

**DETERMINACIÓN Y COMPARACIÓN CUALITATIVA DE
CANNABINOIDES PRESENTES EN MUESTRAS DE *Cannabis sativa*
OBTENIDOS DE PRODUCTOS COMERCIALES DEL DEPARTAMENTO DEL
CAUCA**



JOHNNATAN MAURICIO GIRALDO RUALES

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2018**

**DETERMINACIÓN Y COMPARACIÓN CUALITATIVA DE
CANNABINOIDES PRESENTES EN MUESTRAS DE *Cannabis sativa*
OBTENIDOS DE PRODUCTOS COMERCIALES DEL DEPARTAMENTO DEL
CAUCA**

**Trabajo de Grado
Para Optar el Título de Químico**

JOHNNATAN MAURICIO GIRALDO RUALES

DIRECTOR

RICARDO BENITEZ BENITEZ, Ph.D.

ASESORES

PAOLA ANDREA ARANGO ROMERO, M.Sc

RODRIGO ANDRES SARRIA VILLA, Ph.D.

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN**

2018

Nota de Aceptación

Director _____

RICARDO BENITEZ BENITEZ, Ph.D.

Jurado _____

Jurado _____

Popayán, 2018

DEDICATORIA

Esta tesis la dedico primeramente a mi padre celestial por su presencia y apoyo durante este largo, pero placentero camino, por proveerme de la sabiduría y voluntad necesaria para superar todas las adversidades, porque sé que sin su ayuda no hubiese sido posible llegar a este punto, por protegerme y darme su eterna bendición “bendito seas mi Dios”.

A mis padres Luis Eduardo Giraldo Castaño, mi viejo adorado, esta meta es dedicada a ti, sé que en el reino celestial estás orgulloso de este logro en mi vida profesional, sé que seremos felices en la eternidad. A mi madre Francelina Ruales de Giraldo por su fe inquebrantable y por sus oraciones que siempre me dieron ánimo para continuar y levantarme, como tú dices “algún día” pues es ahora el día.

*“ ¡Cuanto mejor es adquirir sabiduría que oro, y el buen juicio que la plata!
“. Proverbios 16, 16.*

AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a Dios y el privilegio que me ha dado de vivir y emprender este rumbo y culminarlo de la mejor manera.

A mis padres, hermanos familiares y amigos que he tenido el placer de encontrarme en este camino, a la familia Vidal – Ruales por su constante apoyo y todas aquellas personas que han contribuido en mi vida personal y profesional.

A la Universidad del Cauca y al Departamento de Química, sus maestros que contribuyeron a mi formación, al profesor Ricardo Benítez por su apoyo académico y personal, por sus atenciones y su valiosa colaboración prestada para llegar a conseguir mis objetivos trazados.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág	
1	RESUMEN	1
2	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
3	OBJETIVOS	3
3.1	OBJETIVO GENERAL	3
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
4	FUNDAMENTO TEÓRICO	4
4.1	SISTEMA ENDOCANNABINOIDE	4
4.1.1	RECEPTOR CB ₁	5
4.1.2	RECEPTOR CB ₂	5
4.2	NORMATIVIDAD NACIONAL E INTERNACIONAL	6
4.3	COMPARACIÓN CUALITATIVA DE METABOLITOS CANNABINOIDES POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR) Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS (EM)	8
4.4	CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)	10
4.6	ESPECTROMETRÍA DE MASAS (EM)	11
4.6.1	FUENTE DE IONES	12
4.6.2	IONIZACIÓN POR ELECTROSPRAY	12
4.6.3	ESPECTROMETRÍA DE MASAS POR IONIZACIÓN QUÍMICA (EMIQ)	13
4.7	CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS CANNABINOIDES PRESENTES EN MUESTRAS DE <i>Cannabis sativa</i> POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN-ESPECTROMETRÍA DE MASAS	14
5	METODOLOGÍA	18
5.1	MUESTRAS <i>Cannabis sativa</i>	18
5.2	EQUIPOS E INSTRUMENTACIÓN	20
5.3	LIOFILIZACIÓN DE LAS FRACCIONES CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA	20
5.4	SOLVENTES Y REACTIVOS	20
5.5	LAVADO DE MATERIAL	20
5.6	PRUEBAS DE SOLUBILIDAD	21
5.7	PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	21
5.8	CONDICIONES PARA EL ANÁLISIS CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA	21
5.9	CONDICIONES PARA EL ANÁLISIS ESPECTROMETRÍA DE MASAS	21
5.10	RECOLECCIÓN DE FRACCIONES CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA	22
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
6.1	PATRONES DE FRAGMENTACIÓN (EM) DE COMPUESTOS CANNABINOIDES	43
7	CONCLUSIONES	55
8	BIBLIOGRAFÍA	57
9	ANEXOS	62

ÍNDICE DE TABLAS

		Pág
Tabla 1	Datos espectroscópicos y fragmentaciones de algunos compuestos cannabinoides.	15
Tabla 2	Literatura científica, aislamiento de fracciones de <i>Cannabis sativa</i> .	16,17
Tabla 3	Registro herbario, planta de la especie <i>Cannabis sativa</i> .	19
Tabla 4	Condiciones de trabajo para la detección de cannabinoides por cromatografía líquida de alta resolución.	30
Tabla 5	Resultados velocidad lineal promedio de migración de los solutos, factor de retención del analito, muestra D.	31
Tabla 6	Resultados factor de selectividad muestra D.	32
Tabla 7	Fracciones y tiempos de retención para la muestra D, <i>Cannabis sativa</i> .	33
Tabla 8	Resultados velocidad lineal promedio de migración de los solutos, factor de retención del analito muestra E.	47
Tabla 9	Resultados factor de selectividad muestra E..	47
Tabla 10	Fracciones y tiempos de retención para la muestra E <i>Cannabis sativa</i> .	48
Tabla 11	Cannabinoides presentes en las muestras D y E. "X" cannabinoide presente.	54

