatograma patrón de CBD 10.0 ppm.....	27
<b>Figura 5.8</b>	Cromatograma patrón de CBD 5.0 ppm.....	27
<b>Figura 5.9</b>	Representación gráfica del calibrado, fase móvil 60:30:10.....	28
<b>Figura 5.10</b>	Cromatograma patrón de CBD 20.0 ppm.....	29
<b>Figura 5.11</b>	Cromatograma patrón de CBD 10.0 ppm.....	29
<b>Figura 5.12</b>	Representación gráfica del calibrado, fase móvil 82:18.....	30
<b>Figura 5.13</b>	Cromatograma patrón de CBD 200.0 ppm.....	31
<b>Figura 5.14</b>	Cromatograma patrón de CBD 50.0 ppm.....	31
<b>Figura 5.15</b>	Representación gráfica del calibrado CBD (GC).....	32
<b>Figura 6.1</b>	Espectro de cocaína.....	33
<b>Figura 6.2</b>	Espectro de cafeína.....	34
<b>Figura 6.3</b>	Espectro de lidocaína.....	34
<b>Figura 6.4</b>	Espectro de procaína.....	34
<b>Figura 6.5</b>	Cromatograma mezcla del orden de 10 ppm.....	35
<b>Figura 6.6</b>	Cromatograma mezcla CBD y cocaína.....	36
<b>Figura 6.7</b>	Cromatograma cocaína del orden de 10 ppm (82:18).....	36
<b>Figura 6.8</b>	Cromatograma mezcla CBD y cocaína del orden de 10 ppm (82:18).....	37
<b>Figura 6.9</b>	Cromatograma mezcla del orden de 10 ppm (82:18).....	37
<b>Figura 6.10</b>	Cromatograma cocaína del orden de 10 ppm.....	38
<b>Figura 6.11</b>	Cromatograma lidocaína del orden de 10 ppm.....	38
<b>Figura 6.12</b>	Cromatograma cafeína del orden de 10 ppm.....	38
<b>Figura 6.13</b>	Cromatograma procaína del orden de 10 ppm.....	39
<b>Figura 6.14</b>	Cromatograma mezcla del orden de 10 ppm.....	39
<b>Figura 6.15</b>	Cromatograma mezcla del orden de 10 ppm (otras condiciones).....	40
<b>Figura 7.1</b>	Extracciones realizadas (A, B, C y D).....	41
<b>Figura 7.2</b>	Cromatograma de la extracción de cannabis (5 min).....	42
<b>Figura 7.3</b>	Cromatograma extracción 5 min.....	43
<b>Figura 7.4</b>	Aspecto del extracto de cannabis durante la extracción y al finalizar.....	44
<b>Figura 7.5</b>	Montaje del equipo Soxhlet.....	44
<b>Figura 7.6</b>	Cromatograma de la extracción de cannabis (Soxhlet GC).....	45

<b>Figura 7.7</b>	Cromatograma de la extracción de cannabis (Soxhlet HPLC).....	46
<b>Figura 7.8</b>	Plantas utilizadas de izquierda a derecha: 1, 2, 3 y 4.....	47
<b>Figura 7.9</b>	Extractos obtenidos de las plantas.....	48
<b>Figura 7.10</b>	Espectro planta 1 (Begonia Erythrophylla).....	48
<b>Figura 7.11</b>	Espectro planta 2 (Aeonium).....	49
<b>Figura 7.12</b>	Espectro planta 3 (Potho).....	49
<b>Figura 7.13</b>	Espectro planta 4 (Yuca).....	49
<b>Figura 7.14</b>	Cromatograma extracción planta 4 (GC).....	50
<b>Figura 7.15</b>	Cromatograma extracción planta 4 (HPLC).....	51
<b>Figura 7.16</b>	Cromatograma de extracción planta 4 + 0.2 ml 20.0 ppm CBD.....	51
<b>Figura 9.1</b>	Cromatograma patrón CBD 2.5 ppm (60:30:10).....	53
<b>Figura 9.2</b>	Cromatograma patrón CBD 1.3 ppm (60:30:10).....	53
<b>Figura 9.3</b>	Cromatograma patrón CBD 0.3 ppm (60:30:10).....	54
<b>Figura 9.4</b>	Cromatograma patrón CBD 5.0 ppm (82:18).....	54
<b>Figura 9.5</b>	Cromatograma patrón CBD 2.5 ppm (82:18).....	54
<b>Figura 9.6</b>	Cromatograma patrón CBD 0.6 ppm (82:18).....	55
<b>Figura 9.7</b>	Cromatograma patrón CBD 0.15 ppm (82:18).....	55
<b>Figura 9.8</b>	Cromatograma cocaína del orden de 100 ppm (60:30:10).....	56
<b>Figura 9.9</b>	Cromatograma cafeína del orden de 100 ppm (60:30:10).....	56
<b>Figura 9.10</b>	Cromatograma procaína del orden de 100 ppm (60:30:10).....	56
<b>Figura 9.11</b>	Cromatograma lidocaína del orden de 100 ppm (60:30:10).....	57
<b>Figura 9.12</b>	Cromatograma lidocaína del orden de 10 ppm (82:18).....	57
<b>Figura 9.13</b>	Cromatograma procaína del orden de 10 ppm (82:18).....	57
<b>Figura 9.14</b>	Cromatograma cafeína del orden de 10 ppm (82:18).....	58
<b>Figura 9.15</b>	Cromatograma extracción cannabis 5 min (82:18).....	58
<b>Figura 9.16</b>	Cromatograma extracción cannabis 10 min (82:18).....	58
<b>Figura 9.17</b>	Cromatograma extracción cannabis 20 min (82:18).....	59
<b>Figura 9.18</b>	Cromatograma extracción cannabis 40 min (82:18).....	59
<b>Figura 9.19</b>	Cromatograma extracción 10 min (60:30:10).....	59
<b>Figura 9.20</b>	Cromatograma extracción 20 min (60:30:10).....	60
<b>Figura 9.21</b>	Cromatograma extracción 40 min (60:30:10).....	60
<b>Figura 9.22</b>	Cromatograma extracción 5 min (1:10) (60:30:10).....	60
<b>Figura 9.23</b>	Cromatograma extracción Soxhlet diluido.....	61
<b>Figura 9.24</b>	Cromatograma extracción planta 1.....	61
<b>Figura 9.25</b>	Cromatograma extracción planta 2.....	61
<b>Figura 9.26</b>	Cromatograma extracción planta 3.....	62
<b>Figura 9.27</b>	Cromatograma extracción planta 1 + 0.2 ml 20.0 ppm CBD.....	62
<b>Figura 9.28</b>	Cromatograma extracción planta 2 + 0.2ml 20.0 ppm CBD.....	62
<b>Figura 9.29</b>	Cromatograma extracción planta 3 + 0.2 ml 20.0 ppm CBD.....	63
<b>Figura 9.30</b>	Cromatograma patrón CBD 10.0 ppm.....	63
<b>Figura 9.31</b>	Cromatograma patrón CBD 4.0 ppm.....	63



<b>Figura 9.32</b>	Cromatograma de cocaína del orden de 10 ppm.....	64
<b>Figura 9.33</b>	Cromatograma de lidocaína del orden de 10 ppm.....	64
<b>Figura 9.34</b>	Cromatograma de cafeína del orden de 10 ppm.....	64
<b>Figura 9.35</b>	Cromatograma de procaína del orden de 10 ppm.....	65
<b>Figura 9.36</b>	Cromatograma extracción cannabis 10 min.....	65
<b>Figura 9.37</b>	Cromatograma extracción cannabis 20 min.....	65
<b>Figura 9.38</b>	Cromatograma extracción cannabis 40 min.....	66
<b>Figura 9.39</b>	Cromatograma Soxhlet diluido.....	66
<b>Figura 9.40</b>	Cromatograma extracción planta 2.....	66
<b>Figura 9.41</b>	Cromatograma extracción planta 3.....	67
<b>Figura 9.42</b>	Cromatograma extracción planta 1.....	67

### Índice de tablas

<b>Tabla 5.1</b>	Línea de calibrado CBD, fase móvil 60:30:10.....	28
<b>Tabla 5.2</b>	Línea de calibrado CBD, fase móvil 82:18.....	30
<b>Tabla 5.3</b>	Línea de calibrado CBD (GC).....	32
<b>Tabla 7.1</b>	Cantidad de CBD en cada extracción (HPLC).....	42
<b>Tabla 7.2</b>	Cantidad de CBD en cada extracción (GC).....	43
<b>Tabla 7.3</b>	Cantidad de CBD con Soxhlet (GC).....	45
<b>Tabla 7.4</b>	Cantidad de CBD con Soxhlet (HPLC).....	46
<b>Tabla 7.5</b>	Valores de absorbancias obtenidos de los extractos de plantas.....	50



## 1. Introducción

### 1.1. Introducción

El cannabidiol (2-[(1*R*,6*R*)-6-isopropenyl-3-methylcyclohex-2-en-1-yl]-5-pentylbenzene-1,3-diol), también conocido como CBD, es uno de los principales cannabinoides de la planta *Cannabis sativa*, su fórmula molecular es C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>.

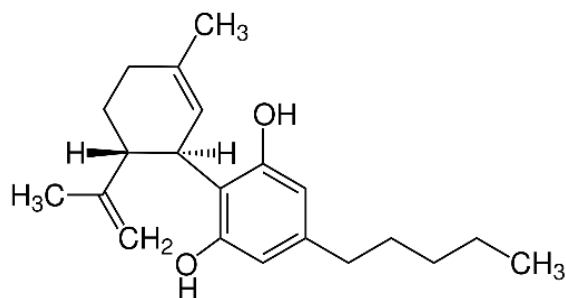


Figura 1.1. Estructura química del CBD

Las plantas de cannabis se han utilizado desde la antigüedad debido a sus características y a los diferentes usos que se le puede dar. Los productos derivados más importantes se pueden clasificar en tres grupos: a) aceite y alimentos derivados de semillas de cáñamo, como por ejemplo la harina de cáñamo; b) fibras, utilizadas en la industria textil y de papel; y c) resinas con interés farmacológico [1].

El cannabis, además del CBD, es fuente de otros cannabinoides como el THC ( $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol), el CBG (cannabigerol) o el CBN (cannabinol), siendo los dos más importantes el CBD y el THC. Los cannabinoides son un tipo de compuestos orgánicos pertenecientes al grupo de los terpenofenoles, con un esqueleto de carbono C<sub>21</sub>, el cual se encuentra exclusivamente en el cannabis [2].

Aunque los cannabinoides se han usado durante siglos, los componentes químicos de los extractos del cannabis no se identificaron hasta finales del siglo XIX. El CBD y el THC se aislaron del extracto de aceite de cáñamo en 1940 y 1942, respectivamente [3]. Posteriormente en 1963, Mechoulam y Shvo determinaron la estructura química del CBD [4].

El primero en caracterizarse y aislarse fue el CBD, sin embargo, se ha investigado más el THC por ser psicoactivo, es decir, que afecta a la conciencia y a la actividad mental de quien lo consume. Pero en los últimos años, se han descubierto diferentes actividades farmacológicas del CBD, entre los que se incluyen efectos analgésicos, antiinflamatorios, antioxidantes, antieméticos o ansiolíticos [5].

A raíz de las investigaciones llevadas a cabo con los cannabinoides, existen algunos fármacos disponibles comercialmente como Sativex<sup>®</sup> (nombre comercial del Nabiximol), un spray para su aplicación sublingual, que contiene CBD y THC, utilizado para el tratamiento de la espasticidad relacionada con la esclerosis múltiple. Este fue el primer extracto de cannabinoides aprobado como medicamento.

Más recientemente, la FDA ha aprobado el uso de Epidiolex<sup>®</sup>, una solución oral de CBD, para su uso en el tratamiento de convulsiones relacionadas con la epilepsia infantil, como el síndrome de Dravet [3].



Figura 1.2. Epidiolex<sup>®</sup>

Como el CBD es el isómero no psicoactivo del THC, algunos investigadores consideran que podría ocurrir la reacción de conversión al ingerirlo. En un estudio publicado por Merrick et al. [6] los autores concluían que el CBD se podía convertir en THC mediante la exposición prolongada a un fluido gástrico, si bien en el trabajo no se realizan ensayos in vivo sino in vitro usando un medio simulado de fluido gástrico, pero no existen evidencias científicas de que esto ocurra en seres humanos. La reacción de isomerización se conoce desde que Adams publicó las posibles estructuras en 1940 [7], quedando definitivamente definida la estructura por Mechoulam en los años 60.

Posteriormente a esta publicación, Grotenhermen et al. publicaron varios artículos y ensayos clínicos donde llegaron a la conclusión de que tal reacción de conversión no podía ocurrir al no existir una enzima que permitiera su realización. Además, la reacción iría en contra de los estudios de farmacocinética y metabolismo llevados a cabo en ensayos clínicos humanos [5].

## 1.2. Justificación del trabajo

En diciembre de 2020, la ONU (Comisión de Estupefacientes) ha reconocido las posibles propiedades terapéuticas del cannabis y de su resina, procediendo a retirar estas sustancias de la lista IV de la Convención sobre drogas de 1961, espacio reservado para las sustancias más perjudiciales y sin potencial médico reconocido.

En los últimos años, el interés por el CBD ha aumentado debido al potencial terapéutico que al parecer presenta, lo cual se puede constatar en las investigaciones sobre su uso medicinal. Los efectos que posee son de tipo: antiinflamatorio, anticonvulsivo, ansiolítico, analgésico e incluso neuroprotector. También hay estudios [8, 9] que sugieren que el CBD podría tener un papel modulador en la actividad del THC, disminuyendo los efectos psicológicos adversos.

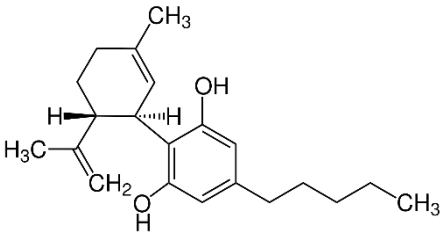
La proporción de CBD en la planta de cannabis está determinada, principalmente por las características genéticas de la planta, pero también pueden influir las condiciones ambientales y de cultivo [10]. El CBD se biosintetiza enzimáticamente como un ácido carboxílico sin actividad farmacológica, el ácido cannabidiólico (CBDA). Se transforma en CBD mediante la descarboxilación que ocurre de forma natural a medida que la planta envejece, y también con la exposición a la luz o al calor [11].

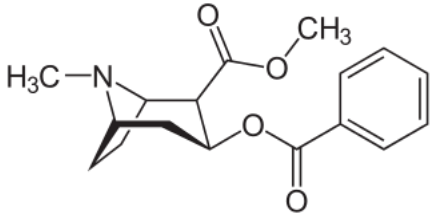
La actividad farmacológica o potencia del cannabis está representada por el contenido total de cannabinoides, en el caso del CBD, es la suma del CBD y de su precursor ácido, CBDA. Como la legalidad del cannabis varía significativamente de un país a otro, es importante determinar el contenido en CBD debido a que, dependiendo de la legislación, podría clasificarse como fármaco o no.

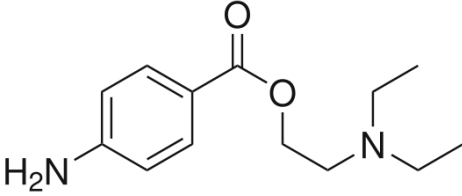
En la Unión Europea, se permite el cultivo de variedades no psicoactivas de cáñamo del tipo fibra con niveles de THC total inferiores al 0.2%. Aunque el CBD es el principal cannabinoide, normalmente se encuentra en el cáñamo de fibra en valores inferiores al 4%; sin embargo, en cultivos enriquecidos en CBD, puede alcanzar valores de hasta un 25%. En estos casos, habría que tener en cuenta la variación porcentual que el enriquecimiento origina con respecto al contenido, en %, de la planta en THC. Ya que el apreciable aumento en CBD, podría llevar a pensar que estos cultivos son en apariencia legales, pero que, sin embargo, tuvieran cantidades totales en THC superiores a las permitidas.

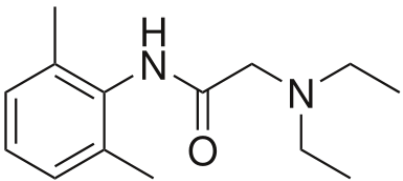
Distinguir de forma natural en el cannabis la mayor o menor proporción de CBD y THC, en base a apreciaciones externas de su apariencia como tamaño, olor, color, etc..., no es factible. Por ello, es necesario determinar el potencial del cannabis mediante métodos de análisis, que permitan caracterizar y cuantificar los compuestos de interés, ya sea con fines médicos, policiales o forenses, o bien para el control de calidad en la industria del cannabis, en aquellos países donde bajo normativa está permitida su producción, venta o consumo [12].

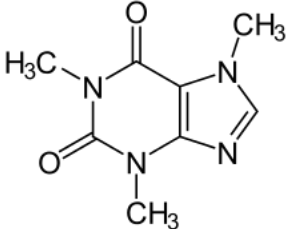
1.3. Características físico-químicas de compuestos analizados en el trabajo

<b>Nombre</b>	Cannabidiol (CBD)
<b>Fórmula molecular</b>	$C_{21}H_{30}O_2$
<b>Masa molar</b>	314.46 g/mol
<b>Estructura química</b>	
<b>Solubilidad en agua</b>	Poco soluble
<b>Solubilidad en alcohol</b>	Etanol (35 mg/ml) y metanol (30 mg/ml)
<b>Punto de ebullición</b>	180 °C

<b>Nombre</b>	Cocaína
<b>Fórmula molecular</b>	$C_7H_{21}NO_4$
<b>Masa molar</b>	303.35 g/mol
<b>Estructura química</b>	
<b>Solubilidad en agua</b>	Ligeramente soluble
<b>Solubilidad en alcohol</b>	Soluble
<b>Punto de ebullición</b>	187 °C

<b>Nombre</b>	Procaína
<b>Fórmula molecular</b>	$C_{13}H_{20}N_2O_2$
<b>Masa molar</b>	236.31 g/mol
<b>Estructura química</b>	
<b>Solubilidad en agua</b>	Soluble
<b>Solubilidad en alcohol</b>	Soluble
<b>Punto de ebullición</b>	373.6 °C

<b>Nombre</b>	Lidocaína
<b>Fórmula molecular</b>	$C_{14}H_{22}N_2O$
<b>Masa molar</b>	234.34 g/mol
<b>Estructura química</b>	
<b>Solubilidad en agua</b>	Soluble
<b>Solubilidad en alcohol</b>	Soluble
<b>Punto de ebullición</b>	350.8 °C

<b>Nombre</b>	Cafeína
<b>Fórmula molecular</b>	$C_8H_{10}N_4O_2$
<b>Masa molar</b>	194.19 g/mol
<b>Estructura química</b>	
<b>Solubilidad en agua</b>	Soluble
<b>Solubilidad en alcohol</b>	Soluble
<b>Punto de ebullición</b>	178 °C

#### 1.4. Objetivos del trabajo

En este Trabajo Fin de Máster se pretende realizar un estudio sobre el cannabidiol (CBD), con el fin de determinarlo en diferentes muestras que incluyen una de origen natural.

El estudio implicará las siguientes etapas:

- a) Estudio previo para su determinación por diferentes técnicas analíticas: Espectroscopia de absorción UV-Visible; Cromatografía de líquidos (HPLC) y Cromatografía de gases (GC)
- b) Toma de muestra y su tratamiento
- c) Extracción y puesta a punto de métodos para su análisis por HPLC y GC
- d) Comprobación de posibles interferentes, derivados de las muestras a analizar
- e) Discusión de los resultados obtenidos
- f) Conclusiones



## 2. Técnicas utilizadas

### 2.1. Espectroscopia de absorción molecular UV-VIS

Este tipo de espectroscopia determina la absorción molecular de la radiación en las regiones ultravioleta y visible de un analito. Se basa en la medición (transmitancia o absorbancia) de la radiación que deja pasar una disolución contenida en una celda transparente a dicha radiación.

Las aplicaciones están relacionadas con la determinación cuantitativa de analitos orgánicos e inorgánicos. En este caso, se utiliza para conocer las longitudes de onda óptimas de absorción del CBD y usarlas en su determinación por HPLC con un detector de UV-Visible. También se utiliza para conocer el espectro de posibles interferentes por absorción a esas longitudes de onda.

### 2.2. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

HPLC es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla a través de su paso por una columna, identificándolos posteriormente con el detector adecuado. El tipo de cromatografía más utilizado es la cromatografía de reparto, que consiste en una fase estacionaria (relleno de la columna) y una fase móvil (líquido que interacciona con la muestra).

La muestra se inyecta y los componentes de la muestra se separan en función de su interacción con la columna y la fase móvil, esto permite conocer el tiempo de retención de cada componente. Para evitar solapamientos o que los tiempos del análisis sean muy largos, hay que tener en cuenta la polaridad del soluto, de la fase móvil y de la fase estacionaria.

En este caso se realiza un estudio con patrones de distinta concentración del compuesto a determinar, para conocer el tiempo de retención sobre la columna en función de las diferentes fases móviles utilizadas. Los resultados obtenidos se aplican posteriormente a la determinación de CBD en las diferentes muestras.

### 2.3. Cromatografía de gases (GC)

La cromatografía de gases es una técnica utilizada para separar los componentes de una muestra vaporizada. Existen dos tipos: cromatografía gas-líquido (CGL) y cromatografía gas-sólido (CGS), la más utilizada es la primera y se la conoce como cromatografía de gases.

Los componentes se separan debido a que se reparten entre una fase gaseosa y una fase estacionaria contenida en una columna. Al realizar la separación cromatográfica, la muestra se vaporiza y se inyecta en la columna cromatográfica. La elución ocurre mediante el paso del flujo de una fase móvil, que consiste en un gas inerte.

A diferencia de la mayoría de los otros tipos de cromatografía, la fase móvil, en nuestro caso nitrógeno, no interacciona con el analito, su función es transportarlo a través de la columna. Por

ello, para realizar el análisis hay que establecer las condiciones de temperatura a lo largo del proceso en función del compuesto a analizar. En este caso se realiza un procedimiento similar al usado en cromatografía de líquidos, se buscan las condiciones óptimas para analizar el compuesto en los diferentes tipos de muestra.

### 3. Antecedentes bibliográficos

Debido al aumento en el desarrollo de preparados con cannabis, existe una demanda creciente de métodos cualitativos y cuantitativos para el análisis de los componentes bioactivos. El método analítico usado para llevar a cabo la determinación va a depender de la aplicación requerida.

Por ello, el análisis puede realizarse con la planta de cannabis o con matrices biológicas, en el primer caso, es para determinar las cantidades de un cannabinoide, permitiendo el control de calidad con fines medicinales. Y en el segundo caso es para tener evidencias de un abuso de drogas o para la realización de estudios farmacocinéticos.

Los diferentes objetivos requieren el uso de diferentes técnicas tanto para la preparación de los extractos como para el análisis de muestras. Para la extracción de material vegetal, lo más común es mediante extracción sólido-líquido. Los cannabinoides ácidos y neutros se pueden extraer utilizando disolventes orgánicos, el más usado es el etanol por su alta eficiencia de extracción ya que posee afinidad por la estructura molecular de los cannabinoides. También se puede utilizar metanol o hexano.

Hay que tener en cuenta si se quieren extraer los compuestos ácidos o neutros de los cannabinoides. La extracción de las formas ácidas se puede llevar a cabo a temperatura ambiente, pero si el extracto va a usarse con fines medicinales es importante asegurar la presencia de los compuestos activos, los cannabinoides neutros, realizando la extracción a temperatura alta o mediante un paso previo de descarboxilación [13, 14].

Las técnicas más utilizadas para analizar CBD son cromatografía de gases (GC) utilizando FID [2] como detector, o con espectrometría de masas (MS) [11]. También se utiliza la cromatografía HPLC con detector de UV [3, 15 y 16] o con MS [5 y 17].

La GC se considera una técnica más rápida y simple que HPLC, pero solo permite obtener el contenido total de cannabinoides, ya que las formas ácidas se convierten en neutras en el puerto de inyección. La determinación por HPLC posee la ventaja de permitir el análisis directo de los cannabinoides en su forma neutra y ácida [12].

Para realizar el análisis de los cannabinoides ácidos y neutros mediante GC-FID, se desarrolló y validó un método analítico [2] que utiliza la derivatización con TMS (tetrametilsilano). La silación ocurre con BSTFA (N, O-Bistrifluoroacetamida), que reacciona con los grupos carboxílicos y/o hidroxilos para formar los derivados de TMS. Ocurre con una alta velocidad de reacción, produciendo una derivatización más completa.

Debido a su naturaleza altamente volátil, el BSTFA y los subproductos de la reacción eluyen pronto en el cromatograma, esto hace que no haya interferencias originando una mayor resolución de los picos de interés y un menor ruido de fondo.

El inconveniente de esta reacción es que, si se busca una tasa de conversión alta, hay que secar las disoluciones o extractos de CBD con una corriente de N<sub>2</sub> gas a 50 °C. Tienen que estar secos porque los derivados de BSTFA y TMS se hidrolizan en presencia de agua o de disolventes próticos.

Para conseguir una buena sensibilidad, se optimizan las condiciones del método usado en GC-FID. Estas son velocidad de flujo del gas portador, He, de 0.8 ml/min y en modo Split con una relación de división de 20:1. La temperatura del inyector es 275 °C, la del detector es 300 °C y el programa de tiempo del horno comienza con 190 °C durante 1 min antes de la rampa a una velocidad de 30 °C/min hasta 230 °C. El horno se mantiene a 230 °C durante 2 min antes de volver a aumentar 5 °C/min hasta alcanzar los 250 °C. Después de esperar 1 min, la temperatura del horno aumenta 20 °C/min hasta 300 °C, donde se mantiene durante 2.75 min, luego el horno se enfría hasta 190 °C. El tiempo total del análisis es 17.5 min.

El amplio tiempo de duración del análisis se debe a la separación durante el mismo de 10 cannabinoides (THCV, CBD, CBC,  $\Delta^8$ -THC,  $\Delta^9$ -THC, CBG, CBN, CBDA, CBGA Y THCAA) presentes en el cannabis. El CBD se encuentra en su forma derivada con tetrametilsilano (TMS), forma que posee un tiempo de retención de 4.87 min. El límite de detección es 0.12 µg/ml y el de cuantificación, 0.35 µg/ml.

Con los resultados obtenidos se analizan las diferentes variedades de cannabis, que son alto contenido en THC, en CBD o una variedad mixta. También permite conocer el contenido de CBD en las diferentes partes de la planta, siendo el contenido más alto en los cogollos, seguido de las hojas y menor contenido en el tallo.

En el caso de HPLC, otros autores [15] además de analizar los extractos del cannabis han evaluado la estabilidad del CBD en las disoluciones. La estabilidad depende de una serie de factores, como son: temperatura, oxidación e influencia del disolvente. Los estudios de estabilidad son importantes para conocer las posibilidades de degradación del compuesto y las condiciones en las que esto ocurre.

El método analítico consiste en una fase inversa con columna C18 y un detector de UV-VIS, la fase móvil es una mezcla de metanol, acetonitrilo y agua (52:30:18) que incluye ácido acético pH 4.5. La velocidad de flujo es 1.8 ml/min, el volumen de inyección es 20 µl y la longitud de onda de detección, 228 nm.

