



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

**Determinación de tetrahidrocannabinol (THC) en muestras
requisadas e infusiones**

Autora: Lorena Rozas Sancho

Tutor: Luis Deban Miguel

(Dpto. Química Analítica)

Cotutora: Raquel Moreno Mayordomo

(Delegación del Gobierno en Castilla-León)

El trabajo que se presenta se ha llevado a cabo por la estudiante de Grado en Química de la Universidad de Valladolid D.^a LORENA ROZAS SANCHO, en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valladolid y en la Delegación del Gobierno, Área de Sanidad de Castilla y León, bajo la dirección de D. LUIS DEBAN MIGUEL, Catedrático de dicho Departamento y D.^a RAQUEL MORENO MAYORDOMO, Jefa de sección de inspección farmacéutica y control de drogas y con el asesoramiento y supervisión de D. JESÚS MIGUEL TEJEDOR MUÑOZ, Director del Área de Sanidad y Política Social de la Delegación del Gobierno en Castilla y León.

ÍNDICE

1. RESUMEN/SUMMARY	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. Tetrahidrocannabinol	2
2.1.1. Mercado del Cannabis	2
2.1.2. Antecedentes bibliográficos	4
2.1.3. Características del tetrahidrocannabinol y de las xantinas estudiadas	8
2.2. Planteamiento y objetivos	12
2.3. Técnicas en la determinación	13
2.3.1. Espectroscopía de absorción molecular UV-Visible	13
2.3.2. Cromatografía	13
2.3.2.1. Cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC)	13
2.3.2.2. Cromatografía de gases (GC)	13
3. TETRAHIDROCANNABINOL (THC). EXPERIMENTACIÓN Y RESULTADOS	14
3.1. Cromatografía líquida de alta eficacia con detector UV/Vis (HPLC-UV/Vis)	14
3.1.1. Equipo empleado	14
3.1.2. Preparación de la muestra “patrón”	14
3.1.3. Estudio de la capacidad de absorción por espectroscopía UV/Vis	14
3.1.4. Equipo empleado	15
3.1.5. Línea de calibrado	15
3.1.6. Estudio de la fase móvil y calibrado	17
3.2. Cromatografía de gases con detector FID (GC-FID)	20
3.2.1. Equipo empleado	20
3.2.2. Preparación de la muestra “patrón”	20
3.2.3. Estudio de las condiciones de trabajo	20
4. TETRAHIDROCANNABINOL (THC) EN MUESTRAS CON XANTINAS. EXPERIMENTACIÓN Y RESULTADOS	23
4.1. Cromatografía líquida de alta eficacia con detector UV/Vis (HPLC-UV/Vis)	23

4.1.1.	Preparación de las muestras patrón de xantinas	23
4.1.2.	Estudio por espectroscopía UV/Vis.....	23
4.1.3.	Determinaciones conjuntas.....	25
4.2.	Cromatografía de gases con detector FID (GC-FID).....	26
5.	EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE THC EN PLANTAS Y RESINA DE CANNABIS. EXPERIMENTACIÓN Y RESULTADOS	28
5.1.	Extracción por agitación.....	28
5.1.1.	Determinación por HPLC	28
5.1.2.	Determinación por GC-FID	31
5.2.	Extracción Soxhlet	32
5.2.1.	Determinación por HPLC	34
5.2.2.	Determinación por GC-FID	36
6.	ESTUDIO PARA LA DETERMINACIÓN DE THC EN INFUSIONES DE MATE, CAFÉ, CACAO Y TÉ.....	38
6.1.	Preparación de las infusiones y extracción de THC	38
6.1.1.	Determinación por HPLC	39
6.1.2.	Determinación por GC-FID	44
7.	CONCLUSIONES	46
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	47
9.	ANEXOS.....	50
9.1.	Cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC)	50
9.1.1.	Estudio de la fase móvil y calibrado	50
9.1.2.	Determinaciones conjuntas.....	54
9.1.3.	Determinación y extracciones de THC en plantas y resina de cannabis	60
9.1.4.	Estudio para la determinación de THC en infusiones de mate, café, cacao y té	61
9.2.	Cromatografía de gases (GC-FID).....	63
9.2.1.	Calibrado	63
9.2.2.	Determinación y extracciones de THC en plantas y resina de cannabis	64
9.2.3.	Estudio para la determinación de THC en infusiones de mate, café, cacao y té	65

1. RESUMEN/SUMMARY

En el trabajo se llevan a cabo diferentes estudios para la puesta a punto de métodos para la determinación de tetrahidrocannabinol (THC) en muestras requisadas de consumo ilícito y en infusiones con presencia de otros compuestos, xantinas, como cafeína, teobromina y teofilina, componentes con presencia en el café, cacao y té. La determinación se llevó a cabo mediante cromatografía de líquidos (HPLC) con detector UV/Vis y cromatografía de gases (GC) con detector de ionización de llama (FID).

Se obtuvieron resultados que permitían la determinación de THC, en presencia de las citadas xantinas, mediante ambas técnicas cromatográficas, en el caso de HPLC a un tiempo de respuesta de 6 minutos y con límite de detección de 0.24 ppm y por GC a 3.3 minutos y con límite de detección de 7.6 ppm.

In the work, different studies are carried out for the development of methods for the determination of tetrahydrocannabinol (THC) in samples seized from illicit consumption and in infusions with the presence of other compounds, xanthines, such as caffeine, theobromine and theophylline, components with presence in coffee, cocoa and tea. The determination was carried out by liquid chromatography (HPLC) with UV/Vis detector and gas chromatography (GC) with flame ionization detector (FID).

Results were obtained that allowed the determination of THC, in the presence of the aforementioned xanthines, by both chromatographic techniques, in the case of HPLC at a response time of 6 minutes and with a detection limit of 0.24 ppm and by GC at 3.3 minutes and with detection limit of 7.6 ppm.

2. INTRODUCCIÓN

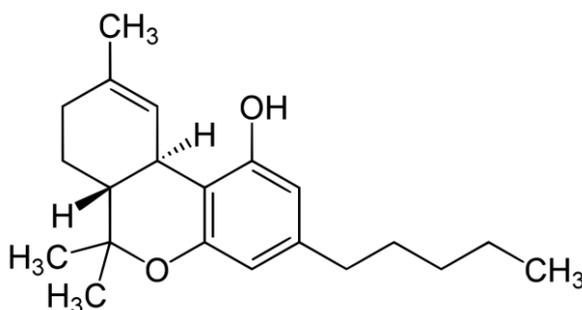
2.1. Tetrahidrocannabinol

2.1.1. Mercado del Cannabis

El tráfico ilícito de productos del cannabis afecta prácticamente a todos los países y figura entre uno de los más importantes del mundo, incautándose entre 5000 y 6000 toneladas de marihuana por año, en el periodo de 2001 a 2017 y del orden, también por año, de 1000 toneladas de resina [1,2]. El cannabis sigue siendo la droga más consumida en todo el mundo, se estima que alrededor de 166 millones de personas la consumen por año, lo que equivale, aproximadamente, al 4% de la población mundial de edad comprendida entre 15 y 65 años.

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 misma. 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.

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.



Se trata de un compuesto perteneciente a los cannabinoides clásicos, derivados de benzopiranos, siendo el que genera las mayores polémicas en torno a la legalización del Cannabis por algunos de sus efectos tales como la alteración de la memoria y la percepción.

El Δ -9-Tetrahidrocannabinol fue aislado por primera vez en 1964 por Habib Edery, Yechiel Gaoni y Raphael Mechoulam, del Instituto Weizmann de Ciencias, en Rejovot, Israel [**páginas Web** ⁽²⁾].

Sus efectos farmacológicos son el resultado de su vinculación con los receptores específicos de cannabinol, CB₁ y CB₂. El THC tiene un efecto analgésico leve o moderado. Otros efectos incluyen relajación, alteración de los sentidos visuales, auditivos, olfativos, fatiga y estimulación del apetito. Se ha demostrado que los fitocannabinoides, en especial el THC y el CBD, reducen la permeabilidad intestinal [3]. Otros estudios [4,5] han sugerido la acción anticolinesterasa del THC, lo que podría ser de interés en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

En 1961, el cannabis fue clasificado como sustancia estupefaciente en la Lista I (debido a su ingrediente activo THC). Esta lista, junto con otras que se han ido haciendo en años sucesivos, conforman el listado de sustancias fiscalizadas a nivel internacional. En España su prescripción médica está regulada mediante Real Decreto 1675/2012, de 14 de diciembre.

La presencia de THC en los aceites de CBD y otros productos con cannabinoides se considera legal siempre que sus concentraciones sean inferiores al 0,2 o 0,3% [**páginas Web** ⁽¹⁾].

Actualmente se están llevando a cabo numerosas investigaciones enfocadas al tratamiento del cáncer usando THC [**páginas Web** ⁽²⁾], que han demostrado efectos antitumorales en ensayos en animales.

Dadas las características actuales de sustancia ilegal, el control de las sustancias incautadas se lleva a cabo en España en las Áreas Funcionales de Sanidad, en las Subdelegaciones y Delegaciones del Gobierno.

En este trabajo pretendemos realizar un estudio para la determinación de THC mediante técnicas cromatográficas en distintos tipos de muestras comercializadas ilegalmente, tales como, resina de cannabis y cogollos de marihuana, así como en otras muestras relacionadas con el consumo como pueden ser las infusiones.

2.1.2. Antecedentes bibliográficos

En la bibliografía que hemos consultado figuran varios métodos analíticos para la identificación y cuantificación del cannabis y los productos del cannabis. Las técnicas más empleadas son la cromatografía de gases y la cromatografía de líquidos de alta eficacia, actualmente ambas acopladas normalmente a la espectrometría de masas, aunque también se emplean otros detectores.

En el año 2010 la sección de laboratorio y asuntos científicos de la Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC) publica un manual [1,2] para uso en laboratorios oficiales de análisis de drogas, en el que se recogen los métodos recomendados para la identificación y análisis del cannabis y productos derivados del mismo. En dicho manual se detallan desde métodos para la determinación del grupo de compuestos al que pertenece una determinada sustancia, sin especificar explícitamente el tipo de compuesto, desde ensayos de color y cromatografía en capa fina (TLC), hasta métodos más concluyentes como Inmunoensayos, Cromatografía de gases (GC) y líquidos (HPLC) con diferentes detectores, así como Espectrometría de masas de relaciones isotópicas (IRMS) que permite identificar el origen geográfico de la materia vegetal.

A continuación, describimos brevemente algunos de los procedimientos citados en dicho manual:

El ensayo presuntivo de color más habitual empleado es el Duquenois-Levine, que consiste en añadir unas gotas del reactivo A formado por acetaldehído y vainillina (0,5 ml de acetaldehído y 0,4 g de vainillina en 20 ml de etanol) junto con unas gotas de ácido clorhídrico concentrado, observándose un color violeta, indicando la presencia de productos del cannabis.

Existen otros ensayos presuntivos de color. Uno de ellos, basado en la sal de Corinth sólida V. Para ello, se doblan dos papeles de filtro superpuestos en cuartos y se abren parcialmente de manera que formen un embudo; colóquese una pequeña cantidad de muestra pulverizada en el centro del papel superior. Se añaden dos gotas de éter de petróleo, dejando que el líquido penetre en el papel de filtro inferior y, posteriormente, se añade una pequeña cantidad de sal de Corinth sólida V (1% peso/peso en sulfato anhidro de sodio) en el centro del papel de filtro y, después, se añaden dos gotas de bicarbonato de sodio (1% peso/peso en solución acuosa). Una mancha de color rojo-púrpura en el centro del papel de filtro es indicio de alguno de los productos que contiene el cannabis: THC, CBN y CBD.

Otro de los ensayos es el de la sal de azul sólido B (o-dianisidina tetrazotizada), de procedimiento similar al anterior. Una mancha de color rojo-púrpura en el centro del papel de filtro es indicio de un producto que contiene cannabis. El color es combinación de los colores de los principales componentes del cannabis: THC rojo, CBN púrpura, CBD anaranjado.

La cromatografía en capa fina (TLC), también llamada cromatografía en capa delgada (CCD), se utiliza con frecuencia, puesto que es una técnica barata, proporciona cierto grado de especificidad, es fácil de usar y es capaz de detectar diferentes compuestos simultáneamente.

En cuanto a técnicas cromatográficas de gases, se suelen utilizar con detector de ionización de llama (GC-FID) y detector de masas (GC-MS), ambas con columnas capilares, normalmente de 15 m x 0,25 mm de diámetro interno x 0,25 mm de grosor de la película. Los gases portadores más utilizados son el helio y el nitrógeno.

Las técnicas de cromatografía de líquidos HPLC, suelen emplear detectores de UV/Vis y masas (HPLC-MS).

La Espectroscopía de masas de relaciones isotópicas nos permite identificar el origen geográfico de la materia vegetal. A diferencia de otras drogas como la heroína y la cocaína, el cannabis no se procesa químicamente para su suministro ilícito, y por lo tanto conserva sus características elementales e isotópicas originales. Así pues, estos parámetros podrían utilizarse para indicar el origen geográfico.

Además del anterior documento expuesto, hemos consultado otros trabajos en los que se detallan diferentes métodos para la determinación de cannabinoides. Hazekamp et al. [6] estudiaron la posibilidad de aislar algunos de los cannabinoides más importantes del Cannabis sativa L. Mediante GC-FID, pudieron identificar y separar Δ^9 -THC, CBD, CBG y CBN. En el estudio realizado de Gallo-Molina et al. [7], se realiza la extracción, caracterización y cuantificación mediante GC-FID de Δ^9 -THC en diferentes muestras de Cannabis sativa L.

Un método GC-FID desarrollado por Ibrahim et al. [8] permite la determinación y cuantificación de cannabinoides ácidos y neutros, CBD, Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, CBG, CBN, CBDA, CBGA y THCA.

En las determinaciones por GC es necesario a veces, dependiendo del compuesto a determinar, llevar a cabo procesos de derivatización, pues determinados compuestos cannabinoides son poco volátiles y el proceso de derivatización permite obtener productos que lo sean para el análisis. En este contexto, Fodor y Molnar-Perl [9] observaron que el proceso de derivatización que ofrecía mayores ventajas era la sililación con grupos trimetilsililo.

Por su parte, Omar et al. **[10]** 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.

En relación a técnicas cromatográficas de gases acopladas a espectrometría de masas, Cardenia et al. **[11]** desarrollaron y validaron un método 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, consiguiendo un análisis completo de los mismos en menos de 7 min, con buena sensibilidad y robustez.

Por otro lado, Hazekamp et al. **[6]** desarrollan un método HPLC-DAD para el análisis de los principales cannabinoides del *Cannabis sativa* L, realizando un segundo análisis mediante GC para cuantificar completamente los diferentes cannabinoides, siendo el tiempo requerido para obtener un cromatograma completo de 32 minutos, mientras que, De Backer et al. **[12]** utilizan 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", obteniéndose 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.

Brighenti et al. y Pellati et al. **[13]** llevan a cabo dos estudios para el análisis de inflorescencias de la planta *Cannabis sativa* L por HPLC-UV/DAD, mientras que, Gallo-Molina et al. **[7]** desarrollan un método basado en la técnica HPLC-UV con el objetivo de determinar Δ^9 -THC en extractos de *Cannabis sativa* L.

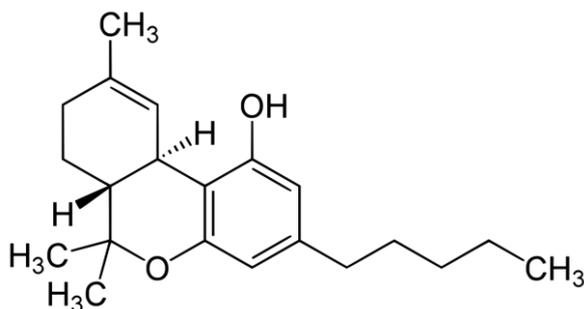
La técnica de HPLC en tándem con espectrometría de masas (HPLC-MS/MS) fue aplicada por Aizpurua-Olaizola et al. **[14]** para el análisis de diferentes extractos de cannabis. Los cannabinoides fueron identificados tras ser aislados previamente mediante SFE.

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. [15] 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.

2.1.3. Características del tetrahidrocannabinol y de las xantinas estudiadas

Tetrahidrocannabinol

- Estructura química: Tetrahidro-6,6,9-trimetil-3-pentil-6*H*-dibenzeno[*b,d*]pirano-1-ol

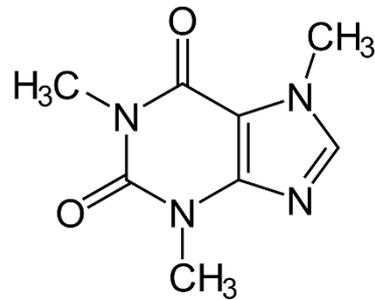


- Tabla de características:

Datos químicos		
Fórmula química	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	
Peso molecular	314,46 g/mol	
pK_a	10,6	
Datos físicos		
Aspecto físico	Aceite viscoso	
Punto de fusión	66°	
Solubilidad	Disolvente	g/100mL
	Agua	2,8
	Etanol	1,0

Cafeína

- Estructura química: 1,3,7-Trimetilxantina

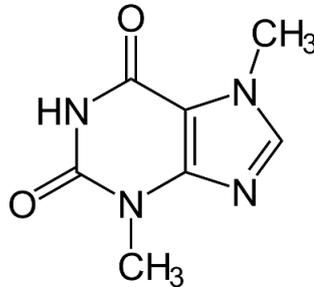


- Tabla de características:

Datos químicos		
Fórmula química	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	
Peso molecular	194,19 g/mol	
pK_a	10,4	
Datos físicos		
Aspecto físico	Sólido blanco inodoro	
Punto de fusión	234-239°	
Solubilidad	Disolvente	g/100mL
	Agua	1,60
	Etanol	1,50

Teobromina

- Estructura química: 3,7-Dimetilxantina

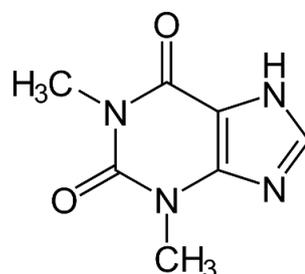


- Tabla de características:

Datos químicos		
Fórmula química	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	
Peso molecular	180,17 g/mol	
pK_a	9,9	
Datos físicos		
Aspecto físico	Sólido blanco inodoro	
Punto de fusión	357°	
Solubilidad	Disolvente	g/100mL
	Agua	0,056
	Etanol	0,042

Teofilina

- Estructura química: 1,3-Dimetilxantina



- Tabla de características:

Datos químicos		
Fórmula química	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	
Peso molecular	180,17 g/mol	
pK_a	8,9	
Datos físicos		
Aspecto físico	Sólido blanco inodoro	
Punto de fusión	270-274 ^o	
Solubilidad	Disolvente	g/100mL
	Agua	0,83
	Etanol	1,25

2.2. Planteamiento y objetivos

Se trata de llevar a cabo la puesta a punto de métodos de análisis para la determinación cromatográfica por gases y líquidos de tetrahidrocannabinol, THC, en muestras requisadas para su venta o consumo, así como la posibilidad de analizar este compuesto en presencia de otros (xantinas) presentes en infusiones, en las que a veces se añade cannabis para su consumo.

Objetivos:

- 1) Estudio por espectroscopía UV-Visible de las longitudes de onda óptimas de absorción del tetrahidrocannabinol y xantinas (cafeína, teobromina y teofilina), con el fin de realizar la determinación de THC por HPLC con detector UV-Visible.
- 2) Determinación de THC en presencia de xantinas por cromatografía de líquidos (HPLC) con detector UV-Vis, a partir de las condiciones ópticas de medida.
- 3) Determinación de THC en presencia de xantinas por cromatografía de Gases (GC) con detector FID.
- 4) Extracción y determinación de THC en infusiones y muestras requisadas de tráfico ilícito.

2.3. Técnicas en la determinación

2.3.1. *Espectroscopía de absorción molecular UV-Visible*

Esta técnica, se basa en la medición de la radiación ultravioleta-visible que es transmitida o absorbida por una muestra, en comparación con una referencia o blanco. Permite la determinación cuantitativa de compuestos que absorban a unas determinadas longitudes de onda. Se suele utilizar ampliamente como detector en los equipos de cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC).

2.3.2. *Cromatografía*

La Cromatografía es un método utilizado para la separación de los componentes de una muestra en función de su distribución entre una fase estacionaria y una fase móvil. Es la técnica más utilizada en este trabajo. En concreto, cromatografía de líquidos (HPLC-UV/Vis) y cromatografía de gases (GC-FID).

2.3.2.1. *Cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC)*

Es un método de separación por elución en el que la fase móvil es un líquido. La muestra, una vez preparada, se inyecta a través del portal de inyección en la columna cromatográfica produciéndose la separación de los analitos. Posteriormente, cuando los analitos salen de la columna, llegan al detector donde se produce una señal característica de cada uno de ellos, que es registrada y visualizada en un cromatograma.

2.3.2.2. *Cromatografía de gases (GC)*

Es un método de separación por elución en el que la fase móvil es un gas. La muestra contenida en un vial, se inyecta en el sistema cromatográfico a través de un portal de inyección donde se vaporiza, pasando a la columna arrastrada por el gas portador (normalmente helio o nitrógeno). Una vez en la columna, se produce la separación de los analitos llegando estos secuencialmente al detector, produciéndose para cada uno de ellos una señal que es registrada en un cromatograma.

3. TETRAHIDROCANNABINOL (THC). EXPERIMENTACIÓN Y RESULTADOS

3.1. Cromatografía líquida de alta eficacia con detector UV/Vis (HPLC-UV/Vis)

Teniendo en cuenta la bibliografía consultada, se trata de una técnica que ha sido utilizada para la determinación de tetrahidrocannabinol. Sin embargo, no es una técnica empleada por la Delegación del Gobierno para la determinación de esta sustancia psicoactiva. En nuestro trabajo, dado la importancia de esta técnica, hemos procedido a realizar un estudio para la determinación de tetrahidrocannabinol en presencia de xantinas a partir de esta técnica.

3.1.1. Equipo empleado

Cromatógrafo de líquidos de alta eficacia	
Equipo	Agilent 1200
Columna	Col KROMAPHASE C18, 5.0 μ m 150 mm x 4,6 mm

3.1.2. Preparación de la muestra “patrón”

La muestra “patrón” (1,0 mL) de tetrahidrocannabinol en etanol, en concentración 1mg/ml, corresponde al proporcionado por el Laboratorio de Estupefacientes de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios al Área de Sanidad de la Delegación del Gobierno.