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág
Figura 1	Estructura de los receptores cannabinoides CB ₁ y CB ₂ . 5
Figura 2	Estructura química de los principales compuestos cannabinoides. 1 THC, 2 CBD, 3CBN, 4CBG 9
Figura 3	Componentes básicos de un cromatógrafo. 11
Figura 4	Esquema de ionización, ESI Electrospray. 13
Figura 5	Cultivos de <i>Cannabis Sativa</i> , Corinto Departamento del Cauca. 18
Figura 6	Clasificación herbaria, planta de la especie <i>Cannabis sativa</i> . 18
Figura 7	Muestras de <i>Cannabis sativa</i> utilizadas en el análisis. 19
Figura 8	Esquema de inyección de muestras, recolección de fracciones. 22
Figura 9	Evaluación del tiempo de análisis de las muestras comerciales. 23
Figura 10	Prueba de polaridad de fase móvil. Las muestras se inyectaron a una longitud de onda $\lambda = 220\text{nm}$, tiempo de análisis 15 minutos. 24
Figura 11	Cromatograma de muestras de <i>Cannabis sativa</i> después de la extracción: 1 CBD, 2 CBN, 3 THC, 4 IS. 25
Figura 12	Prueba de flujo de fase móvil muestra E (24.8 mg/100mL) 248ppm. 26
Figura 13	Prueba de longitud de onda. 27
Figura 14	Estructura química de los principales cannabinoides 1 Δ^9 THC, 2 CBD, 3 CBN. 28
Figura 15	Prueba de concentración de la muestra. 29
Figura 16	Cromatograma muestra D, 100 ppm, $\lambda = 220 \text{ nm}$, (fase móvil ACN/PO ₄ 65/35) flujo de fase móvil 1mL/min. 30
Figura 17	Fracción 1, espectro de masas muestras D, modo de ionización positivo. 33
Figura 18	Fracción 1, espectro de masas muestras D, modo de ionización negativo. 34
Figura 19	Fracción 5, espectro de masas muestras D, modo de ionización positivo. 34
Figura 20	Fracción 5, espectro de masas muestras D, modo de ionización negativo 35
Figura 21	Espectro de masas blanco ACN. 37
Figura 22	Espectro de masas muestras D Cannabis 10ppm. 37
Figura 23	Fracción 1, espectro de masas muestra D. 38
Figura 24	Fracción 2, espectro de masas muestra D. 39
Figura 25	Fracción 3, espectro de masas muestra D. 39
Figura 26	Fracción 4, espectro de masas muestra D. 40
Figura 27	Fracción 5, espectro de masas muestra D. 41
Figura 28	Fracción 6, espectro de masas muestra D. 42
Figura 29	Patrón de fragmentación 1-2 THC, 1-6 THC. 43
Figura 30	Patrón de fragmentación CBN. 44
Figura 31	Patrón de fragmentación CBD. 45
Figura 32	Cromatograma y fracciones recolectadas para el análisis por EM, muestra E (31.6 mg/10mL). 46
Figura 33	Espectro de masas blanco ACN. 48
Figura 34	Espectro de masas muestra E, <i>Cannabis sativa</i> . 49
Figura 35	Fracción 1 muestra E Cannabis. 50

Figura 36	Fraccion 2 muestra E Cannabis.	50
Figura 37	Fraccion 3 muestra E Cannabis.	51
Figura 38	Fraccion 4 muestra E Cannabis.	52
Figura 39	Fraccion 5 muestra E Cannabis.	53
Figura 40	Cromatograma patrón metilparabeno utilizado como control en la evaluación de la reproducibilidad de los datos.	62
Figura 41	Registro herbario, planta de la especie <i>Cannabis sativa</i> . Plantas de Colombia , Herbario (CUCV), Universidad del Valle.	63

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

- ACN. Acetonitrilo.
- ARNm. Ácido Ribonucleico Mensajero.
- CLAR. Cromatografía Líquida de Alta Resolución.
- CBD. Cannabidiol.
- CBG. Cannabigerol.
- CBN. Cannabinol.
- CBD-A. Ácido cannabidiólico.
- CBN-A. Ácido cannabinólico.
- EMIQ. Espectrometría de masas por ionización química.
- IQ. Ionización química.
- IS. Estándar interno.
- K'. Retención relativa.
- KHPO₄. Fosfato monoácido de potasio.
- EM. Espectrometría de Masas.
- PSI. Libra de fuerza por pulgada cuadrada
- SNC. Sistema nervioso central.
- SEIC. Sociedad Española de Investigación sobre Cannabinoides.
- THC-A. Ácido tetra hidro cannabinólico.
- t_r. Tiempo de retención.
- t_m. Tiempo muerto.
- α. Factor de selectividad.
- Δ⁹ THC. Delta 9 Tetrahidrocannabinol.
- v. Velocidad lineal de migración de soluto.

1 RESUMEN

Cannabis sativa en la actualidad ha experimentado un creciente interés por el estudio de sus componentes ya que se le atribuye propiedades terapéuticas en el tratamiento de diferentes enfermedades.

En Colombia y específicamente en el Departamento del Cauca se comercializan productos de Cannabis tanto para fines no medicinales como terapéuticos. En consecuencia, es necesario el análisis de estos productos de manera que se pueda conocer la composición de los mismos y el posible efecto que pueda tener sobre la salud.

El análisis de los componentes de estos productos se lleva a cabo mediante la implementación de técnicas analíticas como cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) y espectrometría de masas (EM), de tal manera que permiten la identificación de las principales especies cannabinoides; Δ^9 tetrahidrocannabinol (THC), cannabidiol (CBD), cannabinol (CBN), cannabigerol (CBG), la separación de los analitos se lleva a cabo mediante la implementación de una columna analítica C₁₈ de fase reversa, elución isocrática 1mL/min, presión del sistema 800 PSI, la fase móvil consiste en una mezcla de acetonitrilo ACN y buffer fosfato (KHPO₄) en relación 65/35, el volumen de inyección de la muestra de 10 μ L, para un tiempo de análisis de 15min, la detección se realiza a una longitud de onda (λ =220nm).

Con base en los cromatogramas obtenidos para las muestras y de acuerdo a las señales para los picos más importantes se asignan intervalos de tiempos de retención para la recolección de las fracciones, donde para la muestra D se recolectaron 6 fracciones y para la muestras E 5 fracciones respectivamente. Posterior a este proceso, dichas fracciones son concentradas mediante la técnica de liofilización, con el fin de evitar la degradabilidad térmica de los componentes cannabinoides para el análisis por espectrometría de masas. Se toman cada una de las fracciones liofilizadas y son diluidas en la fase móvil, adicionando 5 μ L de ácido fórmico como agente ionizante. Se obtienen los espectros de masas para cada una de las fracciones, mostrando los picos y fragmentos correspondientes a las moléculas de THC, CBD y CBN, permitiendo de esta manera establecer la presencia de estos compuestos en las muestras analizadas.