El cromatograma del CBD muestra un pico a un tiempo de retención a 4.72 min. Una vez que el método se ha validado, se estudia la estabilidad del CBD en disolución, en relación con la temperatura, la luz y la presencia de oxígeno atmosférico.

La influencia de la temperatura se comprueba manteniendo las disoluciones a diferentes temperaturas, observándose la mayor estabilidad a bajas temperaturas, por ello se recomienda su almacenamiento a temperatura de refrigeración, unos 4 °C. Con respecto al disolvente, se constata una mayor estabilidad del CBD en disolventes alcohólicos.

En cuanto a su oxidación, se realiza un estudio mediante la adición de peróxido de hidrógeno a disoluciones acuosas, observándose una rápida degradación del CBD. Y en el caso de la fotoestabilidad, se comprueba que las disoluciones de CBD almacenadas en ausencia de luz se mantienen estables, lo que no ocurre en el caso contrario.

También se ha determinado cuantitativamente, mediante HPLC, la cantidad de CBD presente en otros tipos de muestras, como por ejemplo en un spray bucal de cannabis [16]. El método utilizado implica condiciones de fase inversa, fase móvil con una mezcla de metanol y agua (85:15), velocidad de flujo de 1.0 ml/min, volumen de inyección 10  $\mu$ l y longitud de onda a 220 nm. En las condiciones mencionadas anteriormente se produce una buena determinación del CBD, con un tiempo de retención de 3.033 min. Los límites de detección y cuantificación son 0.23  $\mu$ g/ml y 0.76  $\mu$ g/ml, respectivamente.

Debido al interés actual por las propiedades del CBD, se han desarrollado diferentes técnicas analíticas para su extracción, entre ellas las que utilizan CO<sub>2</sub> supercrítico como medio de extracción [1], lo que evita el uso de disolventes orgánicos y permite realizar una extracción selectiva sin contaminación.

La validación del método se lleva a cabo mediante comparación con las extracciones convencionales en metanol. La posterior determinación del CBD se realiza con UPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography) y como detector UV-Vis, usando una columna C18 y una fase móvil con una mezcla de agua y metanol (20:80). La velocidad de flujo es 0.2 ml/min, el volumen de inyección es 2  $\mu$ l y la longitud de onda del detector es 225 nm. El CBD posee un tiempo de retención de 2.9 min, el límite de detección es 1  $\mu$ g/ml y el de cuantificación, 4  $\mu$ g/ml.

#### 4. Reactivos y equipos empleados

##### a) Patrón y muestras vegetales

El patrón de CBD utilizado para el estudio se ha obtenido de Sigma-Aldrich como Cannabidiol solution 1.0 mg/ml in metanol, analytical standard, for drug analysis ref.C6395. El patrón se lleva a un matraz aforado y se enrasa a 5 ml con metanol, obteniéndose así una concentración de 200 ppm, a partir de la cual se preparan por sucesivas diluciones con metanol los correspondientes patrones utilizados.

Se ha utilizado una muestra de cannabis (3.6 g) etiquetada como como ZA-1078/20 suministrada, con la consiguiente autorización, por la Delegación del Gobierno en Castilla y León. También, otras muestras de pureza variable proporcionadas por la misma Delegación.

Con el objetivo de contrastar el proceso de extracción en la muestra vegetal, se utilizaron cuatro variedades de plantas (Begonia Erythrophylla, Aeonium, Potho y Yuca) para la extracción de sus componentes clorofílicos.

##### b) Reactivos

- Metanol para HPLC >99.9 % de Sigma-Aldrich con ref.34860
- Acetonitrilo gradient 240 nm/far UV-HPLC grade. Scharlau ref. ACO3292500
- Agua desionizada
- Otros reactivos de uso habitual

##### c) Equipos y material utilizado

- Material de vidrio de uso general en laboratorio
- Balanza Sartorius Entris 2241-1S (precisión de 0.1 mg)
- Balanza Precisa 40SM-20 A (precisión de 0.01 mg)
- UV-Vis: Agilent 8453 UV-Visible System
- Equipo Soxhlet
- HPLC: Agilent Technologies 1200 Series, componentes:
  - Desgasificador G1322A
  - Bomba cuaternaria G1311A
  - Termostato G1316A
  - Detector UV-Vis G1314B
  - Inyector manual G1328B
  - Columna cromatográfica Kromaphase de 150x4.6 mm, tamaño de partícula 5 µm y fase estacionaria C18

- GC: Agilent Technologies 6890N, componentes:
  - Inyector G2613A
  - Single Inlet, Detector FID G1530N
  - Columna cromatográfica HP-5 (Crosslinked 5% PH ME Siloxane) 30 m x 0.32 mm x 0.25  $\mu$ m Film Thickness

## 5. Cannabidiol (CBD). Parte experimental y resultados

### 5.1. Espectroscopia UV-VIS

Para determinar las longitudes de onda de máxima absorción del CBD, se realiza un barrido comprendido entre 200 y 800 nm. Se utilizan patrones de diferentes concentraciones de CBD en metanol.

Se obtuvieron, para diferentes concentraciones, los espectros de las figuras 5.1 y 5.2, donde aparecen dos bandas diferenciadas, con máximos de absorción a las longitudes de onda de 206 nm y 280 nm. Se selecciona la de 206 nm para las determinaciones por HPLC, debido a su máxima absorción.

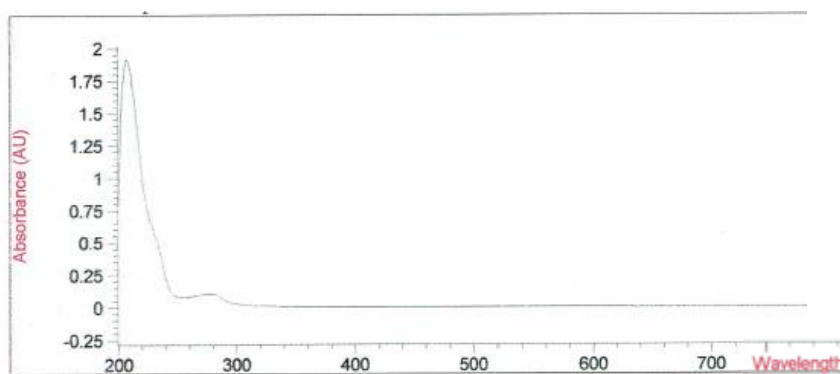


Figura 5.1. Espectro de CBD (10.0 ppm)

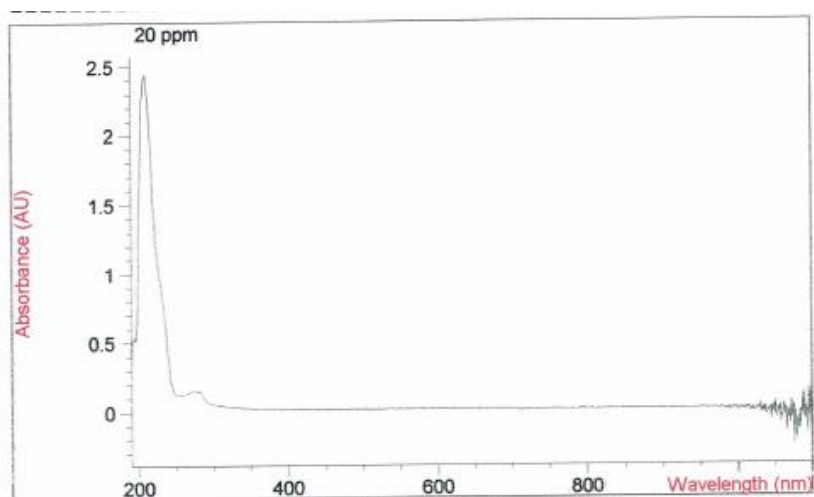


Figura 5.2. Espectro de CBD (20.0 ppm)

#### 5.1.1. Influencia de la concentración

Se realizan líneas de calibrado a 206 nm y 280 nm utilizando los patrones de CBD, preparados a partir de una disolución patrón de 200 ppm. Los resultados obtenidos se reflejan en las figuras 5.3, 5.4 y 5.5.



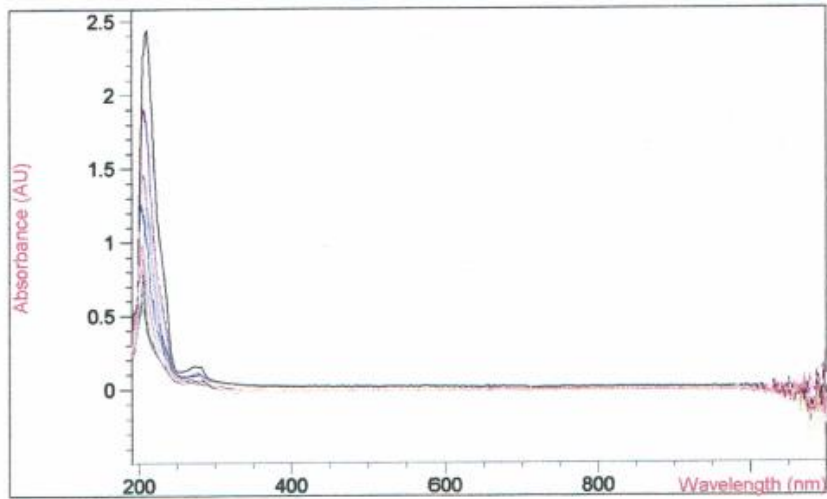


Figura 5.3. Espectro del calibrado de CBD

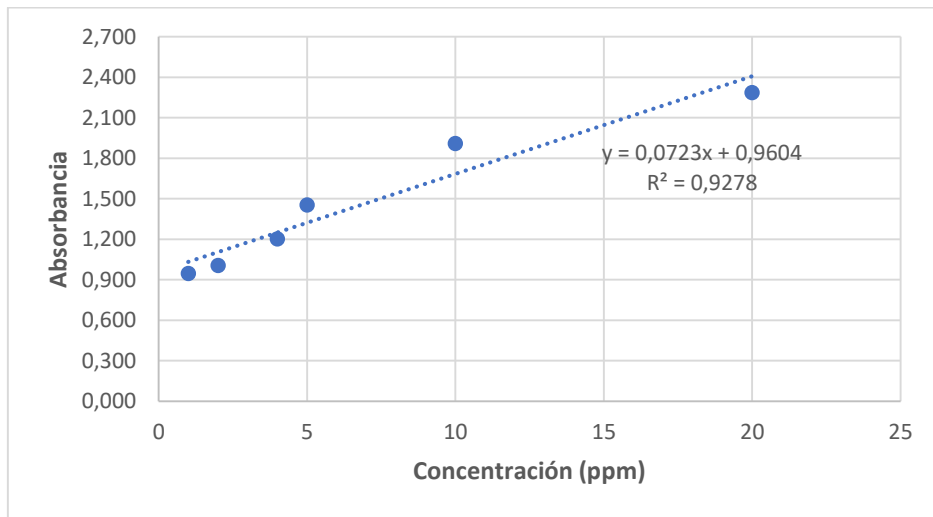


Figura 5.4. Representación gráfica de la absorbancia frente a la concentración (206 nm)

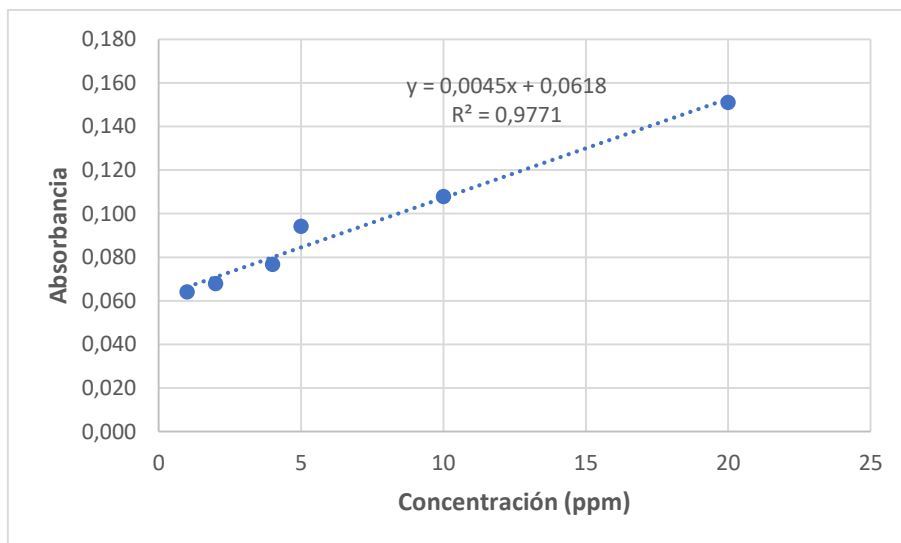


Figura 5.5. Representación gráfica de la absorbancia frente a la concentración (280 nm)

Aplicando la ley de Lambert-Beer,  $A=abc$ , se obtiene a partir de la pendiente de la línea de calibrado, a 206 nm, su absorptividad,  $a = 0.0723 \text{ L/mg}\cdot\text{cm}$ . El valor de la absorptividad molar se determina teniendo en cuenta la masa molar del CBD,  $\epsilon = 2.275 \cdot 10^4 \text{ L/mol}\cdot\text{cm}$ .

En el caso de la línea de calibrado a 280 nm, la absorptividad es  $a = 0.0045 \text{ L/mg}\cdot\text{cm}$  y la absorptividad molar,  $\epsilon = 1.428 \cdot 10^3 \text{ L/mol}\cdot\text{cm}$ . Con ambas longitudes de onda se obtiene un valor de absorptividad molar grande.

### 5.1.2. Estudio con respecto al tiempo

Se ha llevado a cabo un estudio de la estabilidad del CBD frente al tiempo, para ello se comparan los espectros de un mismo patrón almacenado a una temperatura de 4 °C, en ausencia de luz, durante dos semanas. En los espectros de la figura 5.6, se puede observar que no existe una variación apreciable de la absorbancia durante ese periodo de tiempo.

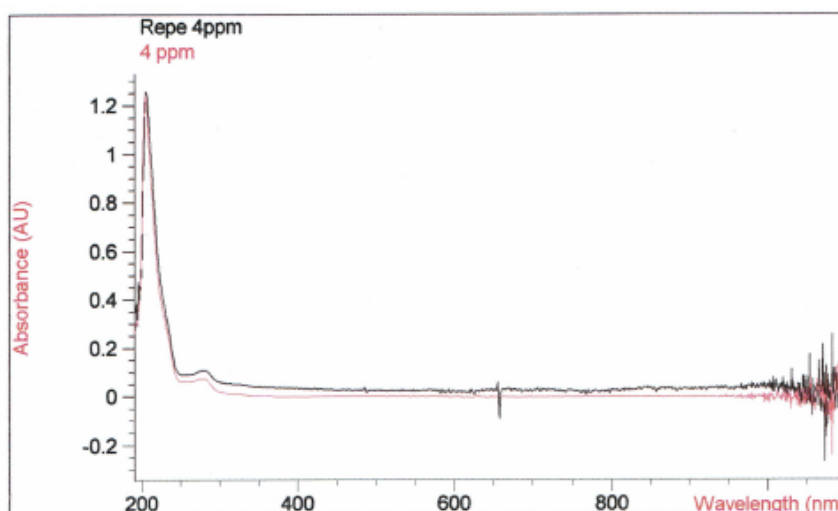


Figura 5.6. Comparación de patrones (4.0 ppm)

## 5.2. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

### 5.2.1. Estudio de la fase móvil y calibrados

Para llevar a cabo la determinación del CBD por este método, previamente hay que realizar pruebas para la elección de la fase móvil. Realizados diferentes ensayos, se obtiene una buena resolución del pico correspondiente a nuestro analito en un corto tiempo de análisis, 3 min, utilizando una mezcla de metanol, acetonitrilo y agua en proporción 60:30:10. Otras condiciones son: longitud de onda de detección 206 nm, velocidad de flujo 1 ml/min y volumen de inyección 5  $\mu\text{l}$ .

Se realizaron medidas con disoluciones patrón de diferentes concentraciones de CBD en metanol. En las siguientes figuras 5.7 y 5.8, se pueden observar los cromatogramas para 10.0 ppm y 5.0 ppm, respectivamente.

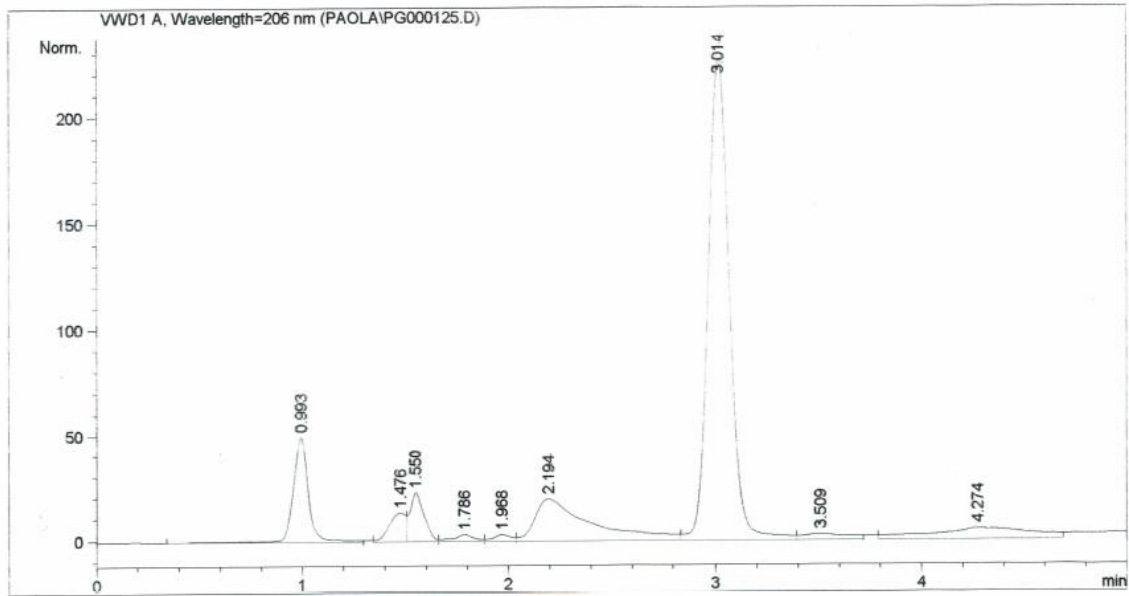


Figura 5.7. Cromatograma patrón de CBD 10.0 ppm

El pico del CBD, correspondiente a un tiempo de retención de 3 min, modifica apreciablemente su intensidad y área al variar la concentración de los patrones añadidos.

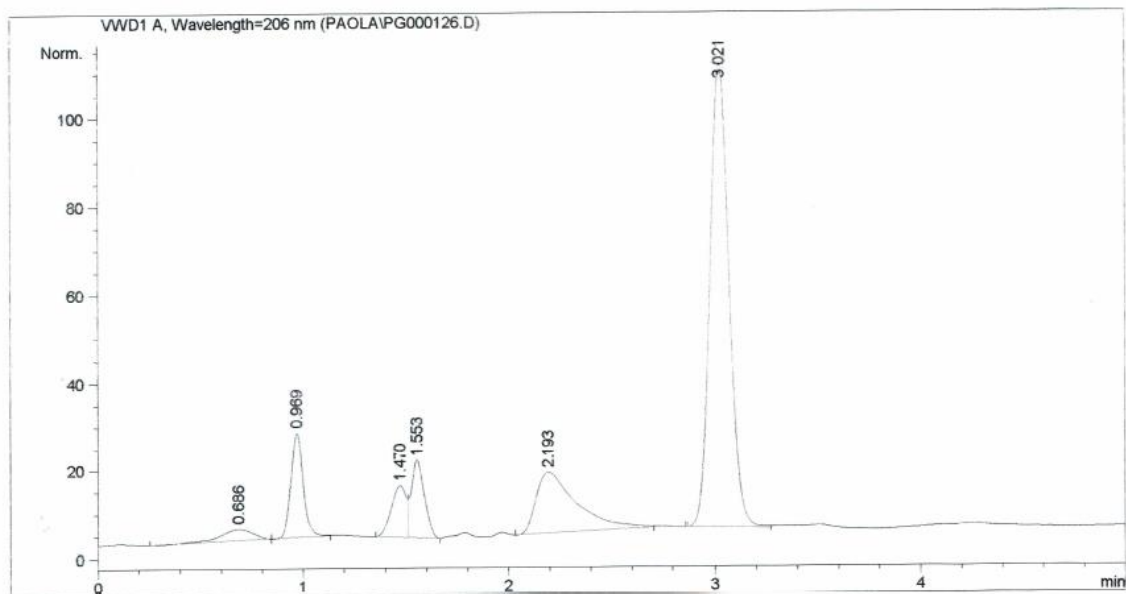
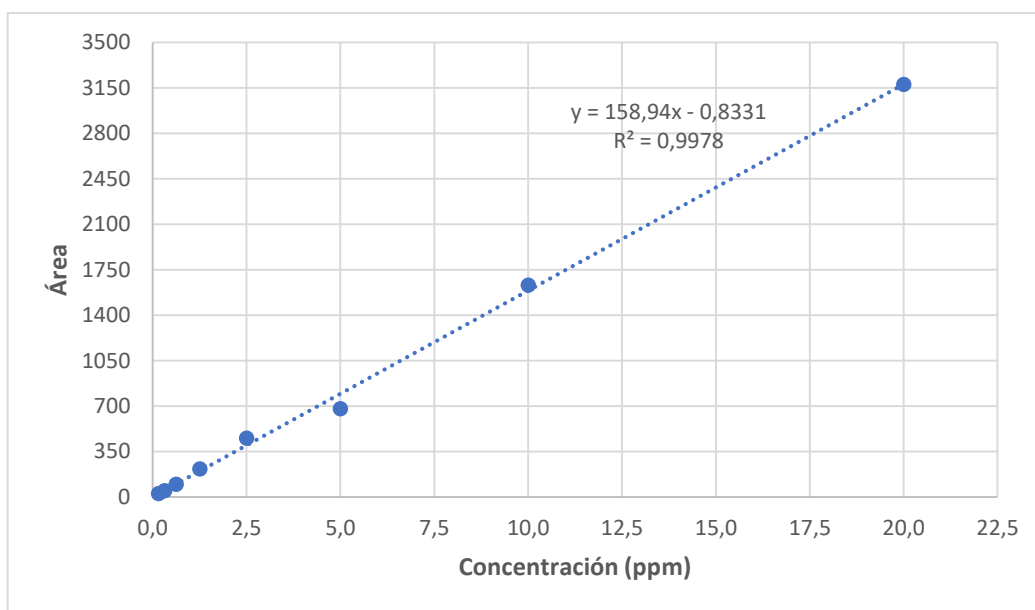


Figura 5.8. Cromatograma patrón de CBD 5.0 ppm

A continuación, se realiza una línea de calibrado con disoluciones patrón de CBD en metanol, los resultados obtenidos se reflejan en la tabla 5.1 y en la figura 5.9. Otros cromatogramas se recogen en el anexo, figuras 9.1 a 9.3.

Concentración (ppm)	Área	t <sub>r</sub> (min)
20,0	3177,5	3,057
10,0	1630,6	3,014
5,0	678,9	3,021
2,5	453,0	3,018
1,3	214,9	3,017
0,6	97,1	3,021
0,3	48,8	3,024
0,15	25,2	3,023

**Tabla 5.1.** Línea de calibrado CBD, fase móvil 60:30:10



**Figura 5.9.** Representación gráfica del calibrado, fase móvil 60:30:10

Otra de las fases móviles estudiadas [18] con buena respuesta cromatográfica, corresponde a una mezcla de agua y acetonitrilo en proporción 82:18, manteniendo constantes el resto de condiciones. En las figuras 5.10 y 5.11, se reflejan los cromatogramas correspondientes a los patrones de 20.0 ppm y 10.0 ppm de CBD.

Se obtiene, con muy buena resolución, el pico a un tiempo de retención algo superior al minuto, comprobándose una apreciable modificación del área al variar la concentración de la disolución patrón.

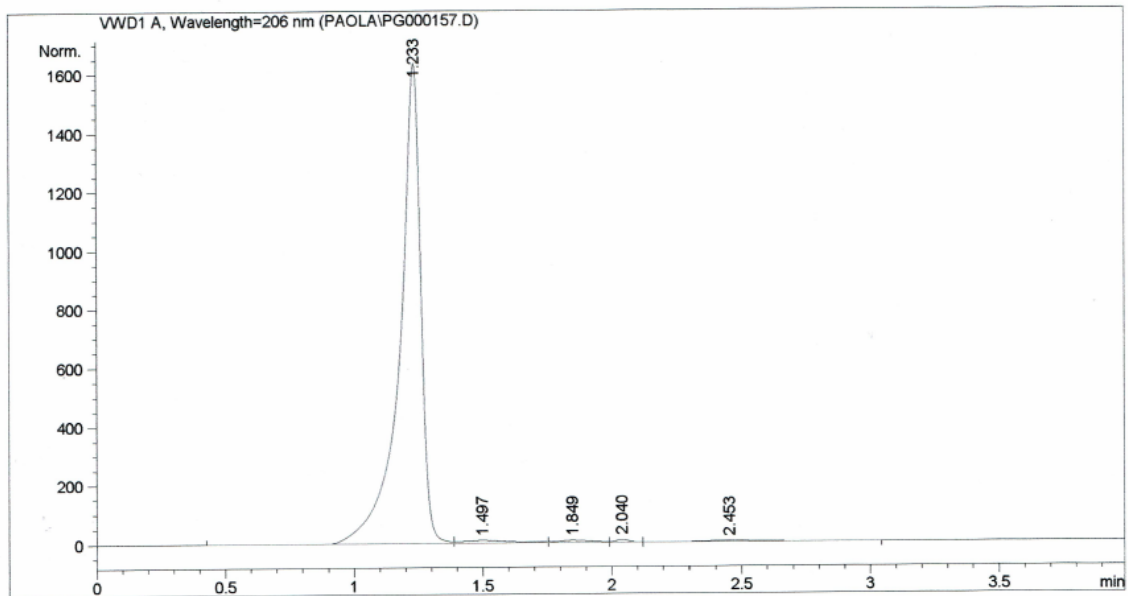


Figura 5.10. Cromatograma patrón de CBD 20.0 ppm

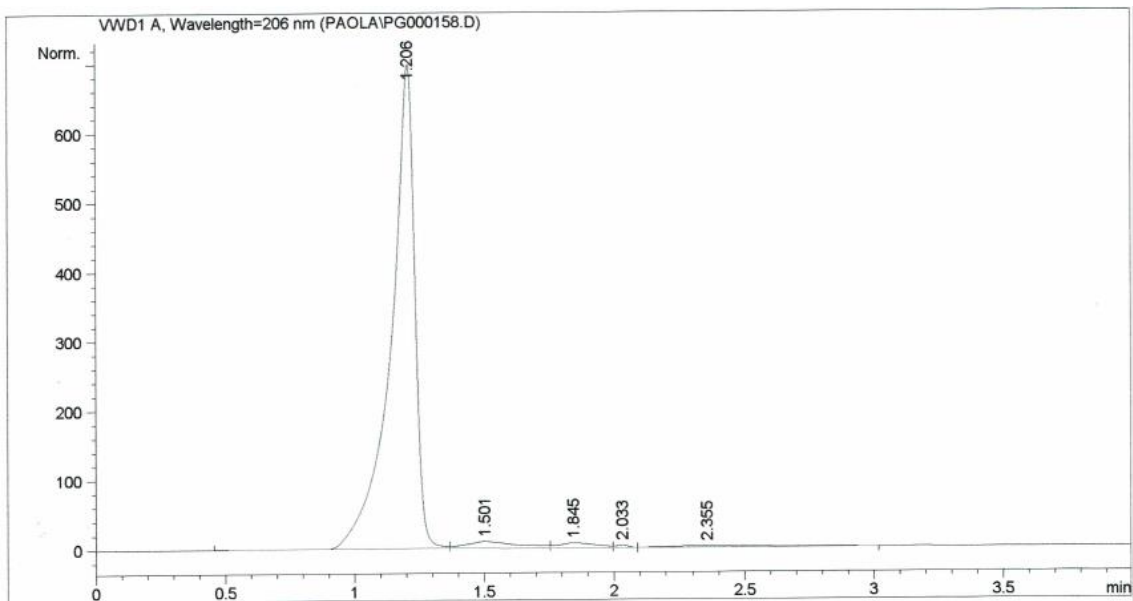


Figura 5.11. Cromatograma patrón de CBD 10.0 ppm

Los resultados correspondientes al calibrado realizado para distintas disoluciones patrón de CBD en metanol, con estas condiciones, se reflejan en la tabla 5.2 y en la representación gráfica correspondiente a la figura 5.12. Otros cromatogramas se recogen en el anexo, figuras 9.4 a 9.7.