A partir del patrón, mediante dilución con etanol, se obtienen otras disoluciones patrón entre 0,1 y 50 ppm, las cuales se mantuvieron a 4°C en ausencia de luz.

3.1.3. Estudio de la capacidad de absorción por espectroscopía UV/Vis

Debido a la utilización de un detector con estas características, es necesario realizar un estudio con el fin de determinar la longitud de onda óptima de absorción para obtener la máxima sensibilidad, selectividad y precisión en las medidas de tetrahidrocannabinol por HPLC.

3.1.4. Equipo empleado

Espectrofotómetro UV/Vis	
Equipo	HEWLETT PACKARD AGILENT 8453
Cubetas	Cuarzo
Lámpara	Deuterio

3.1.5. Línea de calibrado

Se toman "patrones" de tetrahidrocannabinol cuyas concentraciones están comprendidas entre 0,1 y 0,8 ppm y se realizan barridos entre 200 y 850 nm con blanco etanol. Los resultados se recogen en la **Figura 1**.

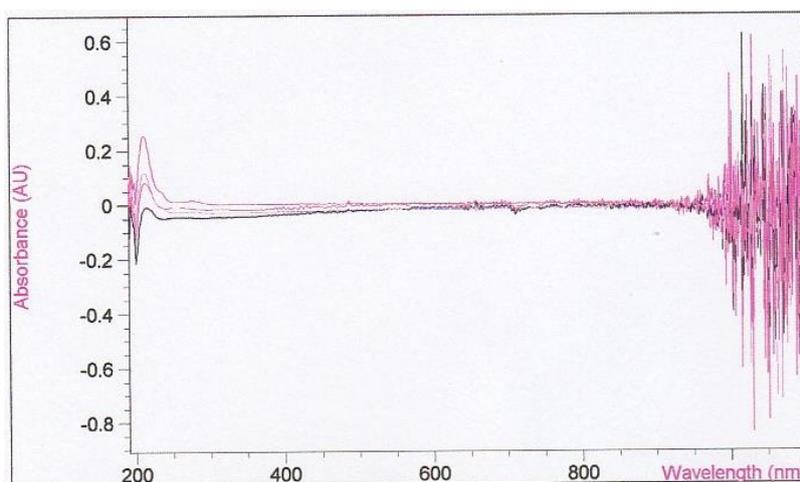


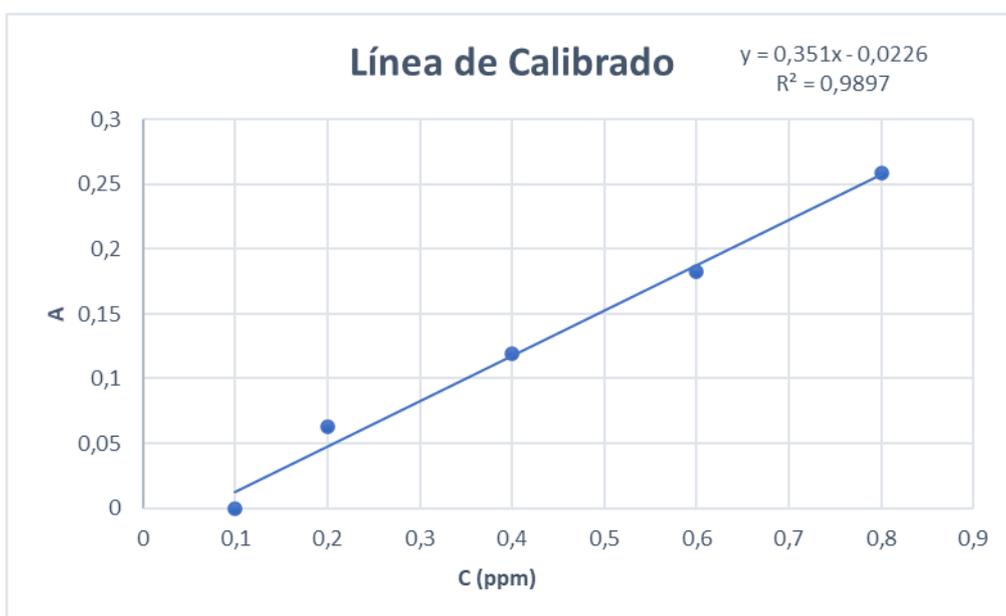
Figura 1: Espectroscopía UV-VIS de los "patrones" de THC

Se observa que aparece una banda característica, con un máximo de absorción a longitud de onda de 210 nm. Por lo tanto, se utilizará esta longitud de onda para el estudio por HPLC.

Se realizó una línea de calibrado a dicha longitud de onda para conocer la relación lineal entre la absorbancia y la concentración de tetrahidrocannabinol y para obtener, además, el valor de la absorptividad del tetrahidrocannabinol. Los resultados se muestran en la **Tabla 1** y en la **Figura 2**.

Tabla 1: Datos de la línea de calibrado del tetrahidrocannabinol por espectroscopía UV/Vis

Concentración (ppm)	Absorbancia
0,1	0,000
0,2	0,063
0,4	0,119
0,6	0,183
0,8	0,259

**Figura 2:** Línea de calibrado del tetrahidrocannabinol por espectroscopía UV/Vis

Aplicando la ley de Lambert-Beer, $A=abc$, se obtiene a partir de la pendiente de la línea de calibrado, a 210 nm, su absorptividad, $a = 0,351 \text{ L/mg}\cdot\text{cm}$. El valor de la absorptividad molar se determina teniendo en cuenta la masa molar del THC, $\epsilon = 1,104 \times 10^5 \text{ L/mol}\cdot\text{cm}$.

3.1.6. Estudio de la fase móvil y calibrado

Para proceder a la determinación de THC por este método, previamente se realizaron pruebas para la elección de la fase móvil más adecuada con el fin de obtener una buena resolución del pico correspondiente al analito.

Se eligió una fase móvil formada por una mezcla de metanol, acetonitrilo y agua en proporción 60:30:10. De esta manera, se consiguió obtener un pico en un tiempo de análisis, en torno a los 6 min.

Otras condiciones de análisis fueron: velocidad de flujo 1 mL/min y volumen de inyección 5 μ L.

Se realizaron medidas con disoluciones patrón de diferentes concentraciones de THC en etanol. En las **Figuras 3 y 4** se pueden observar los cromatogramas para 50 ppm y 5 ppm, respectivamente.

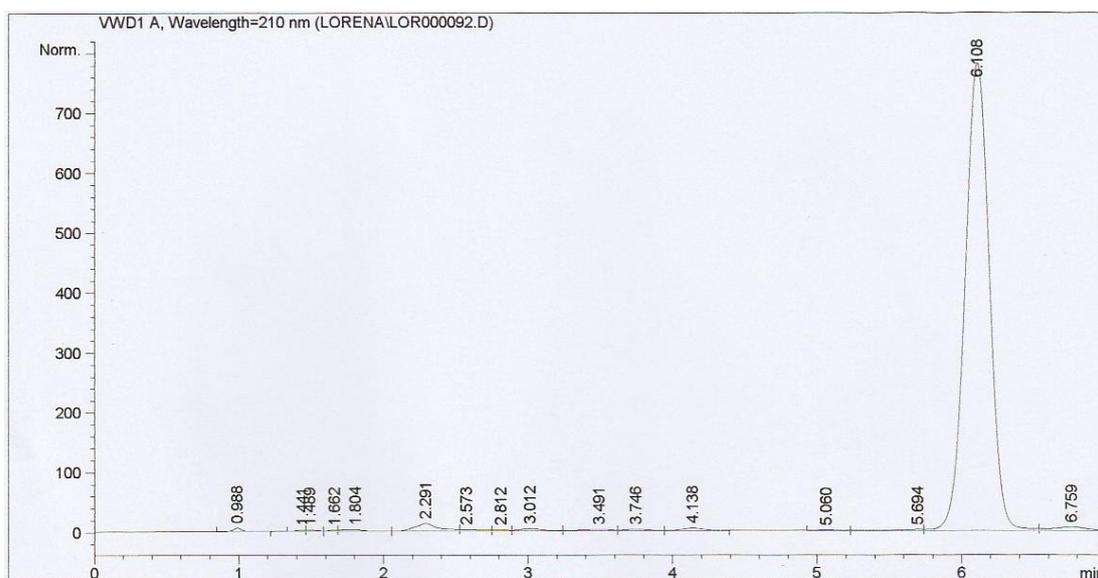


Figura 3: Cromatograma patrón de THC 50 ppm

Se observa que el pico de THC, correspondiente a un tiempo de retención de 6 min, modifica de manera apreciable su intensidad y área al variar la concentración de los patrones añadidos.

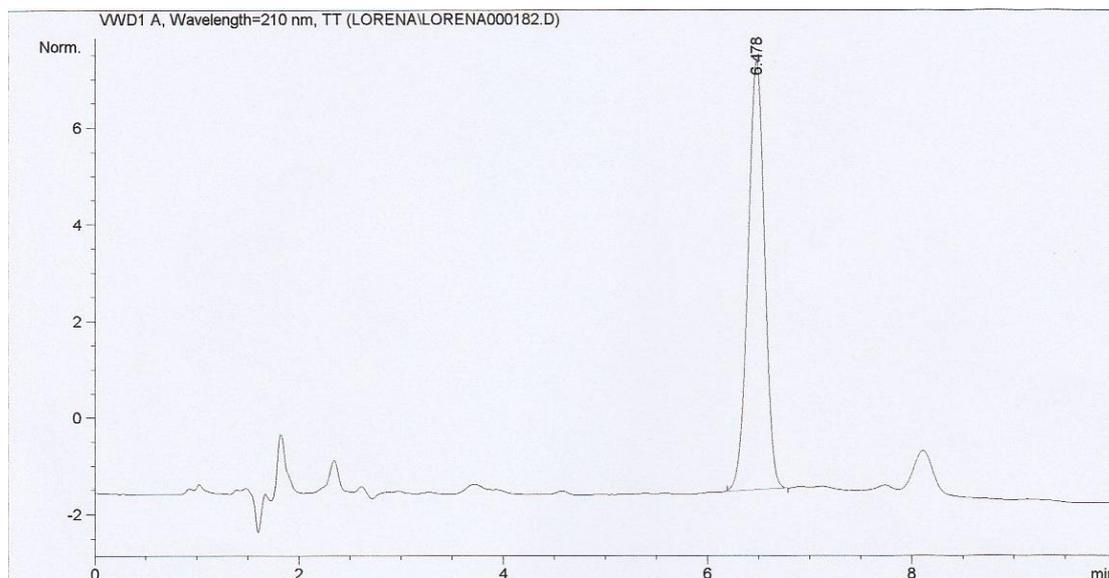


Figura 4: Cromatograma patrón de THC 5 ppm

A continuación, se realiza una línea de calibrado con disoluciones patrón de THC en etanol. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 2** y en la **Figura 5**. Otros cromatogramas se muestran en los anexos, **Figuras 42 a 50**.

Tabla 2: Datos de la línea de calibrado del tetrahidrocannabinol por HPLC, fase móvil 60:30:10

Concentración (ppm)	Área	t _r (min)
0,1	22,7	6.436
0,2	41,8	6.292
0,4	56,8	6.213
0,8	92,1	6.209
1,6	141,5	6.214
3,1	256,8	6.200
6,2	799,6	6.187
12,5	1330,8	6.108
25,0	3237,1	6.112

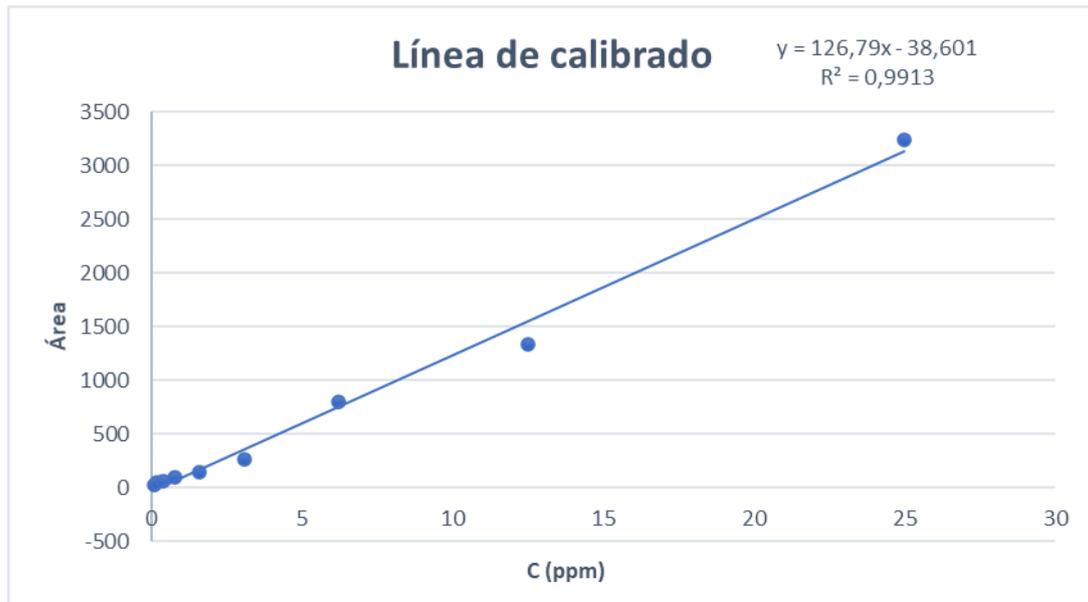


Figura 5: Línea de calibrado del tetrahidrocannabinol por HPLC, fase móvil 60:30:10

Los límites de detección (concentración más pequeña que se puede detectar con un cierto nivel de confianza) y de cuantificación (menor concentración de analito de una muestra que puede determinarse con un nivel de incertidumbre) obtenidos son 0.24 ppm y 0.72 ppm, respectivamente.

3.2. Cromatografía de gases con detector FID (GC-FID)

La GC-FID es una de las técnicas que habitualmente se utiliza en los laboratorios de forma rutinaria para la identificación y el análisis del cannabis. En concreto, es una de las técnicas utilizadas por la Delegación del Gobierno en Castilla y León.

3.2.1. Equipo empleado

Cromatógrafo de gases	
Equipo	Agilent Technologies 6890N
Columna	HP-5 (Crosslinked 5% PH ME Siloxane) 30 m x 0,32 mm x 0,25 µm Film Thickness
Gas portador	Nitrógeno

3.2.2. Preparación de la muestra “patrón”

La muestra “patrón” se prepara a partir de la muestra de tetrahidrocannabinol proporcionada por el Laboratorio de Estupefacientes de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios al Área de Sanidad de la Delegación del Gobierno.

3.2.3. Estudio de las condiciones de trabajo

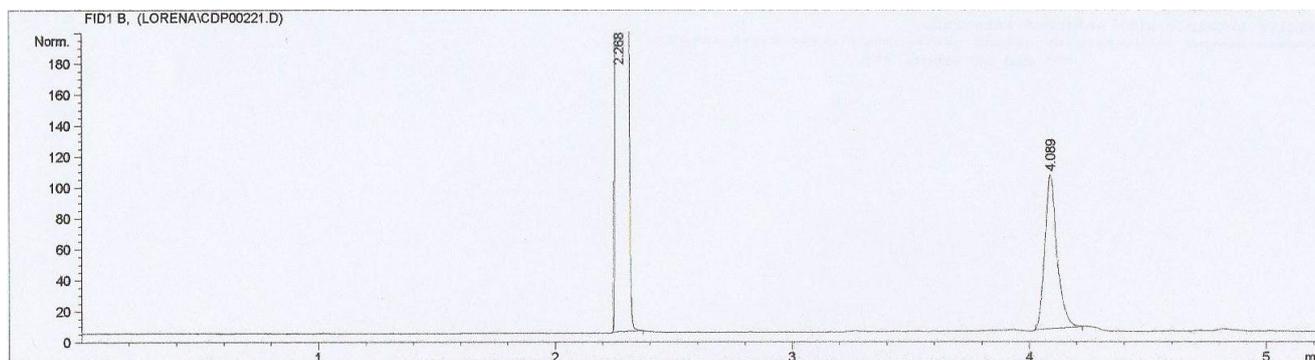
Para la determinación de THC mediante esta técnica, después de realizar ensayos previos, se fijaron las siguientes condiciones: temperatura del inyector 290°C; temperatura inicial del horno 200°C durante 1.5 min, con rampa de 40°C/min hasta 270°C, se mantiene esta temperatura durante 2 min; temperatura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

En la **Tabla 3** se muestran las condiciones de trabajo completas con la rampa de temperatura.

Tabla 3: Condiciones de trabajo con rampa de temperatura

Portal de inyección	Temperatura del inyector	290°C
	Split del inyector	20:1
	Flujo del Split	20.0 ml/min
	Volumen de inyección	1 µL
Horno	Temperatura inicial	200°C
	Temperatura final	270°C
	Rampa de temperatura	40°C/min durante 2 min hasta 270°C
Detector	Duración del ensayo	5.25 min
	Temperatura del horno	350°C

Se realizan medidas para disoluciones de diferente concentración de THC, en etanol. En la **Figura 6**, se recoge el cromatograma correspondiente a 50 ppm.

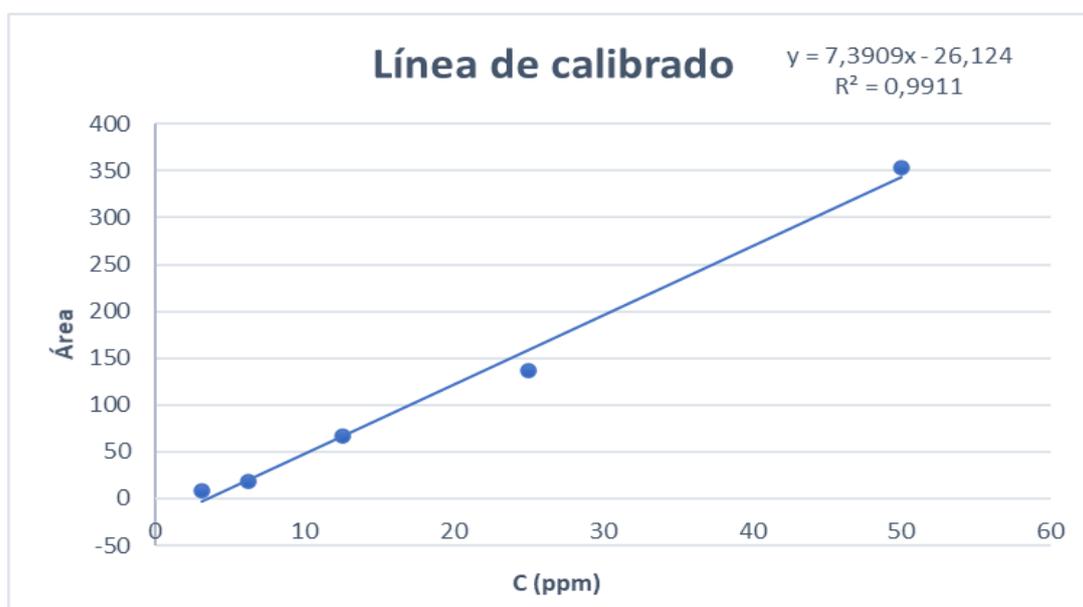
**Figura 6:** Cromatograma patrón de THC 50 ppm

El pico del THC es el correspondiente a un tiempo de retención de 4 min, como se puede observar en los cromatogramas es el que modifica su intensidad y área al variar la concentración de la disolución patrón. Otros cromatogramas aparecen en el anexo, **Figuras 68 a 71**.

Los resultados del calibrado para diferentes patrones, se reflejan en la **Tabla 4** y la **Figura 7**.

Tabla 4: Línea de calibrado THC (GC-FID)

Concentración (ppm)	Área	t _r (min)
3,1	9,04	3.689
6,2	18,58	3.713
12,5	67,03	3.685
25,0	137,12	3.716
50,0	353,42	4.089

**Figura 7:** Representación gráfica del calibrado THC (GC-FID)

Los límites de detección y cuantificación calculados a partir de esta línea de calibrado, fueron: 7.6 ppm y 22.7 ppm, respectivamente.

4. TETRAHIDROCANNABINOL (THC) EN MUESTRAS CON XANTINAS. EXPERIMENTACIÓN Y RESULTADOS

4.1. Cromatografía líquida de alta eficacia con detector UV/Vis (HPLC-UV/Vis)

Se estudia la posibilidad de determinar THC en muestras, en las que pudieran aparecer otras sustancias como consecuencia de la forma de consumo, como es el caso de infusiones. Para ello se prepararon mezclas de THC con cafeína, teobromina y teofilina.

4.1.1. Preparación de las muestras patrón de xantinas

Cafeína $0.01026 \text{ g} \pm 0.00001 \text{ g}$; teobromina $0.01043 \text{ g} \pm 0.00001 \text{ g}$; teofilina $0.01002 \text{ g} \pm 0.00001 \text{ g}$. En todos los casos, se disolvió cada una de las muestras en agua desionizada y se llevaron a 100,0 mL.

Cafeína $0.01058 \text{ g} \pm 0.00001 \text{ g}$; teobromina $0.01012 \text{ g} \pm 0.00001 \text{ g}$; teofilina $0.01035 \pm 0.00001 \text{ g}$. En todos los casos, se disolvió cada una de las muestras en etanol y se llevaron con etanol a 100,0 mL.

4.1.2. Estudio por espectroscopía UV/Vis

Se realiza un estudio previo de las longitudes de onda de absorción de cada uno de los compuestos anteriormente mencionados. Los resultados se muestran en las **Figuras 8 a 10**.