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La planta del género *Cannabis* es utilizada mayoritariamente como droga de consumo por su efecto psicotrópico. Sin embargo, el estudio de los componentes de esta planta ha revelado que no solo presenta este efecto, sino también efecto terapéutico; lo cual ha llamado la atención de la comunidad científica no solo a nivel internacional sino también nacional. De acuerdo a los reportes de diferentes autores se han encontrado alrededor de 500 compuestos orgánicos pertenecientes a la especie *Cannabis sativa*. Los compuestos de mayor importancia son los Cannabinoides terpenofenólicos, los cuales hacen parte de la secreción resinosa producida por los tricomas de la inflorescencia femenina de la planta. De los metabolitos anteriores han sido aislados alrededor de 70 compuestos (ElSohly & Slade, 2005) siendo el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) el que presenta mayor efecto alucinógeno, pero también se le ha asociado acción terapéutica sobre algunas enfermedades.

La comercialización de productos farmacéuticos a base de marihuana ha experimentado un aumento significativo en los últimos años debido a las propiedades terapéuticas que presentan estas biomoléculas en diferentes enfermedades tales como: tratamiento del dolor, epilepsia, trastornos alimentarios y glaucoma; debido a esto la industria farmacéutica mundial ha realizado numerosos estudios para el desarrollo de fármacos a base de Cannabis. Canadá, Holanda y otros países europeos aprobaron la distribución de medicamentos (Sativex, Dronabinol) en el tratamiento de enfermedades crónicas como esclerosis múltiple y cáncer. En Colombia mediante decreto emitido por la presidencia de la república y el Ministerio de Salud y Protección Social (decreto número 613 del 10 de abril de 2017) estipula el cultivo, uso, comercialización exportación e importación de productos de Cannabis con fines médicos y científicos.

En el Departamento del Cauca es muy conocido el cultivo de la especie de *Cannabis sativa* específicamente en los municipios de Corinto, Caloto, Toribio y Jambaló. Esta especie ha mostrado mayor propiedad terapéutica, debido a esto asociaciones indígenas y también vendedores locales comercializan diversos preparados y extractos a base de *Cannabis*. Sin embargo, estos son distribuidos en diferentes presentaciones las cuales no cumplen con los requisitos estipulados por la legislación colombiana para la producción y fabricación de productos de *Cannabis* de acuerdo con la resolución 1216 de 2016, la cual en el artículo 28 establece que estos deben contar con análisis de (THC), (CBN), y (CBD).

Por lo anterior se ve reducida la fiabilidad sobre el consumo de estos medicamentos al no ser claro su contenido y el posible efecto que puedan tener sobre las patologías para las cuales son formulados. Es por ello que se propone la determinación de dichos componentes mediante técnicas como cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) y espectrometría de masas (EM) con el fin de elucidar e identificar los diferentes compuestos cannabinoides presentes, lo cual permitirá establecer criterios confiables sobre el uso de estos productos. Además, hasta la fecha no hay reportes sobre este tipo de análisis en el Departamento del Cauca, lo cual servirá como base para posteriores estudios que potencializaran la investigación sobre las propiedades de *Cannabis sativa* que se produce en la región.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

- ✓ Determinar los metabolitos Cannabinoides presentes en extractos utilizados actualmente en la obtención de productos comerciales de *Cannabis sativa* en el Departamento del Cauca.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Identificar los metabolitos cannabinoides presentes en extractos de *Cannabis sativa* mediante cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) acoplado a espectrometría de masas (EM).
- ✓ Comparar los resultados cromatográficos y espectroscópicos obtenidos de las muestras, con los reportados en la literatura.
- ✓ Comprobar la presencia de los cannabinoides asociados a efectos terapéuticos (THC, CBD, CBG) en las muestras comerciales y relacionar con base en reportes existentes su posible uso en el tratamiento de enfermedades que son indicadas por el fabricante.

4 FUNDAMENTO TEORICO

Cannabis sativa es posiblemente una de las plantas más antiguas cultivadas por el hombre, pero sigue siendo una fuente de controversia a lo largo de su historia, desde el antiguo Egipto existen pruebas científicas de su uso como medicamentos que fueron administrados de manera oral y tópica, ha sido empleada también como fuentes de combustible y en la manufactura de prendas de vestir y cáñamo proveniente de la fibra de la planta (Russo, 2007).

La composición química de Marihuana varia ampliamente teniendo en cuenta el tipo de especie, sus principales componentes son; (Δ^9 -THC), ácido tetrahidrocannabinólico (THC-A) ácido cannabidiólico (CBD-A), Canbidiol (CBD), Cannabinol (CBN), ácido Cannabinólico (CBN- A). Debido a la creciente producción de extractos de Cannabis para uso terapéutico compañías como Bedrocam BV, han desarrollado una variedad de medicamentos estandarizados de acuerdo a sus principios activos, esto mediante la implementación de técnicas como (CLAR) y (EM), (Citti et al., 2016).

Los componentes activos de la marihuana suelen ser termolábiles y fotolábiles es por eso que el almacenamiento de cannabis conduce a una disminución significativa de THC. La presencia de sus componentes depende de otros factores como edad de la planta, y condiciones climáticas. En los países bajos el uso de productos de *Cannabis* terapéutico está disponible con receta médica donde el *Cannabis* medicinal tiene que ser de un tipo y calidad específicos, según la oficina holandesa de medicamentos de *Cannabis*. Para su calidad es necesario determinar las concentraciones de THC, CBD y CBN en la muestra, por esta razón es necesario contar con un método analítico con alta selectividad para determinar los componentes presentes tal como se lleva a cabo en el trabajo desarrollado por (Stolker et al., 2004).