Concentración (ppm)	Área	t <sub>r</sub> (min)
20,0	9376,9	1,223
10,0	4385,4	1,206
5,0	2957,6	1,180
2,5	1291,0	1,127
1,3	593,8	1,075
0,6	303,3	1,037
0,3	199,7	1,022
0,15	152,9	1,014

Tabla 5.2. Línea de calibrado CBD, fase móvil 82:18

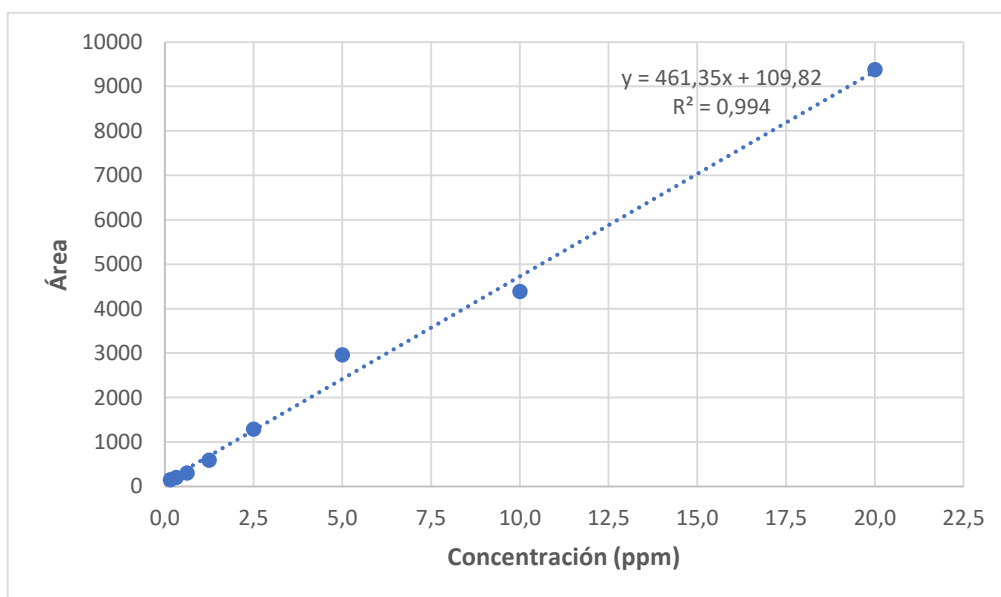


Figura 5.12. Representación gráfica del calibrado, fase móvil 82:18

Al realizar el análisis de las extracciones correspondientes a la muestra de cannabis, así como en el caso de la determinación del CBD en presencia de otros compuestos (muestras adulteradas), la elección de la fase móvil va a depender de los tiempos de retención de los compuestos presentes, conocidos o no, con el objetivo de evitar solapamientos con el CBD.

Los límites de detección (concentración más pequeña que se puede detectar con un cierto nivel de confianza) y de cuantificación (menor concentración de analito en una muestra que puede determinarse con un nivel aceptable de incertidumbre) obtenidos [11] para cada una de las fases móviles son:

- a) Metanol, acetonitrilo y agua (60:30:10): LOD 0.11 ppm y LOQ 0.34 ppm
- b) Agua y acetonitrilo (82:18): LOD 0.16 ppm y LOQ 0.48 ppm

### 5.3. Cromatografía de gases (GC)

Para la determinación de CBD mediante esta técnica, después de realizar algunos ensayos previos, se fijaron las siguientes condiciones: temperatura del inyector 290 °C; temperatura inicial del horno 200 °C durante 1.5 min, con rampa de 40 °C/min hasta 270 °C, se mantiene a esta temperatura durante 2 min; temperatura del detector 350 °C.

Se realizan medidas para disoluciones de diferente concentración de CBD, en metanol. En las figuras 5.13 y 5.14, se recogen los cromatogramas correspondientes a 200.0 ppm y 50.0 ppm respectivamente.

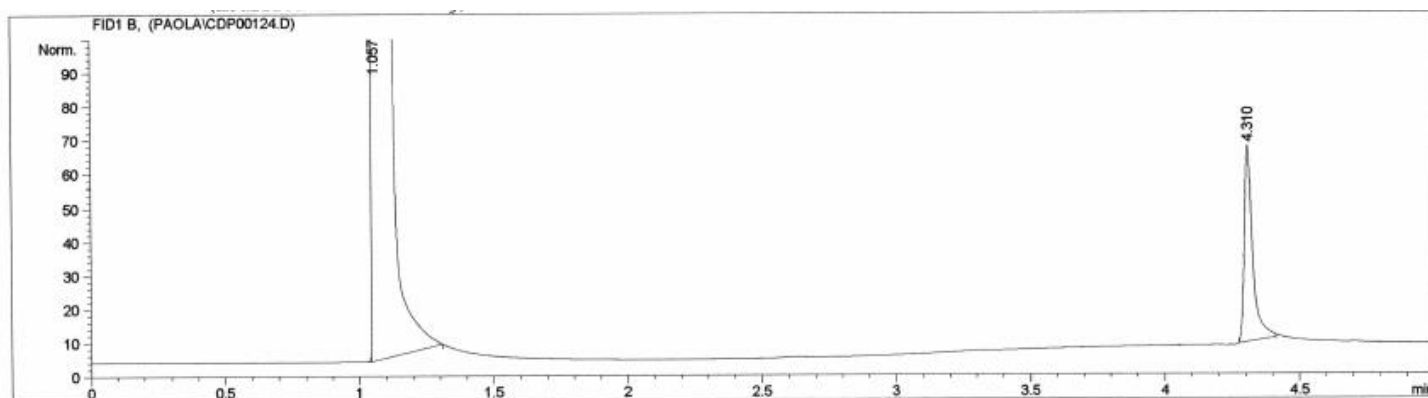


Figura 5.13. Cromatograma patrón de CBD 200.0 ppm

El pico del CBD es el correspondiente a un tiempo de retención de 4.3 min, como se puede observar en los cromatogramas es el que modifica su intensidad y área al variar la concentración de la disolución patrón.

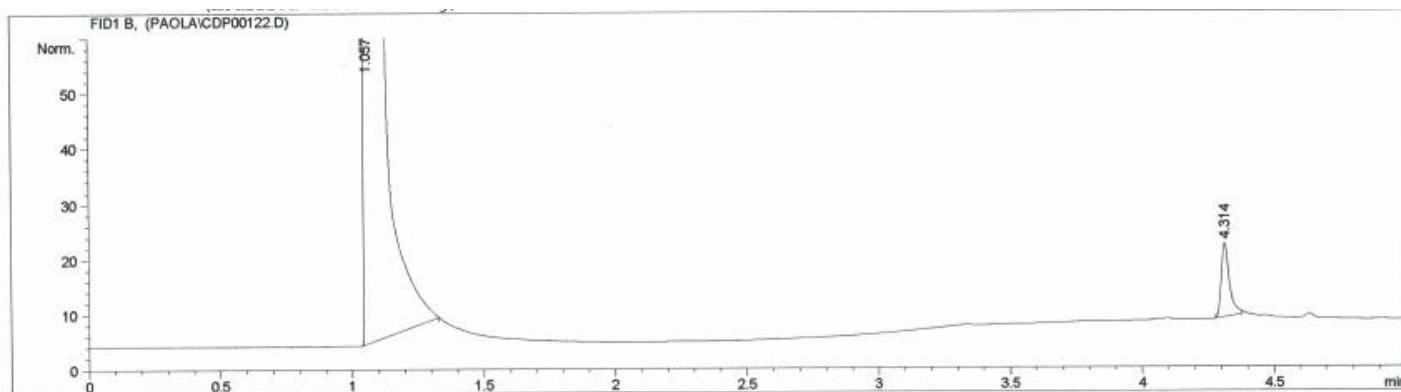


Figura 5.14. Cromatograma patrón de CBD 50.0 ppm

Los resultados del calibrado realizado aparecen en la tabla 5.3 y la representación gráfica, en la figura 5.15. Los límites de detección y cuantificación para la cromatografía de gases son 0.95 ppm y 2.88 ppm, respectivamente. Otros cromatogramas aparecen en el anexo, figuras 9.30 y 9.31.

Concentración (ppm)	Área	t <sub>r</sub> (min)
200,0	125,1	4,310
50,0	31,51	4,314
10,0	6,92	4,314
4,0	2,30	4,316
2,0	1,24	4,310
1,0	1,04	4,310

Tabla 5.3. Línea de calibrado CBD (GC)

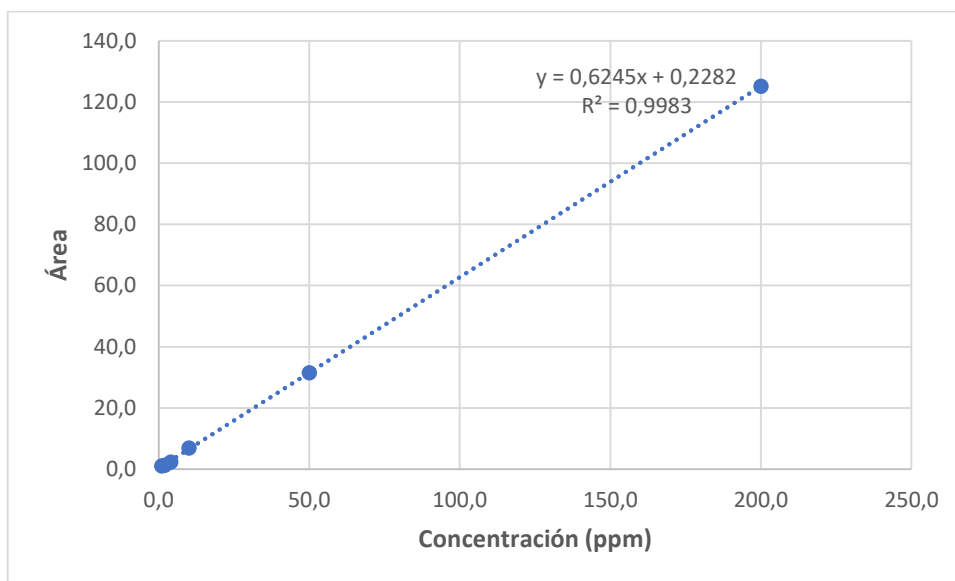


Figura 5.15. Representación gráfica del calibrado CBD (GC)



## 6. Cannabidiol (CBD) en muestras adulteradas. Parte experimental y resultados

Se estudia la posibilidad de determinar CBD en muestras de procedencia ilegal, en las que pudieran aparecer otras sustancias como consecuencia de las manipulaciones realizadas en las mismas, relacionado con el comercio al menudeo. Para ello, se prepararon en agua y en metanol, mezclas de CBD con cocaína, lidocaína, cafeína y procaína.

### 6.1. Preparación de muestras

Cantidad de muestras tomadas con contenido en *cocaína*  $0.02615 \pm 0.00001$  g; *cafeína*  $0.02667 \pm 0.00001$  g; *procaína*  $0.02574 \pm 0.00001$  g; *lidocaína*  $0.01287 \pm 0.00001$  g. En todos los casos, se trató cada una de las muestras con agua, se filtraron y el líquido de filtrado se llevó a un matraz aforado, enrasando con agua a 25 ml.

Cantidad de muestras tomadas con contenido en *cocaína*  $0.00335 \pm 0.00001$  g; *cafeína* y *procaína*  $0.00266 \pm 0.00001$  g cada uno; *lidocaína*  $0.00103 \pm 0.00001$  g. En este caso, se trataron con metanol las muestras, se filtraron y el líquido de filtrado se llevó a un matraz aforado, enrasando con metanol a 25 ml.

### 6.2. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

#### 6.2.1. Estudio de la influencia de la longitud de onda

Se realiza un estudio previo de las longitudes de onda de absorción de cada uno de los compuestos anteriormente mencionados, en las figuras 6.1 a 6.4 se muestran los espectros obtenidos.

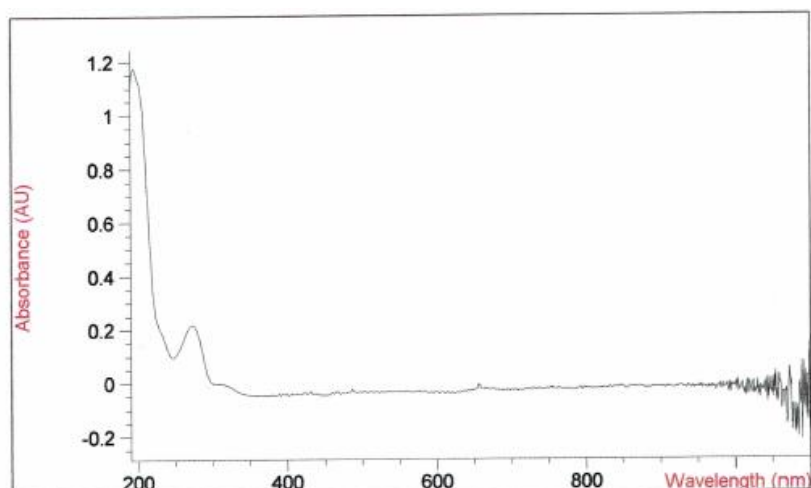


Figura 6.1. Espectro de cocaína

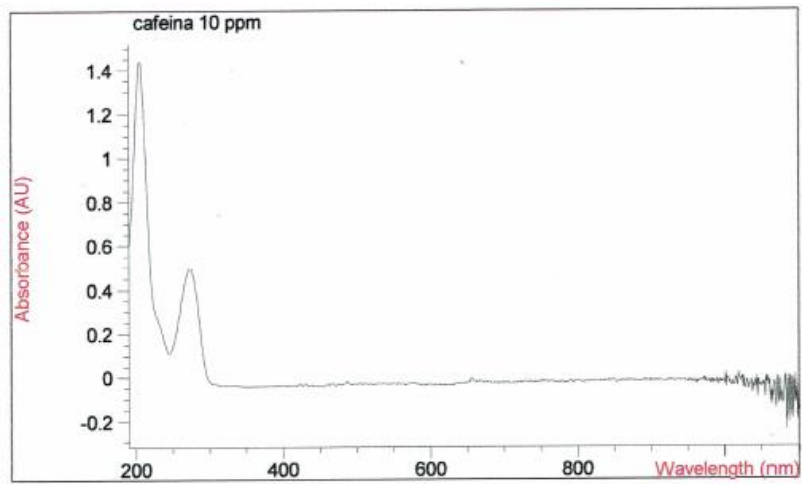


Figura 6.2. Espectro de cafeína

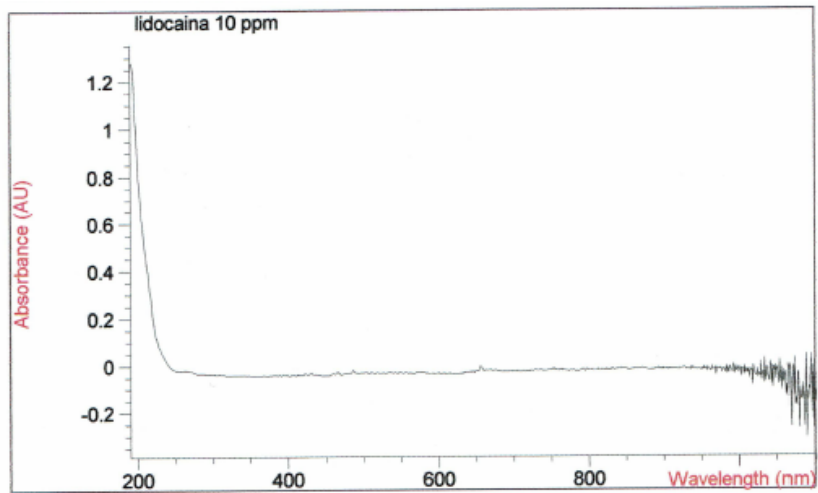


Figura 6.3. Espectro de lidocaína

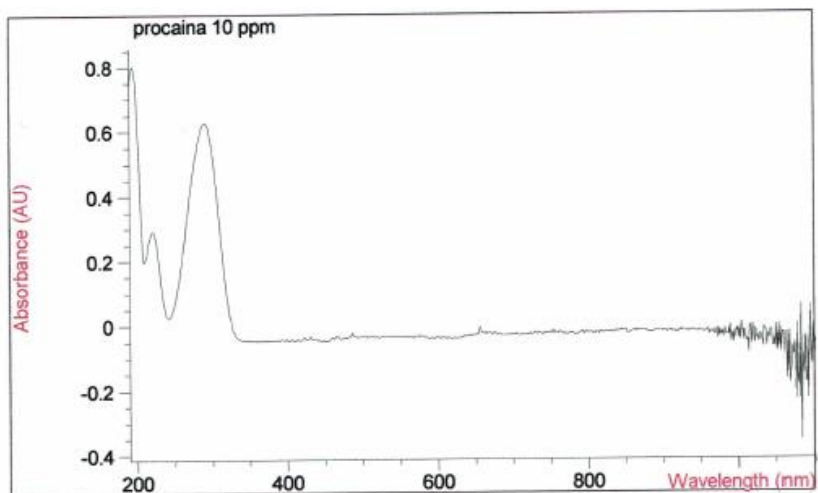


Figura 6.4. Espectro de procaína

Todos los espectros presentan una absorbancia apreciable a 206 nm, longitud de onda seleccionada para llevar a cabo la determinación de CBD por HPLC.

### 6.2.2. Estudio de la fase móvil en determinaciones conjuntas de adulterantes y CBD

Antes de analizar con HPLC las mezclas de CBD y estos compuestos, se analiza cada uno por separado para conocer el tiempo de retención del posible pico. Se utilizan las condiciones de fase móvil de metanol, acetonitrilo y agua en proporción 60:30:10. Los cromatogramas obtenidos de cada compuesto aparecen en el anexo, figuras 9.8 a 9.11.

A continuación, se obtiene el cromatograma, figura 6.5, de una mezcla con contenido en cocaína, lidocaína, cafeína y procaína, más el CBD. Observando que la cocaína y el CBD coeluyen ya que ambos salen a un tiempo de retención de 3 minutos (figura 6.6).

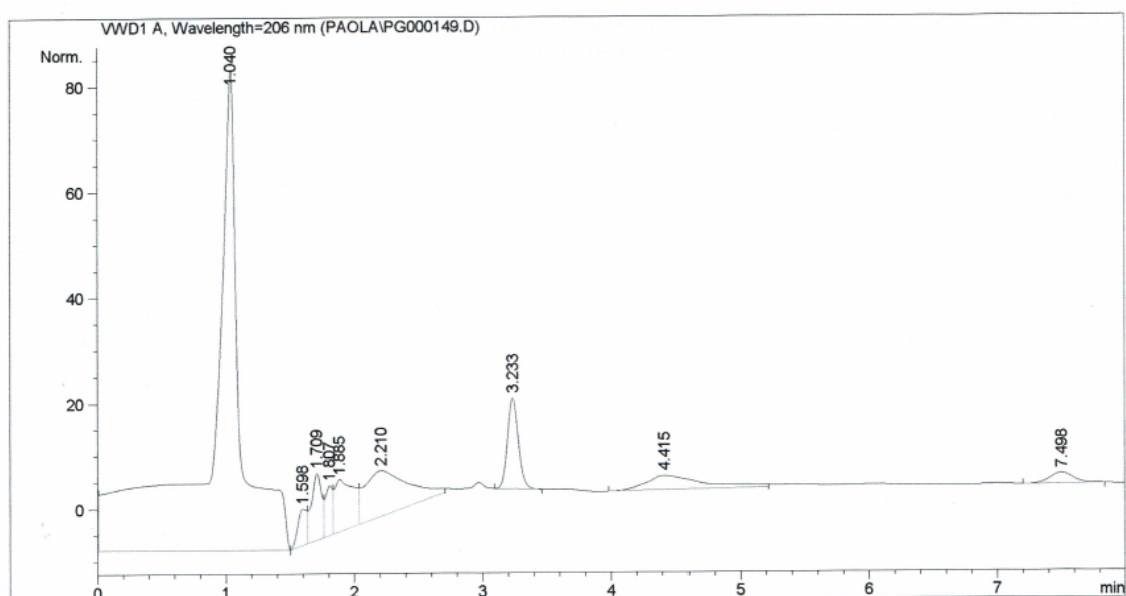


Figura 6.5. Cromatograma mezcla del orden de 10 ppm

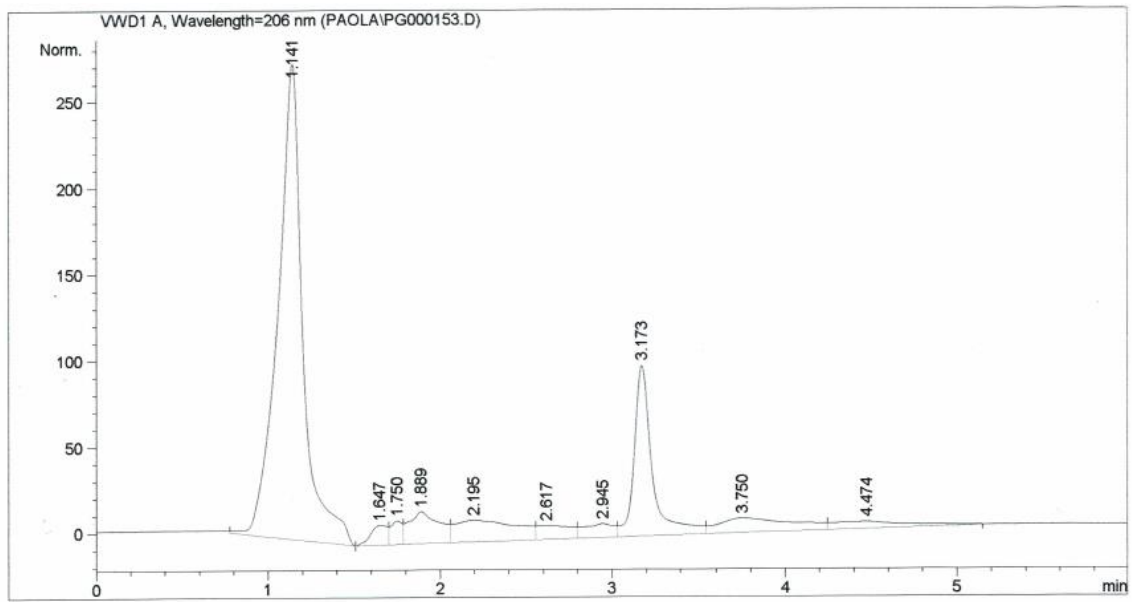


Figura 6.6. Cromatograma mezcla CBD y cocaína

Con el objetivo de separar estos picos, se utilizó la otra fase móvil descrita anteriormente, compuesta por una mezcla de 82:18 de agua y acetonitrilo. Al obtener el cromatograma de la cocaína, figura 6.7, el pico se adelanta a un tiempo de 2.9 min.

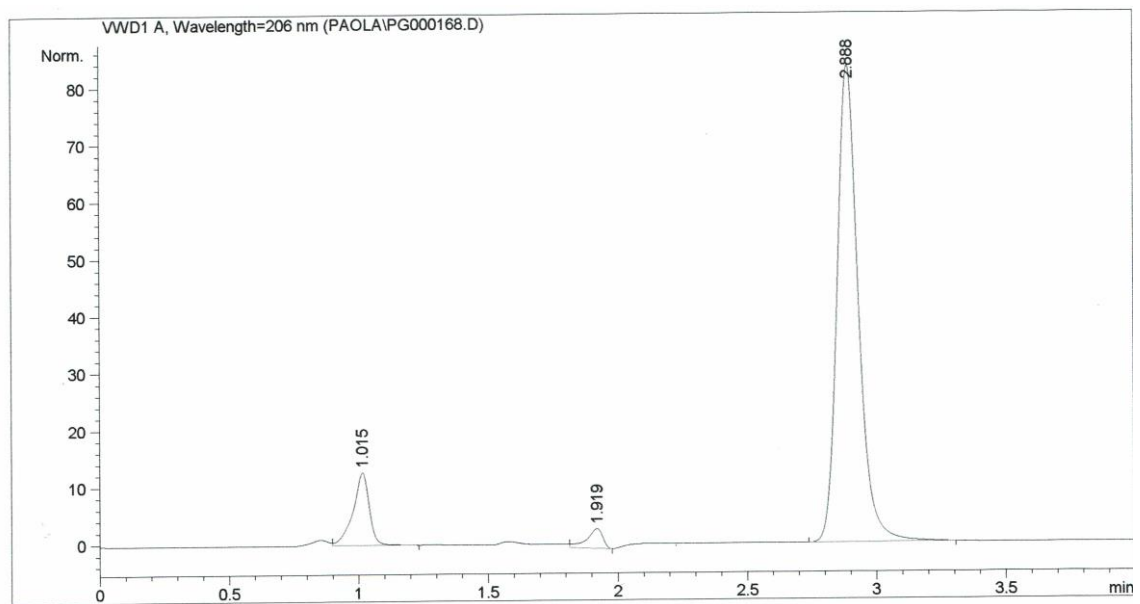
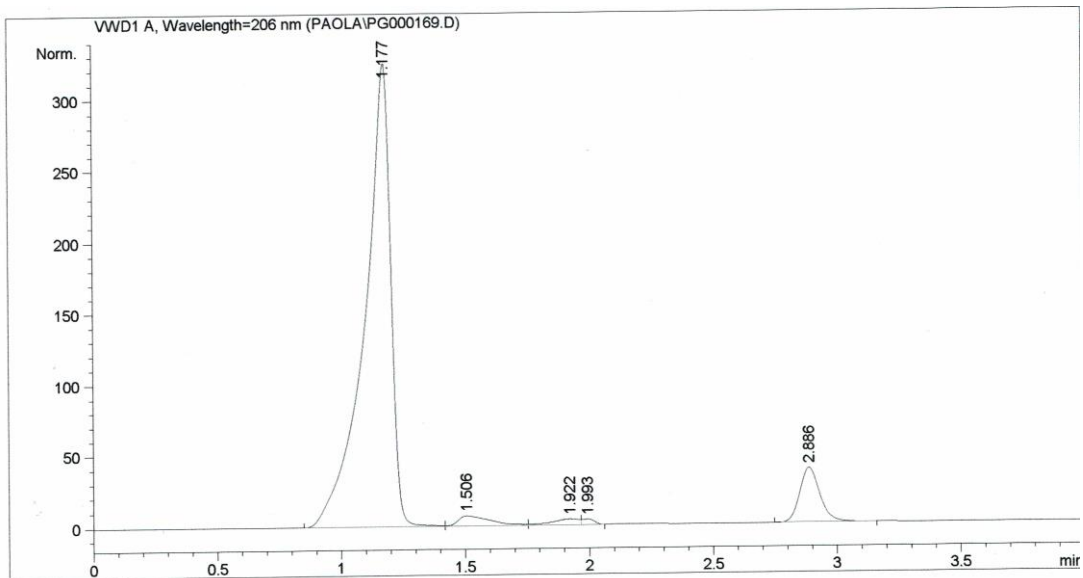


Figura 6.7. Cromatograma cocaína del orden de 10 ppm (82:18)

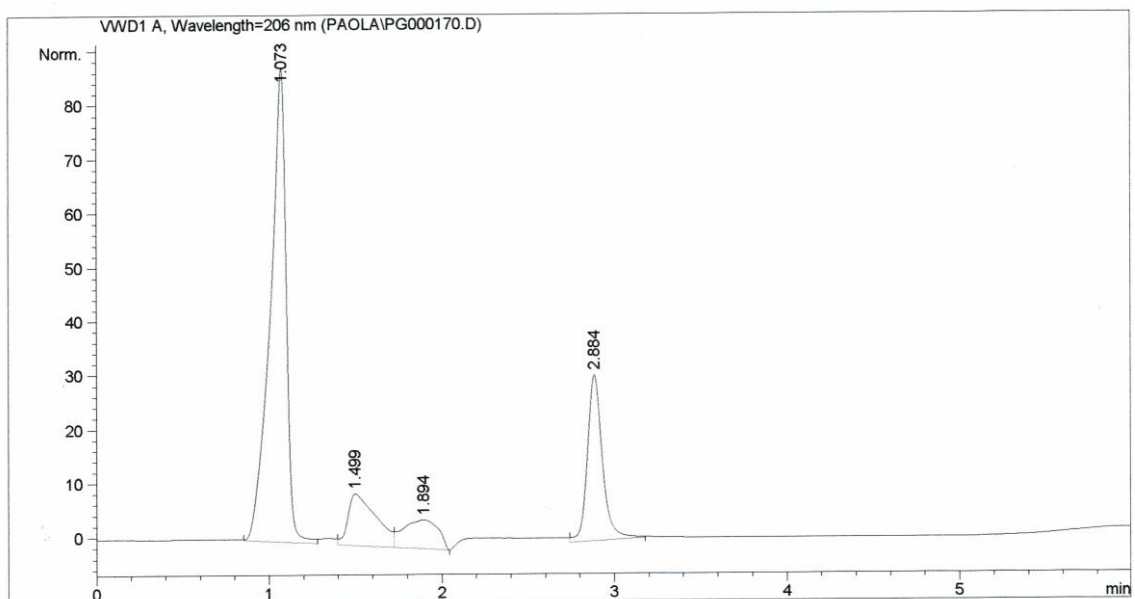
Al obtener el cromatograma de una mezcla de CBD y cocaína, se comprueba que con esta fase móvil se separan. Como se puede observar en la figura 6.8, el pico del CBD sale a un tiempo de retención de 1 min.