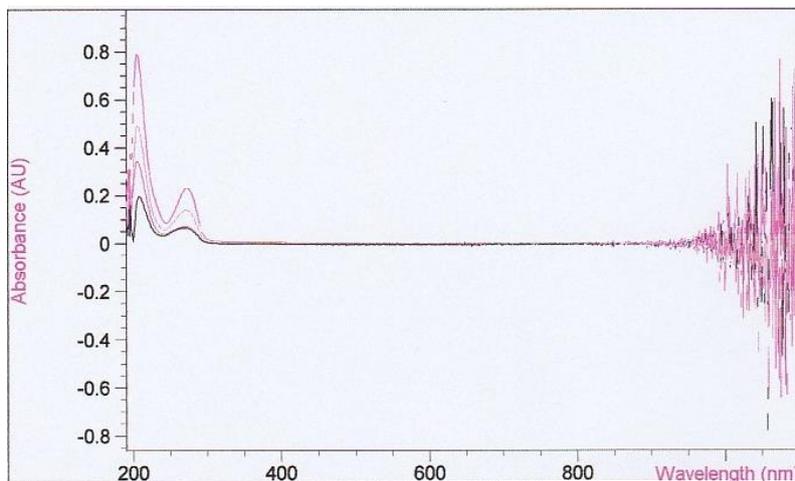


Figura 8: Espectro de cafeína

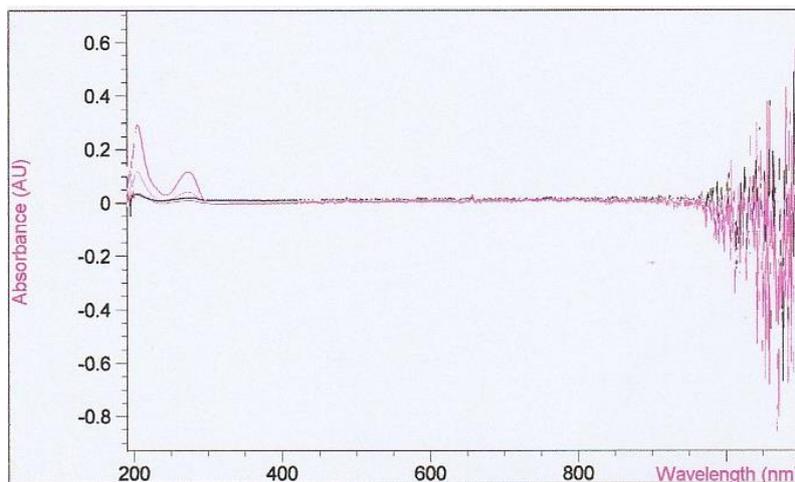


Figura 9: Espectro de teobromina

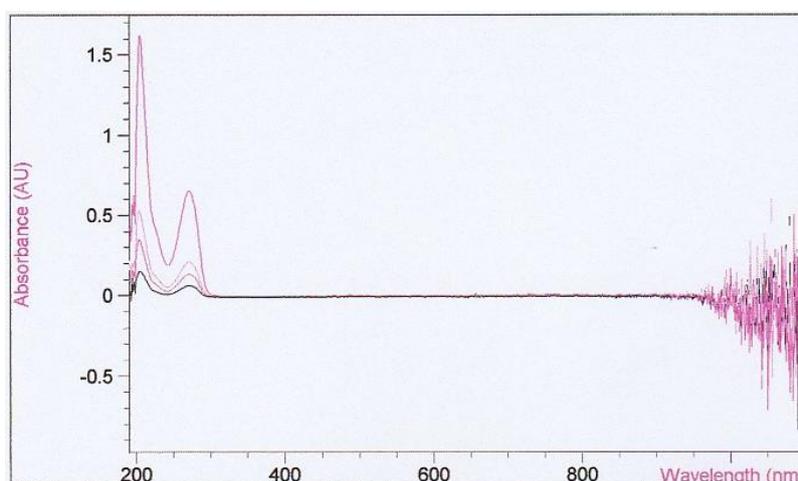


Figura 10: Espectro de teofilina

Los datos de las longitudes de onda y bandas de las distintas xantinas se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5: Longitud de onda y bandas de los distintos adulterantes

Compuesto	Longitudes de onda de absorción (nm)
Cafeína	206 y 273
Teobromina	206 y 273
Teofilina	206 y 273

Tal y como se observa en las figuras todos los compuestos muestran absorbancia también a 210 nm, lo que significa que todas las xantinas van a dar respuesta a la λ seleccionada para llevar a cabo la determinación por HPLC del tetrahidrocannabinol.

4.1.3. Determinaciones conjuntas

Antes de analizar por HPLC las mezclas de THC y xantinas, se analiza cada una de las xantinas por separado para conocer su tiempo de retención. Se utiliza la fase móvil de metanol, acetonitrilo y agua en proporciones 60:30:10, que es la considerada óptima en el análisis del THC. Los cromatogramas obtenidos en estas y otras condiciones indican que dichos compuestos se detectan mucho antes de la aparición del THC, todos ellos se muestran en los anexos, **Figuras 51 a 53**.

A continuación, se mezclan en medio etanol, 1,0 mL (5 ppm) de THC con 1,0 mL (100 ppm) de cada una de las xantinas y se procede a su determinación cromatográfica. En la **Figura 11** se muestra el cromatograma de la mezcla. A la vista de estos resultados, se considera que se puede determinar THC en presencia de cafeína, teobromina y teofilina, si bien en estas condiciones no se podría diferenciar cada una de las xantinas por solapamiento de los picos.

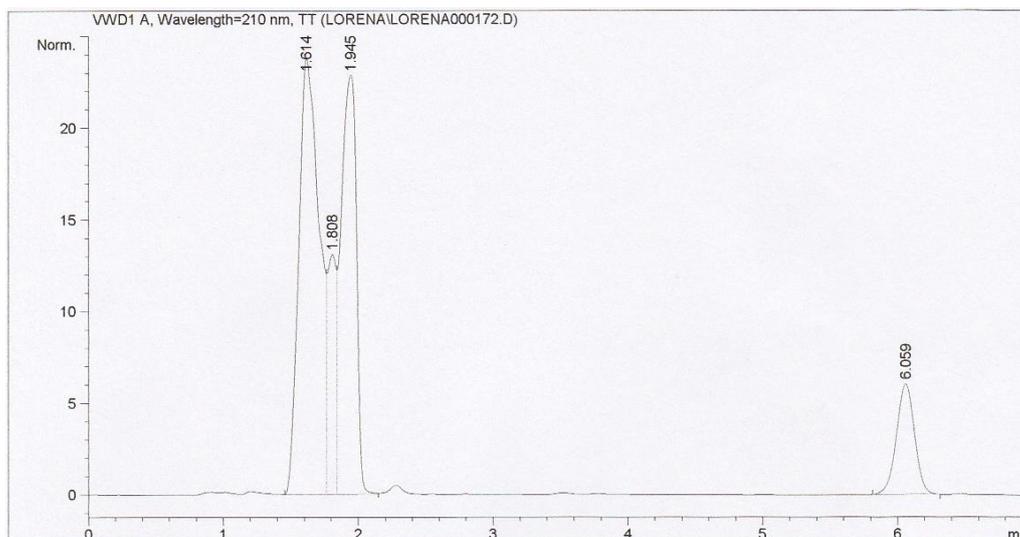


Figura 11: Cromatograma mezcla de cafeína, teobromina, teofilina y THC

4.2. Cromatografía de gases con detector FID (GC-FID)

Utilizando las condiciones seleccionadas en el apartado 3.2.3, se lleva a cabo un análisis por GC de cada una de las xantinas en etanol. Los cromatogramas obtenidos aparecen en las **Figuras 12 a 14**.

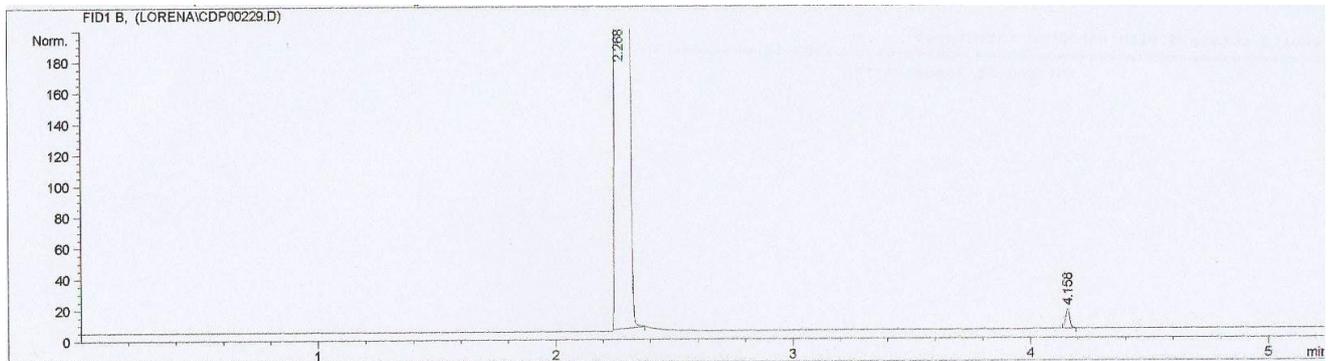


Figura 12: Cromatograma cafeína

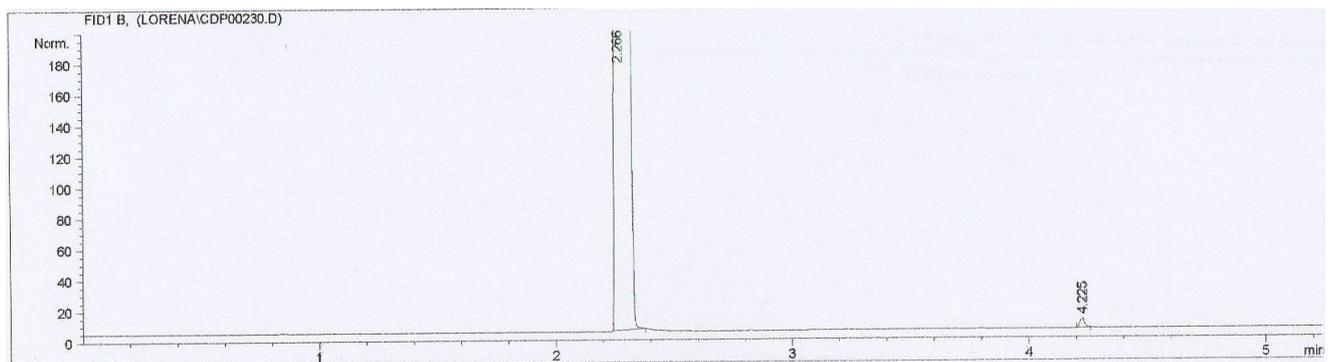


Figura 13: Cromatograma teobromina

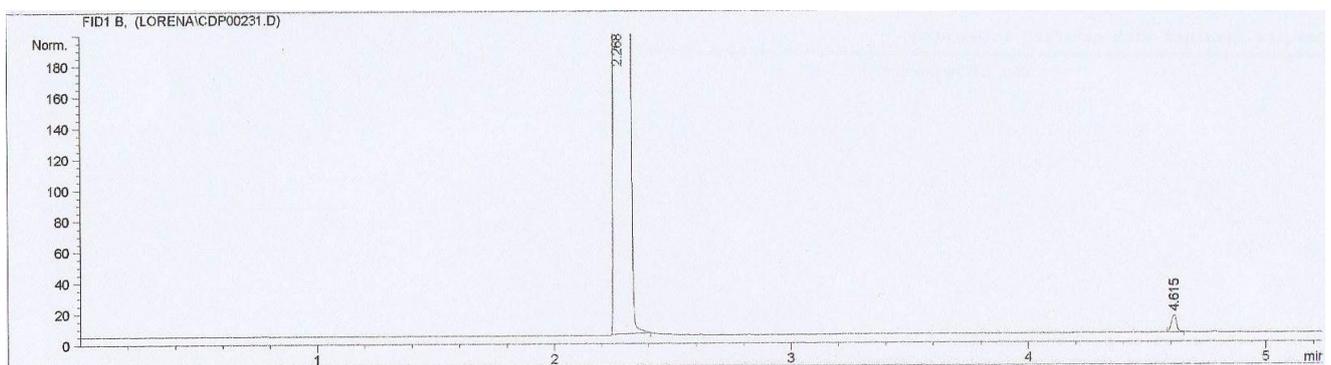


Figura 14: Cromatograma teofilina

Comparando los tiempos de retención obtenidos, al realizar una mezcla de las xantinas con el THC (**Figura 15**) se diferencian cada uno de los picos correctamente: THC 3.399 min; cafeína 4.318 min; teobromina 4.791 min y teofilina 5.024 min.

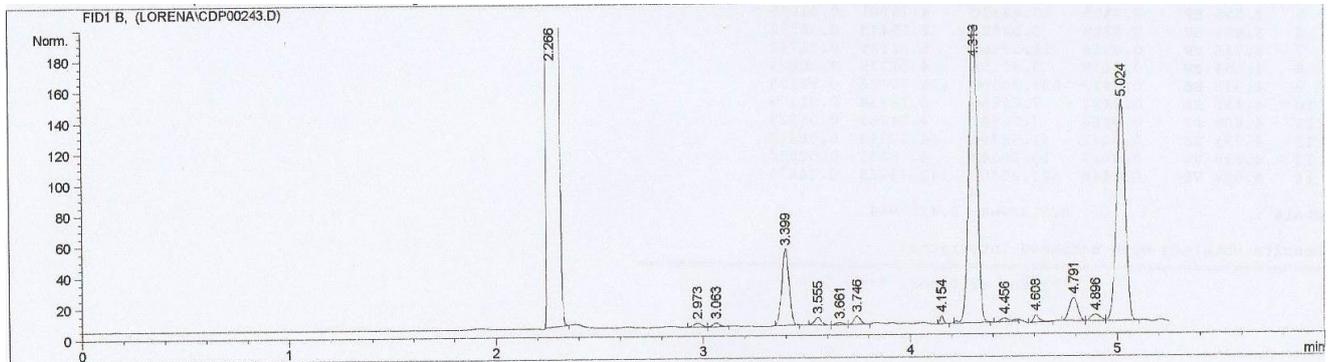


Figura 15: Cromatograma mezcla de 25 ppm

5. EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE THC EN PLANTAS Y RESINA DE CANNABIS. EXPERIMENTACIÓN Y RESULTADOS

5.1. Extracción por agitación

En los tubos donde se va a realizar la extracción (**Figura 16**), se adiciona una cantidad de cogollo de cannabis, pesada con precisión de 0,1 mg y 25,0 mL de etanol y se lleva a cabo la extracción mediante agitación automática durante aproximadamente 30 minutos. A continuación, se filtra y la disolución transparente obtenida se almacena a 4°C en ausencia de luz. Del mismo modo se procede en la extracción en la resina de cannabis.



Figura 16: Extracciones realizadas de cannabis y resina de cannabis

5.1.1. Determinación por HPLC

Las determinaciones de THC se realizaron utilizando la fase móvil óptima indicada en el apartado 3.1.4: 60% metanol: 30% acetonitrilo: 10% agua.

Las **Figuras 17 y 18** muestran los resultados obtenidos en el caso del cogollo.

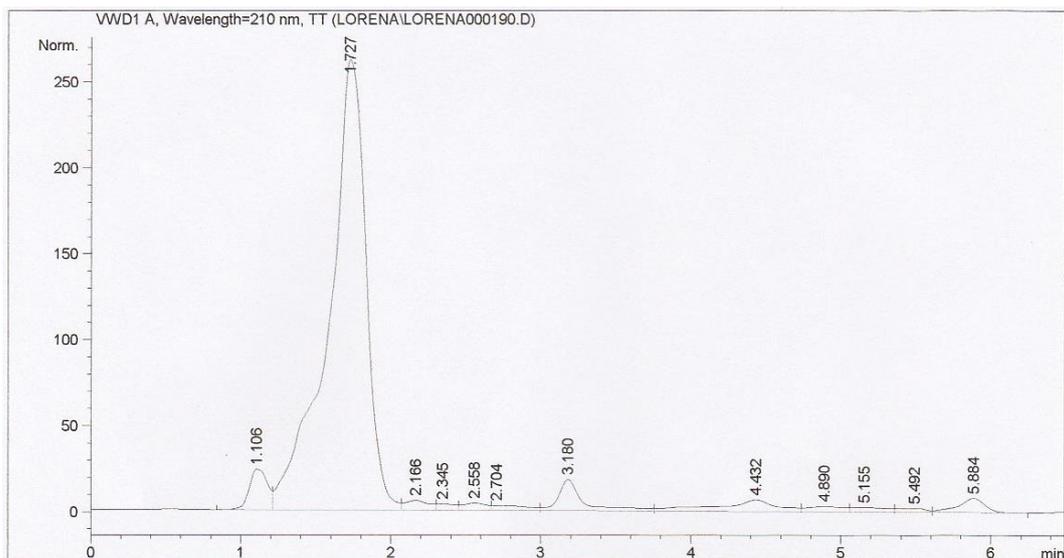


Figura 17: Cromatograma de la extracción de cannabis en el cogollo

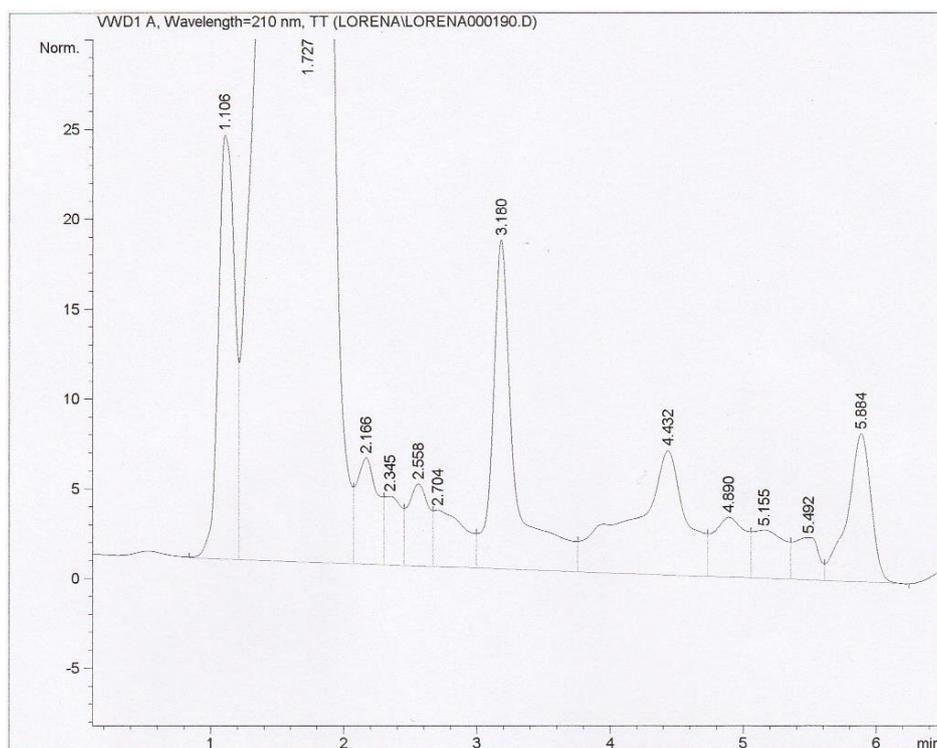


Figura 18: Cromatograma ampliado de la extracción de cannabis en el cogollo

El pico de THC es el correspondiente a 5.884 min. Los otros picos de diferentes áreas, pueden ser debidos a otros compuestos presentes en el cannabis, que también se extraen con etanol.

A continuación (**Figura 19**), se muestra el cromatograma correspondiente a la extracción en la resina de cannabis.

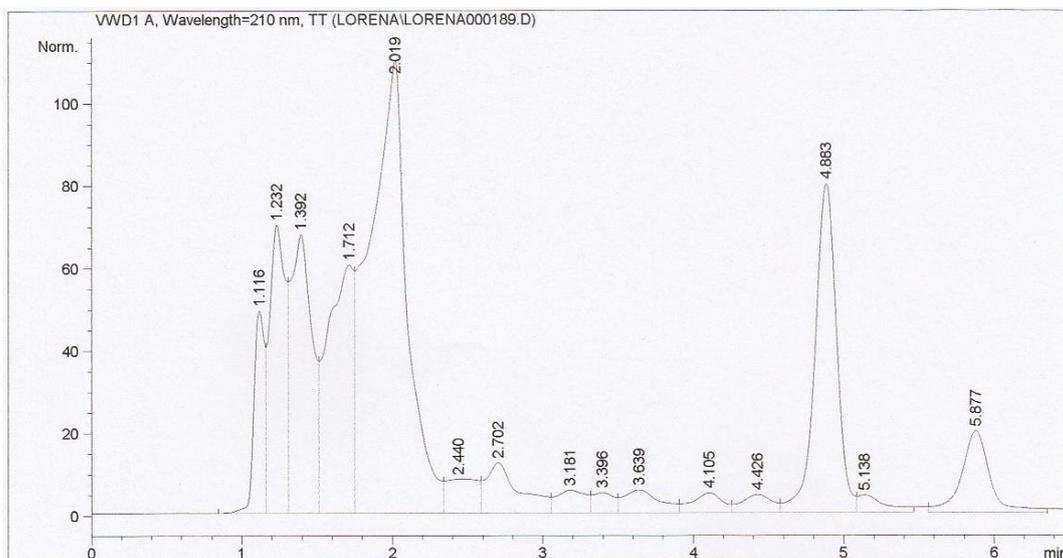


Figura 19: Cromatograma de la extracción de cannabis en la resina

En este caso, el pico de retención del THC se observa a 5.877 min. Los otros picos, como en el caso anterior, corresponderían a otros compuestos presentes en la resina de cannabis que se extraen con etanol y no dificultan la medida.

Con los resultados obtenidos, utilizando la correspondiente línea de calibrado, se calcula la cantidad de THC existente en cada muestra (**Tabla 6**).

Tabla 6: Cantidad de THC en cada extracción (HPLC)

Extracciones cannabis	t_r (min)	Peso muestra cannabis (g)	% [THC]
Cogollo	5.884	0,0827	3,3
Resina	5.877	0,0300	2,0

5.1.2. Determinación por GC-FID

La determinación de THC por GC se realiza en las condiciones indicadas en el apartado 3.2.3. Se muestra, en la **Figura 20**, el resultado correspondiente al cogollo.

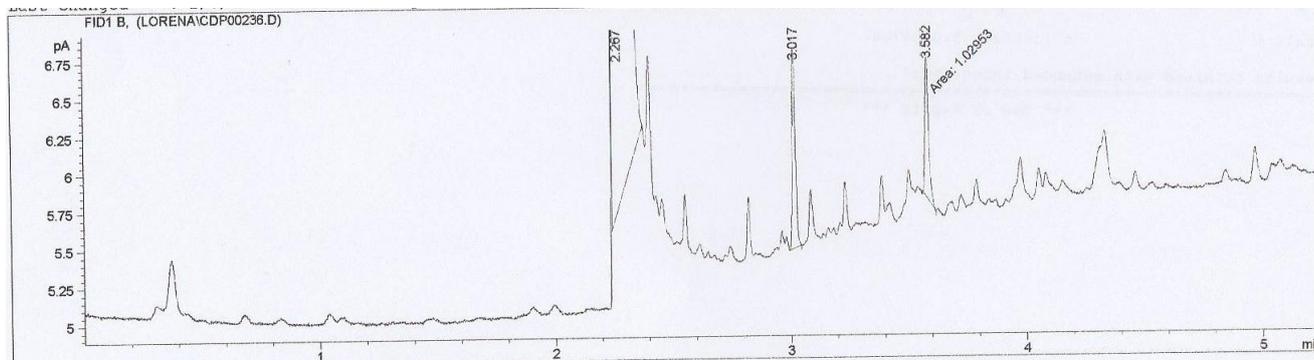


Figura 20: Cromatograma extracción de cannabis en el cogollo

El pico del THC es el que corresponde a un tiempo de retención de 3.017 min.