Los Cannabinoides desempeñan un papel interesante como antieméticos estimulantes del apetito en enfermedades degenerativas (Cáncer y Sida), analgésicos, lesiones de la médula espinal, síndrome de Tourette, epilepsia entre otras, debido a esto se han llevado a cabo números ensayos clínicos que demuestran la eficacia de los metabolitos de la marihuana ante diferentes tipos de enfermedades según una compilación de estudios realizados por (Ben Amar, 2006).

4.1 SISTEMA ENDOCANNABINOIDE.

El sistema endocannbinoide es una red compleja de lípidos que comprende ligandos endógenos, sus receptores cannabinoides y las enzimas que catalizan la información y degradación de endocannbinoides.

La naturaleza liposoluble de los ligandos naturales hizo pensar, en un principio, que estos compuestos ejercían sus efectos a través de interacciones inespecíficas con lípidos de membrana. Pero la inhibición de la actividad adenil ciclasa por el ligando Δ^9 -THC a través de proteínas Gi/o (Devane, Dysarz, Johnson, Melvin, & Howlett, 1988), y la existencia de sitios de unión estereoespecíficos y de alta afinidad en membranas de cerebro de rata para el ligando cannabinoide sintético [3H]CP-55940, demostraron la

existencia de receptores cannabinoides. Hasta el momento, los dos receptores clonados, CB1 y CB2, pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas Gi/o con siete dominios transmembrana y comparten un 44% de homología de secuencia. En la figura 1 se ilustra cómo transcurre este proceso.

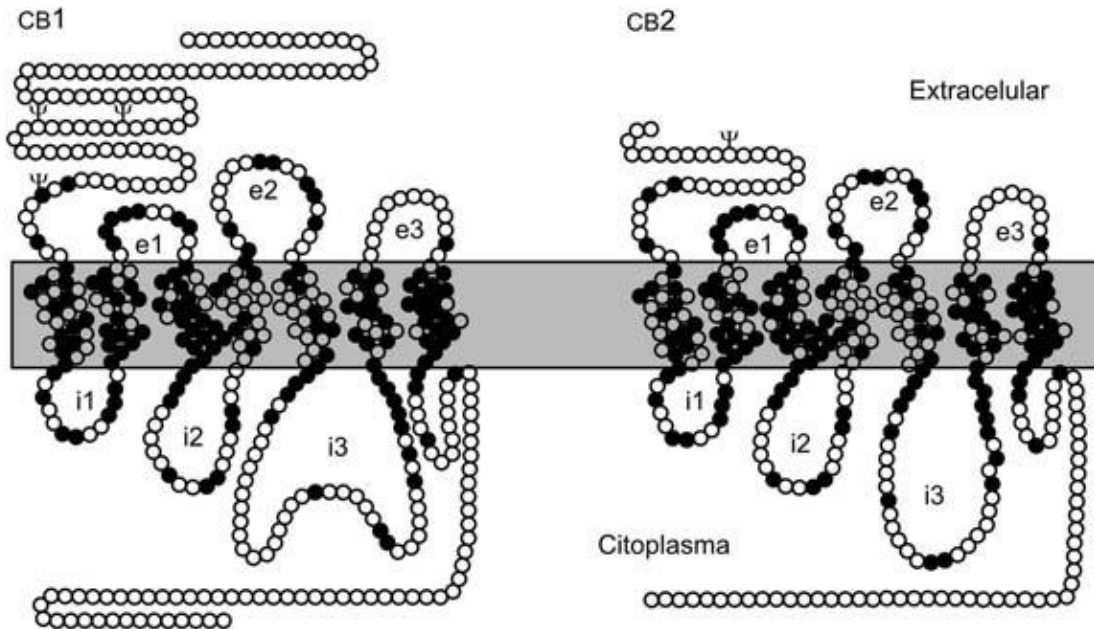


Figura 1. Estructura de los receptores cannabinoides CB1 y CB2. (Benito Sastre, 2010).

4.1.1 RECEPTOR CB1:

Este receptor endocannabinoide, se clonó por primera vez en cerebro de rata y poco después en cerebro humano, está presente en otras especies animales pero su abundancia se ve representada mayoritariamente en cerebro de mamíferos. Se localiza principalmente en neuronas del cerebro, médula espinal y sistema nervioso periférico, pero también en órganos y tejidos periféricos como son células inmunes, glándulas adrenal y pituitaria, corazón, pulmón y partes del tracto gastrointestinal, urinario y reproductivo. Recientemente se han unido a la lista, adipocitos, hígado y células parietales de estómago.

Estudios de autorradiografía e inmunohistoquímica en rata, muestran con detalle su distribución en el Sistema Nervioso Central (SNC), encontrando una mayor densidad de receptores en ganglios basales, hipocampo y cerebelo. Estas áreas del cerebro están relacionadas con la actividad motora, capacidad cognitiva, memoria, y coordinación respectivamente, de modo que algunos de los efectos farmacológicos ejercidos por cannabinoides están vinculados a la distribución del receptor CB1. En humanos, esta distribución se mantiene, aunque se encuentra una expresión mayor del receptor en la corteza límbica que en regiones motoras y sensoriales, lo que sugiere que CB1 desempeña un papel importante en el procesamiento de la información motivacional y Cognitiva (Benito et al., 2003).

4.1.2 RECEPTOR CB2:

Este segundo receptor se clonó en el año 1993 en muestras humanas, y posteriormente en ratón y rata. A diferencia del receptor CB1, se localiza principalmente en células del sistema inmune y hematopoyético. Los niveles más altos de ARNm del receptor CB2 se encuentran en Linfocitos B > monocitos > neutrófilos > Linfocitos T8 > Linfocitos T4. Tras años de gran controversia, ahora se acepta que la distribución de CB2 no es estrictamente periférica y que también se encuentra en el SNC. En 1996, (Skaper et al., 1996) por medio de técnicas de hibridación *in situ* describieron expresión del ARNm de CB2 en cerebelo, concretamente en las células granulares y de Purkinje. Años más tarde, detectaron expresión de CB2 *in vitro* en neuronas sensoriales y localizaron el receptor en neuronas del tallo cerebral donde podría modular emesis. Algunos estudios proponen una distribución más amplia del receptor en cerebro y una expresión en neuronas inducida por procesos patológicos.