**Figura 6.8.** Cromatograma mezcla CBD y cocaína del orden de 10 ppm (82:18)

Con esta fase móvil, 82% de agua y 18% de acetonitrilo, se obtienen también los cromatogramas de las otras muestras: lidocaína, procaína y cafeína (anexo figuras 9.12 a 9.14).

En la figura 6.9 aparece el cromatograma de la mezcla de todas las muestras, incluyendo el CBD. Se obtiene un pico bien definido, correspondiente al CBD, a un tiempo de retención de 1.1 min. Los picos que salen a 1.5 min y 1.9 min, posiblemente son impurezas de las muestras adulteradas, y el de 2.9 min es el correspondiente a la cafeína y a la cocaína, ya que se solapan.



**Figura 6.9.** Cromatograma mezcla del orden de 10 ppm (82:18)

### 6.3. Cromatografía de gases (GC)

Utilizando las condiciones seleccionadas en el apartado 5.3, se lleva a cabo el análisis por GC de cada uno de los adulterantes en metanol: cocaína, lidocaína, procaína y cafeína. Los cromatogramas obtenidos aparecen en las figuras 6.10 a 6.13.

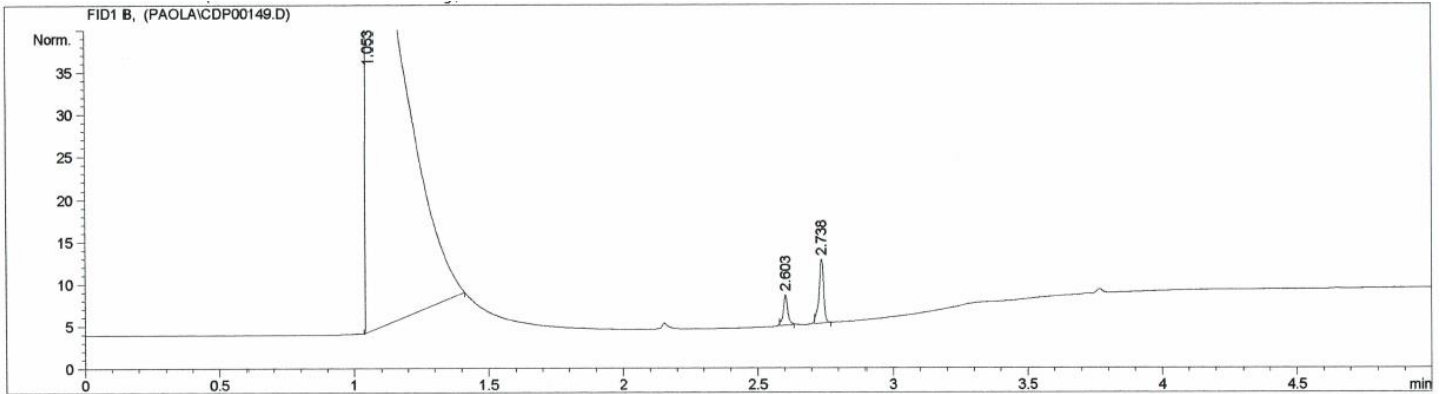


Figura 6.10. Cromatograma cocaína del orden de 10 ppm

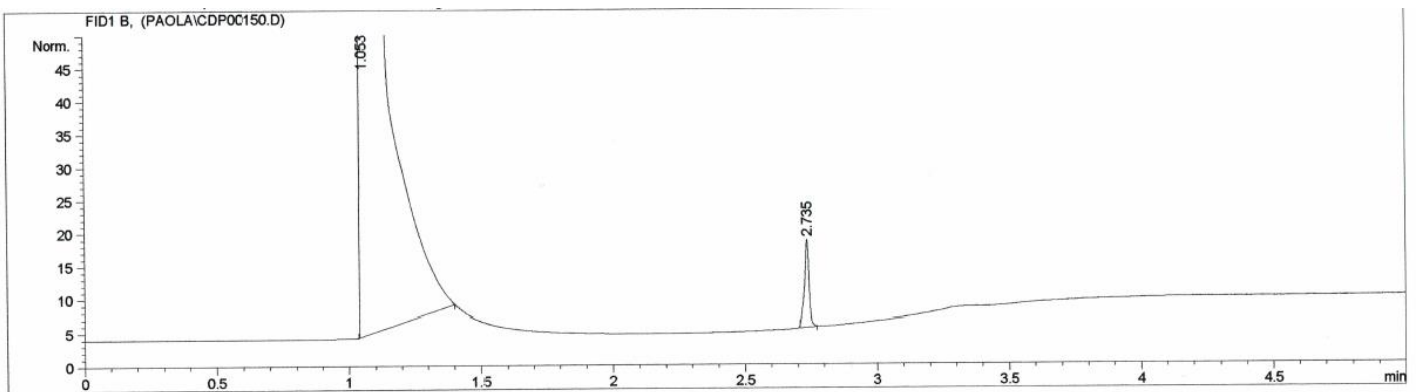


Figura 6.11. Cromatograma lidocaína del orden de 10 ppm

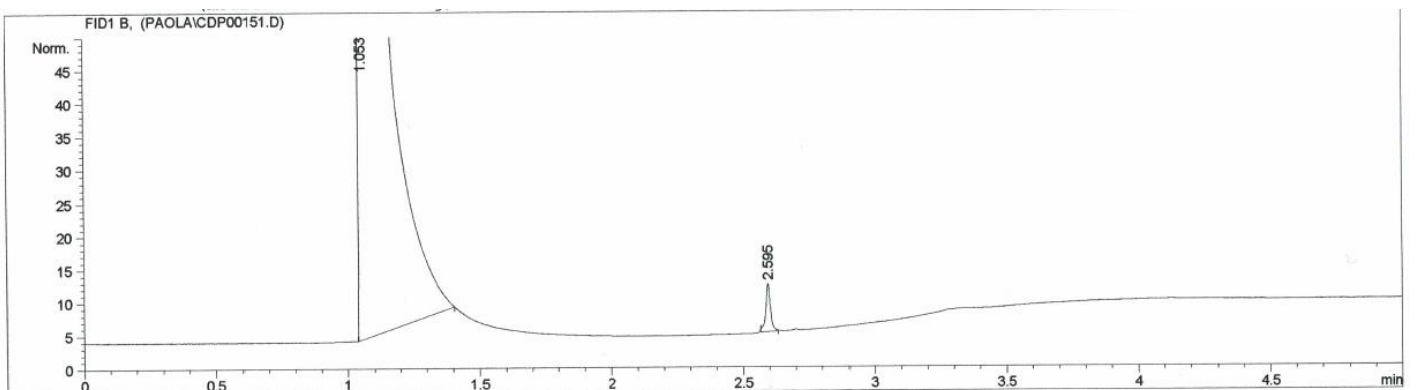


Figura 6.12. Cromatograma cafeína del orden de 10 ppm

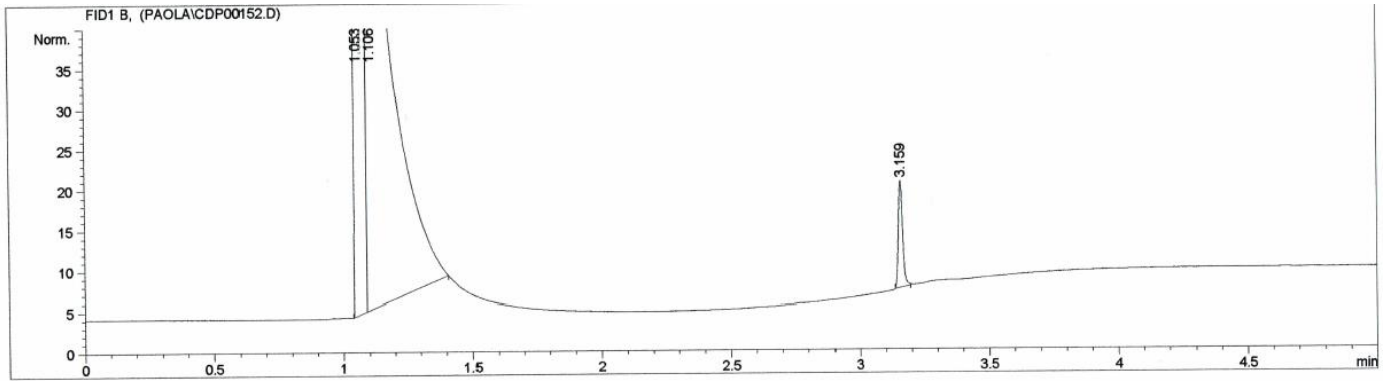


Figura 6.13. Cromatograma procaína del orden de 10 ppm

Comparando los tiempos de retención obtenidos, al realizar una mezcla de los adulterantes con el CBD (figura 6.14) no se diferencian los picos de cocaína y de lidocaína, ya que ambos salen a 2.7 min. Otros picos en el cromatograma, pueden ser debidos a impurezas desconocidas.

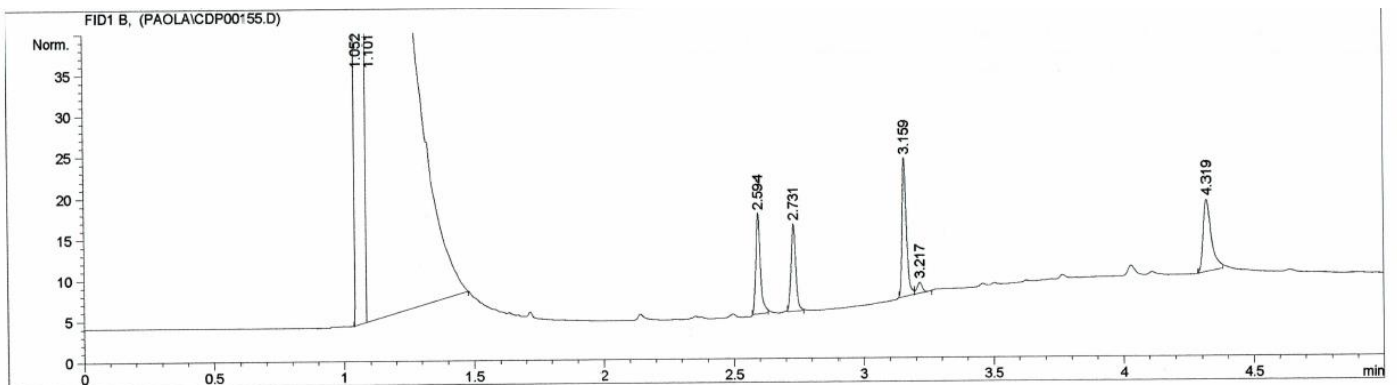


Figura 6.14. Cromatograma mezcla del orden de 10 ppm

### 6.3.1. Estudio de otras condiciones

Con el objetivo de mejorar el proceso de separación de los compuestos y acortar el tiempo de análisis, se realizaron pruebas con otras condiciones. Los mejores resultados se obtuvieron con: temperatura inicial del horno 250 °C durante 1 min y rampa de 2 °C hasta 270 °C durante 1 min.

Se consiguieron adelantar los tiempos de retención, acortando el tiempo de análisis, aunque no se logró la separación de cocaína y lidocaína. En la figura 6.15 se representa el cromatograma de la mezcla de 10 ppm, el orden de aparición de los compuestos es: cafeína, mezcla de cocaína y lidocaína, procaína y CBD. El resto de cromatogramas de cada compuesto por separado aparecen en el anexo, figuras 9.32 a 9.35.

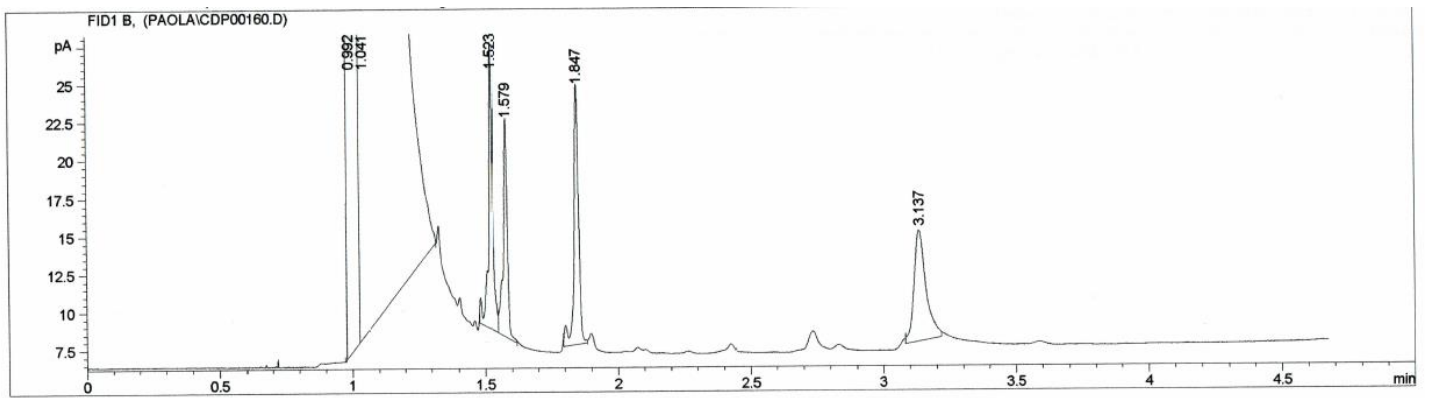


Figura 6.15. Cromatograma mezcla del orden de 10 ppm (otras condiciones)



## 7. Determinación de CBD en extracciones de plantas de cannabis. Parte experimental y resultados

### 7.1. Tiempo de extracción

Para comprobar la capacidad de extracción del disolvente, metanol en este caso, se realiza la extracción de aproximadamente 0.3 g de muestra a temperatura ambiente y a diferentes tiempos de extracción: 5, 10, 20 y 40 min.

En cada tubo, donde se va a realizar la extracción, se adiciona el cannabis y 20 ml de metanol, y se lleva a cabo la extracción mediante agitación automática en los tiempos indicados arriba. El líquido filtrado se enrasa a 25 ml con metanol. La disolución a inyectar en el cromatógrafo, en la preparación de los viales, se pasa previamente a través de un filtro de jeringa.

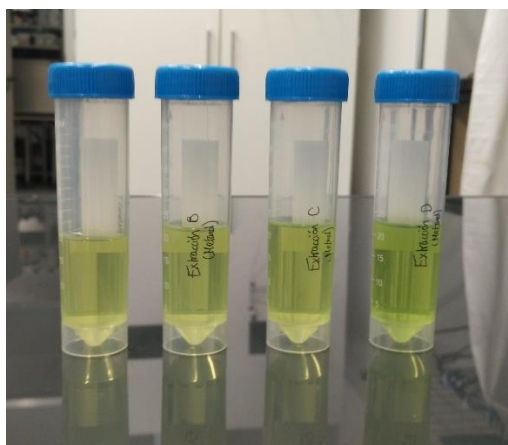
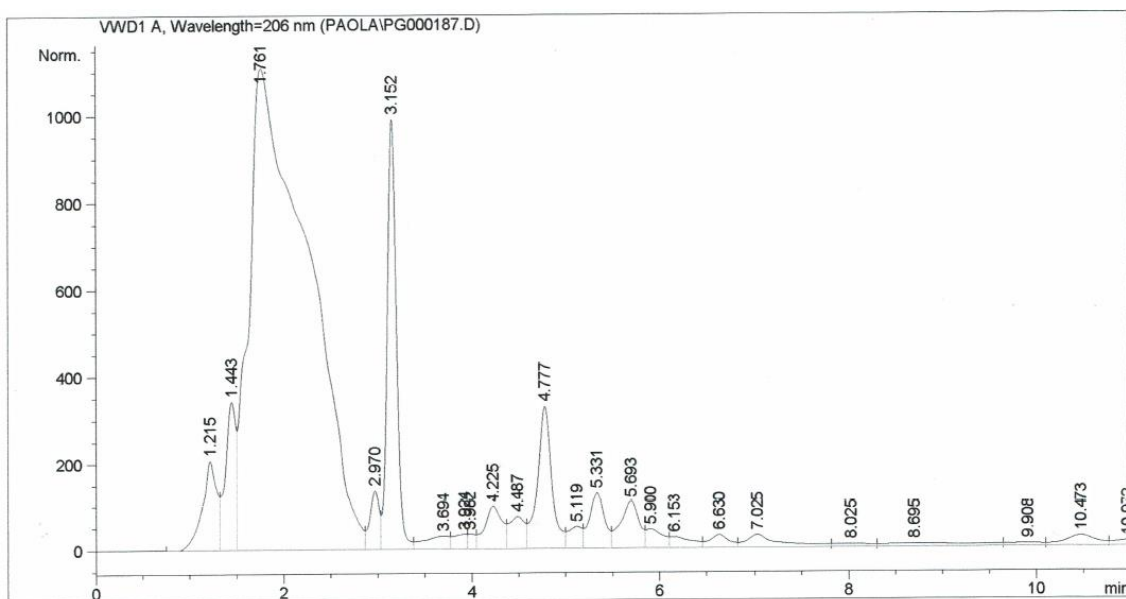


Figura 7.1. Extracciones realizadas (A, B, C y D)

#### 7.1.1. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

Las extracciones de cannabis se analizan por HPLC utilizando las dos fases móviles estudiadas: 82% agua y 18% acetonitrilo (anexo, figuras 9.15 a 9.18); 60% metanol, 30% acetonitrilo y 10% agua. Al comparar los cromatogramas obtenidos, se elige la segunda mezcla de fase móvil ya que el pico está más definido, como se puede observar en la figura 7.2.



**Figura 7.2.** Cromatograma de la extracción de cannabis (5 min)

En esta figura se muestra el resultado obtenido para la extracción de cannabis a los 5 min de agitación. El pico del CBD es el que sale a 3.1 min, los otros dos picos con mayor área son debidos a otros compuestos presentes en el cannabis, que se extraen con el metanol pero que no dificultan la medida. El resto de cromatogramas obtenidos se encuentran en el anexo, figuras 9.19 a 9.22.

Con los resultados obtenidos utilizando la línea de calibrado correspondiente (figura 5.9), se calcula la cantidad de CBD existente en cada extracción (tabla 7.1), el volumen final para las cuatro extracciones es el mismo, 25 ml.

Extracciones cannabis	Tiempo de extracción (min)	$t_r$ (min)	Pesado cannabis (g)	g/kg
A	5	3,152	0,3402	2,7
B	10	3,139	0,3203	1,3
C	20	3,138	0,3115	2,8
D	40	3,143	0,3267	2,7

**Tabla 7.1.** Cantidad de CBD en cada extracción (HPLC)

Teniendo en cuenta las cantidades de g/kg obtenidas, se observa que el tiempo de extracción no es un factor determinante ya que se obtienen cantidades similares. El valor más bajo de la extracción B puede ser debido a la homogeneización de la muestra de la planta de cannabis, ya que no todas las partes de la planta poseen la misma cantidad de CBD como se ha visto en la bibliografía (de mayor a menor: cogollo, hoja y tallo).

### 7.1.2. Cromatografía de gases (GC)

Se obtienen los cromatogramas de las extracciones de cannabis realizadas mediante GC, en la figura 7.3 se muestra el resultado de la extracción A' (5 min), obteniéndose el pico de CBD a un tiempo de retención de 4.3 min. El resto de cromatogramas obtenidos se recogen en el anexo, figuras 9.36 a 9.38.

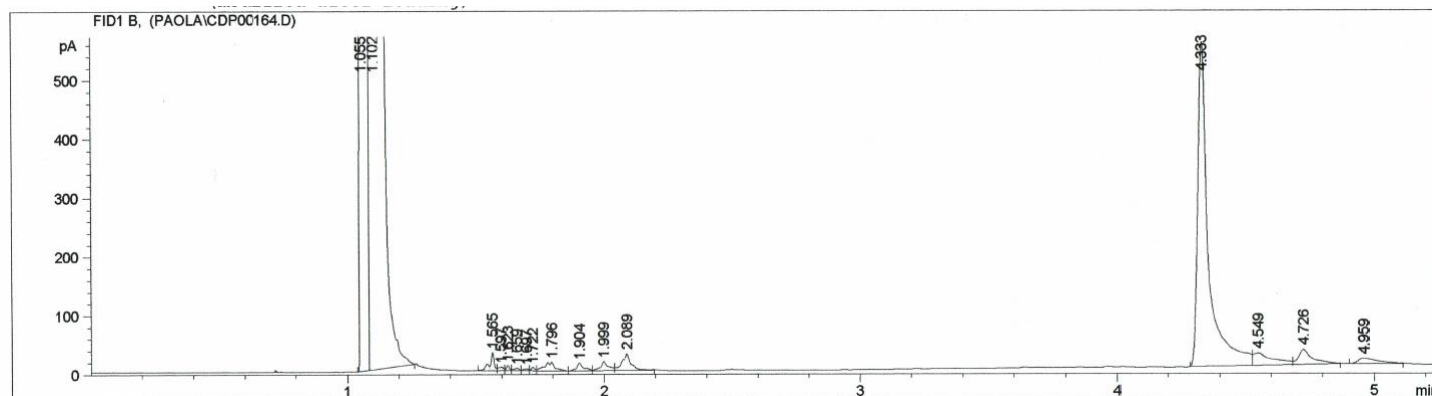


Figura 7.3. Cromatograma extracción 5 min

Los resultados obtenidos para las extracciones de cannabis mediante GC se recogen en la tabla 7.2. La relación de g/kg es similar en las extracciones lo que implica que, como en el caso de HPLC, usando este procedimiento el tiempo de extracción no es determinante a partir de cinco minutos.

Extracciones cannabis	Tiempo de extracción (min)	$t_r$ (min)	Pesado cannabis (g)	g/kg
A'	5	4,333	0,3412	3,9
B'	10	4,326	0,3231	3,5
C'	20	4,326	0,3108	9,4
D'	40	4,332	0,3255	3,7

Tabla 7.2. Cantidad de CBD en cada extracción (GC)

Se obtiene una mayor cantidad (g/kg) de CBD con GC que con HPLC, debido a que en la planta de cannabis pueden existir cannabinoides ácidos y neutros (CBDA y CBD en el caso del cannabidiol). Con el aumento de temperatura, los ácidos se convierten en los neutros, lo que puede aumentar lo detectado.

## 7.2. Estudio con respecto al procedimiento de extracción

Se realiza este estudio con el objetivo de comprobar, si la extracción mediante el método Soxhlet puede ser una mejor opción comparado con las extracciones en agitación constante. Los parámetros a analizar son el tiempo de extracción y la cantidad de CBD extraído.

La cantidad de la planta de cannabis utilizada es aproximadamente 1.3 g y como extractante se utilizan 250 ml de metanol. Se realizan cinco ciclos con una duración de alrededor de 25 min cada uno. Una vez que el proceso de extracción ha finalizado, se destila parte del metanol para concentrar el extracto, se filtra y se enrasa a 50 ml.

El extracto obtenido con este procedimiento presenta un color verde muy intenso, se filtra para evitar posibles impurezas en suspensión. Antes de inyectarlo en el cromatógrafo se utiliza un filtro de jeringa.



Figura 7.4. Aspecto del extracto de cannabis durante la extracción y al finalizar

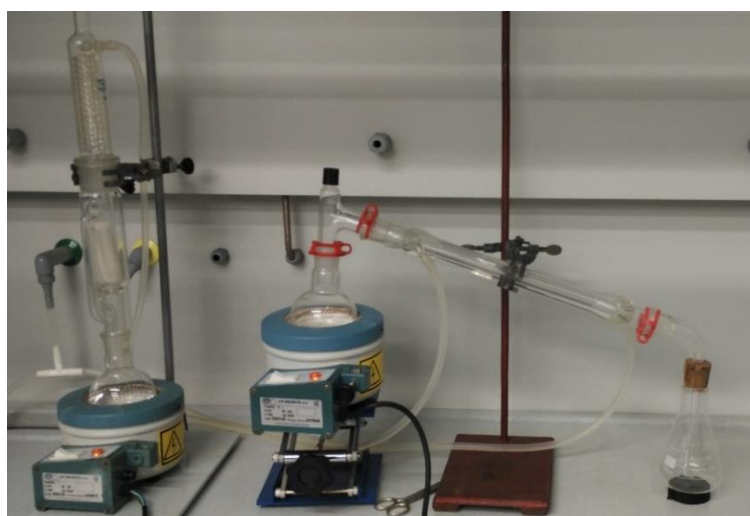


Figura 7.5. Montaje del equipo Soxhlet

### 7.2.1. Cromatografía de gases (GC)

En la figura 7.6, se puede observar el cromatograma obtenido de la extracción con Soxhlet de la planta de cannabis (dilución en el anexo, figura 9.39). El pico del CBD sale a un tiempo de retención de 4.3 min aproximadamente. En la tabla 7.3, aparece el resultado para la extracción de la planta mediante Soxhlet.