A continuación, se llevó a cabo la extracción en la resina. En la **Figura 21** se muestra el cromatograma correspondiente.

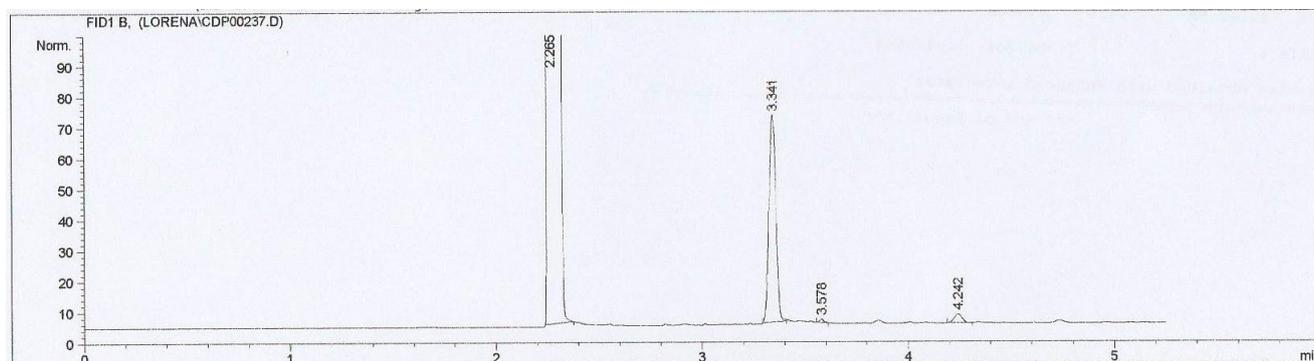


Figura 21: Cromatograma extracción de cannabis en la resina

En este caso, el pico del THC es el correspondiente a un tiempo de retención de 3.341 min.

Tal y como se aprecia en los cromatogramas, se produce una pequeña variación en la retención del THC en la columna en función de la sustancia utilizada para la extracción del cannabis.

Los resultados obtenidos para las extracciones de cannabis, tanto en el cogollo como en la resina, realizadas mediante GC, se recogen en la **Tabla 7**.

Tabla 7: Cantidad de THC en cada extracción (GC)

Extracciones cannabis	t_r (min)	Peso muestra cannabis (g)	% [THC]
Cogollo	3.017	0,0827	3,7
Resina	3.341	0,0300	2,7

Se obtiene una mayor cantidad de THC con GC que con HPLC, debido a que en la planta de cannabis pueden existir cannabinoides ácidos y neutros (THCA y THC en el caso del tetrahidrocannabinol). Con el aumento de la temperatura, los ácidos se convierten en neutros, por lo que se puede producir un aumento en la detección de la cantidad de THC presente.

5.2. Extracción Soxhlet

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.

Se pesa, con precisión de 0,1 mg, una cantidad de cogollo del orden de 0,3 g, y como extractante se utilizan unos 250,0 mL de etanol. Una vez finalizado el proceso de extracción realizado durante unas tres horas, ocho ciclos, se destila parte del etanol para concentrar el extracto, se filtra y se enrasa a 50,0 mL con etanol.

El extracto obtenido con este procedimiento presenta un color verde muy intenso (**Figuras 22 y 23**). Antes de inyectarlo en el cromatógrafo se filtra en filtro de jeringa de 0.22 µm.



Figura 22: Aspecto de la extracción Soxhlet del cogollo y disolución final de 50 mL



Figura 23: Proceso de destilación del etanol a partir del extracto de Soxhlet

Posteriormente, de forma análoga, se realiza la extracción en la resina. La cantidad pesada, con precisión de 0,1 mg, es del orden de un gramo y como extractante se utilizan unos 250,0 mL de etanol. Una vez finalizado el proceso de extracción, se destila parte del etanol para concentrar el extracto, se filtra y se enrasa como en el caso anterior.

El extracto obtenido con este procedimiento presenta un color marrón muy intenso, **Figura 24**. Antes de inyectarlo en el cromatógrafo se filtra con filtro de jeringa.



Figura 24: Aspecto del extracto de resina de cannabis durante la extracción y al finalizar

5.2.1. Determinación por HPLC

Los extractos obtenidos del cogollo y la resina de cannabis se inyectan en el cromatógrafo obteniéndose los cromatogramas que se recogen en las **Figuras 25 y 26**, otros cromatogramas correspondientes a diluciones se reflejan en el anexo (**Figuras 62 y 63**). El pico correspondiente al THC sale a un tiempo de retención de 5.888 min en el extracto del cogollo y de 6.016 min en el extracto de la resina. La fase móvil utilizada es la óptima, metanol, acetonitrilo y agua en proporción 60:30:10. Las medidas se realizan a longitud de onda de 210 nm.

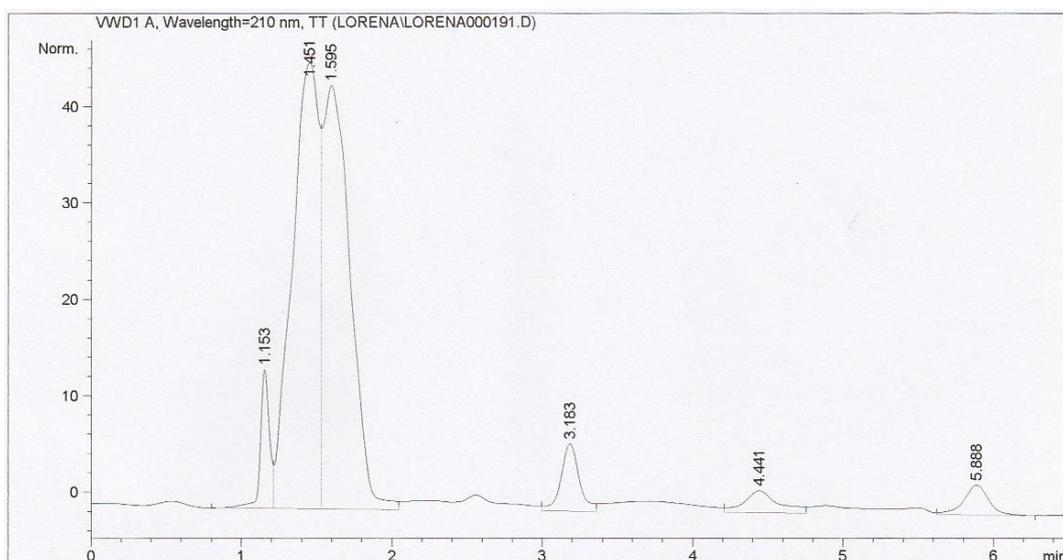


Figura 25: Cromatograma de la extracción en el cogollo (Soxhlet HPLC)

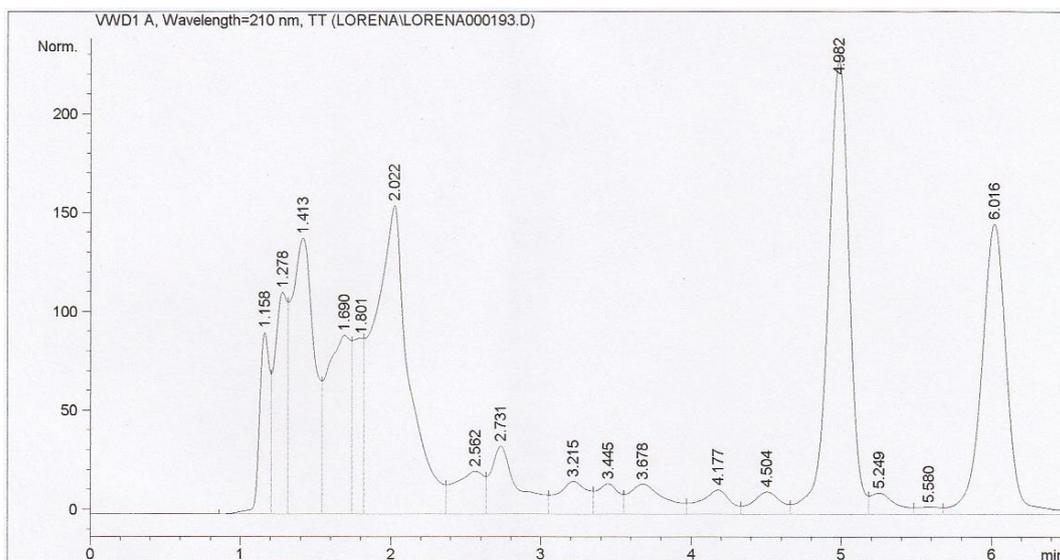


Figura 26: Cromatograma de la extracción en la resina (Soxhlet HPLC)

En la **Tabla 8**, se reflejan los resultados de la cantidad de THC obtenido de la extracción de cannabis mediante este procedimiento.

Tabla 8: Cantidad de THC con Soxhlet (HPLC)

Extracciones cannabis	t_r (min)	Peso muestra cannabis (g)	% [THC]
Cogollo	5.888	0,2867	3,9
Resina	6.016	0,9351	2,8

Comparando los resultados obtenidos para el cogollo y la resina, la cantidad de THC obtenida por extracción con Soxhlet es algo mayor a la de agitación constante.

5.2.2. Determinación por GC-FID

Se procede a la determinación de las muestras por cromatografía de gases en las condiciones indicadas anteriormente. En la **Figura 27** se muestra el cromatograma obtenido para la extracción en el cogollo. El pico de THC sale a un tiempo de retención de 3.056 min (dilución en el anexo, **Figura 72**).

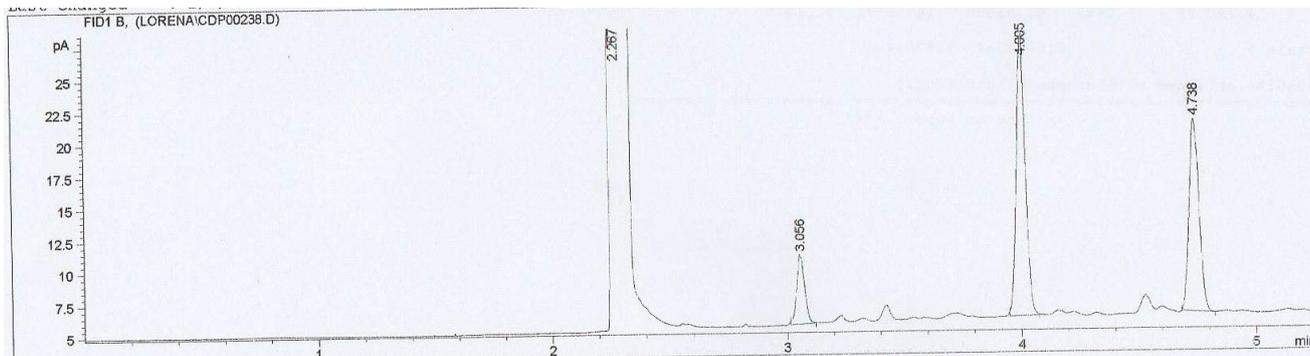


Figura 27 Cromatograma de la extracción de cannabis en el cogollo (Soxhlet GC)

En el análisis correspondiente a la extracción de THC en resinas de cannabis, se obtiene un pico para el THC a un tiempo de retención de 3.289 min, **Figura 28**, (dilución en el anexo, **Figura 73**).

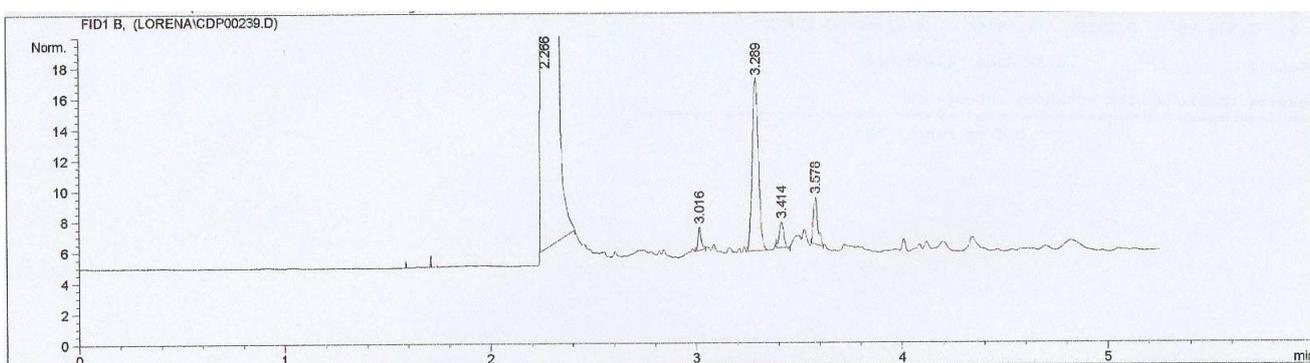


Figura 28: Cromatograma de la extracción del cannabis en la resina (Soxhlet GC)

A continuación (**Tabla 9**), se muestran los resultados obtenidos por este método.

Tabla 9: Cantidad de THC con Soxhlet (GC)

Extracciones cannabis	t_r (min)	Peso muestra cannabis (g)	% [THC]
Cogollo	3.056	0,2867	4,3
Resina	3.229	0,9351	2,9

Comparando los resultados obtenidos para el cogollo y resina por ambos métodos, extracción con agitación constante y mediante Soxhlet, se obtiene una ligera cantidad superior de THC por este último.

Aunque se obtiene una mayor cantidad, también implica más tiempo de extracción (aproximadamente 2 horas). Sin embargo, al poder utilizar una mayor cantidad de muestra de cannabis en la extracción, los resultados serían más representativos.

La diferencia obtenida entre GC y HPLC puede ser debida 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 THC se pasa de THCA a THC, por lo que se detecta mayor cantidad.

6. ESTUDIO PARA LA DETERMINACIÓN DE THC EN INFUSIONES DE MATE, CAFÉ, CACAO Y TÉ.

6.1. Preparación de las infusiones y extracción de THC

Preparación

Se toma una cantidad de muestra del orden de un gramo de cada uno de los compuestos (**Figura 29**), se adiciona sobre agua desionizada y se calienta hasta ebullición durante unos 15 minutos. A continuación, se añade 1,0 mL de THC, se agita con varilla de vidrio y se deja enfriar a temperatura de laboratorio. Por último, se filtra hasta disolución transparente y se enrasa a 25,0 mL con agua desionizada.



Figura 29: Muestras de café, té, cacao y mate

Extracción

El proceso de extracción de las xantinas y del THC se realiza haciendo pasar secuencialmente a través de una columna C18, 10,0 mL de metanol, 10,0 mL de agua desionizada y 5,0 mL de muestra. Posteriormente se realiza el lavado de la columna con agua desionizada. El extracto retenido en la columna se recupera mediante dos sucesivas adiciones de 1,0 mL de acetonitrilo y se almacena a 4°C en ausencia de luz.

6.1.1. Determinación por HPLC

Previo al análisis de las infusiones con THC, se lleva a cabo una determinación por esta técnica de cada una de las infusiones sin THC con el mismo tratamiento de extracción, para comprobar la respuesta a los componentes presentes en dichas infusiones que hayan quedado retenidos en la columna C18 y posteriormente eluidos con acetonitrilo. Los cromatogramas se reflejan en los anexos, **Figuras 64 a 67**.

Las medidas en todos los casos de las mezclas con THC o solo infusiones, se realizan con fase móvil: metanol, acetonitrilo y agua en proporciones 60:30:10. Longitud de onda 210 nm, y demás condiciones recogidas en el apartado 3.1.4.

A continuación, **Figuras 30 a 37**, se muestran cromatogramas correspondientes a distintas infusiones con THC. En cada uno de ellos, se puede deducir que se produce una correcta separación entre las xantinas presentes en las disoluciones de cacao, té, café, mate y el THC.

Café

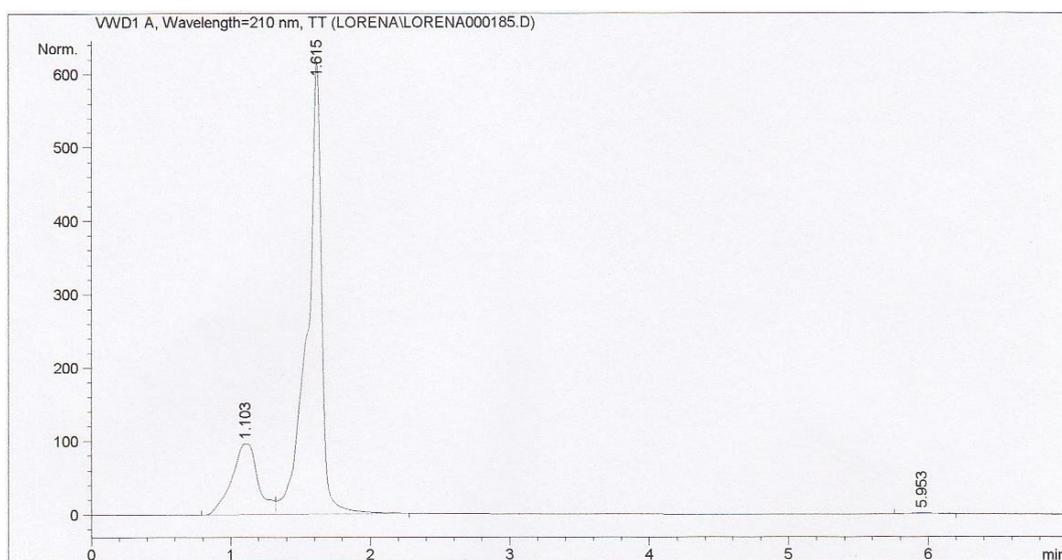


Figura 30: Cromatograma mezcla de café y THC

Dadas las dificultades de caracterizar el pico a 5.953 min, debido a lo diluido de la muestra, se incluye a continuación cromatograma de la misma muestra a diferente escala. (**Figura 31**)

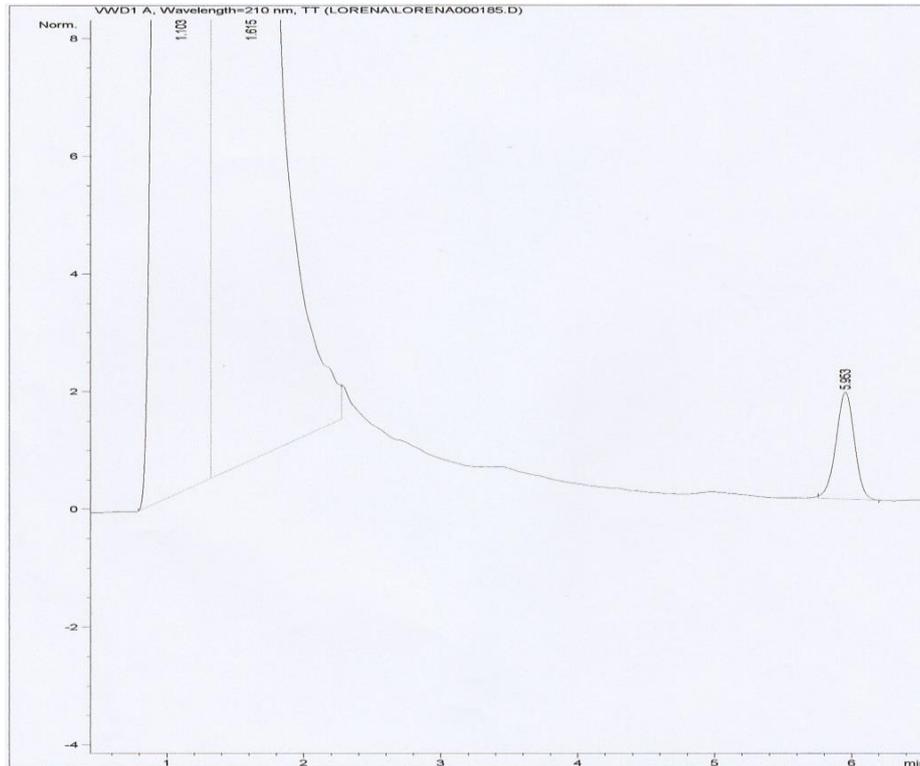


Figura 31: Cromatograma ampliado mezcla de café y THC

El pico correspondiente al THC sale a 5.953 min. Los otros picos con mayor área pueden ser debidos a otros compuestos presentes en el café.