4.2 NORMATIVIDAD NACIONAL E INTERNACIONAL

En la actualidad el tema relacionado a los cannabinoides ha experimentado un creciente interés debido a que se le atribuyen propiedades terapéuticas como el manejo de diferentes tipos de patologías y tratamientos de diferentes enfermedades, la investigación científica, el aumento de países que legalizaron su uso y la difusión de información, han contribuido a que el uso medicinal del Cannabis se haya extendido.

El *Cannabis* (marihuana) es considerado una de las drogas más consumidas en todo el mundo, las sustancias psicoactivas integradas en esta planta han sido utilizadas a lo largo de la historia para diferentes fines: medicina, tejidos, ceremonias religiosas y por supuesto para fines recreativos, es por ello que su regulación legal depende de las leyes y normas de cada país.

En Colombia en los últimos años el mercado de Cannabis ha experimentado un importante crecimiento, se comercializan diferentes tipos de productos para el tratamiento de diferentes enfermedades, sin embargo, la procedencia poco segura y la falta de estudios confiables ha destinado estos productos a la clandestinidad haciendo que el desarrollo del Cannabis en el campo medicinal se vea limitado. Ante esto el gobierno nacional durante los últimos años ha promovido el desarrollo de leyes y decretos que permitan el manejo y producción de productos más inocuos y seguros para el consumidor a través de diferentes mecanismos mediante los cuales el productor garantice la composición final y cumpla con los parámetros establecidos por la ley para su uso como Cannabis medicinal. La normatividad legal a la cual se deben someter los productos de Cannabis es aún tema de discusión en el territorio colombiano, sin embargo se han presentado avances significativos en la formulación de leyes, decretos y resoluciones por parte del congreso de la república y el ministerio de justicia, relacionado para la adquisición de semillas, cultivo, elaboración, comercialización e investigación científica en el área de Cannabis (Ministerio de Justicia, 2018).

✓ **Ley 1787 del 6 de julio de 2016.**

Artículo 1°. Objeto. La presente ley tiene como objeto crear un marco regulatorio que permita el acceso seguro e informado al uso médico y científico del Cannabis y sus derivados en el territorio nacional Colombiano.

Artículo 3°. El Estado asumirá el control y la regulación de las actividades de cultivo, producción, fabricación, adquisición a cualquier título, importación, exportación, almacenamiento, transporte, comercialización, distribución, uso y posesión de las semillas de la planta de Cannabis, de sus derivados y de los productos que lo contengan con fines medicinales y científicos, en los términos y condiciones que al respecto fije la normativa.

Artículo 6°. El Ministerio de Salud y Protección Social tendrá a su cargo la expedición de las licencias que permitan la importación, exportación, producción, fabricación, adquisición a cualquier título, almacenamiento, transporte, comercialización, distribución y uso de derivados de Cannabis, así como de los productores que los contengan, desarrollando el procedimiento administrativo correspondiente y la coordinación con otras entidades para la expedición de las licencias (Ministerio de Justicia, 2016).

✓ **Decreto 613 de 2017.**

Por el cual se reglamenta la Ley 1787 de 2016 y se subroga el Título 11 de la Parte 8 del Libro 2 del Decreto 780 de 2016, en relación con el acceso seguro e informado al uso médico y científico del Cannabis

✓ **Resolución 0577 del 8 de agosto de 2017.**

Por la cual se regula técnicamente lo establecido en el Decreto 613 de 2017 por medio del cual se reglamentó la Ley 1787 de 2016 y se subrogó el Título 11 de la Parte 8 del Libro 2 del Decreto 780 de 2016, en lo relativo a la evaluación y seguimiento a las licencias de uso de semillas para siembra, cultivo de plantas de Cannabis psicoactivo y cultivo de plantas de Cannabis no psicoactivo.

✓ **Resolución 0578 del 8 de agosto de 2017.**

Por la cual se establece el manual de tarifas correspondiente a los servicios de evaluación y seguimiento que deben pagar las personas naturales y jurídicas solicitantes de licencias de uso de semillas para siembra, cultivo de plantas de Cannabis psicoactivo y cultivo de plantas de Cannabis no psicoactivo indicadas en el Capítulo 2 del Título 11 de la Parte 8 del Libro 2 del Decreto 780 de 2016.

✓ **Resolución 0579 del 8 de agosto de 2017.**

Por la cual se establece el criterio de definición de los pequeños y medianos cultivadores, productores y comercializadores nacionales de Cannabis medicinal.

✓ **decreto 631 del 9 de abril de 2018.**

Artículo 2.8.11.11.1. Fuente Semillera: Son las semillas para siembra preexistente(s) que ya están en el territorio colombiano y que, hasta el 31 de diciembre de 2018, será(n) destinada(s) exclusivamente a la producción de semillas para siembra de planta de Cannabis psicoactivo y no psicoactivo. Al finalizar esa fecha quienes requieran hacer uso de la fuente semillera deberán haber radicado ante el ICA el trámite de productor de semilla seleccionada, presentando las fichas técnicas de los cultivares a ser usados como fuente semillera. La fuente semillera es un atributo de cada cultivar, por lo que cumplido el término establecido en el inciso primero del presente artículo no se podrán adicionar fichas técnicas de cultivares diferentes a los presentados dentro del término. Lo anterior, no exime del registro de los cultivares en el Registro Nacional de Cultivares Comerciales, ya sea para producir semillas con fines comerciales o de uso propio con los mismos fines, según los requisitos establecidos por el Instituto Colombiano Agropecuario - ICA. "

En el ámbito internacional la reglamentación sobre el uso de productos de Cannabis terapéutico varía dependiendo de la normativa de cada país. La Ley sobre los Estupefacientes neerlandesa determina que está oficialmente prohibido vender, usar y procesar cualquier tipo de Cannabis. Sin embargo, hay algunas excepciones: se autoriza para uso medicinal si ha sido prescrito por un médico, se vende en las farmacias y ha sido cultivado por productores que cuentan con un permiso oficial (por ejemplo: Bedrocan en los Países Bajos). Investigadores, científicos y empresas farmacéuticas requieren igualmente de una licencia para poder trabajar con el Cannabis. Para el cultivo de cáñamo industrial, la Ley sobre los Estupefacientes neerlandesa establece que este cultivo está autorizado para la producción de fibra y (la multiplicación) de semilla. Cabe señalar que en la UE esta autorización solo se aplica para ciertas variedades de cáñamo que contienen menos de 0,2% de THC en las flores secas.