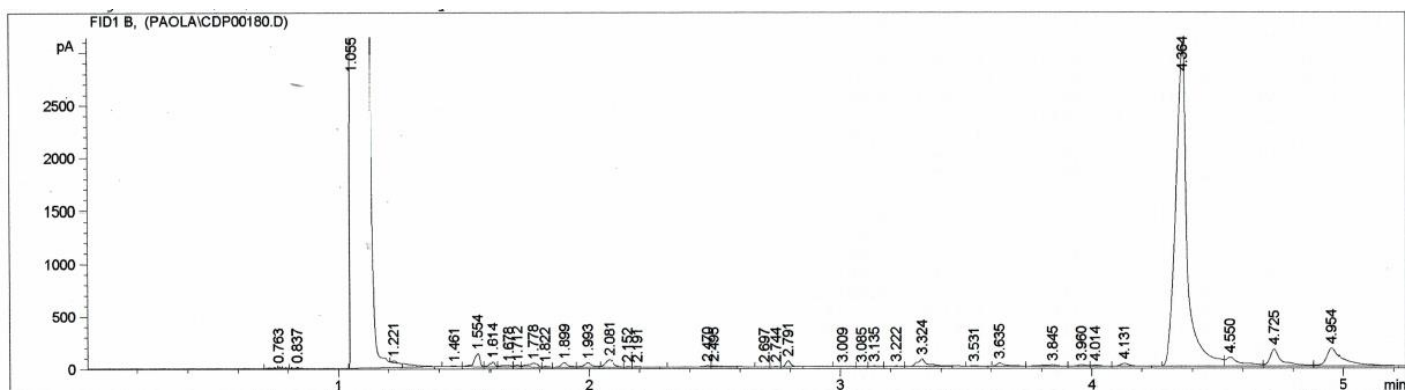


Figura 7.6. Cromatograma de la extracción de cannabis (Soxhlet GC)

<b>t<sub>r</sub> (min)</b>	<b>Pesado cannabis (g)</b>	<b>g/kg</b>
4,364	1,2815	12,6

Tabla 7.3. Cantidad de CBD con Soxhlet (GC)

Comparando los resultados obtenidos de g/kg con ambos métodos utilizados, extracción con agitación constante (aproximadamente 4 g/kg) y mediante Soxhlet (12.6 g/kg), se obtiene una mayor cantidad de CBD con el último.

Aunque se obtiene más cantidad también implica más tiempo de extracción (2 horas y media) y que solo se ha podido realizar una extracción en ese tiempo. Sin embargo, al poder utilizar una mayor cantidad de la planta de cannabis en la extracción, las muestras son más representativas, ya que se utilizan las diferentes partes de la planta (cogollo, hoja y tallo).

Con agitación constante se pueden preparar extracciones de hasta seis tubos de centrífuga e implica un menor gasto de reactivos, en este caso de metanol, ya que con Soxhlet se recupera mediante una destilación. Sin embargo, las muestras en este caso son menos representativas debido a que se pesa una menor cantidad (del orden de 4 veces menor). Por todo ello, se recomienda la extracción con el método Soxhlet.

### 7.2.2. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

El extracto obtenido de la planta de cannabis se inyecta en el cromatógrafo y se obtiene el siguiente cromatograma (figura 7.7) (dilución en el anexo, figura 9.23). El pico correspondiente al CBD sale a un tiempo de retención de 3.1 min. La fase móvil utilizada es una mezcla 60:30:10 de metanol, acetonitrilo y agua, siendo la longitud de onda 206 nm.

En la tabla 7.4, se puede observar el resultado de la cantidad de CBD obtenido de la extracción de cannabis mediante este procedimiento.

<b>t<sub>r</sub> (min)</b>	<b>Pesado cannabis (g)</b>	<b>g/kg</b>
3,132	1,2815	8,5

Tabla 7.4. Cantidad de CBD con Soxhlet (HPLC)

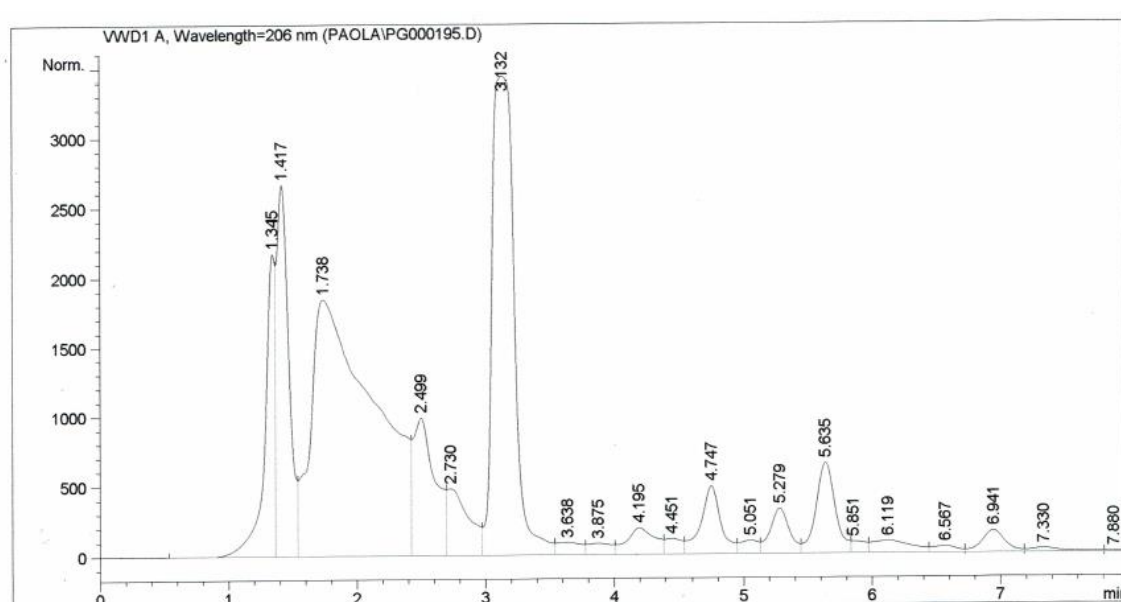


Figura 7.7. Cromatograma de la extracción de cannabis (Soxhlet HPLC)

Comparando los resultados obtenidos de g/kg con extracción con agitación constante (aproximadamente 3 g/kg) y mediante Soxhlet (8.5 g/kg), se obtiene una mayor cantidad de CBD con este último procedimiento. La comparativa entre los métodos es lo mismo que se ha comentado anteriormente con la cromatografía de gases.

La diferencia de la cantidad obtenida, en g/kg, entre la cromatografía de gases y HPLC es debido a que en la planta de cannabis hay cannabinoides ácidos y neutros. Con el aumento de temperatura los ácidos se transforman en neutros, en el caso del cannabidiol se pasa de CBDA a CBD, lo que conlleva que se pueda detectar una mayor cantidad.



### 7.3. Estudio de posibles interferencias de otros compuestos presentes en la planta de cannabis

Tanto en las extracciones de la planta de cannabis con agitación constante como con Soxhlet, los extractos obtenidos presentan una tonalidad verde debido a la clorofila. Para comprobar si esta u otros componentes de la planta pueden afectar a la determinación de CBD y dado que no se disponía de patrones de clorofila y de otros componentes habituales en las plantas, se lleva a cabo un estudio con cuatro plantas diferentes a las que teníamos acceso: Begonia Erythrophylla (1), Aeonium (2), Potho (3) y Yuca (4).

Se lleva a cabo la extracción de las cuatro plantas mediante agitación constante, se pesan alrededor de 0.3 g y se llevan a un tubo de centrifuga añadiendo 20 ml de metanol como extractante. Se mantiene la agitación durante 20 min, lo obtenido se filtra y se enrasa a 25 ml, luego se inyecta utilizando un filtro de jeringa.

Se muestra en la figura 7.8 las plantas utilizadas y en la figura 7.9, el aspecto de los extractos obtenidos.



**Figura 7.8.** Plantas utilizadas de izquierda a derecha: 1, 2, 3 y 4

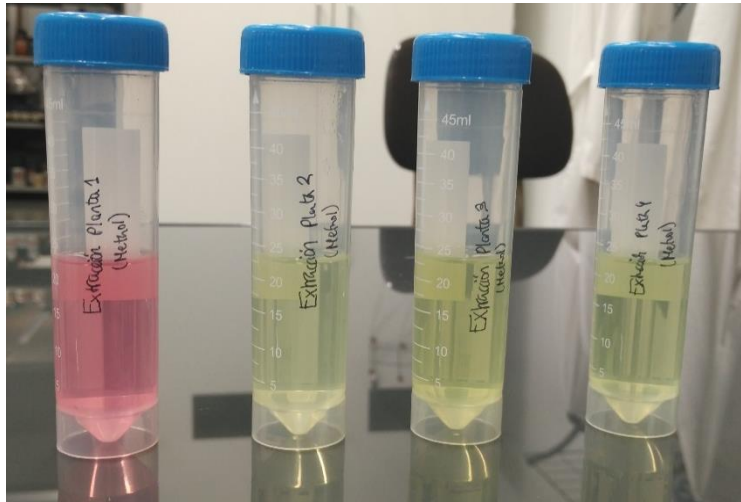


Figura 7.9. Extractos obtenidos de las plantas

### 7.3.1. Absorción UV-VIS

Con el objetivo de comprobar si la clorofila u otros componentes de la planta pueden afectar a la determinación del CBD, se realiza un barrido entre 200 nm y 800 nm. Los espectros obtenidos de las cuatro plantas aparecen en las figuras 7.10 a 7.13.

En la tabla 7.5, aparecen los valores de las absorbancias obtenidos a las dos longitudes de onda estudiadas con el CBD, 206 nm y 280 nm, se observa que las plantas poseen valores de absorbancia apreciables.

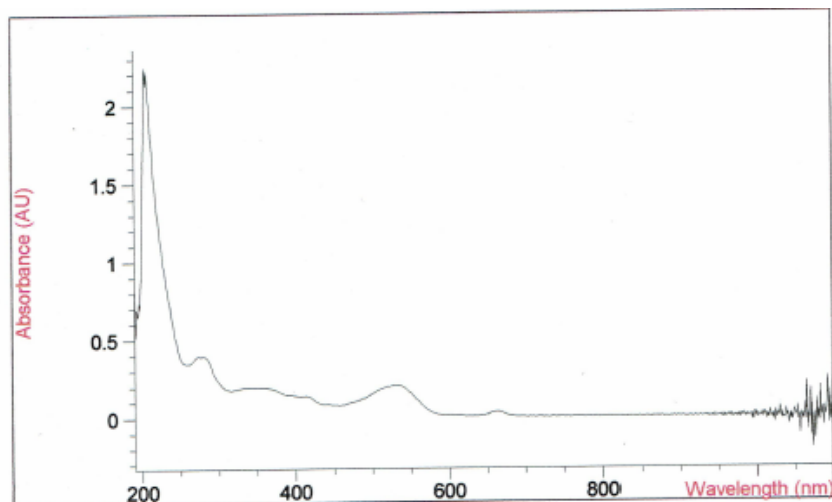


Figura 7.10. Espectro planta 1 (Begonia Erythrophylla)



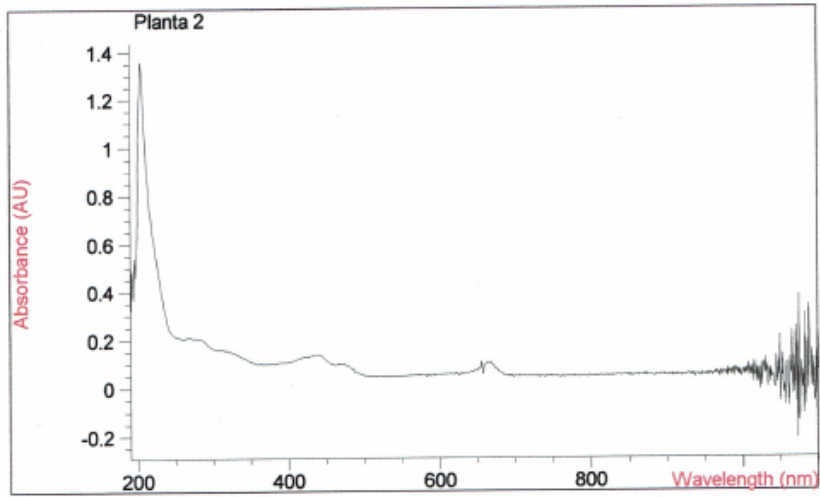


Figura 7.11. Espectro planta 2 (Aeonium)

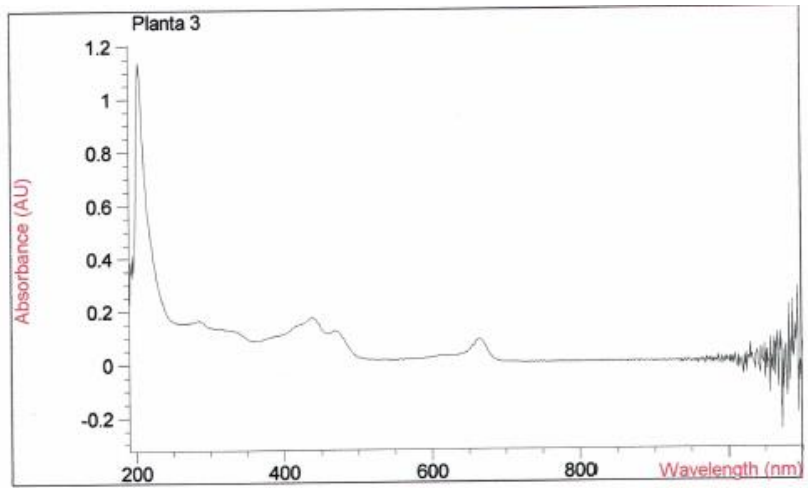


Figura 7.12. Espectro planta 3 (Potho)

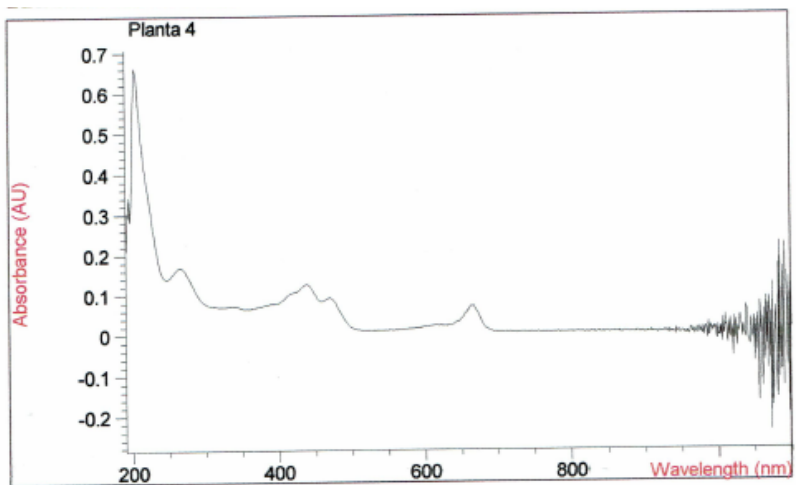


Figura 7.13. Espectro planta 4 (Yuca)

Planta	Absorbancia	
	206 nm	280 nm
1	2,137	0,395
2	1,285	0,205
3	1,062	0,161
4	0,638	0,131

Tabla 7.5. Valores de absorbancias obtenidos de los extractos de plantas

### 7.3.2. Cromatografía de gases (GC)

Se obtienen los cromatogramas de las extracciones de las cuatro plantas mencionadas anteriormente, al tiempo de retención del CBD (4.3 min) no aparecen picos con la suficiente intensidad para distinguirlos del ruido de fondo.

Por ello, en las extracciones de la planta de cannabis la presencia de clorofila u otros componentes, que la planta pudiera tener, no afectan a los picos obtenidos del CBD. En la figura 7.14 se refleja el cromatograma de la extracción de la planta 4 (Yuca), el resto de cromatogramas aparece en el anexo, figuras 9.40 a 9.42.

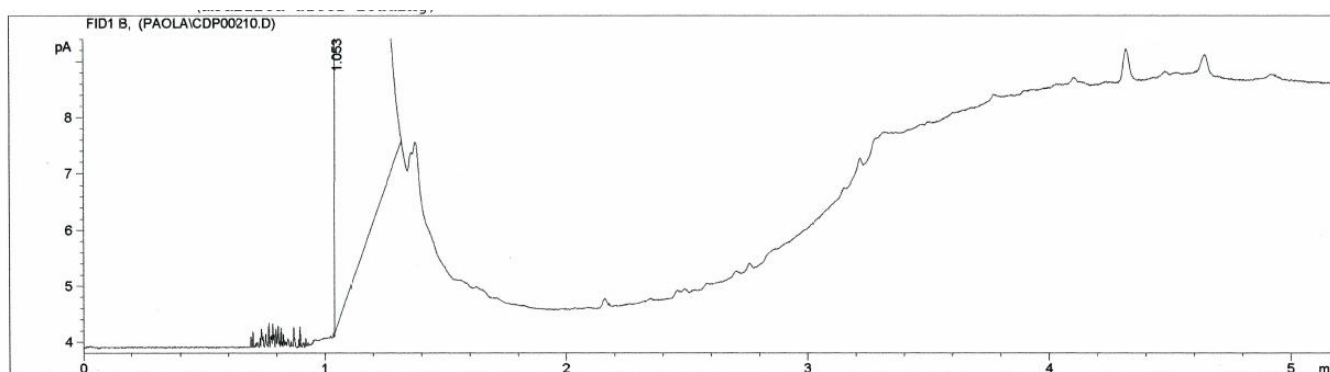


Figura 7.14. Cromatograma extracción planta 4 (GC)

### 7.3.3. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

Utilizando como fase móvil la mezcla 60:30:10 de metanol, acetonitrilo y agua, se obtienen los cromatogramas de las extracciones de las plantas. Al tiempo de retención del CBD, sobre los 3 min, no se observa ningún pico, por lo tanto, la detección del CBD no se ve afectada por la presencia de la clorofila u otros componentes con posibilidad de estar en la planta.

En la figura 7.15 se puede observar el cromatograma correspondiente a la extracción de la planta 4, el resto aparece en el anexo, figuras 9.24 a 9.26.

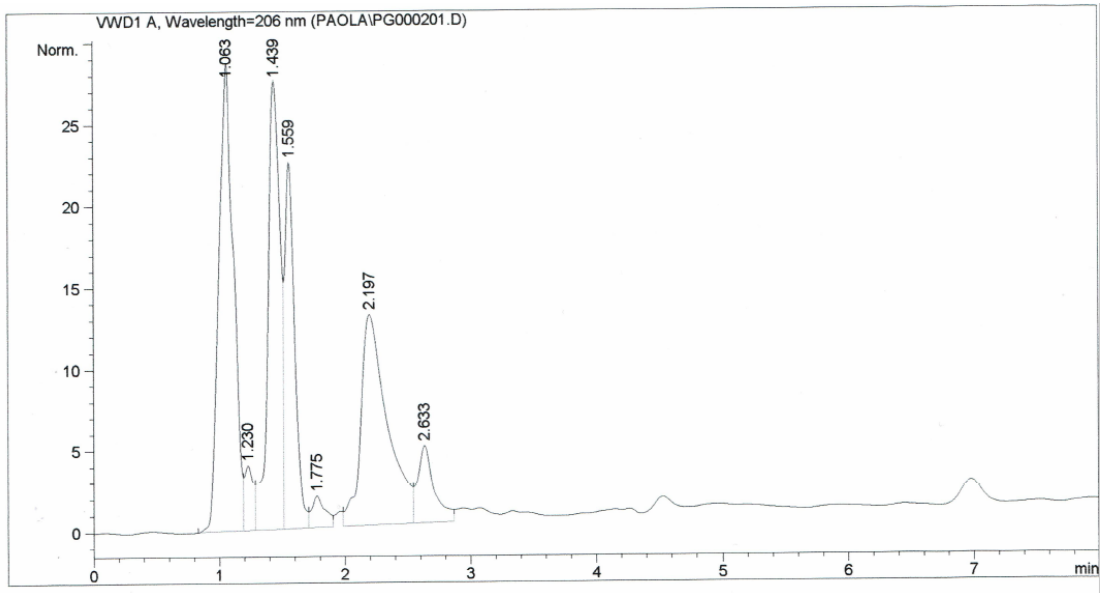


Figura 7.15. Cromatograma extracción planta 4 (HPLC)

Para comprobar la presencia del CBD al tiempo de retención esperado, se lleva a cabo sobre las extracciones de las plantas la adición de una cantidad conocida, 0.2 ml, del patrón de 20.0 ppm de CBD a 0.5 ml de las extracciones.

En la figura 7.16 aparece el cromatograma de la extracción de la planta 4, en el que se comprueba que a 3.1 min sale el pico correspondiente al CBD. El resto de cromatogramas aparece en el anexo, figuras 9.27 a 9.29.

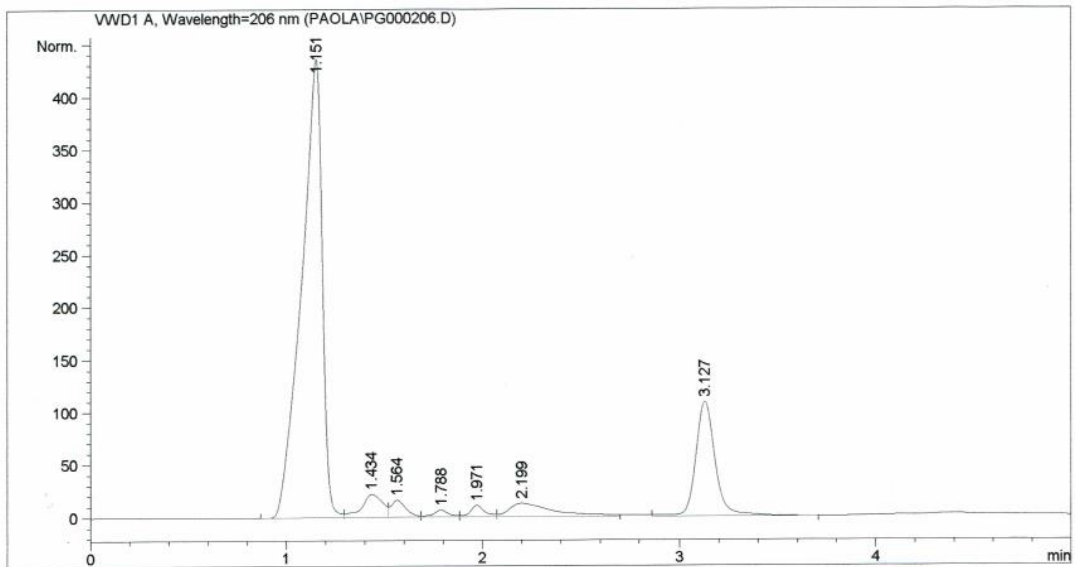


Figura 7.16. Cromatograma de extracción planta 4 + 0.2 ml 20.0 ppm CBD

## 8. Conclusiones

1) Se realiza un estudio del CBD por espectroscopia de absorción molecular UV-VIS para determinar la longitud de onda óptima en las medidas por HPLC, la de mayor absorción corresponde a 206 nm. Se estudia también por esta técnica, la estabilidad de sus disoluciones en metanol frente al tiempo, comprobándose que son estables al menos durante quince días, en ausencia de luz y a 4 °C.

2) Se ha puesto a punto un método para la determinación de CBD por HPLC, se proponen dos fases móviles: a) 60% metanol, 30% acetonitrilo y 10% agua y b) 82% agua y 18% acetonitrilo. Para cada una se obtienen los siguientes resultados:

Fase a) Tiempo de retención del CBD 3.0 min; límite de detección 0.11 ppm y límite de cuantificación 0.34 ppm.

Fase b) Tiempo de retención del CBD 1.1 min; límite de detección 0.16 ppm y límite de cuantificación 0.48 ppm.

En muestras adulteradas con otros compuestos presentes en la distribución y “menudeo” de drogas ilegales, se propone como fase móvil la b), 82% de agua y 18% de acetonitrilo, ya que permite la identificación de CBD en presencia de cocaína.

3) Se ha puesto a punto un método para determinar CBD mediante GC, las condiciones utilizadas son: temperatura del inyector 290 °C; temperatura inicial del horno 200 °C (1.5 min), rampa de 40 °C/min hasta 270 °C (2 min); temperatura del detector 350 °C. En estas condiciones el CBD se determina a un tiempo de retención de 4.3 min, y se puede identificar perfectamente en presencia de los adulterantes citados en el trabajo. Los límites de detección y de cuantificación obtenidos son 0.95 ppm y 2.88 ppm.

4) Se realiza un estudio para la determinación de CBD en plantas de cannabis utilizando metanol como extractante. Los mejores resultados se obtienen mediante extracción Soxhlet, comprobándose la viabilidad de los dos métodos cromatográficos estudiados, HPLC y GC, para la determinación de CBD en este tipo de muestras.