Mate

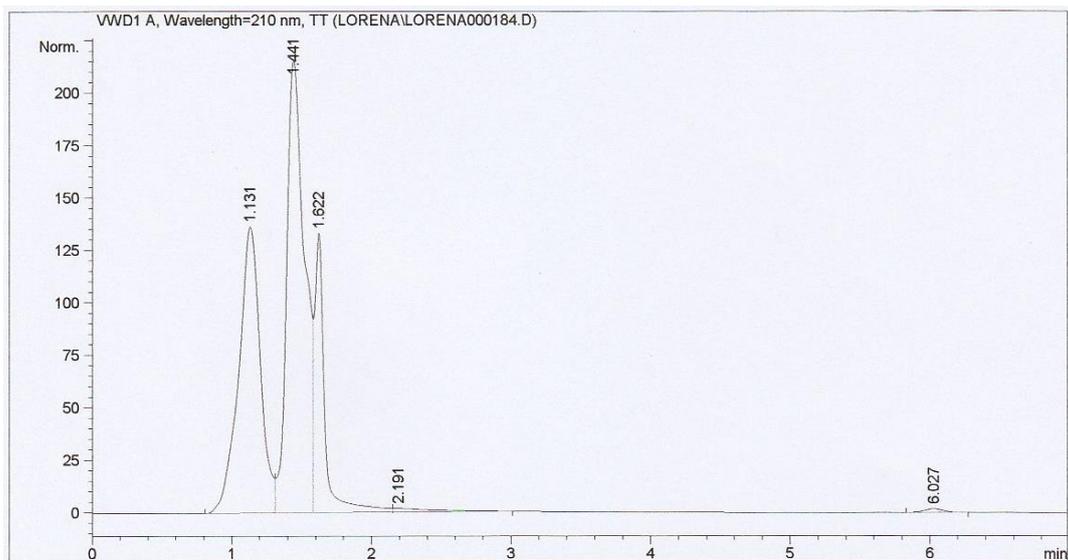


Figura 32: Cromatograma mezcla de mate y THC

Dadas las dificultades de caracterizar el pico, **Figura 32**, a 6.027 min, debido a lo diluido de la muestra, se incluye a continuación cromatograma de la misma muestra diferente escala. (**Figura 33**)

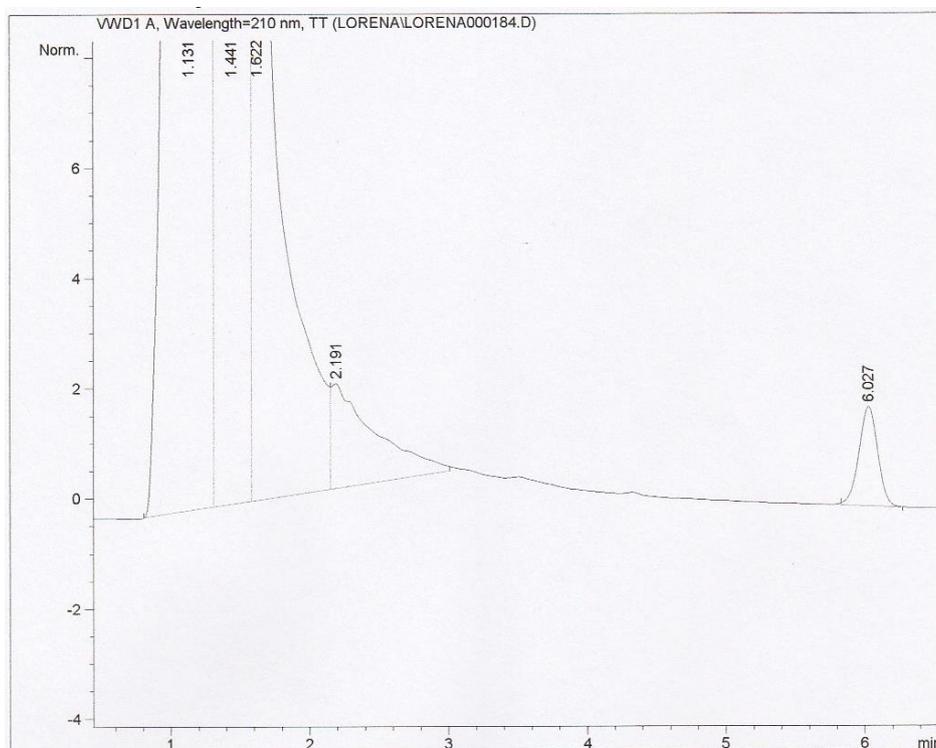


Figura 33: Cromatograma ampliado mezcla de mate y THC

El pico correspondiente al THC es el que sale a los 6.027 min. Los otros picos solapados y con mayor área se suponen debidos a otros compuestos presentes en el mate.

Té

Los resultados están recogidos en forma análoga a los dos anteriores. La exposición en la memoria de la secuencia de los cromatogramas se realiza para favorecer la visualización en el primero de ellos de la presencia de otros componentes, **Figura 34**, y en el segundo del THC, **Figura 35**, donde debido al tipo de escala los componentes mayoritarios aparecen cortados.

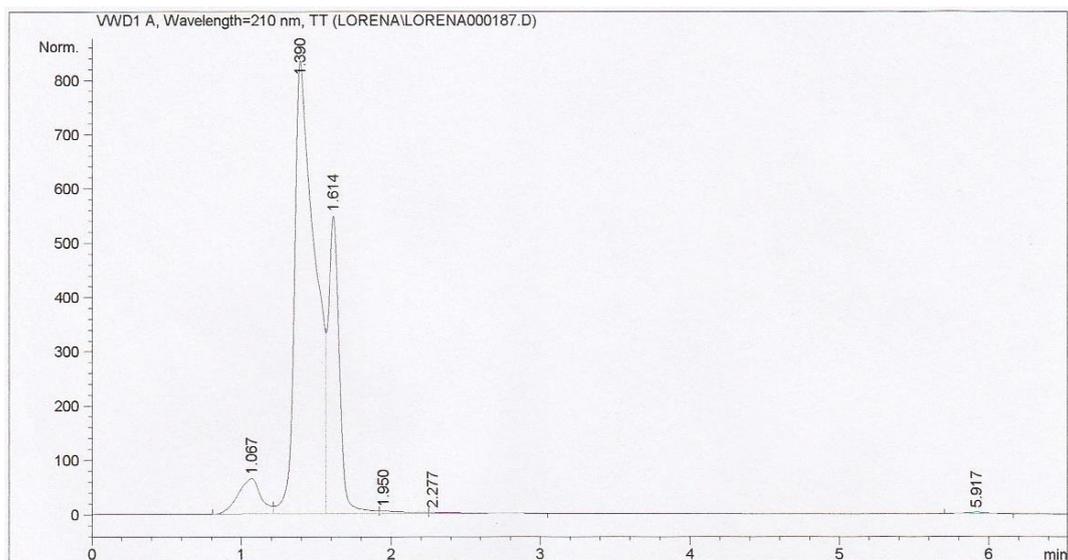


Figura 34: Cromatograma mezcla de té y THC

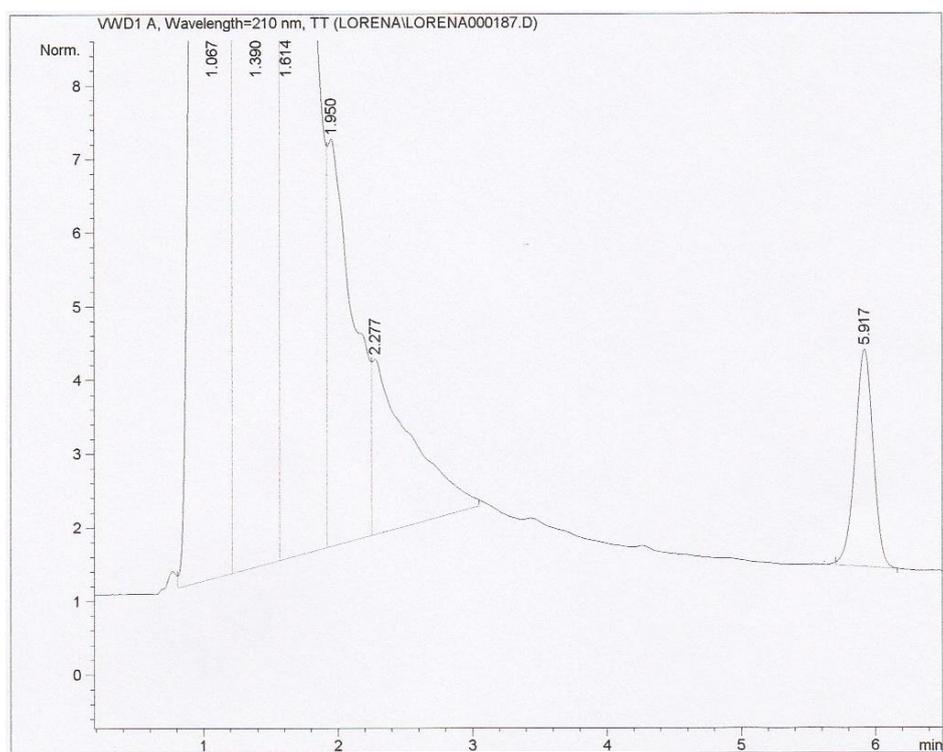


Figura 35: Cromatograma ampliado mezcla de té y THC

El pico correspondiente al THC es el que sale a los 5.917 min. Los otros picos con mayor área pueden ser debidos a otros compuestos presentes en el té.

Cacao

Los resultados están recogidos en forma análoga a los anteriores, **Figura 36** sin ampliar y **Figura 37** ampliada.

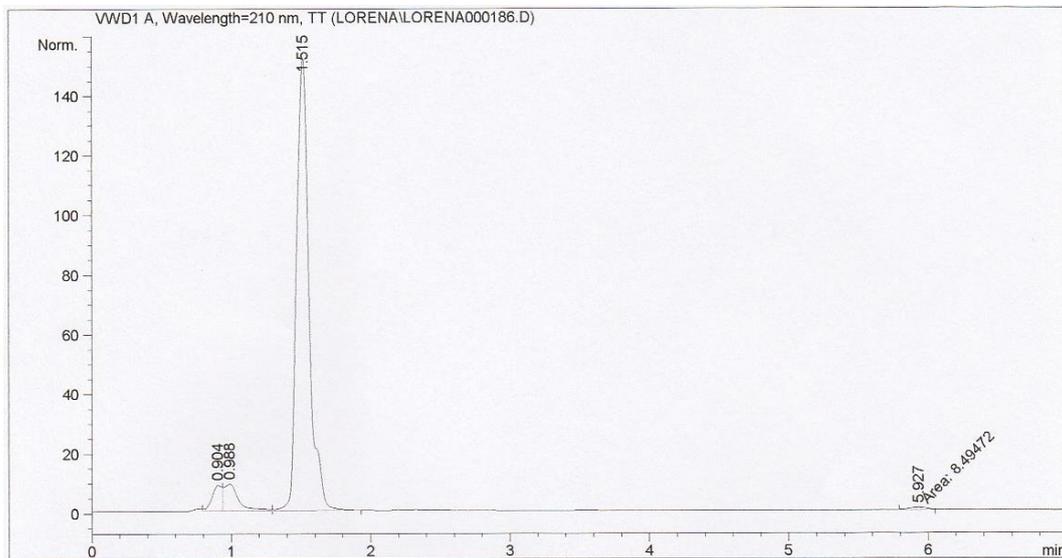


Figura 36: Cromatograma mezcla de cacao y THC

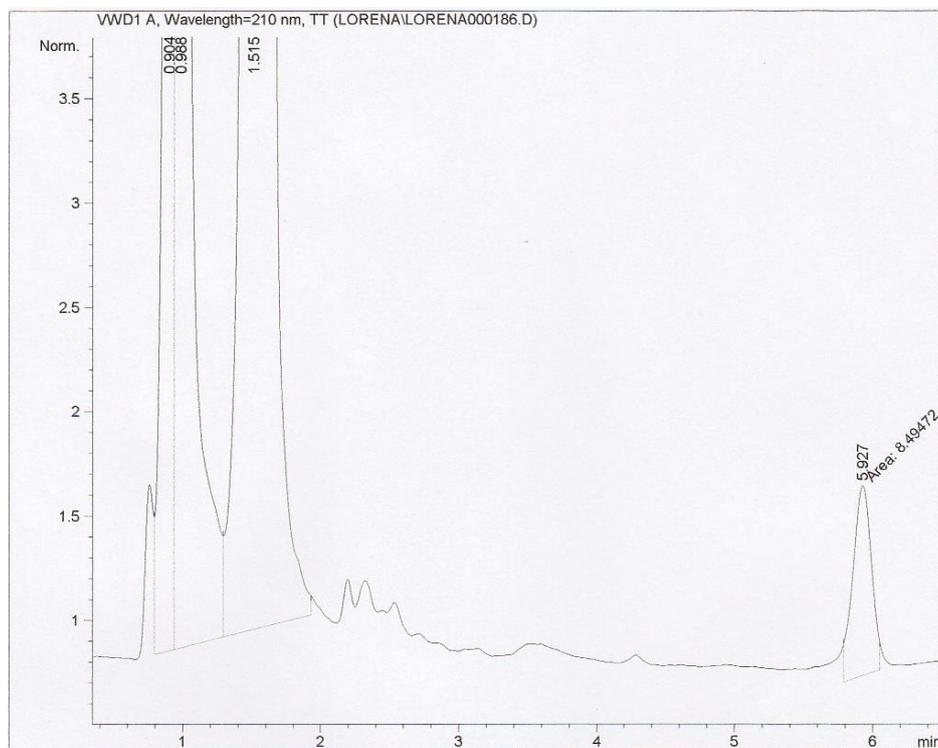


Figura 37: Cromatograma ampliado mezcla de cacao y THC

El pico correspondiente al THC es el que aparece a 5.927 min. Los otros picos como en los anteriores casos, pueden ser debidos a otros compuestos presentes en el cacao.

6.1.2. Determinación por GC-FID

Antes de analizar por GC las mezclas de las infusiones con THC, se analiza como en el procedimiento anterior, la determinación en infusiones sin THC. Se utilizan las condiciones seleccionadas en el apartado 3.2.3. Los cromatogramas se recogen en los anexos, **Figuras 74 a 77**.

A continuación, se muestran los cromatogramas de las infusiones con THC mediante este método.

El pico del THC es el correspondiente a un tiempo de retención de 3.3 min.

Mate

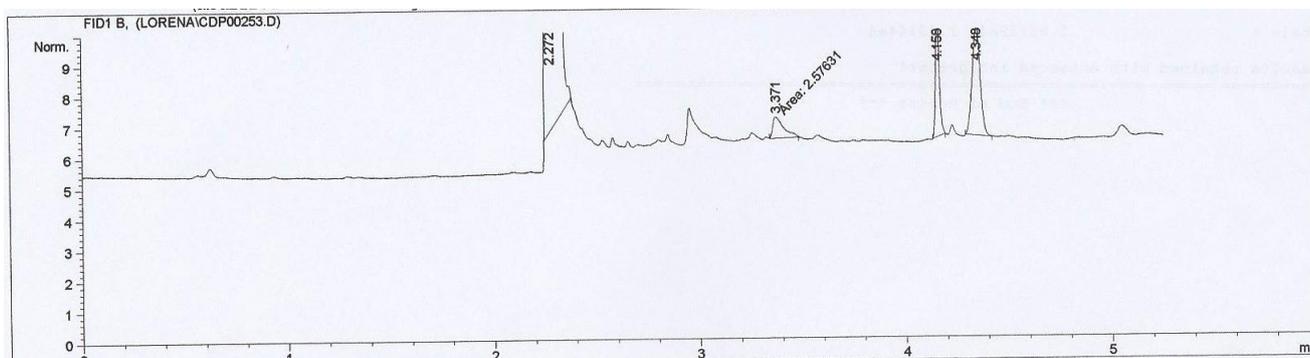


Figura 38: Cromatograma mezcla mate + THC

Té

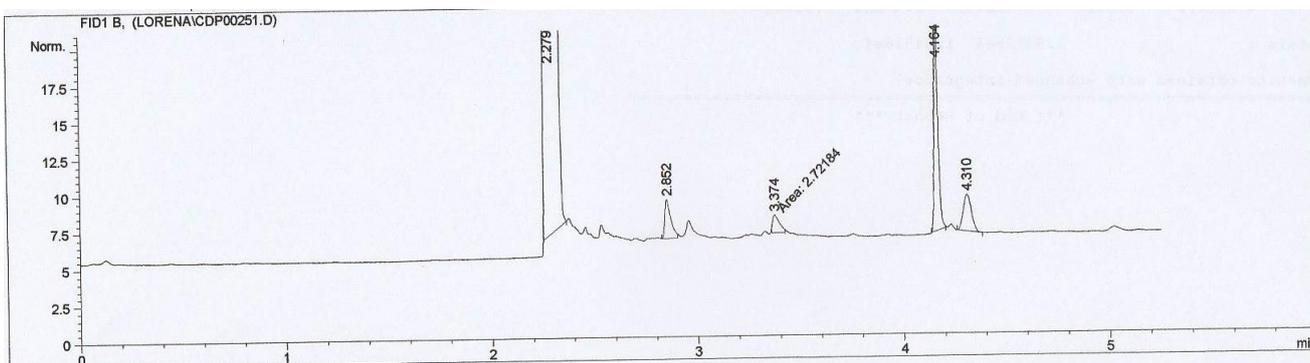


Figura 39: Cromatograma mezcla de té + THC

Cacao

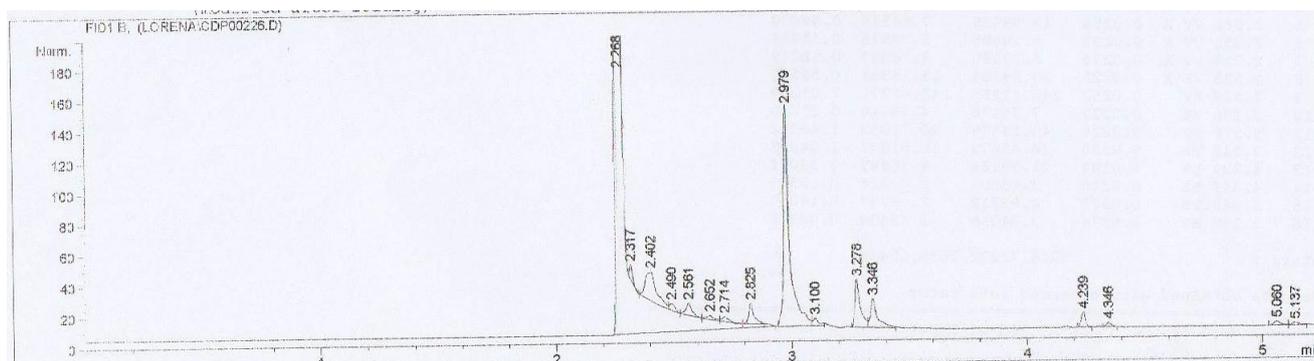


Figura 40: Cromatograma mezcla cacao + THC

Café

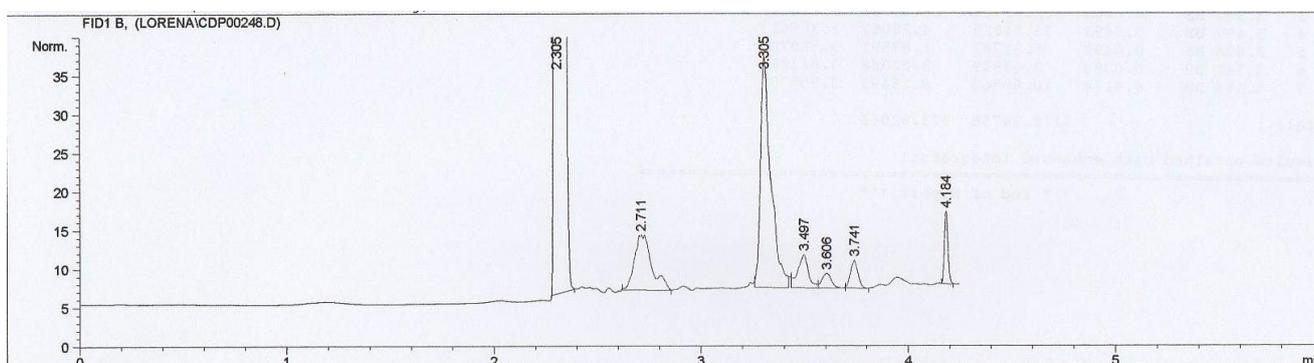


Figura 41: Cromatograma mezcla café + THC

Como se puede observar en cada uno de los cromatogramas, al compararlos con los obtenidos para las infusiones sin adición de THC (anexos, **Figuras 74 a 77**), se produce una adecuada separación del pico correspondiente al cannabinoide con respecto a otros componentes presentes en las infusiones, lo que permitiría la determinación del THC en dichas muestras.

7. CONCLUSIONES

- 1) Se ha puesto a punto un método para la determinación de THC por HPLC, obteniéndose una buena respuesta a un tiempo de análisis de 6 minutos con LOD = 0.24 ppm; LOQ = 0.72 ppm. Las condiciones de medida fueron: fase móvil: 60% metanol, 30% acetonitrilo y 10% agua; longitud de onda 210 nm; flujo 1mL/min y volumen de inyección 5 µL.
- 2) Se ha puesto a punto un método para determinar THC mediante GC, las condiciones propuestas 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 THC se determina a un tiempo de retención de 3 minutos con LOD = 7.6 ppm; LOQ = 22.7 ppm.
- 3) Se realiza un estudio para la determinación de THC en cogollos y resina de cannabis utilizando etanol como extractante, comprobándose la viabilidad de los dos métodos cromatográficos estudiados, HPLC y GC, para la determinación de THC en este tipo de muestras.
- 4) Se realiza un estudio para la determinación de THC en infusiones de mate, café, cacao y té, tratadas con dicho cannabinoide. Se comprueba la viabilidad de los dos métodos cromatográficos estudiados, HPLC y GC, para la determinación de THC en este tipo de muestras.

8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] UNODC. Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (2014).
- [2] UNODC. Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (2010): "Métodos recomendados para la identificación y el análisis del cannabis y los productos del cannabis", Nueva York.
- [3] Pertwee, R. G. (2006). «The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: An overview». *International Journal of Obesity* 30: S13-S18.
- [4] Brown, Hugh (1972). «Possible anticholinesterase-like effects of trans (-)Δ8 and -Δ9 tetrahydrocannabinol as observed in the general motor activity of mice». *Psychopharmacologia* 27 (2): 111-6
- [5] Eubanks, Lisa M.; Rogers, Claude J.; Beuscher, 4th; Koob, George F.; Olson, Arthur J.; Dickerson, Tobin J.; Janda, Kim D. (2006). «A Molecular Link Between the Active Component of Marijuana and Alzheimer's Disease Pathology»
- [6] Hazekamp, A. Cannabis; extracting the medicine. PhD thesis, Universiteit Leiden, 2007.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] Omar, J., Olivares, M., Alzaga, M., Etxebarria, N. Optimisation and characterisation of marihuana extracts obtained by supercritical fluid extraction and focused ultrasound extraction and retention time locking GC-MS. *J. Sep. Sci.* 2013, 36(8), 1397-1404.

- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] Sánchez-Carnerero Callado, C., Núñez-Sánchez, N., Casano, S., Ferreiro-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.