Actualmente 28 de los 50 estados de (EEUU) han legalizado de algún modo el consumo de Cannabis. Son varios los estados que permiten el uso del Cannabis con fines no médicos, tal es el caso de California donde es legal el consumo del llamado oro verde. En estados como Florida y otros 5 estados ya es legal la formulación medicamentos con alto de THC y CBD para uso terapéutico (Grucza et al., 2018).

De esta manera son cada día más los países que ajustan sus normas para dar paso al uso de la marihuana medicinal en el tratamiento de diferentes enfermedades.

4.3 COMPARACIÓN CUALITATIVA DE METABOLITOS CANNABINOIDES POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR) Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS (EM).

La marihuana es la droga cruda derivada de la planta de *Cannabis sativa L*, una planta que actualmente se acepta como perteneciente a una familia Cannabaceae que pertenece al género (*Cannabis*) y la especie (*sativa*) que es muy variable.

El Cannabis ha tenido una larga historia de uso (más de 5000 años), comenzando en el centro y noreste de Asia, y su uso actualmente se está extendiendo por todo el mundo como droga recreativa o como medicamento, esto en algunos países donde se ha autorizado para tal fin. El Cannabis es muy complejo en su química debido a la gran cantidad de sus componentes y su posible interacción entre sí. Estos compuestos representan casi todas las clases químicas, por ejemplo: mono y sesquiterpenos, azúcares, hidrocarburos, esteroides, flavonoides compuestos nitrogenados y aminoácidos, entre otros (Carranza, 2012).

El número total de estos compuestos naturales identificados en *C. sativa. L* en 1980 fue de 423 y en 1995 fue de 483, en la actualidad se conocen alrededor de 500 tipos de compuestos presentes (López, Esther, & Niizawa, 2014) compuestos de tipo cannabinoides se conocen aproximadamente 75 con estructuras características para este tipo de moléculas de las cuales las más importantes asociadas a efecto terapéutico se encuentran THC, CBD, CBN y CBG (figura 2).

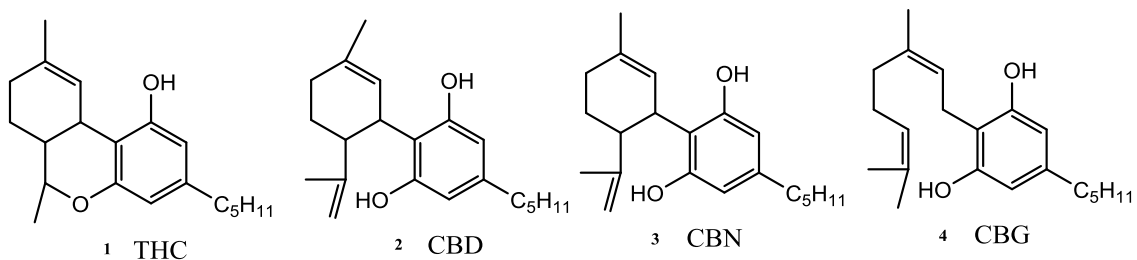


Figura 2. Estructura química de los principales compuestos cannabinoides: 1 THC, 2 CBD, 3 CBN, 4 CBG.

La clase más conocida y más específica de componentes de Cannabis, son los cannabinoides terpenofenólicos C_{21} siendo el Δ^9 tetrahidrocannabinol el componente más activo psicológicamente. Presenta propiedades hidrofóbicas por lo que es muy soluble en lípidos, esto hace que su distribución en el organismo y su eliminación presente diferencias con lo descrito para otras drogas de abuso. El Δ^9 THC tiene un perfil farmacológico muy parecido al del Δ^8 THC, aunque sus efectos son más débiles, solo aparece en algunas variedades de la planta y su concentración es muy pequeña en comparación con la del Δ^9 THC. El desarrollo de cannabinoides sintéticos y el descubrimiento de ligandos receptores de cannabinoides endógenos (endocannabinoides), han impulsado el uso del término fitocannabinoides para describir estos compuestos (Berrendero, 2002).

Los compuestos cannabinoides debido a la semejanza en sus estructuras químicas presentan isómeros que le confieren propiedades e identidades específicas de acuerdo a la distribución y naturaleza química de los átomos que lo conforman. Dentro de los principales cannabinoides a los cuales se les atribuyen propiedades medicinales: THC, CBD, CBN presentan análogos los cuales se pueden encontrar asociados a otros compuestos en la planta. Actualmente se conocen 7 compuestos de tipo cannabigerol (CBG- C_5), compuesto aislado por primera vez de la resina de la marihuana como sustancia química pura. Aunque los compuestos de tipo CBG son inactivos cuando se comparan con Δ^9 tetrahidrocannabinol, muestran actividad antibacteriana considerable contra las bacterias gram positivas, el compuesto aislado más recientemente, el ácido cannabinerólico es el isómero *trans* del ácido cannabigerólico, todos los demás compuestos tipo CBG tienen geometría *cis*.

El cannabidiol (CBD) se aisló en 1940, es un compuesto bicíclico, al estar en anillo de tetrahidropirano escindido. Es un cannabinoide prácticamente desprovisto de propiedades psicoactivas, por lo que se están investigando sus posibles efectos clínicos, el tratamiento con CBD atenúa algunas de las alteraciones psicológicas inducidas por altas dosis de THC, como por ejemplo los sentimientos de ansiedad y pánico.

Se ha atribuido al CBD un papel neuroprotector al comprobar su actuación como antioxidante frente a los efectos oxidativos producidos en las neuronas por la liberación

de glutámico, también ha sido relacionado desde hace algún tiempo con el sistema inmune inhibiendo la producción de diversas citoquinas.

El cannabinoide (CBN) es el cannabinoide que generalmente es indicativo de la edad de la planta de cannabis. Esto se debe a que el CBN se forma a partir de la degradación de THC en la exposición al calor y a la luz ultravioleta ocurriendo esta conversión con el tiempo sujeta a las condiciones de almacenamiento. Además de ser un producto de degradación de THC, también ha demostrado ser un metabolito rápido de THC en sangre.

CBN actúa como un agonista débil para CB₁ y CB₂ aproximadamente 4 veces menos potente que CB₁ en comparación con THC.