## 9. Anexo

### 9.1. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

#### 9.1.1. Estudio de la fase móvil y calibrados

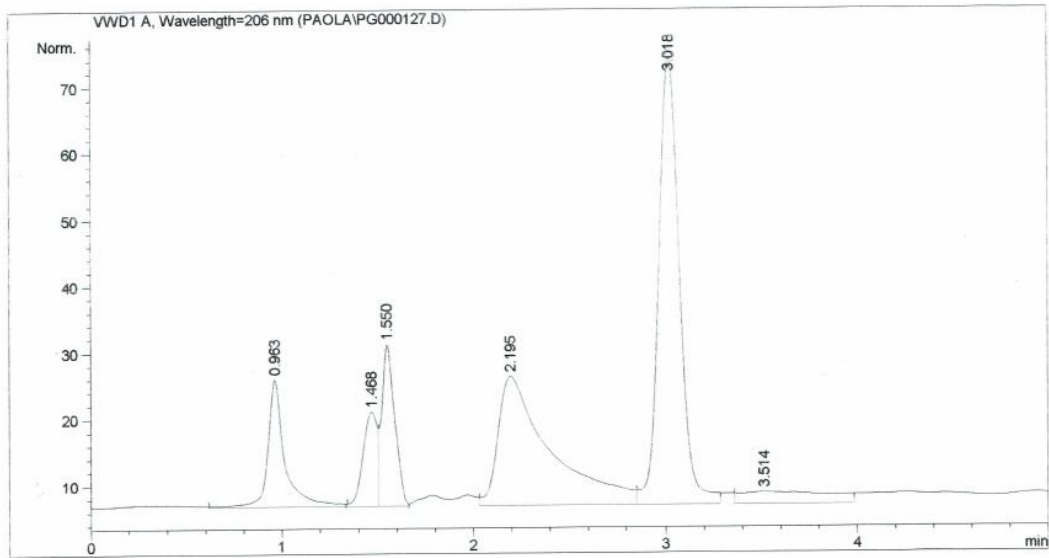


Figura 9.1. Cromatograma patrón CBD 2.5 ppm (60:30:10)

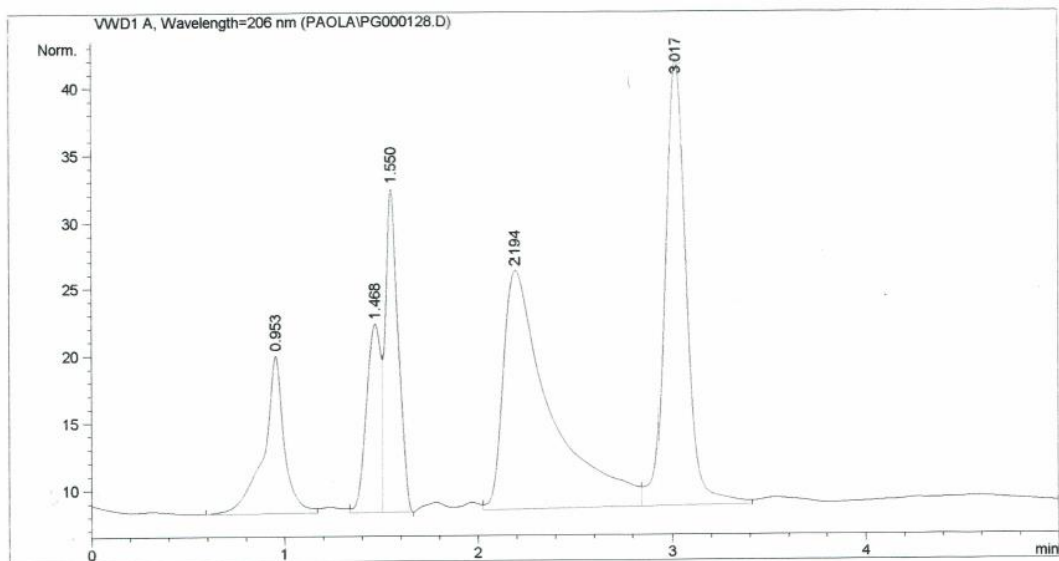


Figura 9.2. Cromatograma patrón CBD 1.3 ppm (60:30:10)

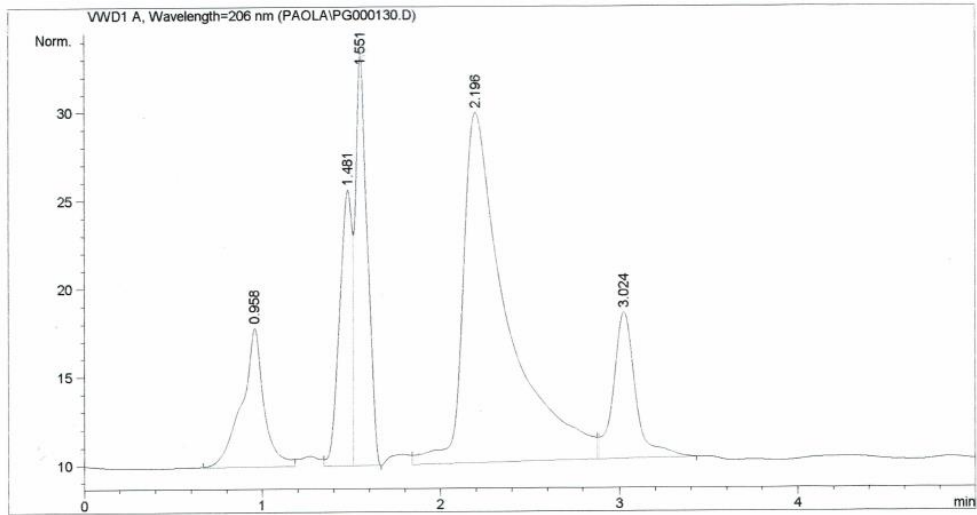


Figura 9.3. Cromatograma patrón CBD 0.3 ppm (60:30:10)

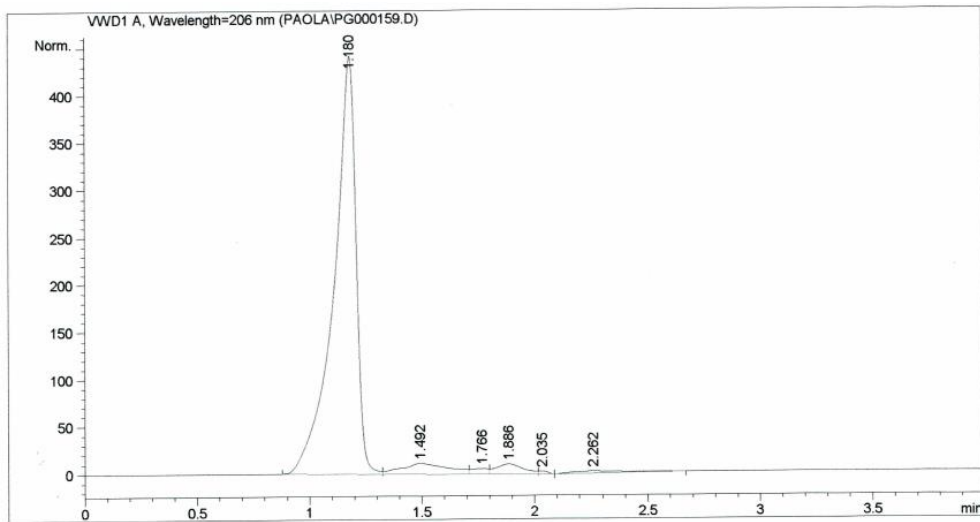


Figura 9.4. Cromatograma patrón CBD 5.0 ppm (82:18)

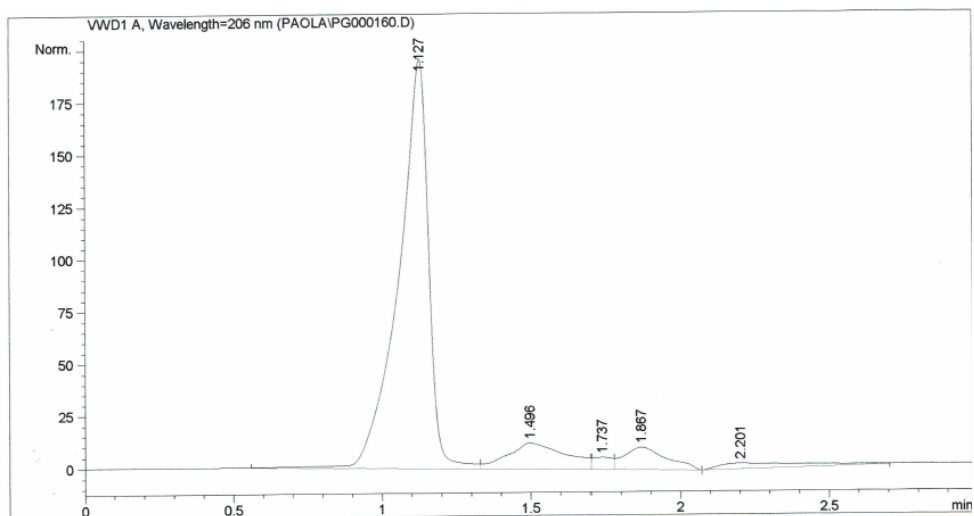


Figura 9.5. Cromatograma patrón CBD 2.5 ppm (82:18)

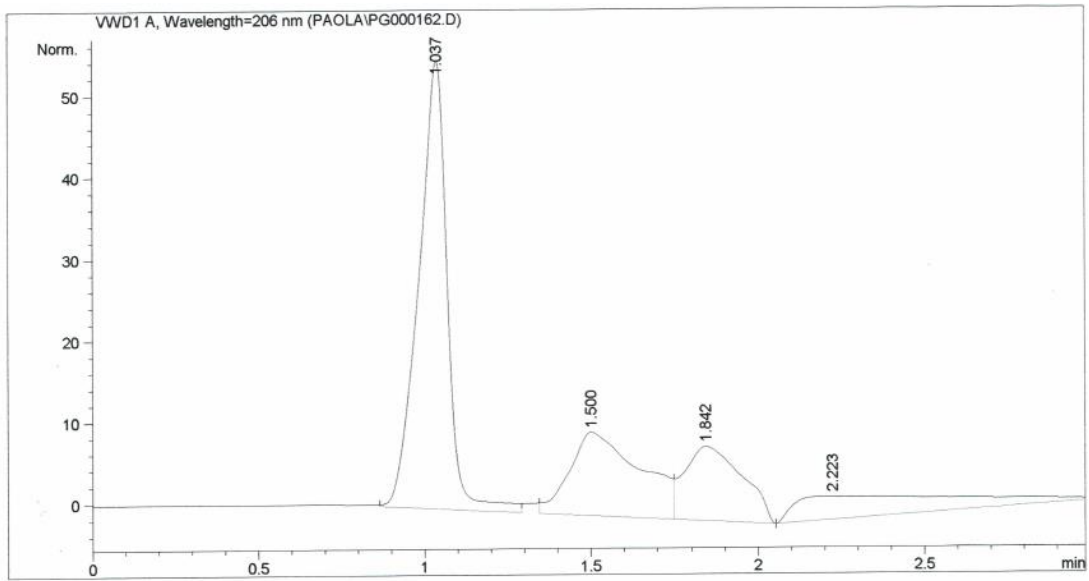


Figura 9.6. Cromatograma patrón CBD 0.6 ppm (82:18)

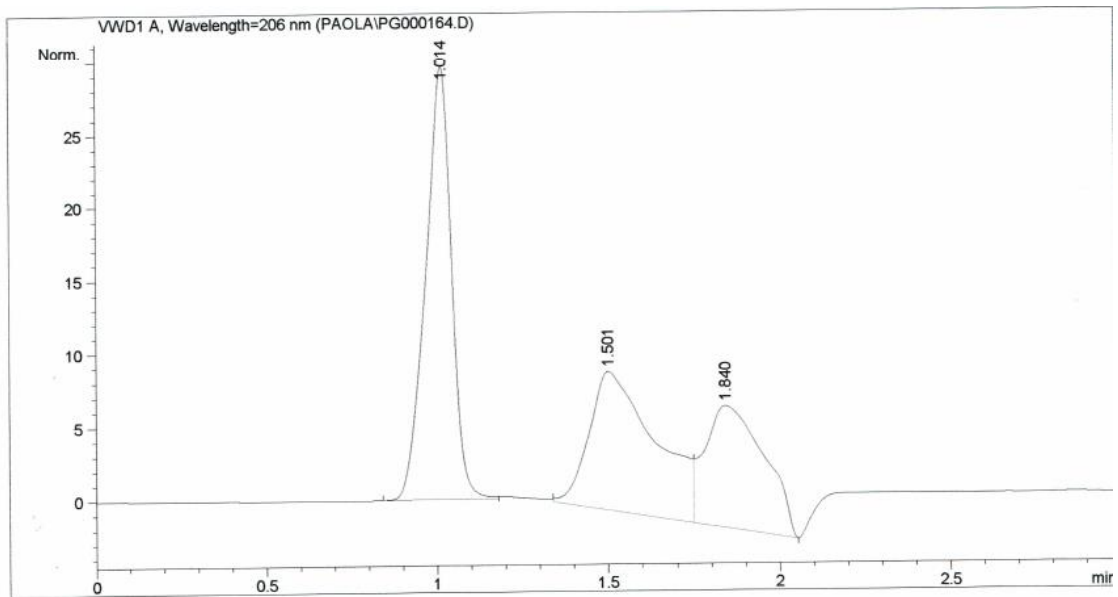


Figura 9.7. Cromatograma patrón CBD 0.15 ppm (82:18)

9.1.2. Estudio de la fase móvil en determinaciones conjuntas de adulterantes y CBD

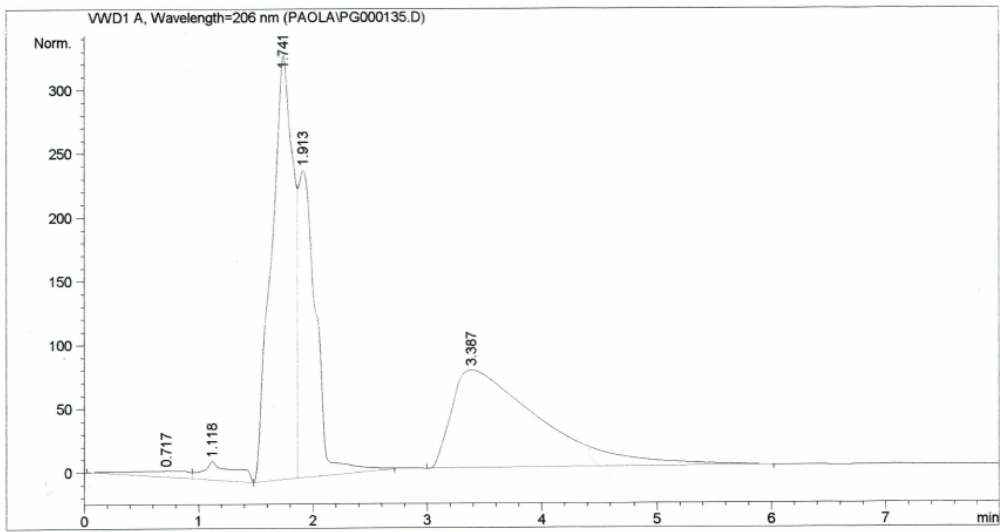


Figura 9.8. Cromatograma cocaína del orden de 100 ppm (60:30:10)

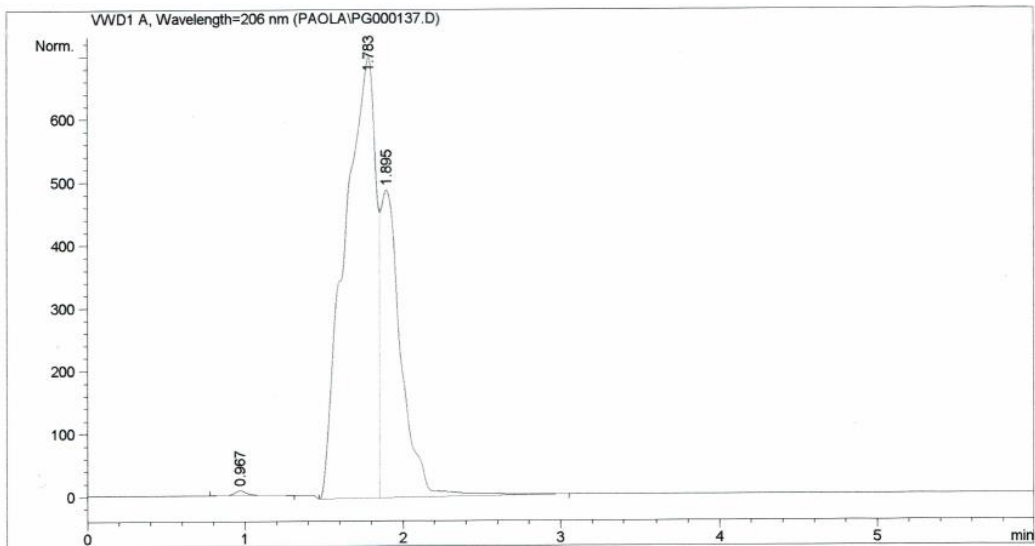


Figura 9.9. Cromatograma cafeína del orden de 100 ppm (60:30:10)

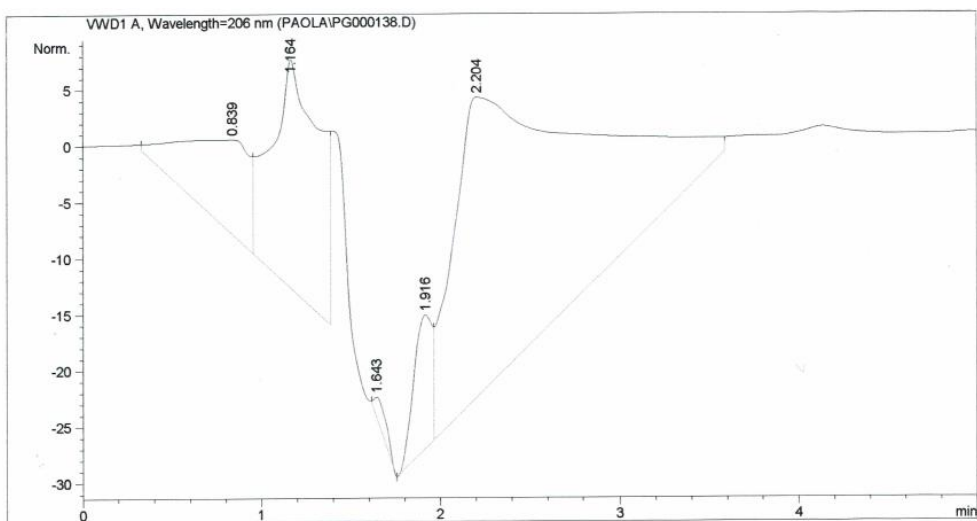


Figura 9.10. Cromatograma procaína del orden de 100 ppm (60:30:10)



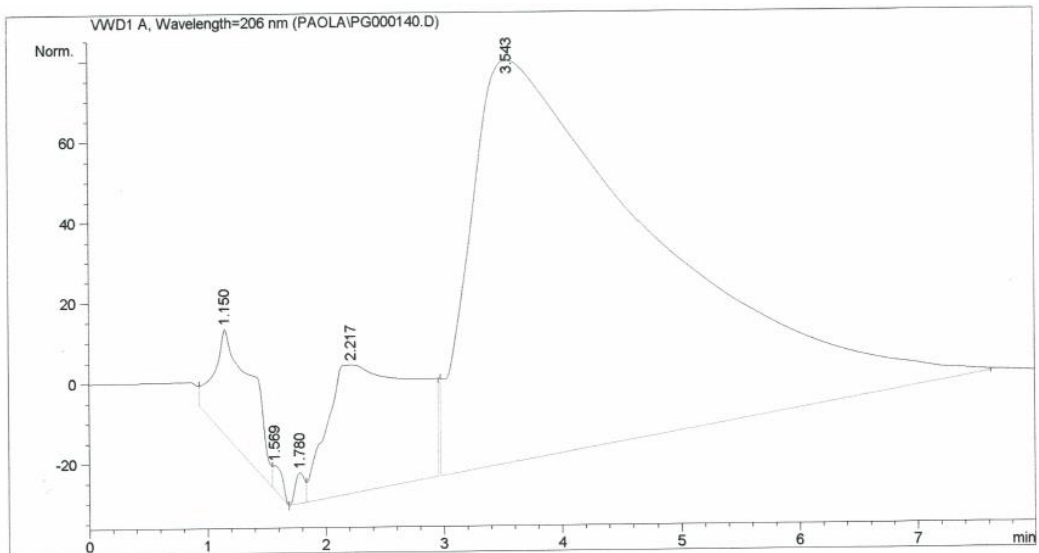


Figura 9.11. Cromatograma lidocaína del orden de 100 ppm (60:30:10)

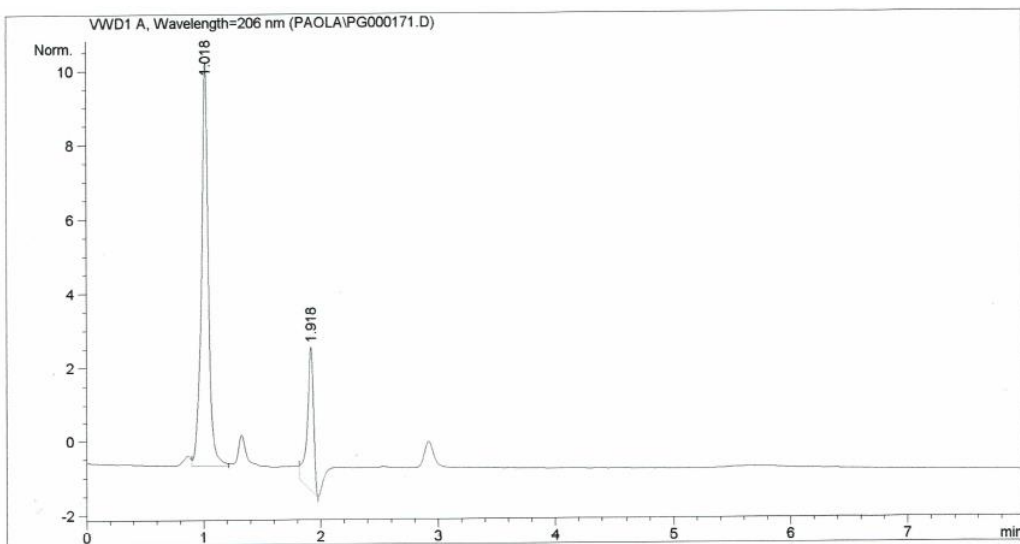


Figura 9.12. Cromatograma lidocaína del orden de 10 ppm (82:18)

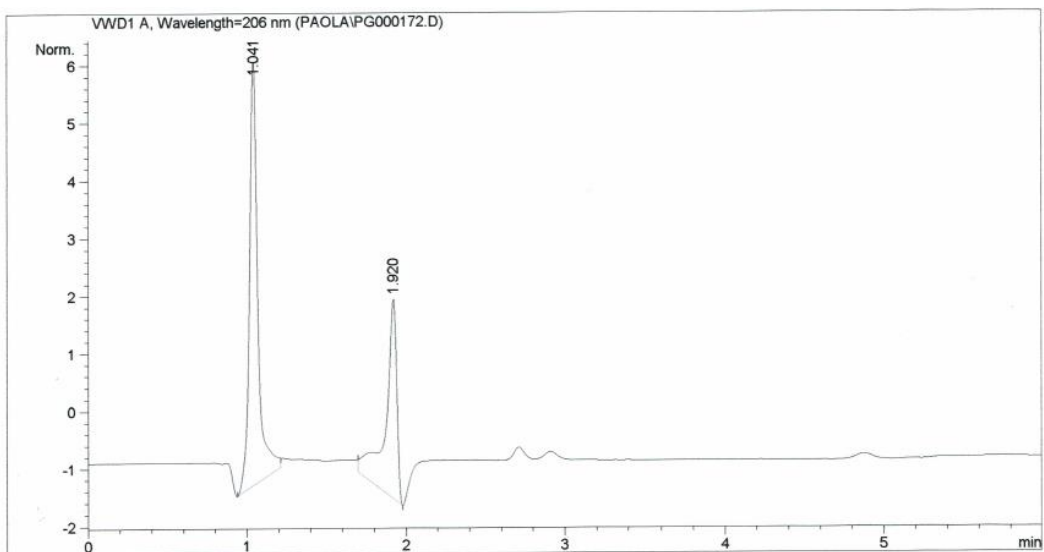


Figura 9.13. Cromatograma procaína del orden de 10 ppm (82:18)

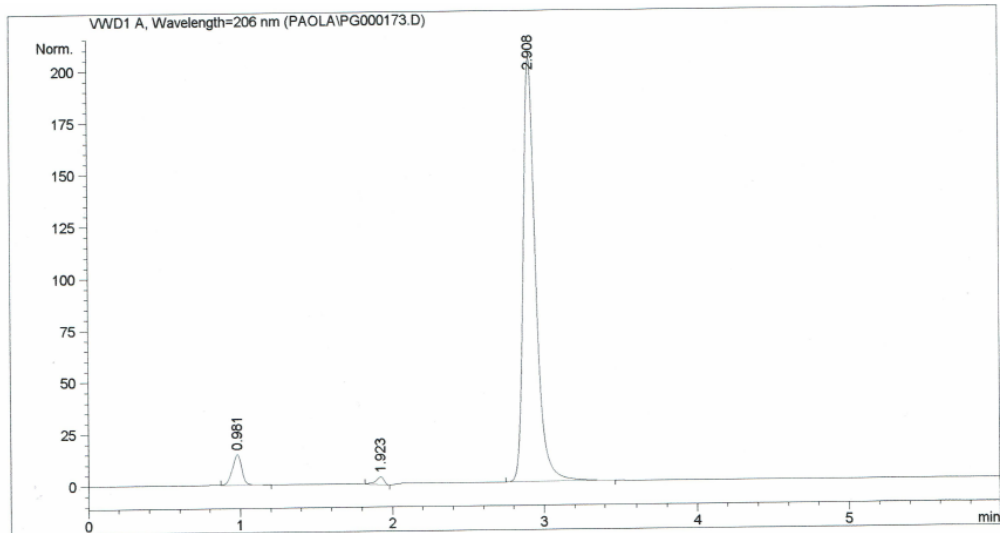


Figura 9.14. Cromatograma cafeína del orden de 10 ppm (82:18)

9.1.3. Determinación de CBD en extracciones de plantas de cannabis

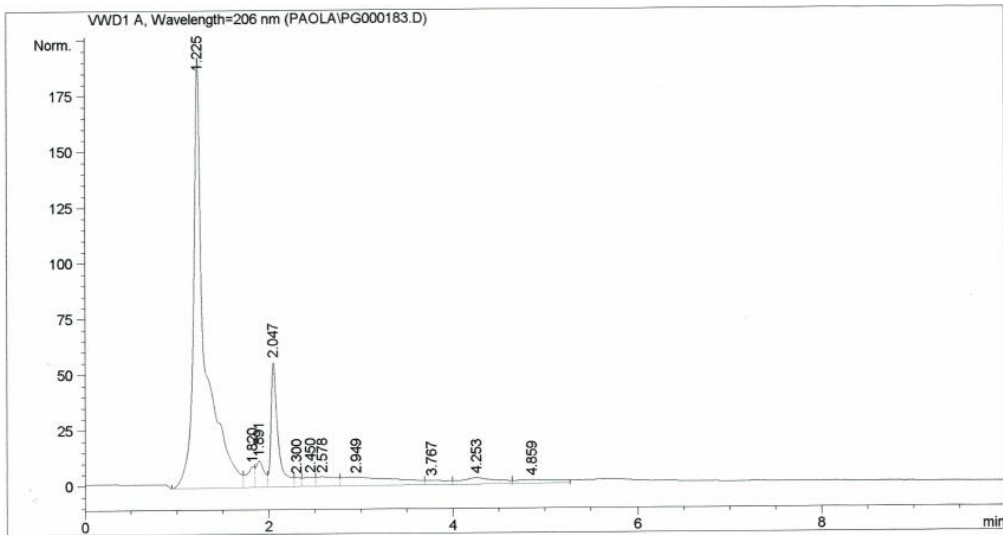


Figura 9.15. Cromatograma extracción cannabis 5 min (82:18)

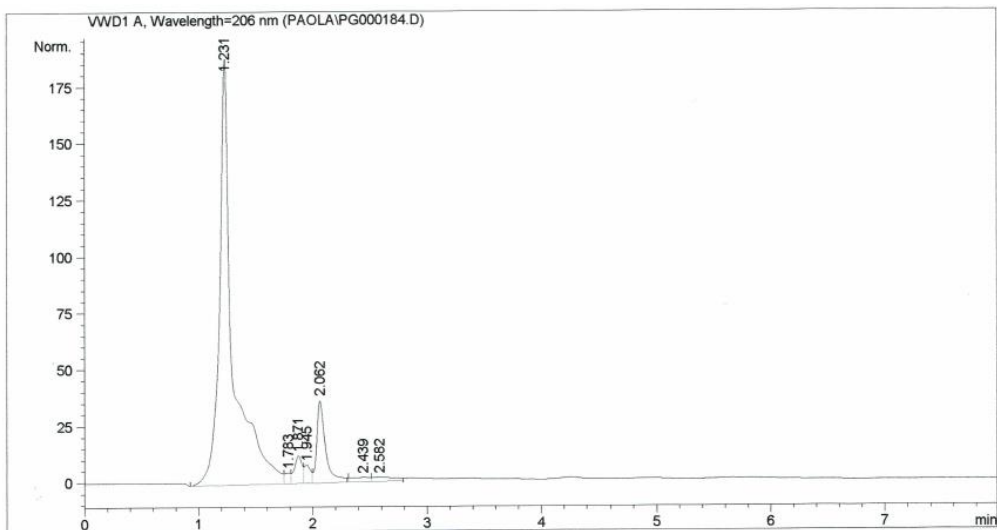


Figura 9.16. Cromatograma extracción cannabis 10 min (82:18)