Páginas Web

- 1) Kalapa Clinic: <https://www.kalapa-clinic.com>
- 2) Cibdol: <https://www.cibdol.es/>

9. ANEXOS

9.1. Cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC)

9.1.1. Estudio de la fase móvil y calibrado

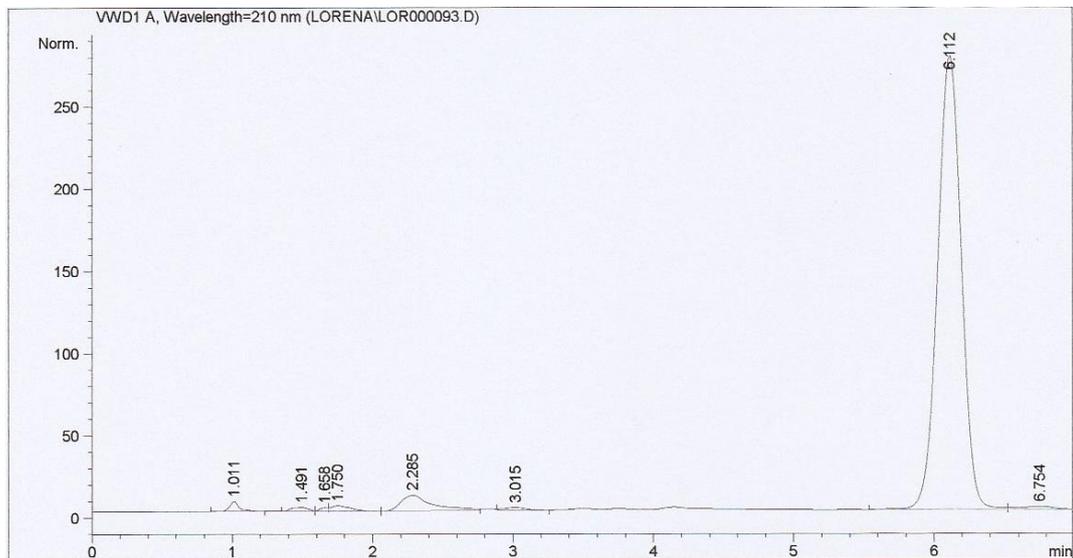


Figura 42: Cromatograma patrón THC 25 ppm (60:30:10)

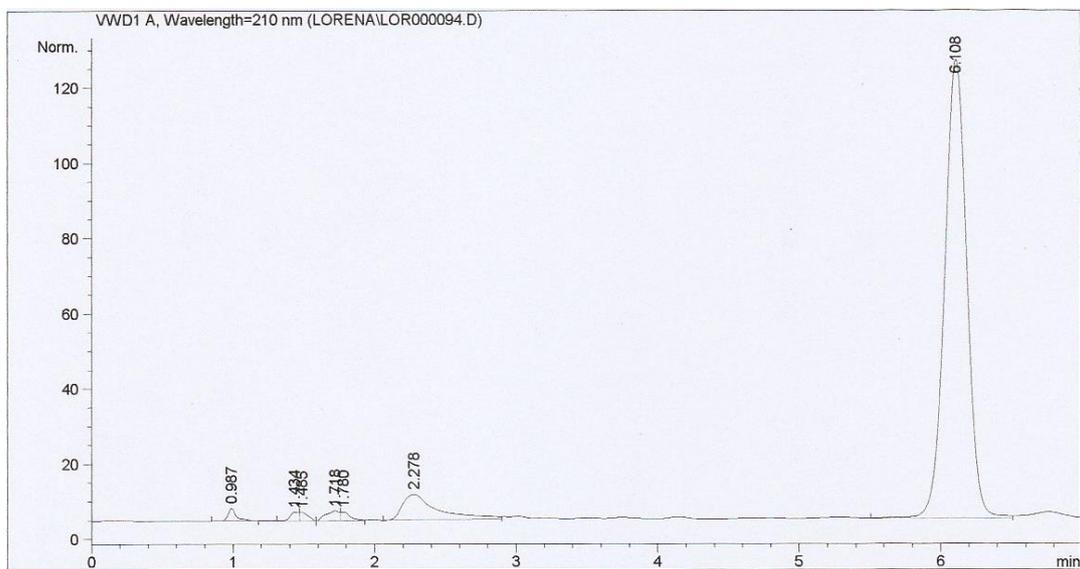


Figura 43: Cromatograma patrón THC 12,5 ppm (60:30:10)

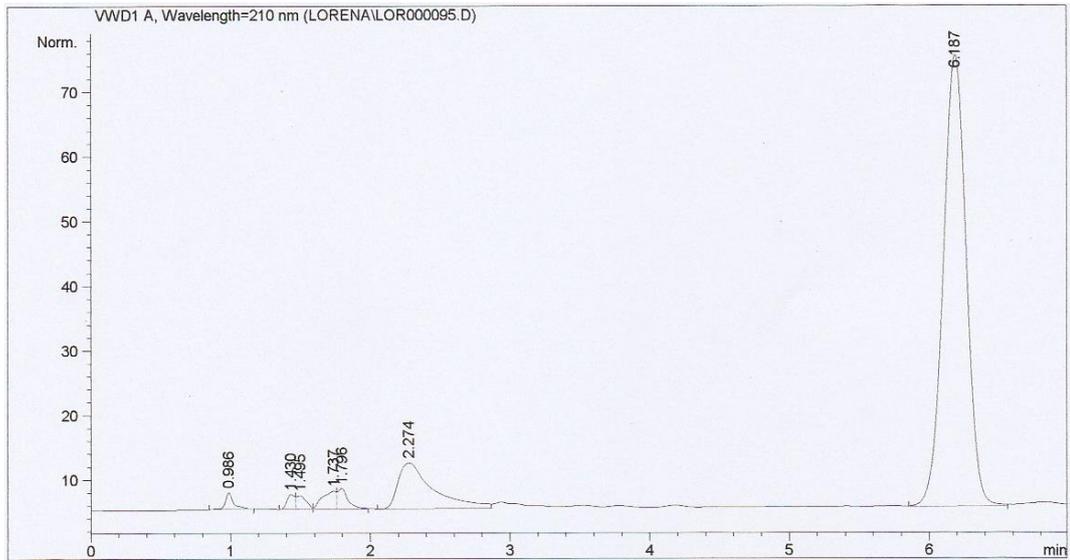


Figura 44: Cromatograma patrón THC 6,2 ppm (60:30:10)

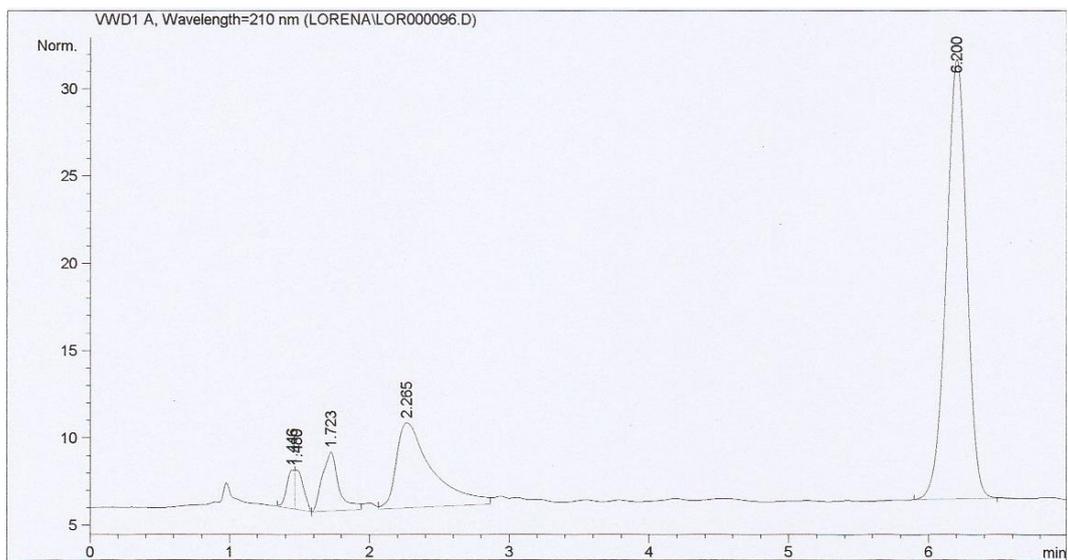


Figura 45: Cromatograma patrón THC 3,1 ppm (60:30:10)

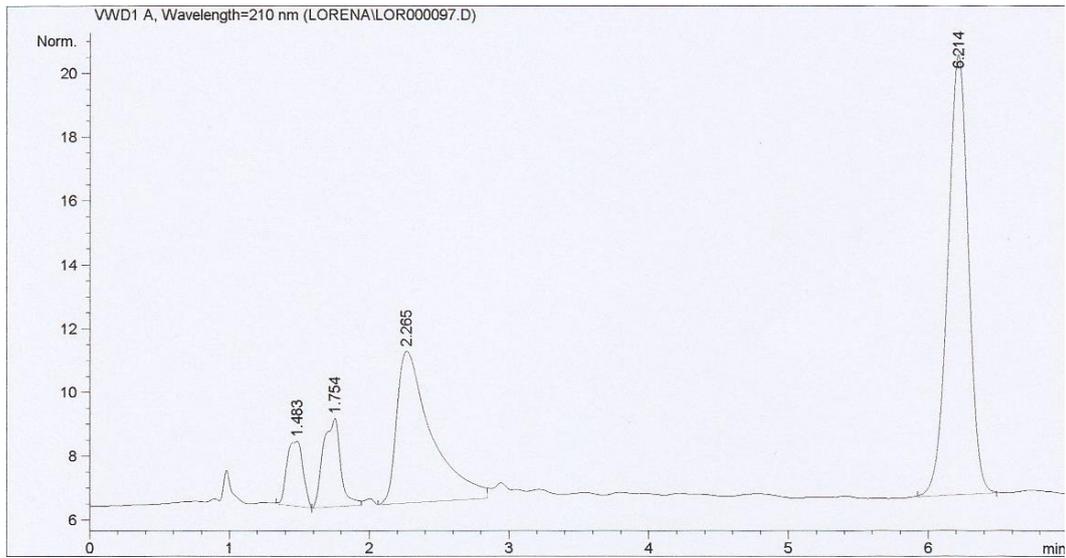


Figura 46: Cromatograma patrón THC 1,6 ppm (60:30:10)

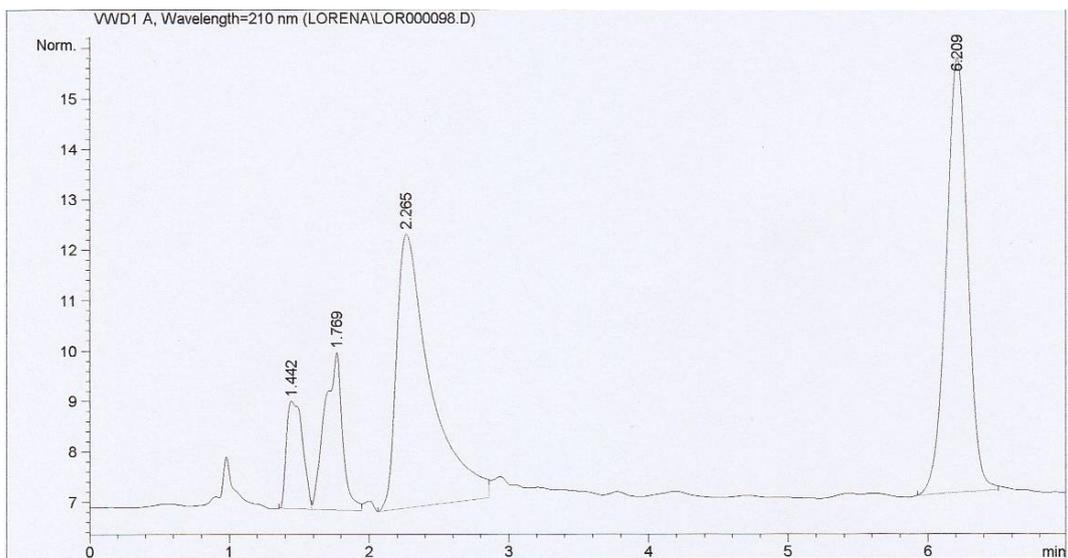


Figura 47: Cromatograma patrón THC 0,8 ppm (60:30:10)

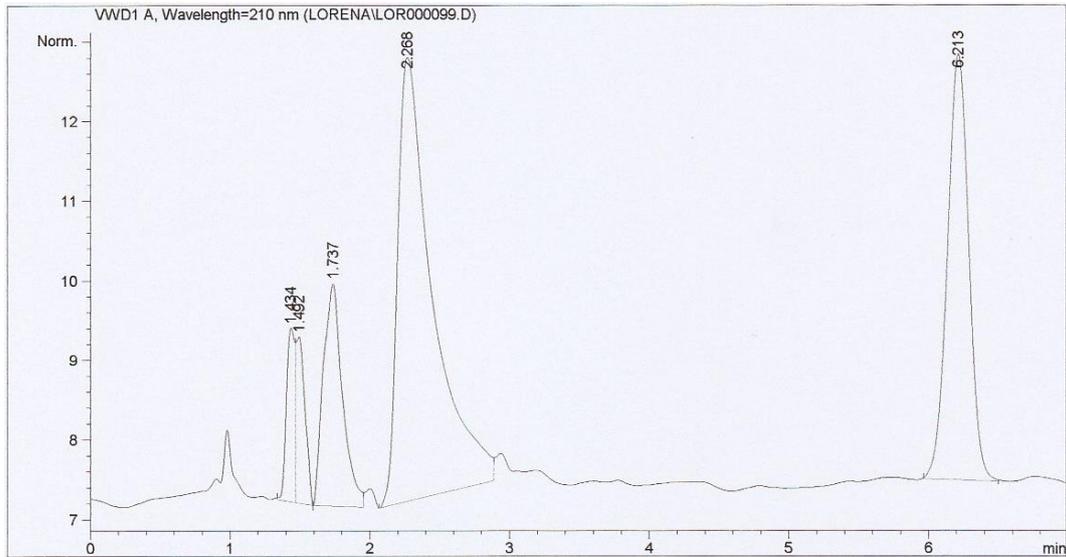


Figura 48: Cromatograma patrón THC 0,4 ppm (60:30:10)

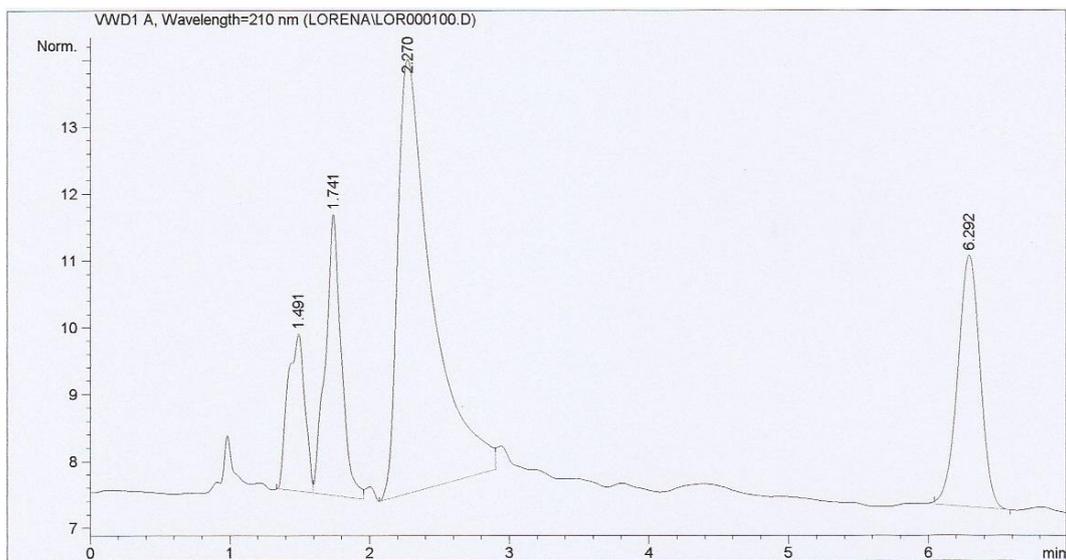


Figura 49: Cromatograma patrón THC 0,2 ppm (60:30:10)

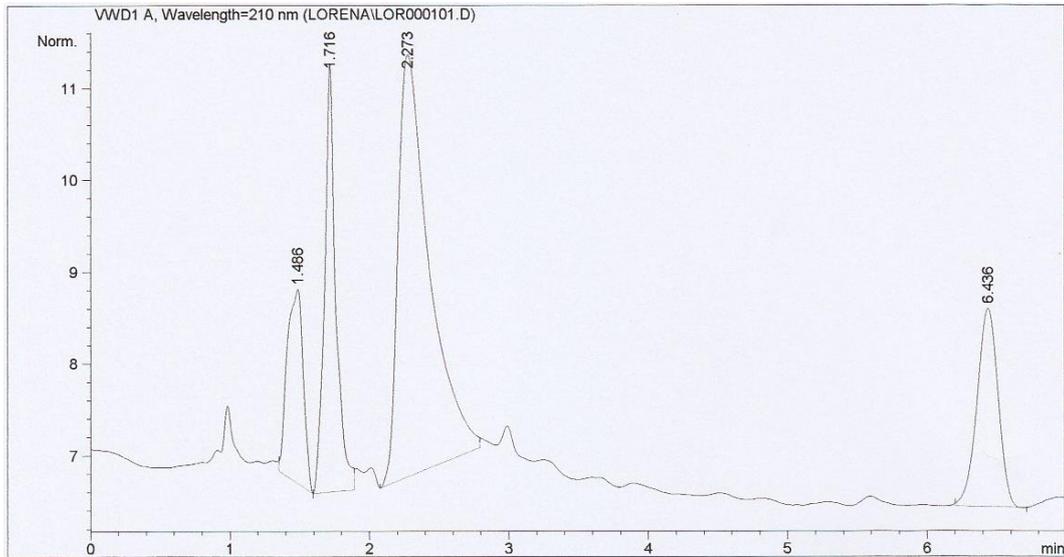


Figura 50: Cromatograma patrón THC 0,1 ppm (60:30:10)

9.1.2. Determinaciones conjuntas

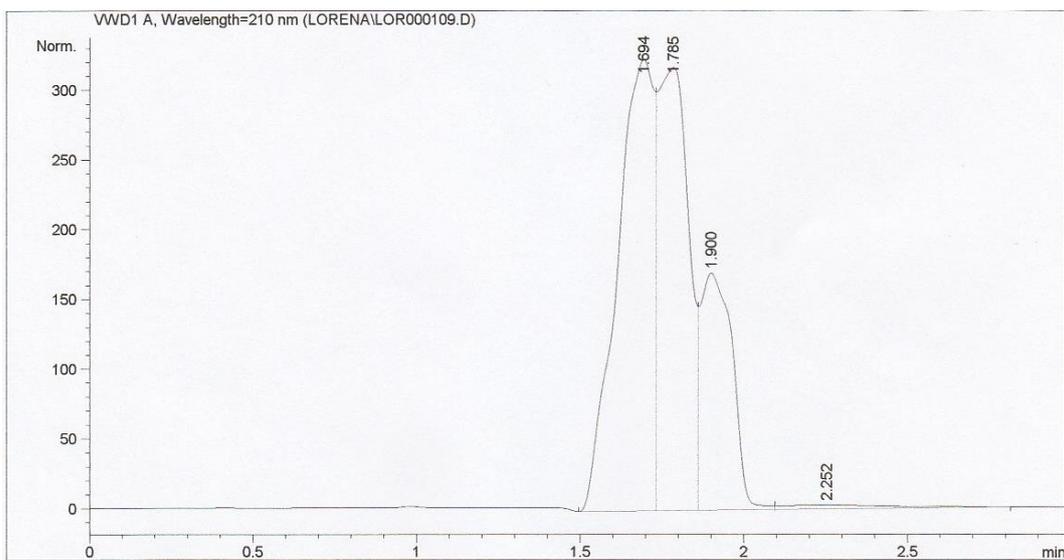


Figura 51: Cromatograma cafeína del orden de 100 ppm (60:30:10)

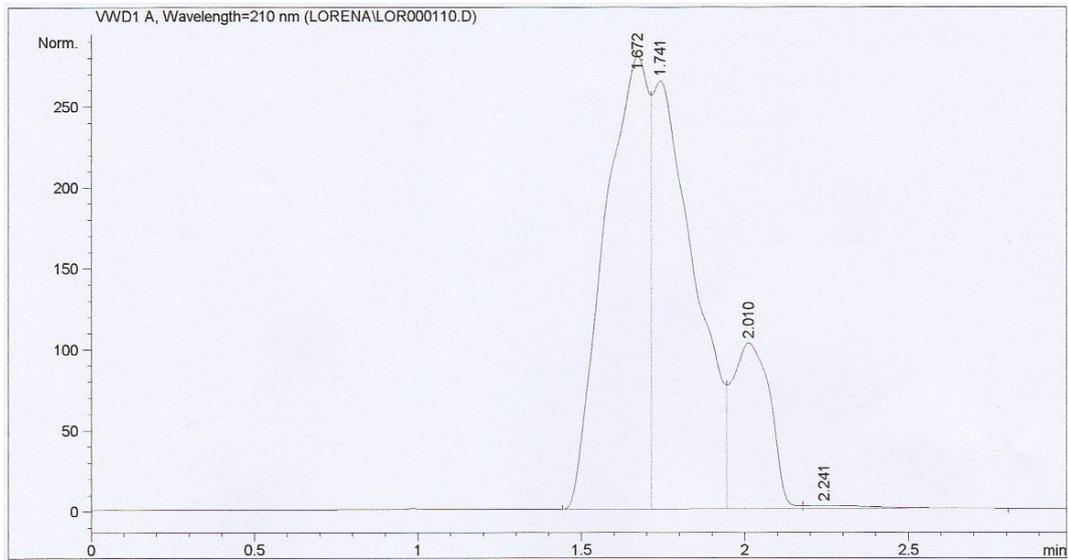


Figura 52: Cromatograma teobromina del orden de 100 ppm (60:30:10)

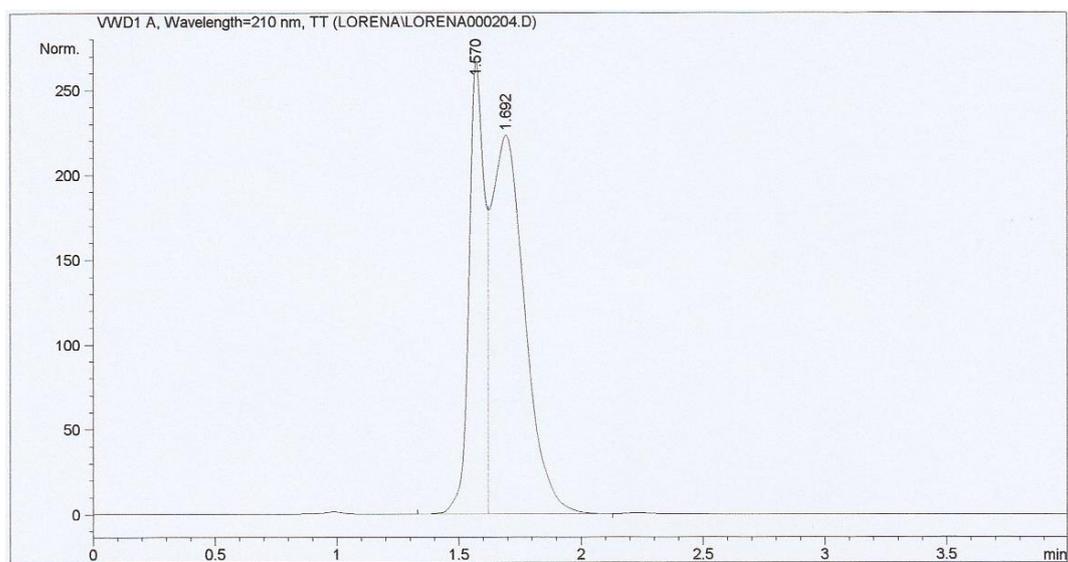


Figura 53: Cromatograma teofilina del orden de 100 ppm (60:30:10)