Los efectos farmacológicos de CBN podrían indicar que es un compuesto terapéutico creíble, podría ser un buen compuesto para manipular los efectos mediados por CB₁ en el sistema endocannabinoide, sin los conocidos efectos conductuales que están asociados con los fuertes agonistas de CB₁.

4.4 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR).

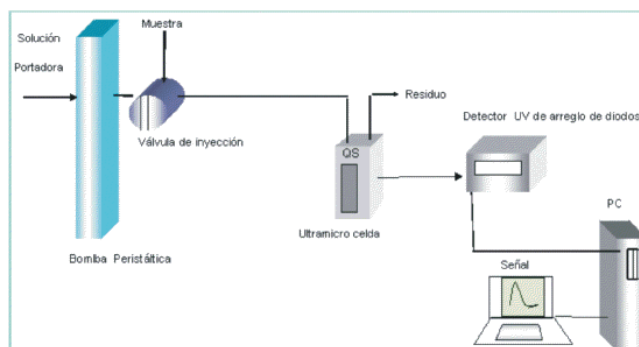
En la cromatografía líquida de alta resolución, la fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna que tiene la fase estacionaria. La separación cromatográfica en (CLAR) es resultado de las interacciones específicas entre las moléculas de la muestra en ambas fases, móvil y estacionaria.

La cromatografía líquida de alta resolución es de gran importancia en el campo científico ya que es capaz de separar macromoléculas y especies iónicas, productos naturales lábiles, materiales poliméricos y otra gran variedad de grupos polifuncionales de alto peso molecular. Cada analito avanzará a lo largo del sistema con una velocidad diferente que dependerá de su afinidad por cada una de las fases, esto supone que después de terminado el recorrido de la muestra por la columna cada una de las sustancias introducidas en el sistema eluirá con un tiempo diferente, es decir, estarán separadas. Atendiendo a la polaridad de la fase móvil. Entre los tipos de cromatografía se encuentran: cromatografía de fase normal e inversa (Moldoveanu & David, 2017).

En la primera, la fase normal presenta puntos activos de alta polaridad y las interacciones que se presentan con el soluto son específicas del sitio activo, la fase estacionaria puede ser un sólido absorbente (sílice o alúmina), o bien un soporte al que se unen químicamente moléculas orgánicas que presentan grupos funcionales de alta polaridad (ciano, amino etc). En la cromatografía de fase reversa la fase estacionaria tiene una naturaleza apolar (cadenas hidrocarbonadas, grupos fenilo)

Dentro de la instrumentación utilizada en la cromatografía de alta eficacia debido al pequeño diámetro de las partículas que forman la fase estacionaria esta requiere de una serie de dispositivos que hacen parte del cromatógrafo (figura 3) como son:

- ✓ Dispositivo de suministro de eluyentes (bomba y dispositivo de mezclado de eluyentes).



- ✓ Dispositivo de inyección.
- ✓ Conducciones y conexiones.
- ✓ Detector y registrador.
- ✓ Columna.

Figura 3. Componentes básicos de un cromatógrafo , (Universidad Central de Venezuela,. Facultad de Ingeniería., Mendoza, Vega, & Mora, 2009).

4.5 ESPECTROMETRÍA DE MASAS (EM).

La espectrometría de masas es una técnica de análisis cualitativo de amplia utilización para la determinación de estructuras orgánicas, por sí sola o en combinación con otras técnicas de espectrofotometría.

Esta técnica está basada en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa; una vez obtenidos estos iones, se separan de acuerdo con su masa y su carga y finalmente se detectan por medio de un dispositivo adecuado. El detector más utilizado es el multiplicador de electrones, donde un haz de iones incide sobre un cátodo arrancando electrones, después de una serie de dinodos colocados cada vez a un potencial más alto amplifica la corriente de electrones (Jose Angel Corcho de Juan, 2008).

Un espectrómetro de masas será en consecuencia una información bidimensional que presenta un parámetro relacionado con la abundancia de los diferentes tipos de iones en función de la relación masa/carga de cada uno de ellos.

Los procesos que tienen lugar en un espectrómetro de masas son de naturaleza química; en consecuencia, la presencia y abundancia en el espectro de determinados tipos de iones, identificables a partir de su masa, será función de la estructura química de cada compuesto, la información ofrecida por un espectro de masas es de alguna forma, comparable a la obtenida mediante una gran cantidad de reacciones de las utilizadas para la determinación de estructuras por vía química por lo que la espectrometría de masas puede ofrecer una enorme cantidad de información sobre un compuesto determinado.

La importancia y proyección de la EM es debida a su potencial analítico. Las ventajas de esta técnica son: proporcionar una alta especificidad en la determinación del peso molecular debido a la posibilidad de medir exactamente su masa molecular, así como obtener información a partir de los fragmentos iónicos de un analito. Su sensibilidad es muy elevada y en teoría la EM permite detectar una única molécula. Es muy versátil ya que permite determinar la estructura de tipos de compuestos muy diversos. Es aplicable a los elementos y a todo tipo de muestras, volátiles, no volátiles, polares y apolares, sólidos, líquidos y gases.

El análisis por espectrometría de masas se realiza en cuatro etapas básicas.

- ✓ Introducción de la muestra.
- ✓ Ionización de la misma, en la que se forman los átomos o moléculas en especies iónicas en fase gaseosa, con la siguiente pérdida de electrones o protones.
- ✓ Separación y el análisis de los iones moleculares y de los fragmentos cargados producidos según su relación m/z .
- ✓ El espectro resultante es un gráfico que representa la abundancia relativa de iones producidos (% de abundancia relativa de los iones producidos) respecto a su relación m/z . La señal correspondiente a un ión aparece en forma de varios picos que corresponden a la distribución estadística de los distintos isótopos del ión.

Ya que el espectrómetro debe cumplir estas cuatro funciones, deberá constar de cuatro partes.

- ✓ Sistema de introducción de muestra.
- ✓ Fuente de iones.
- ✓ Analizador para la separación de iones.
- ✓ Sistema detector y registrador.