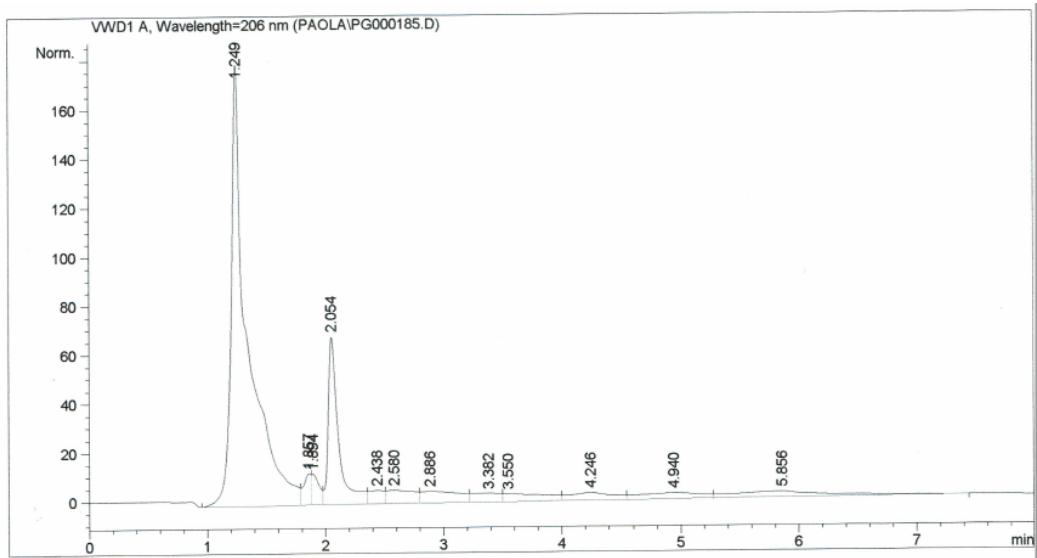


Figura 9.17. Cromatograma extracción cannabis 20 min (82:18)

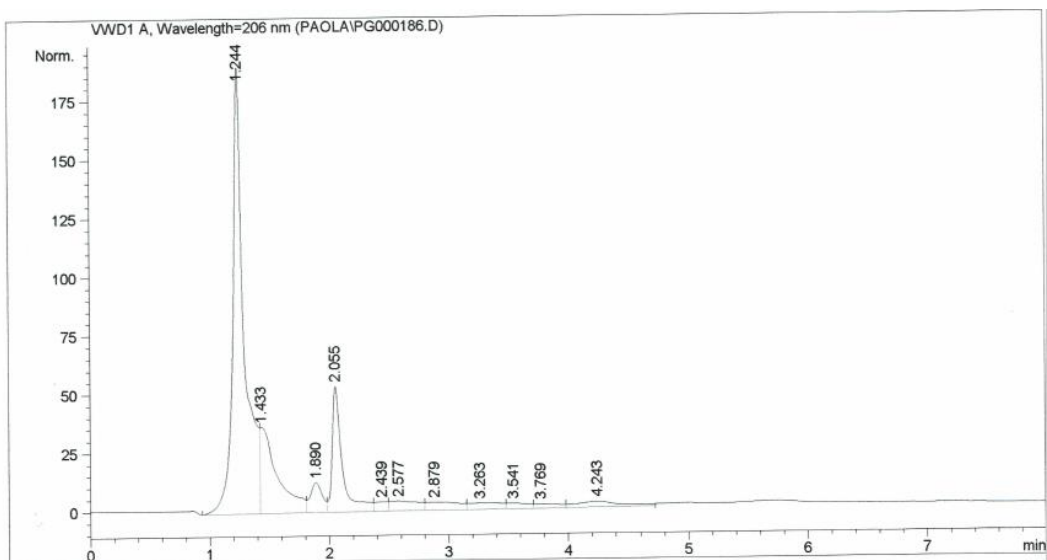


Figura 9.18. Cromatograma extracción cannabis 40 min (82:18)

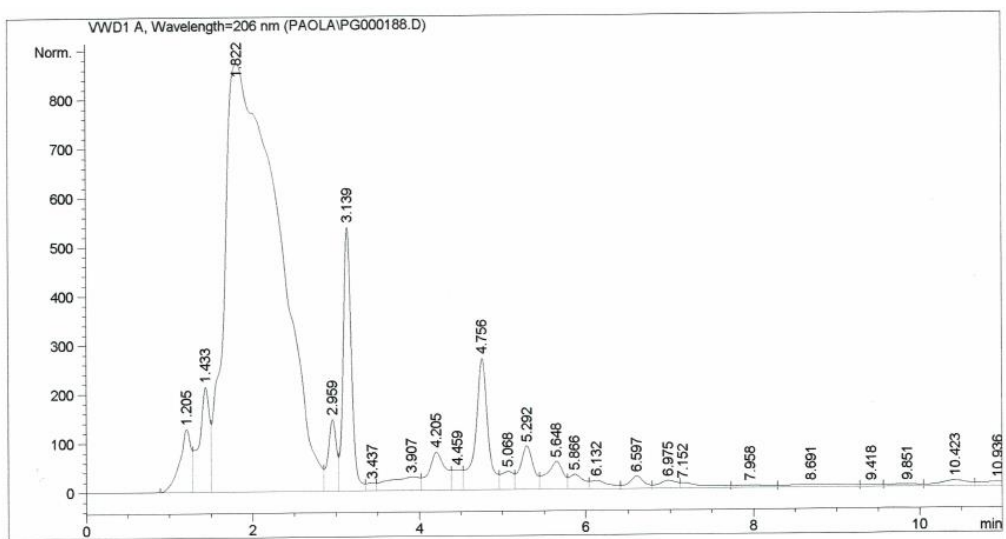


Figura 9.19. Cromatograma extracción 10 min (60:30:10)

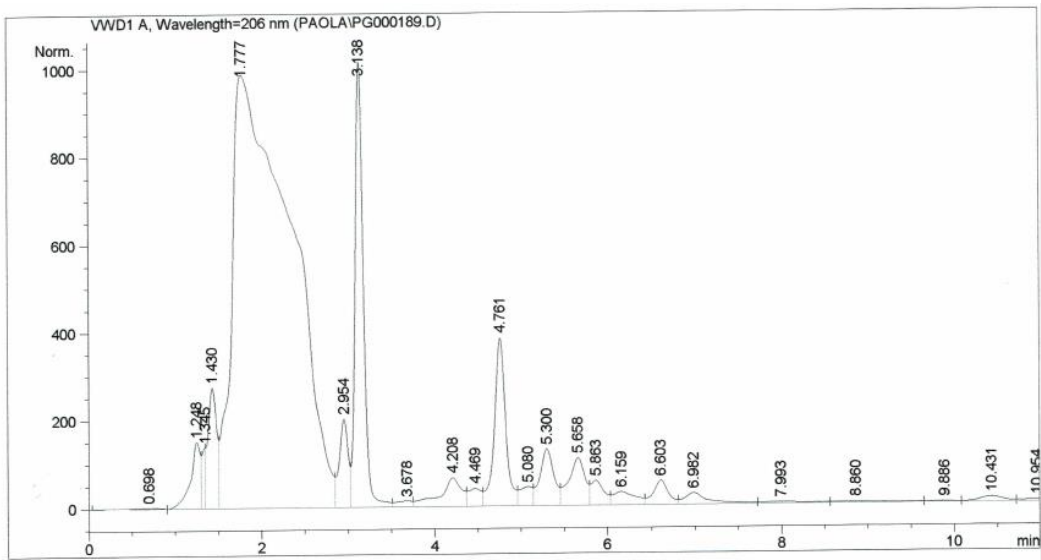


Figura 9.20. Cromatograma extracción 20 min (60:30:10)

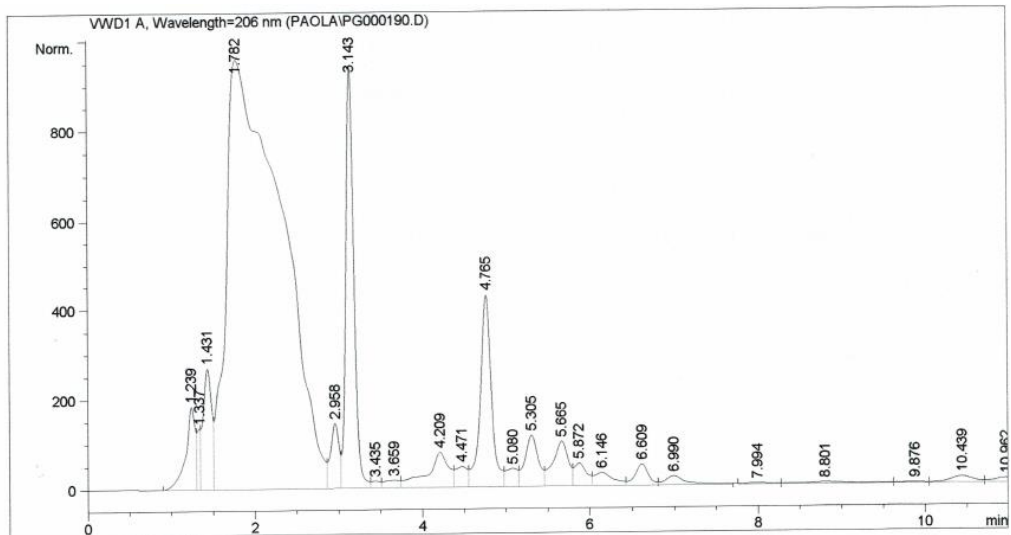


Figura 9.21. Cromatograma extracción 40 min (60:30:10)

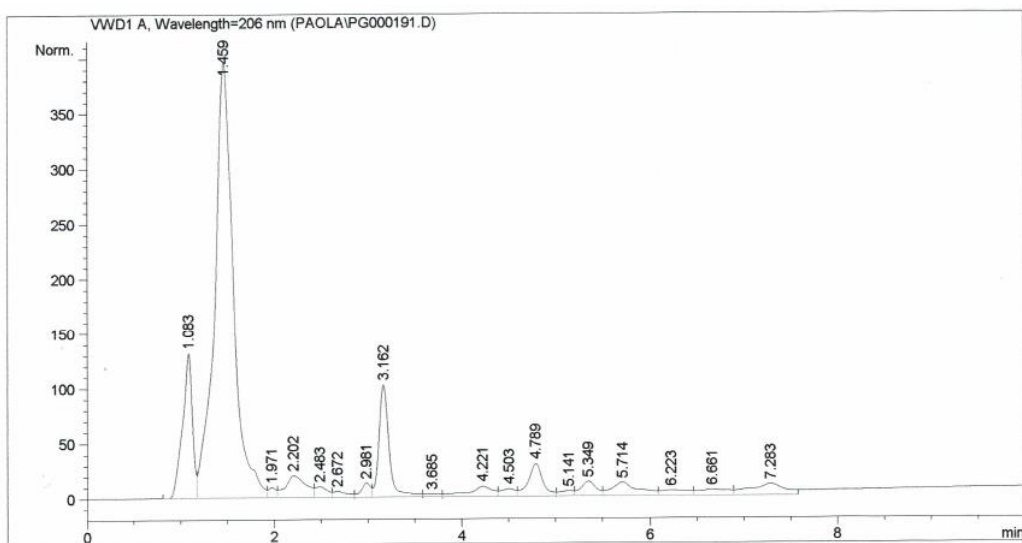


Figura 9.22. Cromatograma extracción 5 min (1:10) (60:30:10)