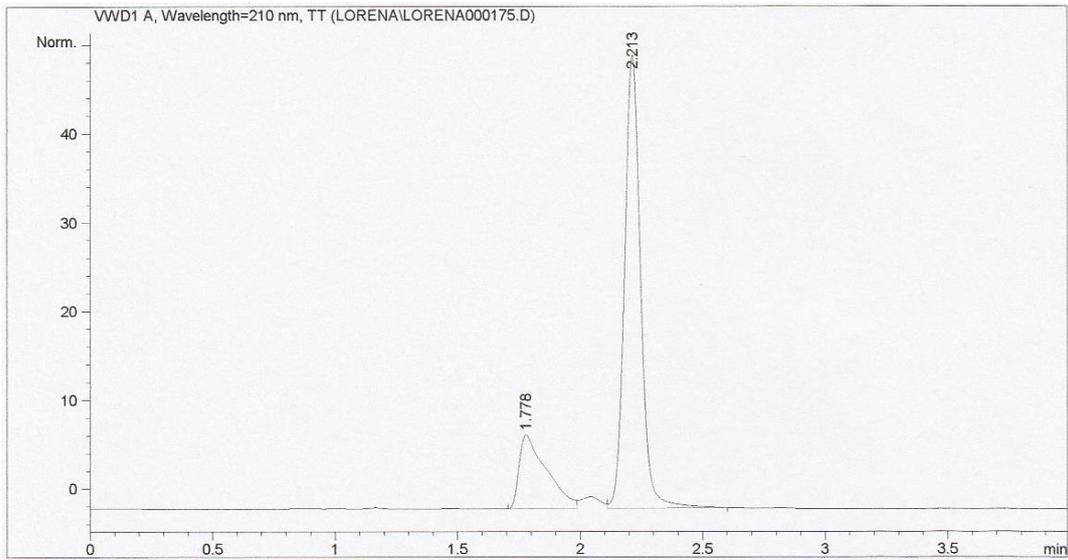


Figura 54: Cromatograma teobromina del orden de 25 ppm (86:14)

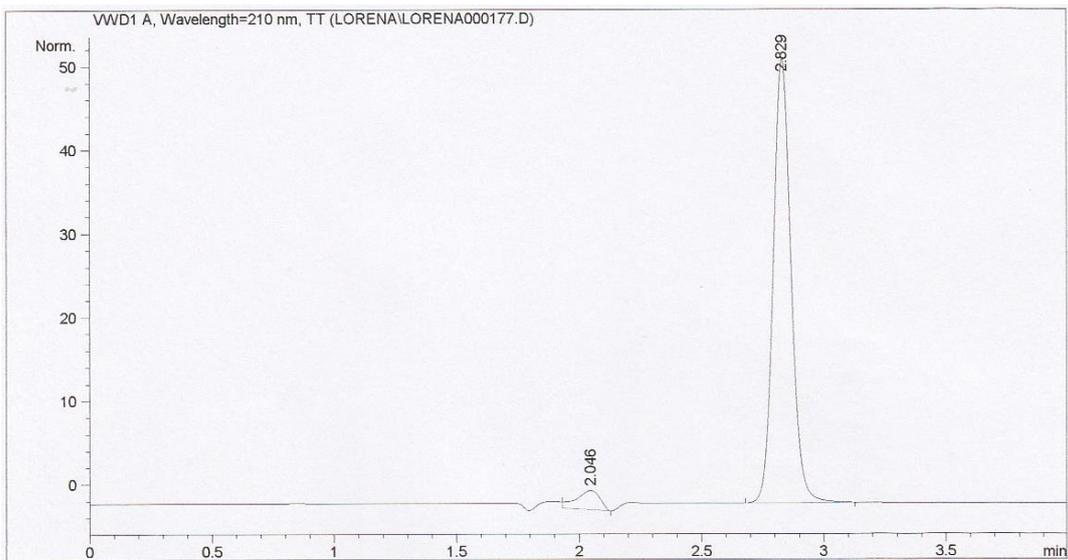


Figura 55: Cromatograma teofilina del orden de 34 ppm (86:14)

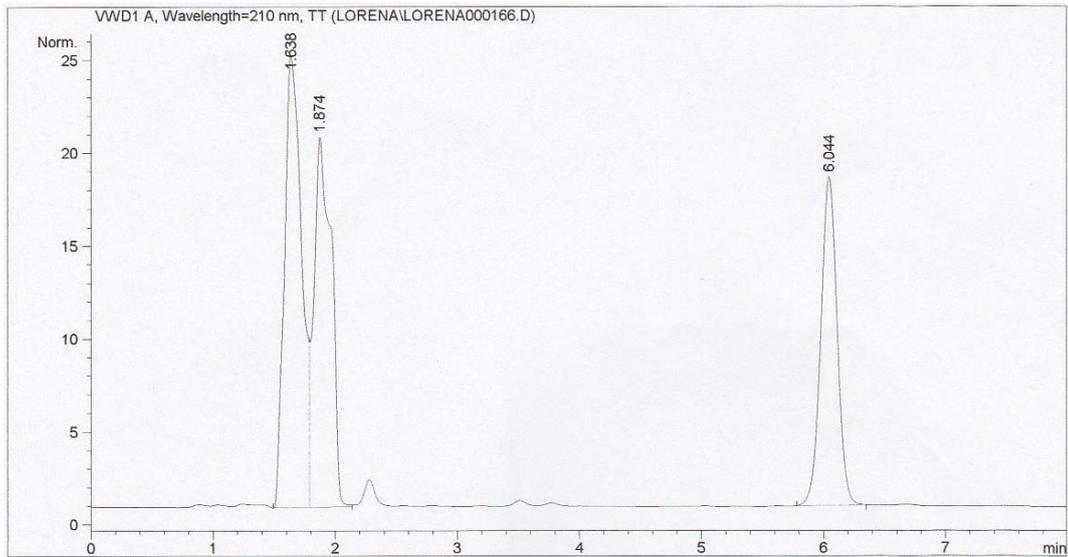


Figura 56: Cromatograma mezcla de cafeína y THC (60:30:10)

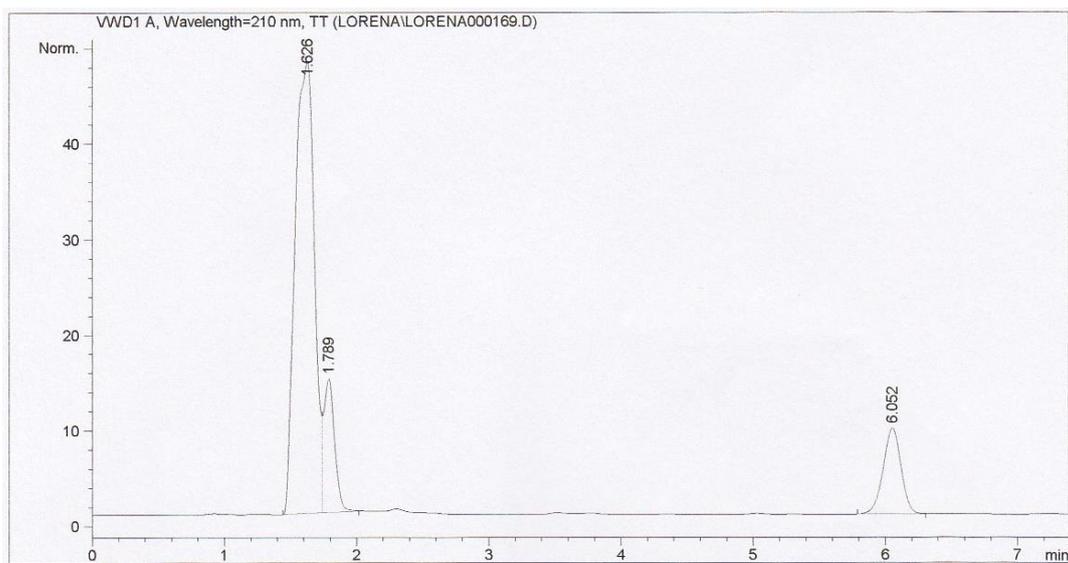


Figura 57: Cromatograma mezcla de cafeína, teobromina y THC (60:30:10)

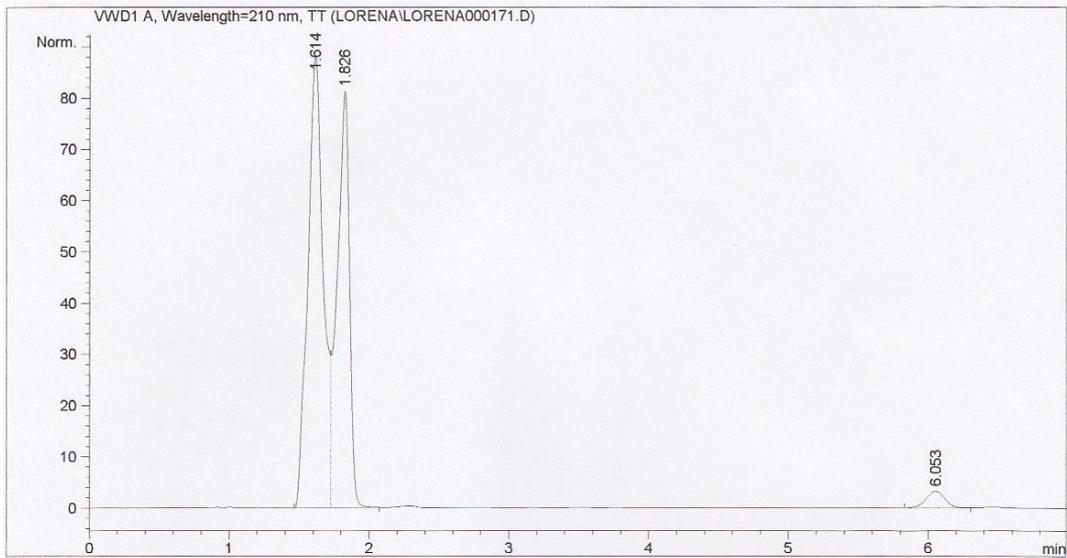


Figura 58: Cromatograma mezcla de cafeína, teofilina y THC (60:30:10)

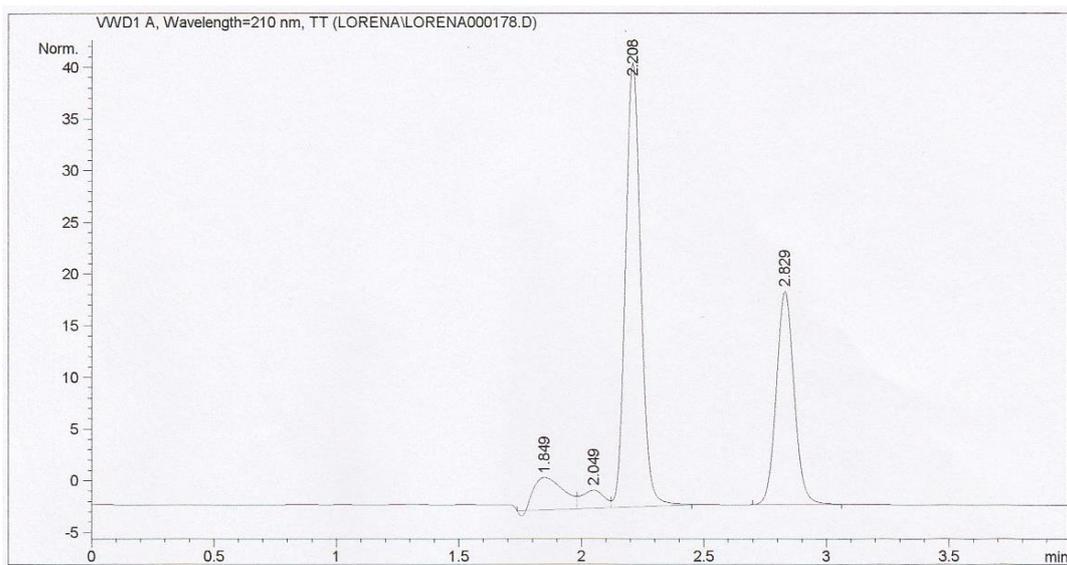


Figura 59: Cromatograma mezcla de teobromina y teofilina (86:14)

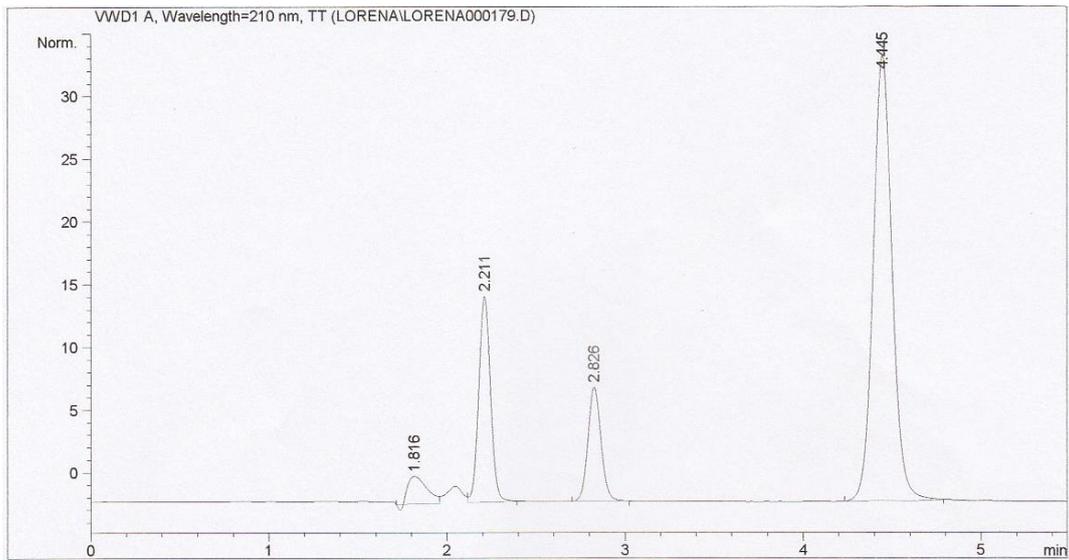


Figura 60: Cromatograma mezcla de cafeína, teobromina y teofilina (86:14)

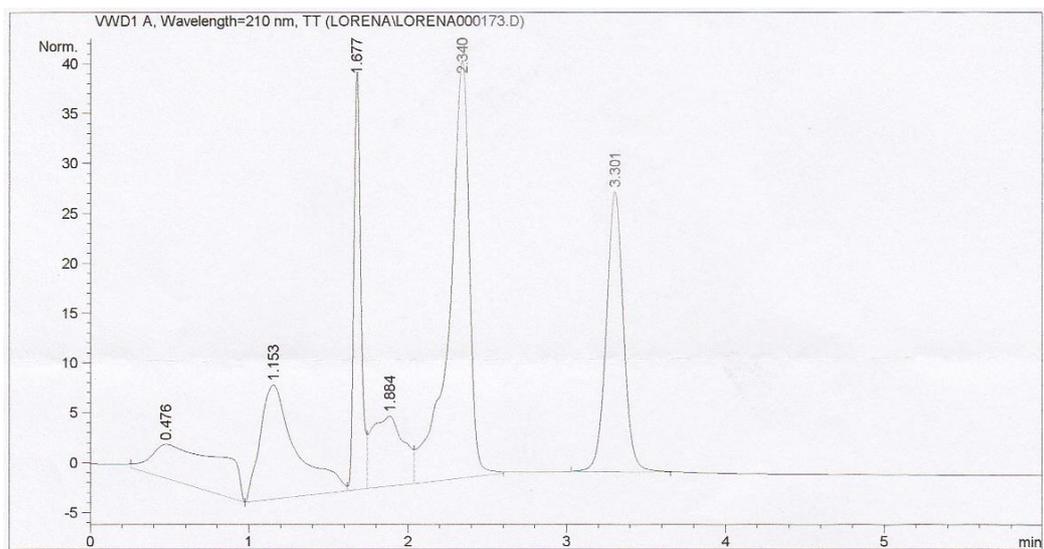


Figura 61: Cromatograma mezcla cafeína, teobromina, teofilina y THC (86:14)