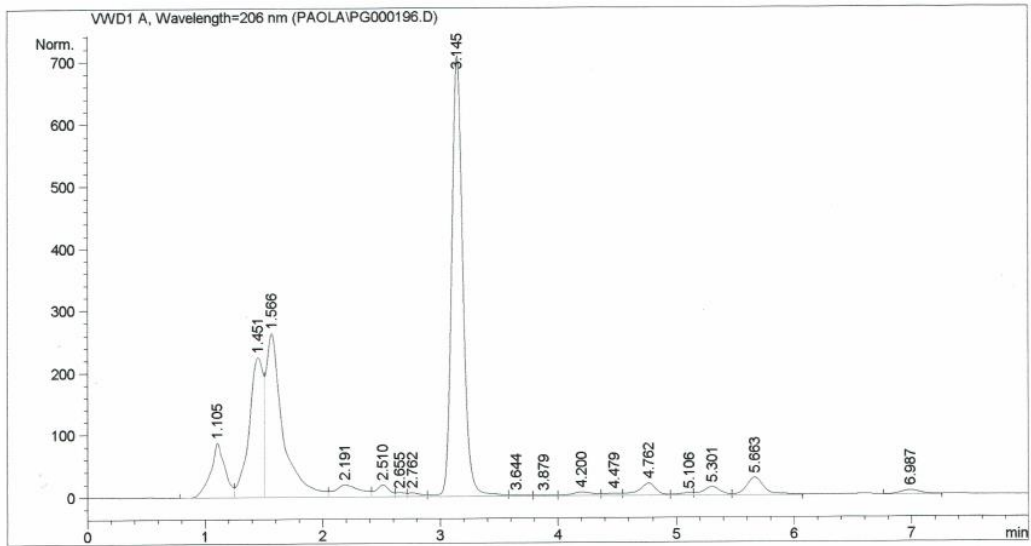


Figura 9.23. Cromatograma extracción Soxhlet diluido

9.1.4. Estudio de posibles interferencias de otros compuestos presentes en la planta de cannabis

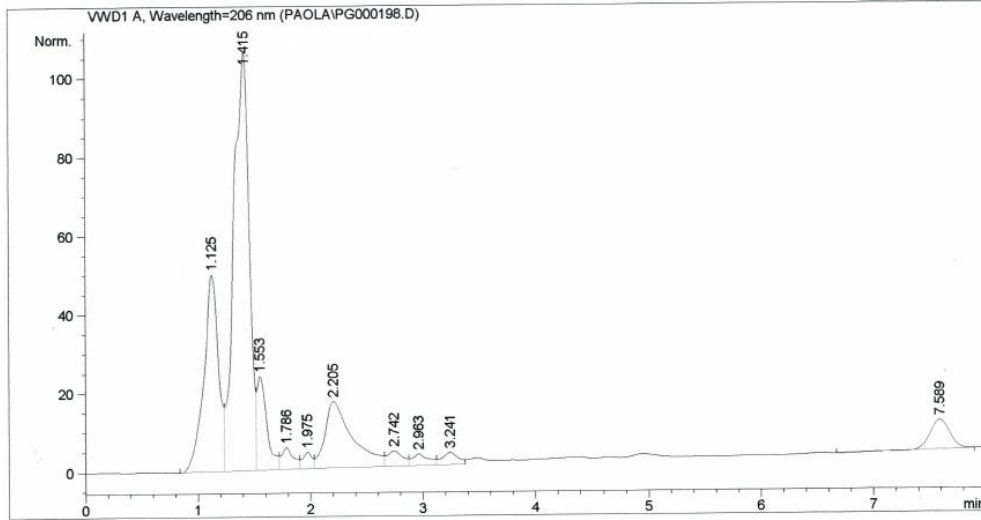


Figura 9.24. Cromatograma extracción planta 1

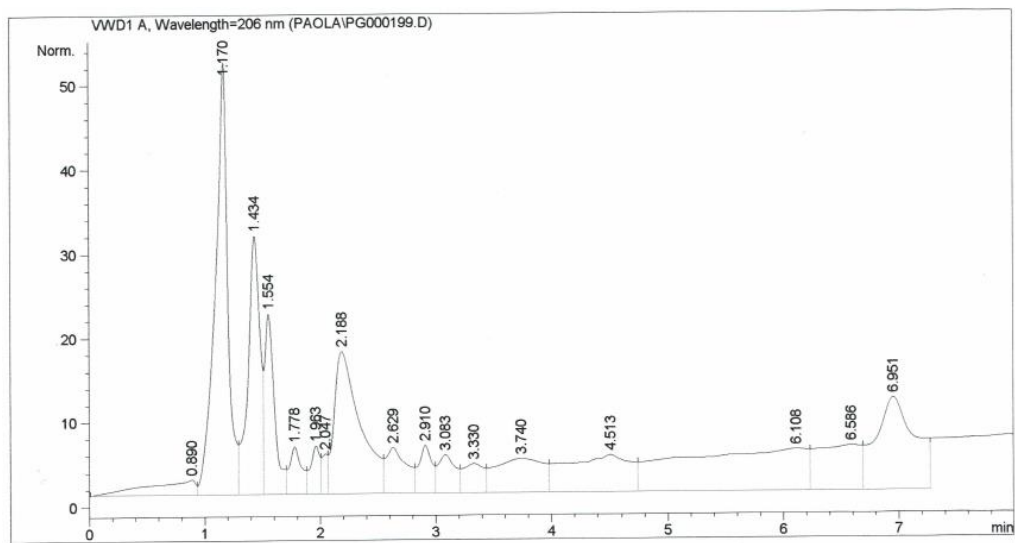


Figura 9.25. Cromatograma extracción planta 2

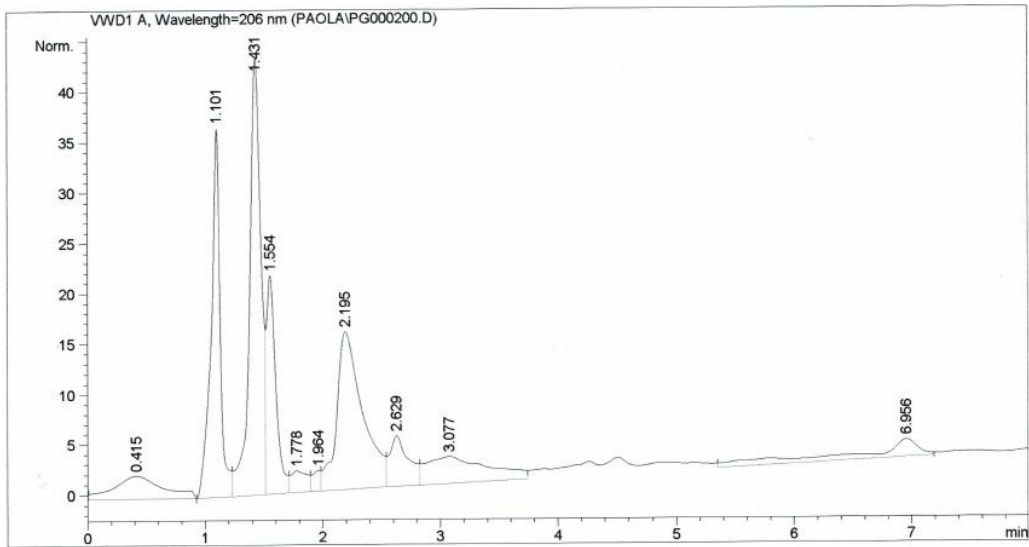


Figura 9.26. Cromatograma extracción planta 3

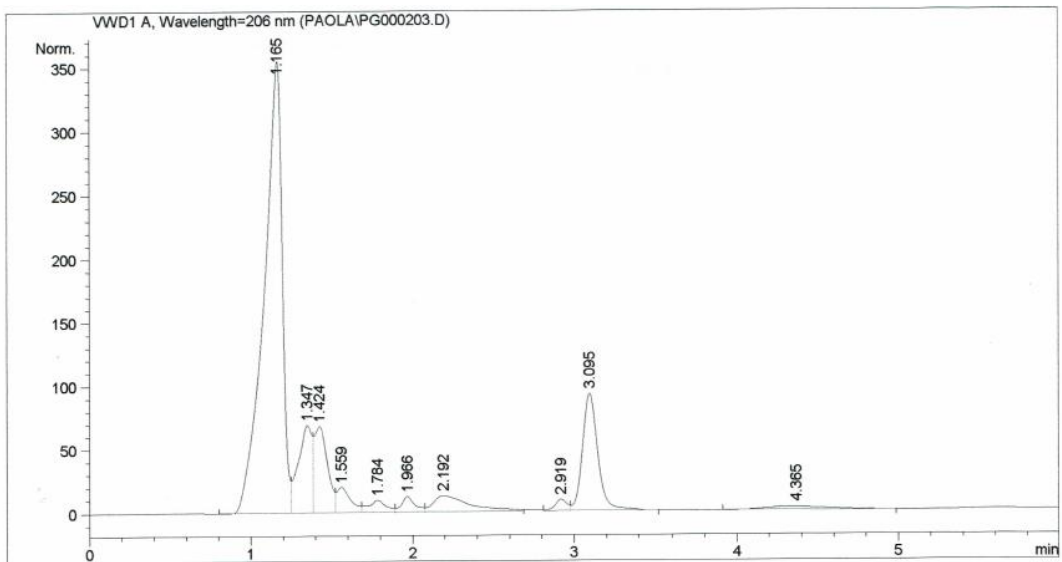


Figura 9.27. Cromatograma extracción planta 1 + 0.2 ml 20.0 ppm CBD

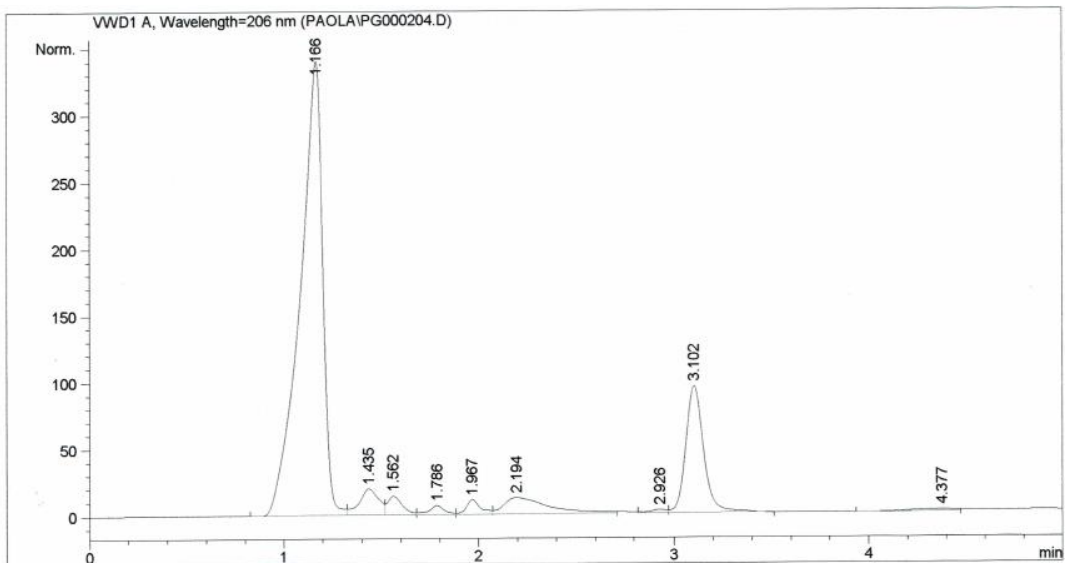


Figura 9.28. Cromatograma extracción planta 2 + 0.2ml 20.0 ppm CBD

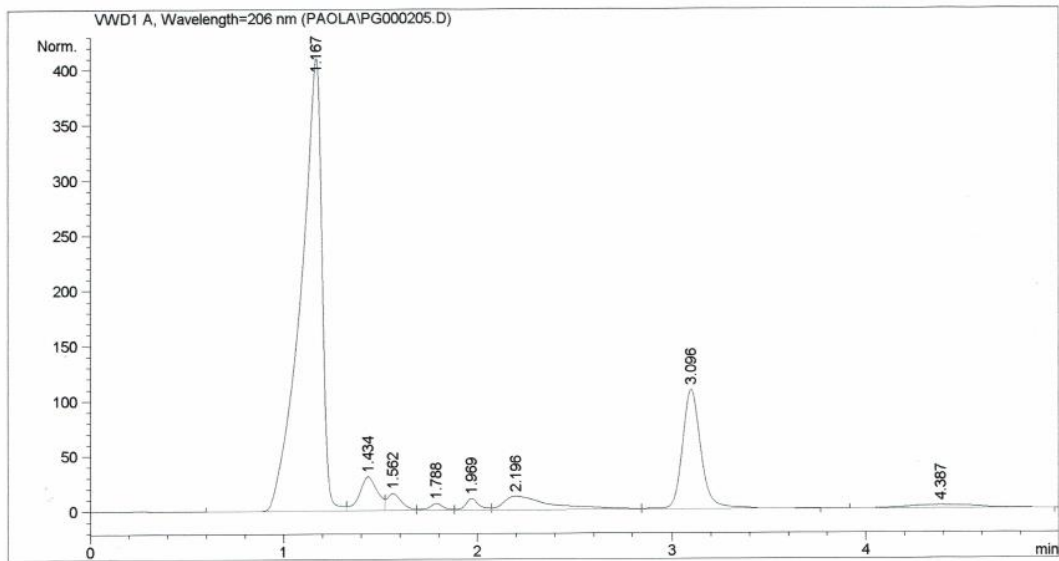


Figura 9.29. Cromatograma extracción planta 3 + 0.2 ml 20.0 ppm CBD

## 9.2. Cromatografía de gases (GC)

### 9.2.1. Calibrado

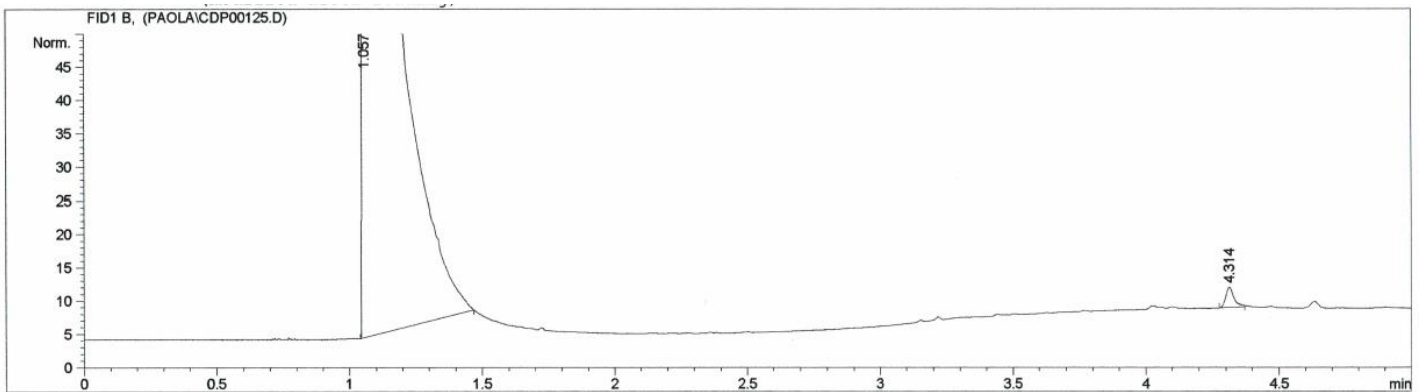


Figura 9.30. Cromatograma patrón CBD 10.0 ppm

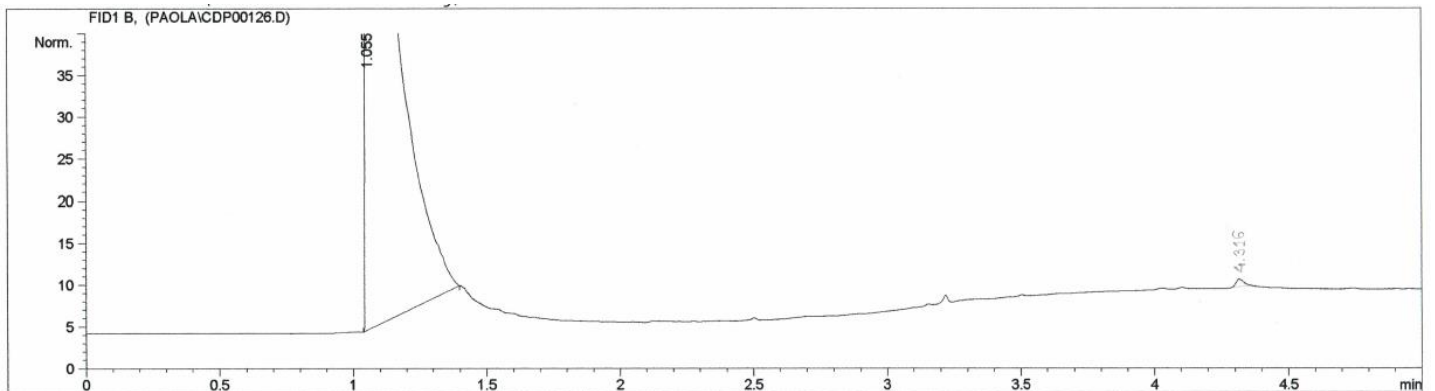


Figura 9.31. Cromatograma patrón CBD 4.0 ppm

9.2.2. Estudio de otras condiciones (adulterantes)

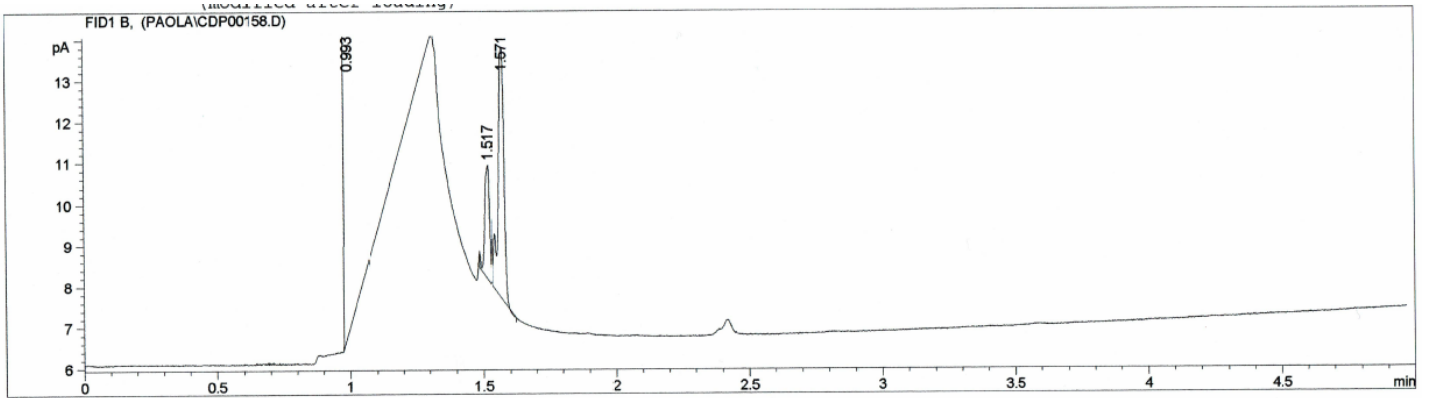


Figura 9.32. Cromatograma de cocaína del orden de 10 ppm

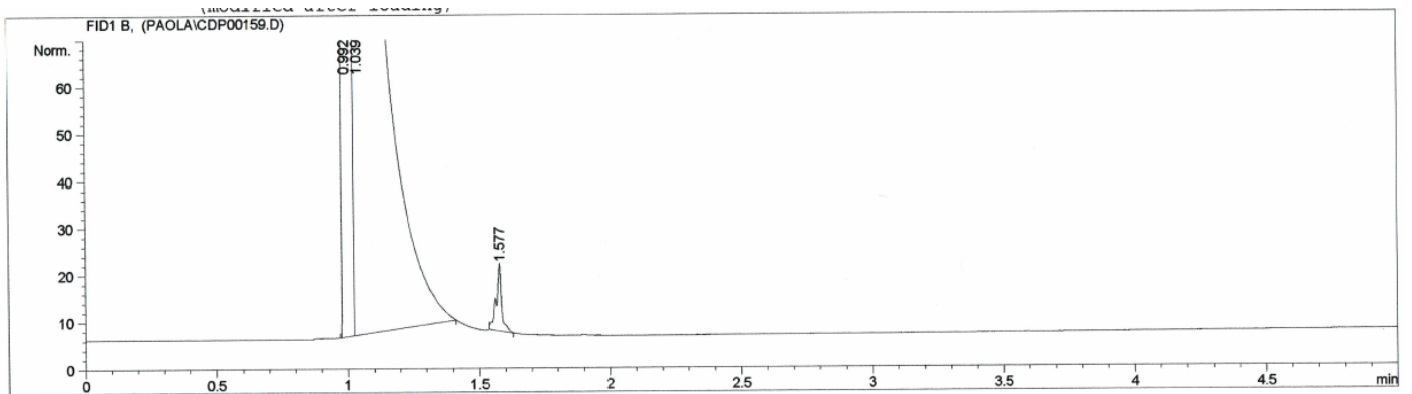


Figura 9.33. Cromatograma de lidocaína del orden de 10 ppm

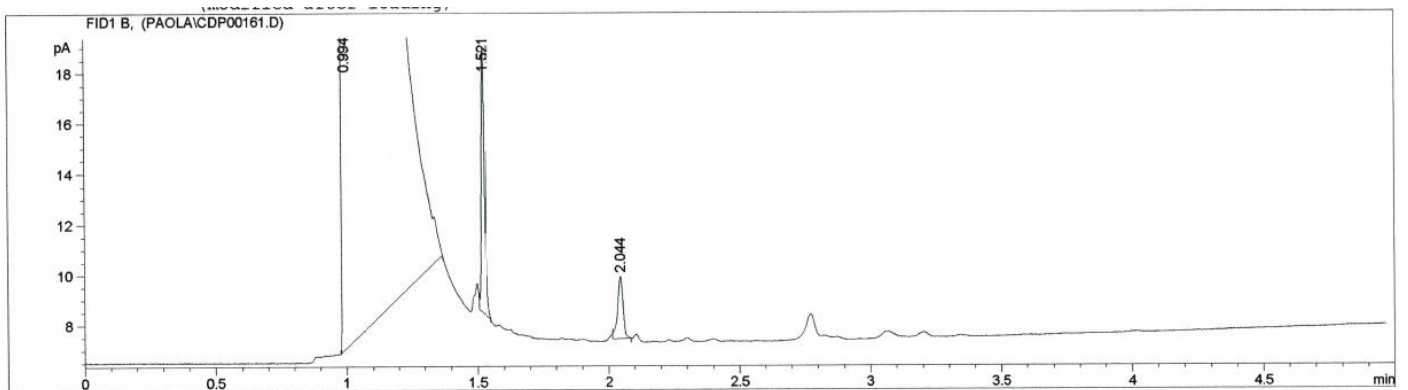


Figura 9.34. Cromatograma de cafeína del orden de 10 ppm



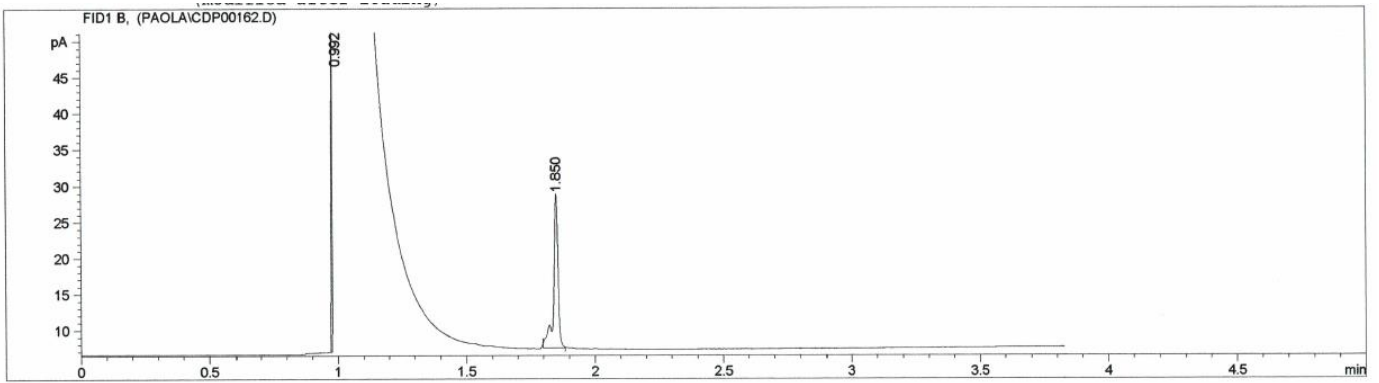


Figura 9.35. Cromatograma de procaína del orden de 10 ppm

### 9.2.3. Determinación de CBD en extracciones de plantas de cannabis

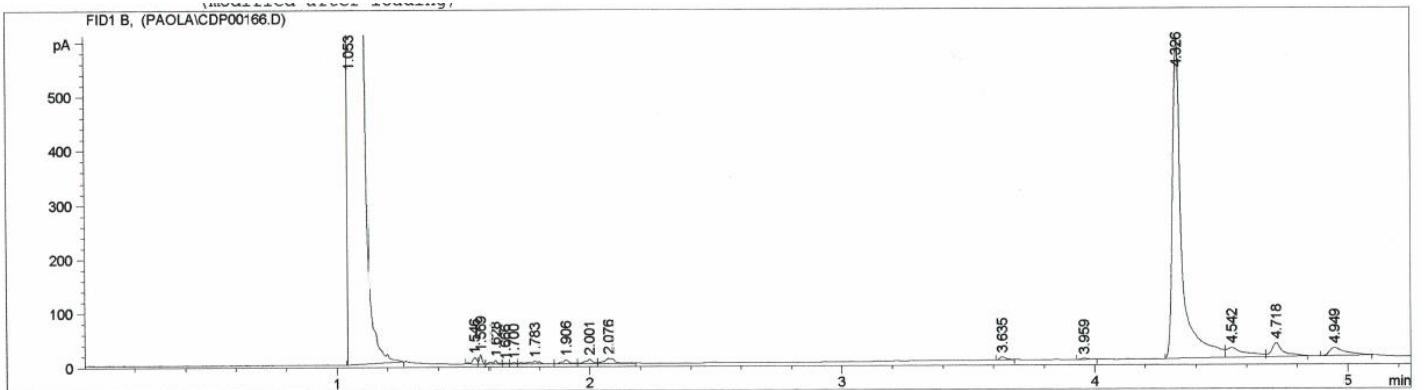


Figura 9.36. Cromatograma extracción cannabis 10 min

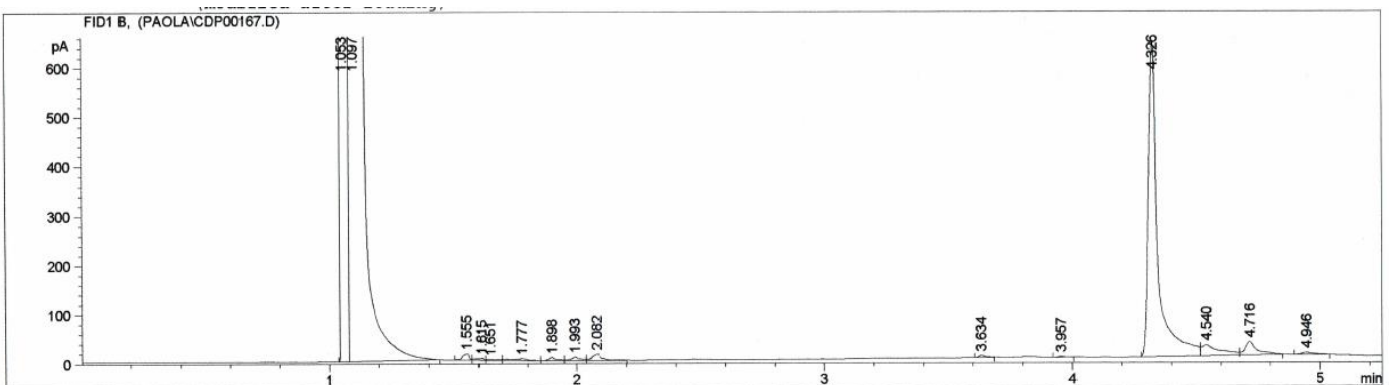


Figura 9.37. Cromatograma extracción cannabis 20 min

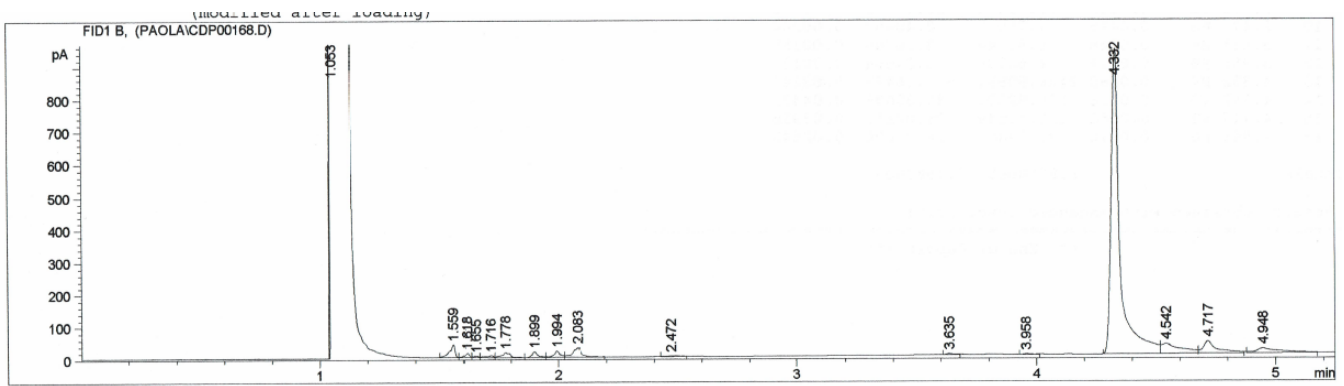


Figura 9.38. Cromatograma extracción cannabis 40 min

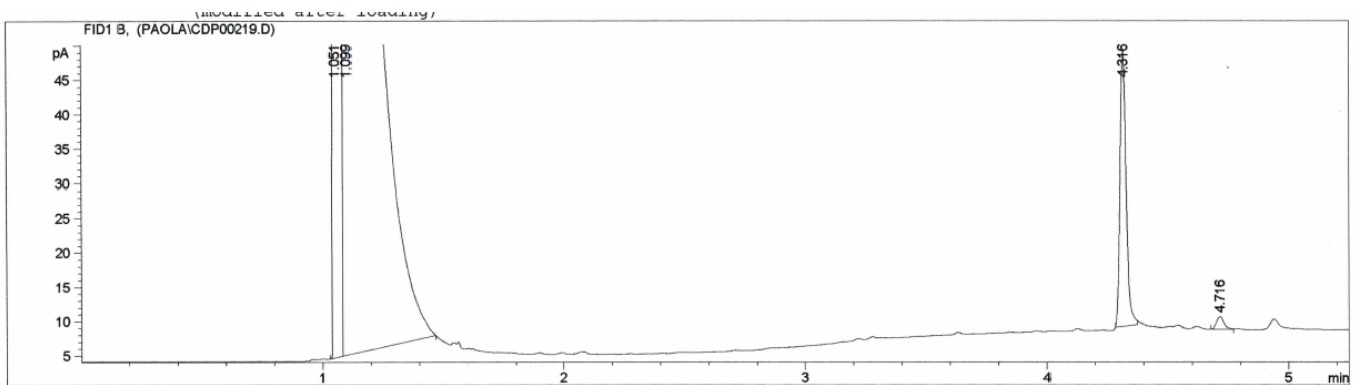


Figura 9.39. Cromatograma Soxhlet diluido

#### 9.2.4. Estudio de posibles interferencias de otros compuestos presentes en la planta de cannabis

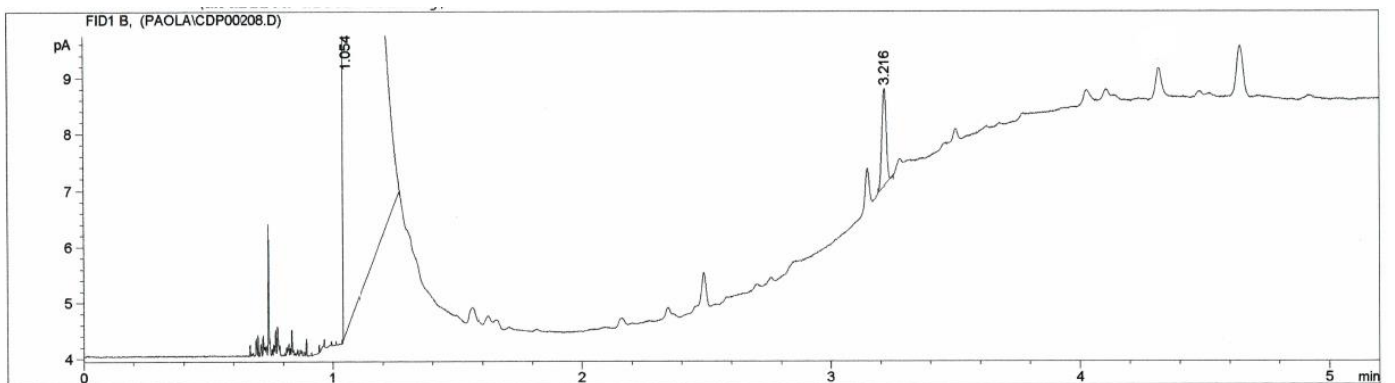


Figura 9.40. Cromatograma extracción planta 2

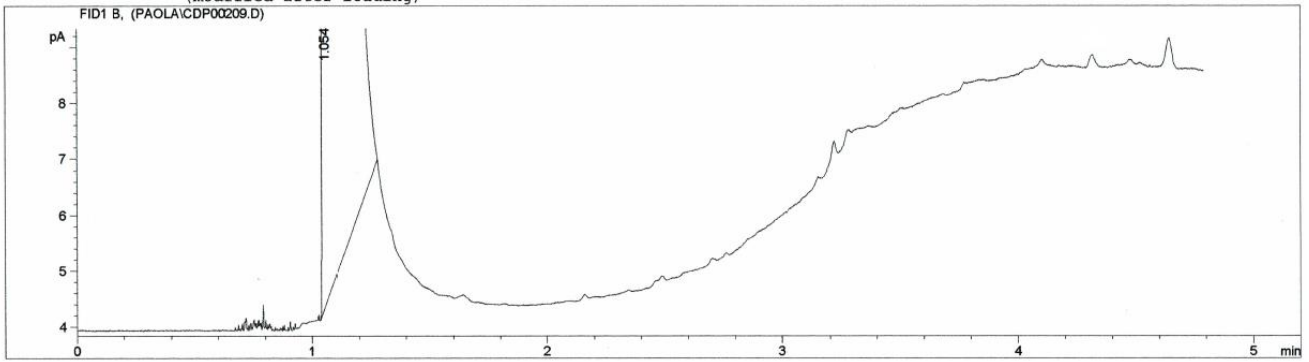


Figura 9.41. Cromatograma extracción planta 3

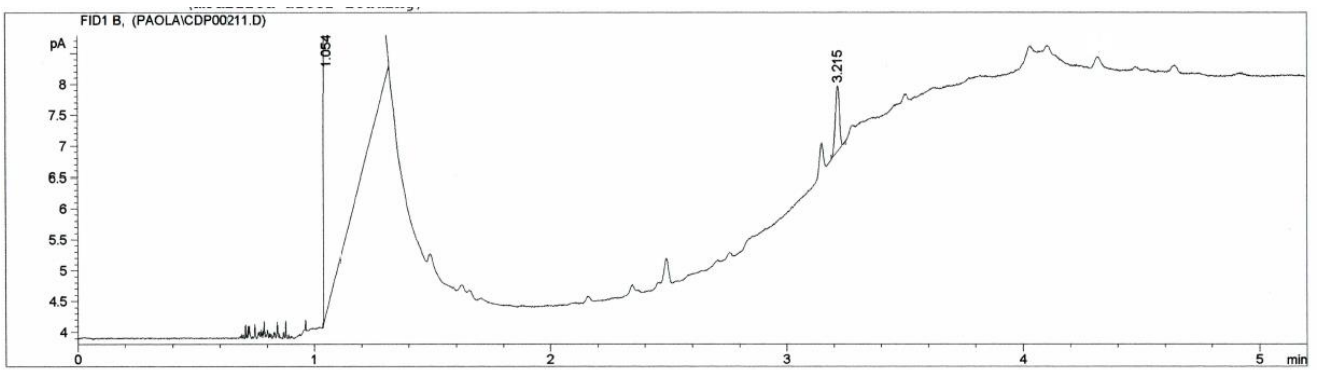


Figura 9.42. Cromatograma extracción planta 1

## 10. Bibliografía

1. [MARZORATI], Stefania; [FRISCIONE], Danilo; [PICCHI], Enrico; [VEROTTA], Luisella  
*CBD from inflorescences of Cannabis sativa L.: Green extraction and purification processes*  
Industrial Crops & Products 155, 112816  
[2020]
2. [IBRAHIM], E. A.; [GUL], W.; [GUL], S. W.; [STAMPER], B. J.; [HADAD], G. M.; [SALAM], R. A. 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 84, 250-259  
[2017]
3. [ZGAIR], Atheer; [WONG], Jonathan C.M.; [SABRI], Akmal; [FISCHER], Peter M.; [BARRETT], David A.; [CONSTANTINESCU], Cris S.; [GERSHKOVICH], Pavel  
*Development of a simple and sensitive HPLC-UV method for the simultaneous determination of cannabidiol and  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol in rat plasma*  
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 114, 145-151  
[2015]
4. [MECHOULAM], R.; [SHVO], Y; [HASHISH], I.  
*The structure of cannabidiol*  
Tetrahedron 19 (12), 2073–2078  
[1963]
5. [PALAZZOLI], Federica; [CITTI], Cinzia; [LICATA], Manuela; [VILELLA], Antonietta; [MANCA], Letizia; [ZOLI], Michele; [VANDELLI], Maria Angela; [FORNI], Flavio; [CANNAZA], Giuseppe  
*Development of a simple and sensitive LC-MS/MS method for the determination of cannabidiol (CBD), THC and its metabolites in rat whole blood after oral administration of a single high dose of CBD*  
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 150, 25-32  
[2018]
6. [MERRICK], John; [LANE], Brian; [SEBREE], Terri; [YAKSH], Tony; [O'NEILL], Carol; [BANKS], Stan L.  
*Identification of psychoactive degradants of cannabidiol in simulated gastric and physiological fluid*  
Cannabis Cannabinoid Res. 1 (1), 102–112  
[2016]

- 7.** [ADAMS], Roger; [HUNT], Madison; [CLARK], J. H.  
*Structure of Cannabidiol, a Product Isolated from the Marijuana Extract of Minnesota Wild Hemp*  
J. Am. Chem. Soc. 62, 196  
[1940]
- 8.** [IFFLAND], Kerstin; [GROTENHERMEN], Franjo  
*An Update on Safety and Side Effects of Cannabidiol: A Review of Clinical Data and Relevant Animal Studies*  
Cannabis and Cannabinoid Research, vol. 2, 139–154  
[2017]
- 9.** [PISANTI], S.; [MALFITANO], A. M.; [CIAGLIA], E.; [LAMBERTI], A.; [RANIERI], R.; [CUOMO], G.; [ABATE], M.; [FAGGIANA], G.; [PROTO], M. C.; [FIORE], D.; [LAEZZA], C.; [BIFULCO], M.  
*Cannabidiol: State of the art and new challenges for therapeutic applications*  
Pharmacology & Therapeutics 175, 133–150  
[2017]
- 10.** [POTTER], David J.  
A review of the cultivation and processing of cannabis (*Cannabis sativa* L.) for production of prescription medicines in the UK  
Drug Testing Analysis 6, 31–38  
[2014]
- 11.** [WANG], M.; [WANG], Y. H.; [AVULA], B.; [RADWAN], M. M.; [WANAS], A. S.; [ANTWERP], J. van; [PARCHER], J. F.; [ELSOHLY], M. A.; [KHAN], I. A.  
*Decarboxylation Study of Acidic Cannabinoids: A Novel Approach Using Ultra-High-Performance Supercritical Fluid Chromatography/Photodiode Array-Mass Spectrometry*  
Cannabis and Cannabinoid Research vol. 1, 262–271  
[2016]
- 12.** [HÄDENER], Marianne; [KÖNIG], Stefan; [WEINMANN], Wolfgang  
*Quantitative determination of CBD and THC and their acid precursors in confiscated cannabis samples by HPLC-DAD*  
Forensic Science International 299, 142-150  
[2019]
- 13.** [GIESE], Matthew W.; [LEWIS], Mark A.; [GIESE], Laura; [SMITH], Kevin M.  
*Development and Validation of a Reliable and Robust Method for the Analysis of Cannabinoids and Terpenes in cannabis*  
Journal of AOAC International vol. 98, No. 6, 1503–1522  
[2015]

- 14.** [CITTI], Cinzia; [BRAGHIROLI], Daniela; [VANDELLI], Maria Angela; [CANNAZZA], Giuseppe  
*Pharmaceutical and biomedical analysis of cannabinoids: A critical review*  
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 147, 565-579  
[2018]
- 15.** [FRAGUAS-SÁNCHEZ], A. I.; [FERNÁNDEZ-CARBALLIDO], A.; [MARTÍN-SABROSO], C.; [TORRES-SUÁREZ], A. I.  
*Stability characteristics of cannabidiol for the design of pharmacological, biochemical and pharmaceutical studies*  
Journal of Chromatography B 1150, 122188  
[2020]
- 16.** [SAINGAM], Worawan; [SAKUNPAK], Apirak  
*Development and validation of reverse phase high performance liquid chromatography method for the determination of delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol in oromucosal spray from cannabis extract*  
Revista Brasileira de Farmacognosia 28, 669-672  
[2018]
- 17.** [MÍGUEZ-FRAMIL], Martha; [COCHO], José Ángel; [TABERNERO], María Jesús; [BERMEJO], Ana María; [MOREDA-PIÑEIRO], Antonio; [BERMEJO-BARRERA], Pilar  
*An improved method for the determination of delta9-tetrahydrocannabinol, cannabinol and cannabidiol in hair by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*  
Microchemical Journal 117, 7-17  
[2014]
- 18.** [PÉREZ LEMUS], Nereida  
*Estudio comparativo de métodos para la determinación de cocaína*  
Tesis de Licenciatura  
[2013]