9.1.3. Determinación y extracciones de THC en plantas y resina de cannabis

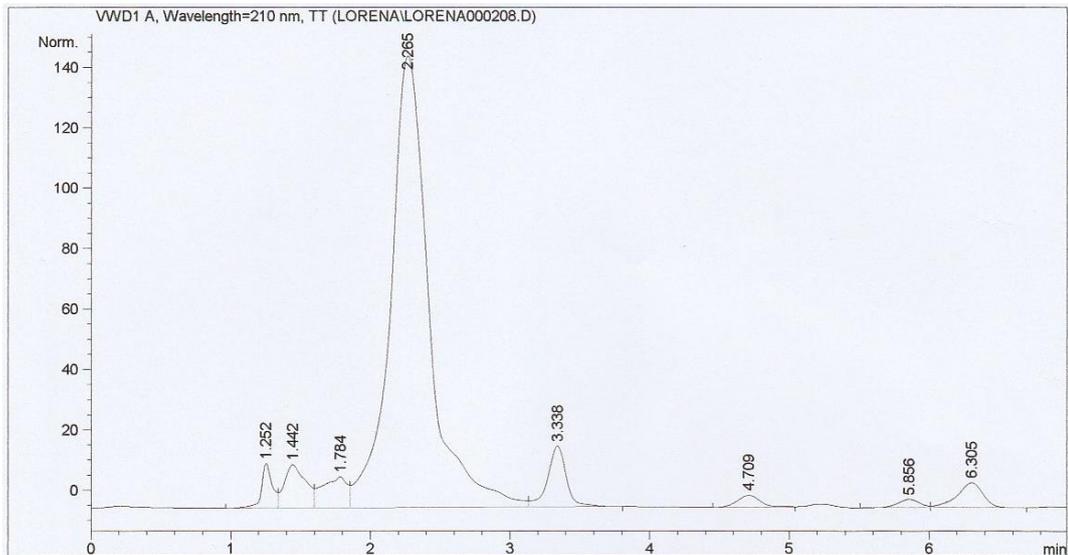


Figura 62: Cromatograma extracción en el cogollo Soxhlet diluido

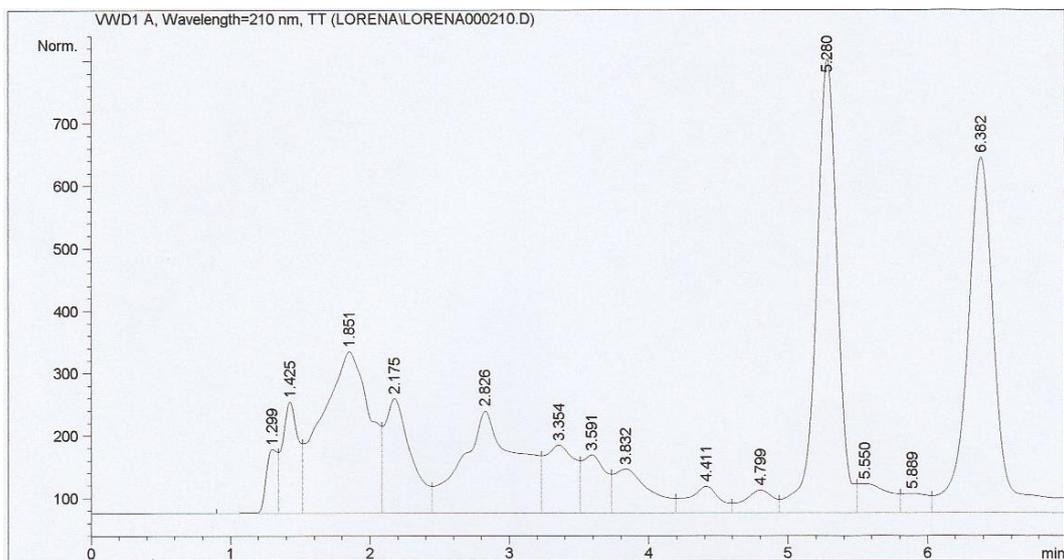


Figura 63: Cromatograma extracción en la resina Soxhlet diluido

9.1.4. Estudio para la determinación de THC en infusiones de mate, café, cacao y té

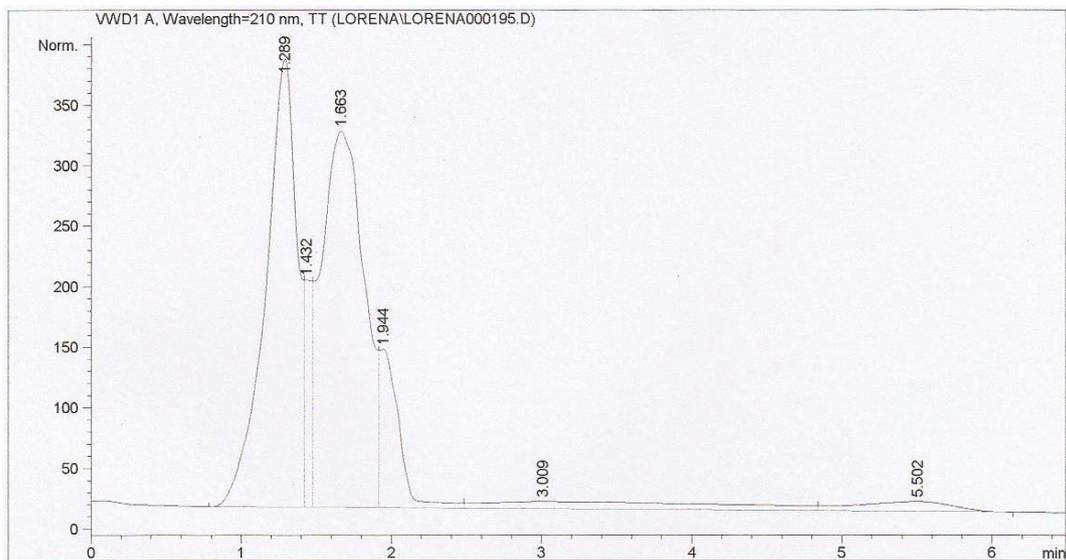


Figura 64: Cromatograma infusión de mate

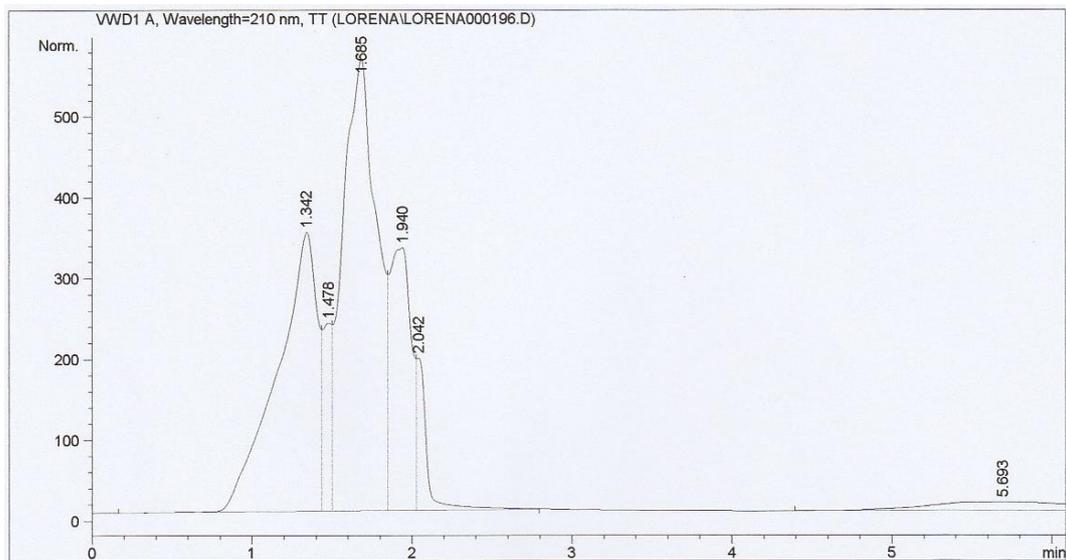


Figura 65: Cromatograma infusión de café

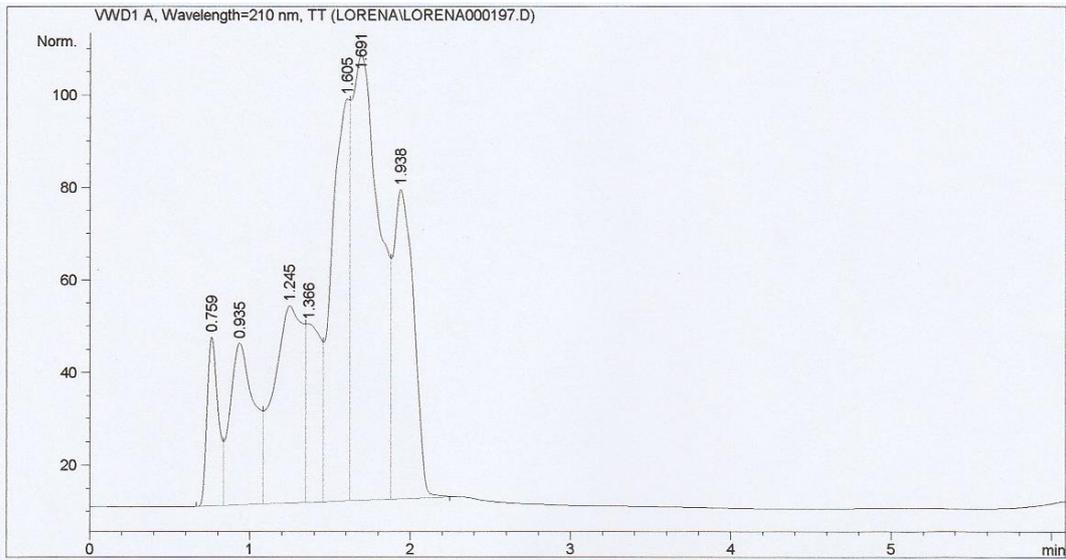


Figura 66: Cromatograma infusión de cacao

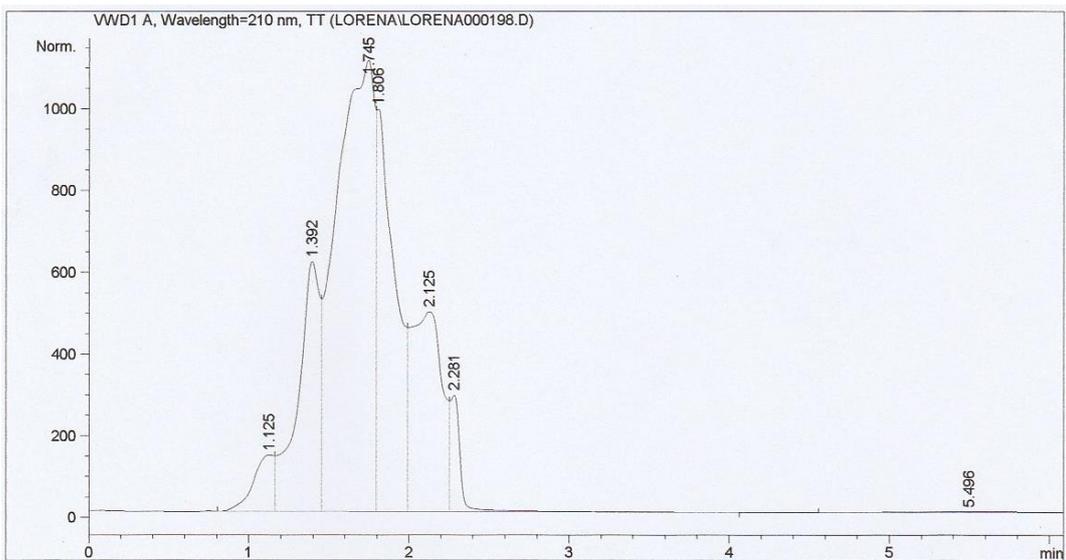


Figura 67: Cromatograma infusión de té

9.2. Cromatografía de gases (GC-FID)

9.2.1. Calibrado

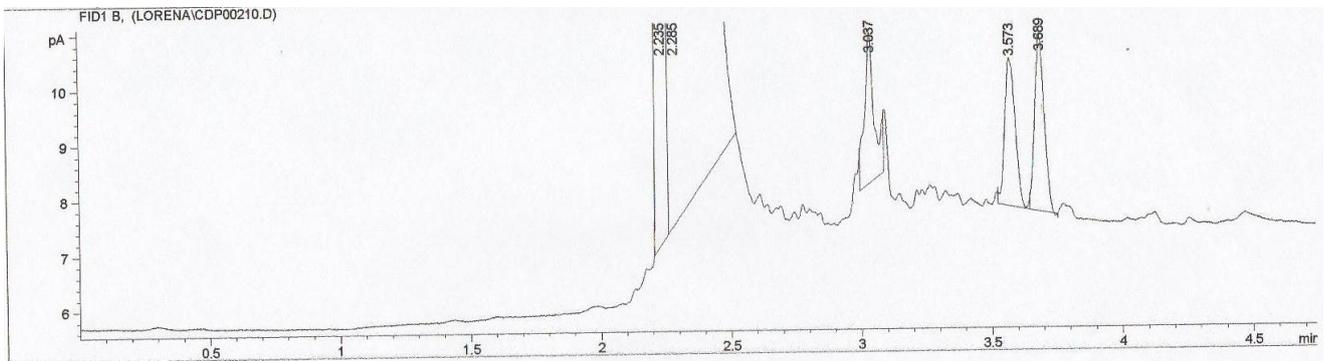


Figura 68: Cromatograma patrón THC 3,1 ppm

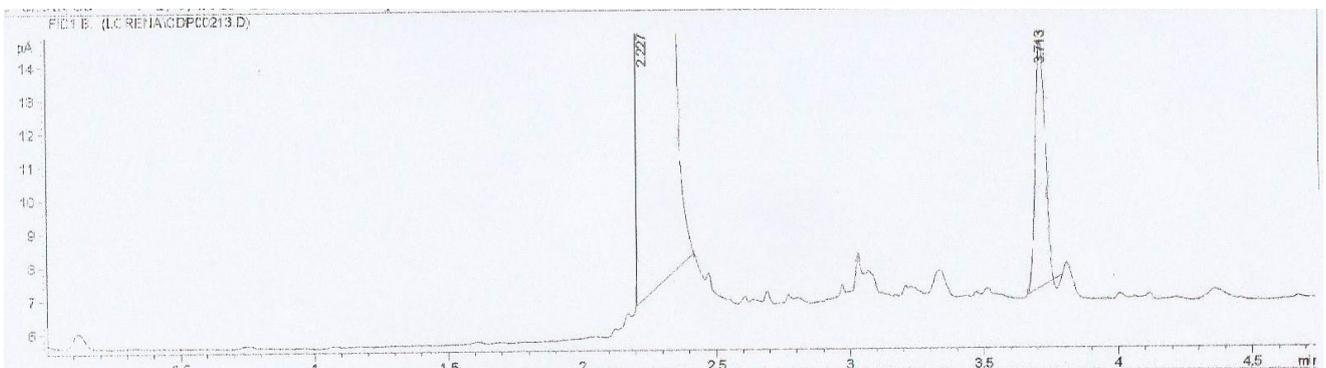


Figura 69: Cromatograma patrón THC 6,25 ppm

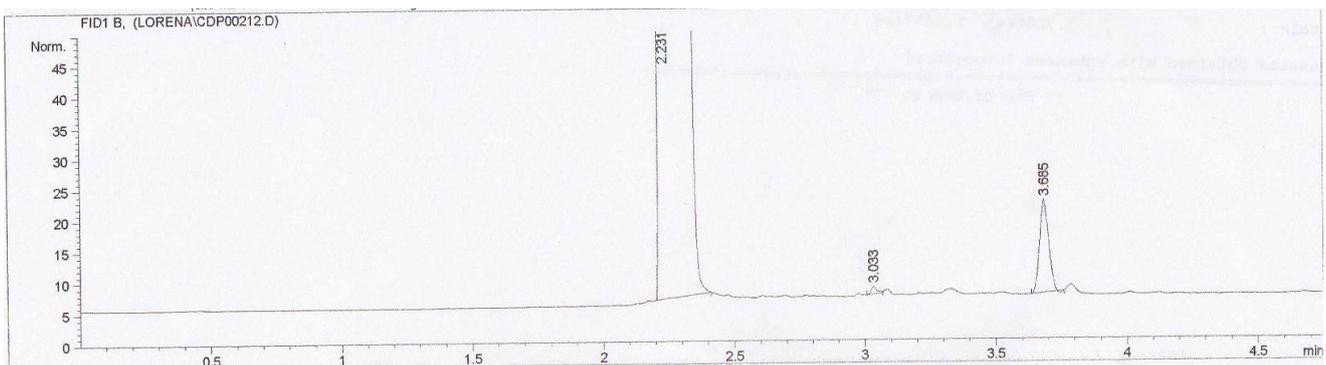


Figura 70: Cromatograma patrón THC 12,5 ppm

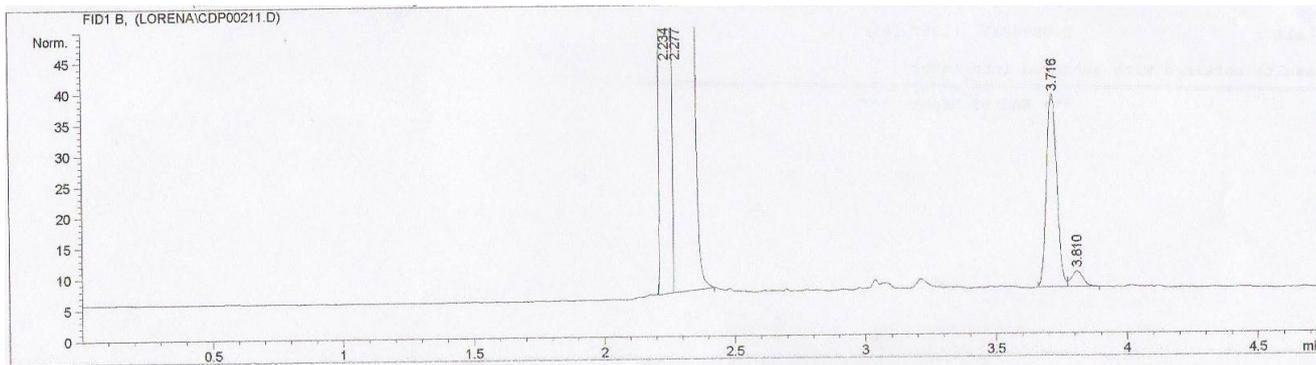


Figura 71: Cromatograma patrón THC 25 ppm

9.2.2. Determinación y extracciones de THC en plantas y resina de cannabis

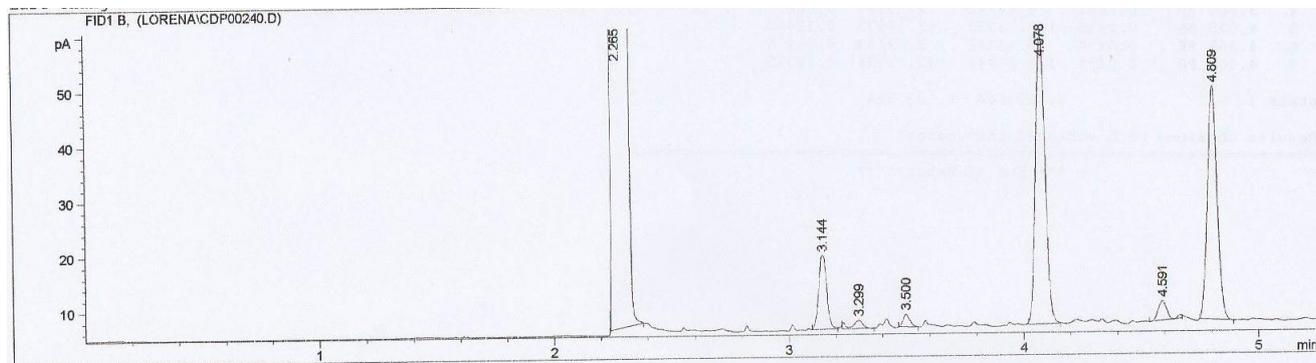


Figura 72: Cromatograma extracción en el cogollo Soxhlet diluido

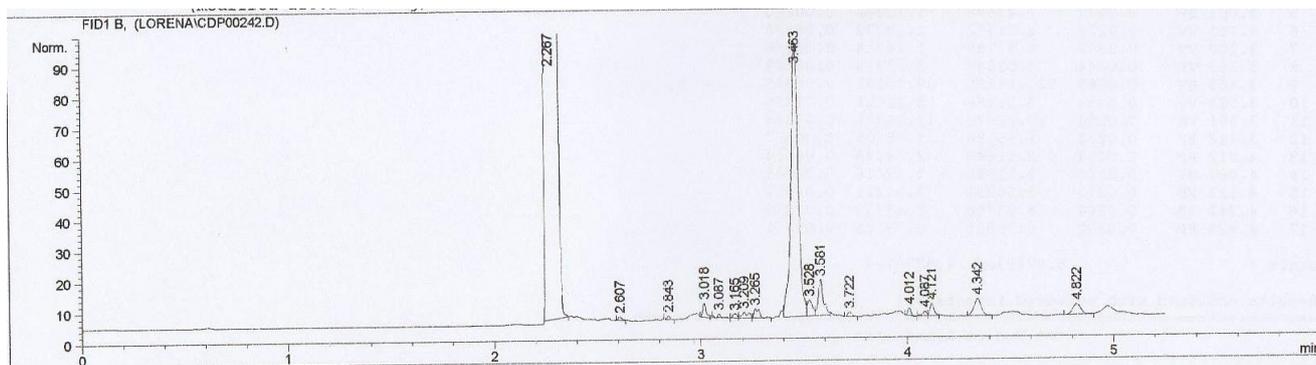


Figura 73: Cromatograma extracción en la resina Soxhlet diluido

9.2.3. Estudio para la determinación de THC en infusiones de mate, café, cacao y té

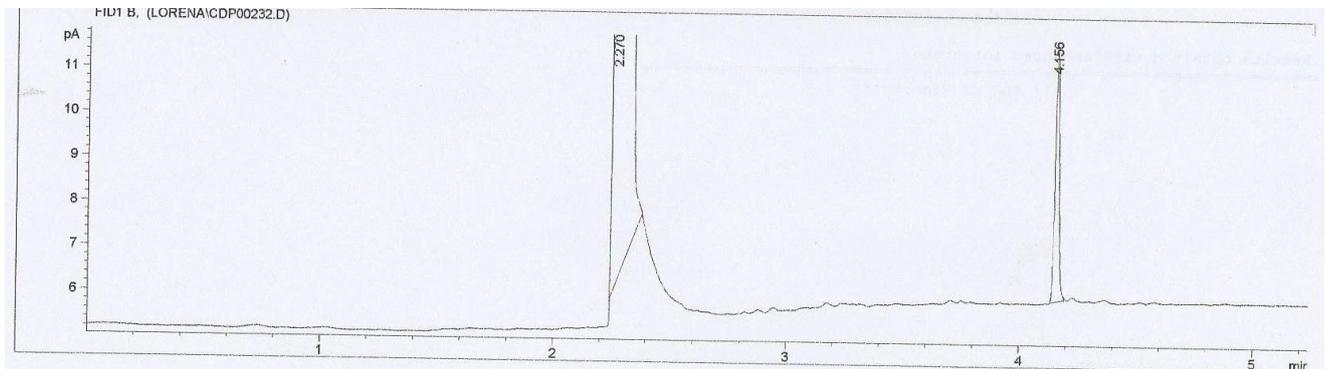


Figura 74: Infusión de mate

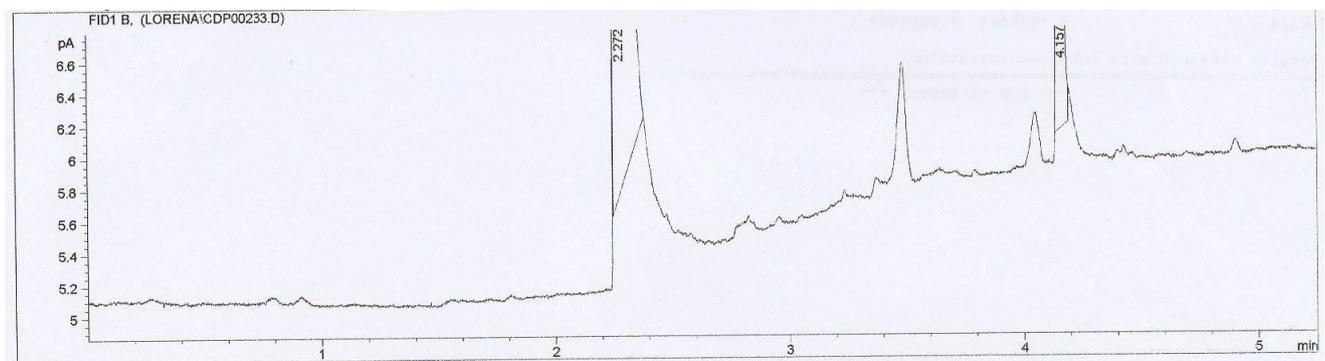


Figura 75: Infusión de café

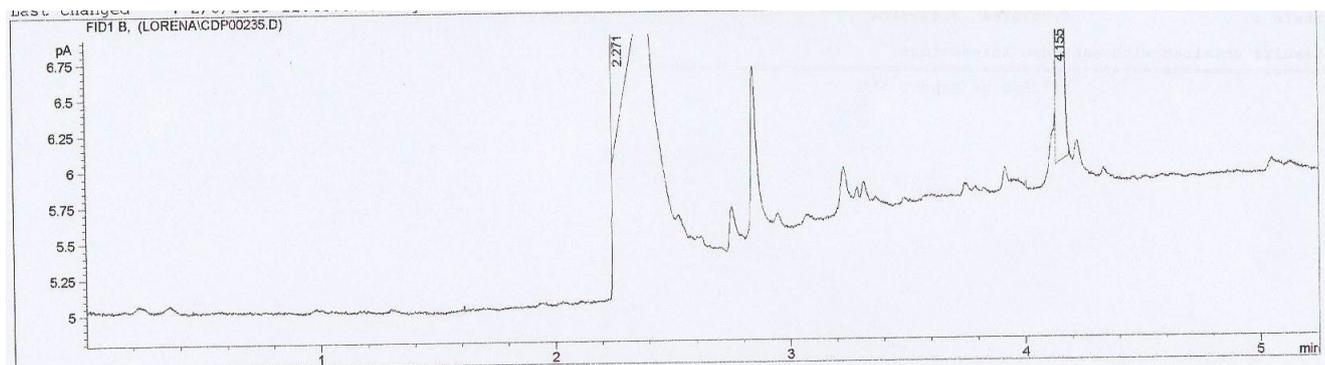
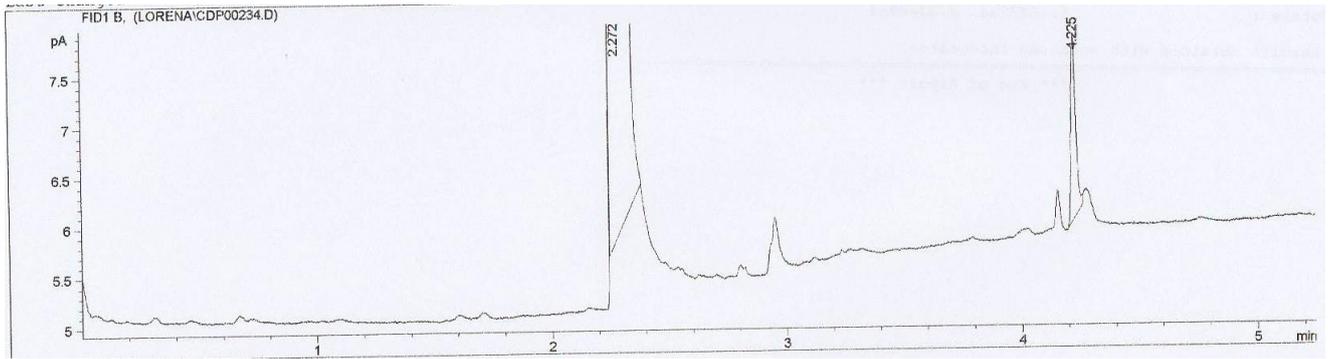


Figura 76: Infusión de té



77: Infusión de cacao