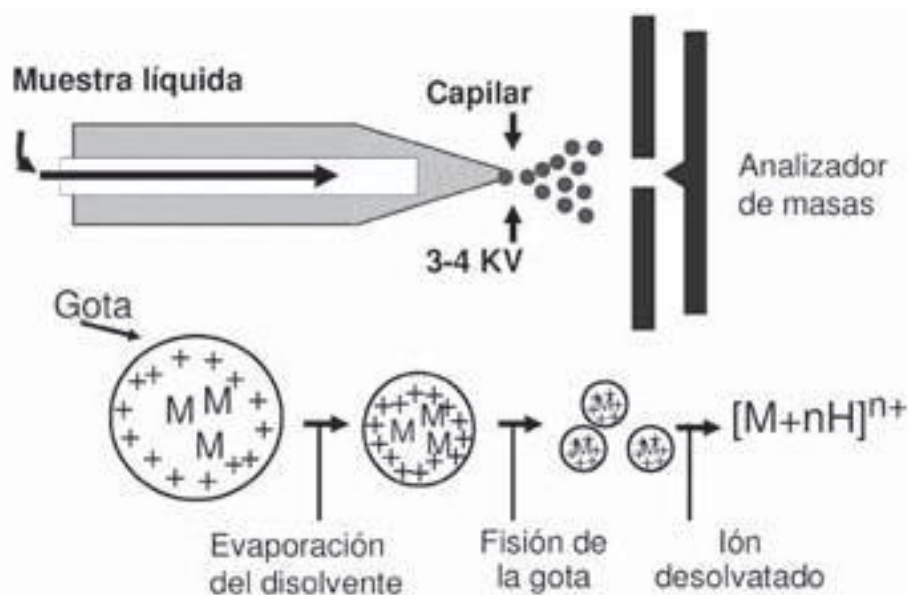
4.5.1 FUENTE DE IONES.

Existen diferentes métodos para producir la ionización de la muestra en estado gaseoso: la ionización por impacto electrónico, ionización química, ionización por electrospray entre otros.

4.5.2 IONIZACIÓN POR ELECTROSPRAY.

Es una ionización a presión atmosférica que se aplica a un amplio grupo de muestras y específicamente se utiliza para la caracterización de biomoléculas.

En la ionización por electro spray la muestra a disuelt a en un disolvente adecuado



pasa a través de un capilar metálico, en cuya punta se aplica un potencial de 3 a 4 kv y una presión de una atmosfera. Se produce una fina niebla de gotas de elevada carga y la evaporación del solvente hace que aumente la densidad de carga, produciéndose la desorción en fase gaseosa.

El análisis por ESI se puede hacer provocando una ionización positiva o negativa. Se selecciona la polaridad de los iones que se desea analizar mediante el voltaje del capilar.

Este proceso se utiliza con frecuencia en espectrometría de masas en tándem. En muchos casos se pueden determinar masas moleculares de macromoléculas con una precisión de $\pm 0.005 \%$.

Figura 4. Esquema de ionización, ESI electro spray (Sol & Juan, 2018).

4.5.3 ESPECTROMETRÍA DE MASAS POR IONIZACIÓN QUÍMICA (EMIQ).

Para ciertos compuestos el espectro de iones negativos es significativamente más intenso que el de los iones positivos.

En la espectrometría de masas por ionización química (bimolecular), en la cual tanto los iones positivos como negativos son sometidos a un potencial apropiado, así son enviados en pulsos, alternativamente desde la fuente de ionización química, a través de un analizador con cuadrupolo a un multiplicador de electrones separados. Para reunir los iones negativos se aplica un potencial positivo al primer dinodo del multiplicador.

Debido a su alta sensibilidad y espectros únicos la IQ (bimolecular) se ha convertido en una competidora de la técnica tradicional de impacto de electrones (unimolecular, ionización del campo).

En el caso de la IQ, un gas reactivo se introduce en la cámara de ionización para formar los nuevos iones moleculares que pueden ser separados sobre la base de la relación m/z . La principal ventaja de la técnica con IQ es que se producen menos fragmentaciones en el espectro de masas, en general es mucho más sencillo de interpretar (Gennaro, Remington, & Belluci, 2003).

4.6 CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS CANNABINOIDES PRESENTES EN MUESTRAS DE *Cannabis sativa* POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN-ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

Debido a las diferentes propiedades que se le asocian en el campo medicinal a *Cannabis sativa* ha producido un creciente interés por conocer los compuestos pertenecientes a la planta, lo cual ha impulsado el estudio y desarrollo de diferentes metodologías que permitan conocer los compuestos presentes y la utilidad que estos puedan presentar a nivel biológico, farmacéutico e industrial.

El estudio de la composición de Cannabis es extenso debido a que existe una gran cantidad de compuestos del tipo cannabiniode así como de tipo terpénicos entre otros lo cual hace que sea una matriz compleja para su análisis lo que representa un inconveniente desde el punto de vista investigativo. Debido a esto, se pueden encontrar diferentes metodologías que permiten identificar y cuantificar los compuestos presentes en el tipo de muestra objeto de estudio.

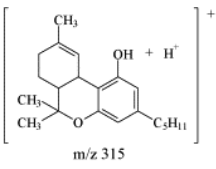
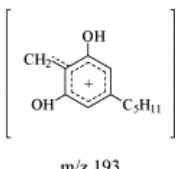
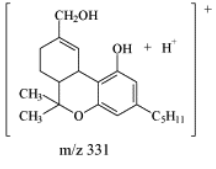
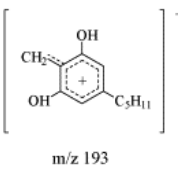
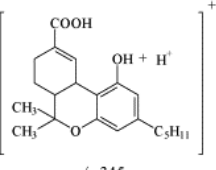
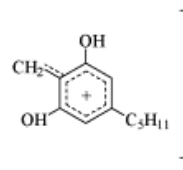
Entre las diversas metodologías que se encuentran esta la cromatografía de gases la cual permite conocer e identificar los componentes volátiles como terpenos y sesquiterpenos así como también cannabinoides en su forma neutra. Sin embargo, la cromatografía de gases representa cierto tipo de desventaja ya que los componentes que presentan características termolábiles por la acción de la temperatura a la cual opera las columnas para cromatografía de gases tienden a degradarse, en este caso específicamente las formas ácidas del *Cannabis* que tienden a descarboxilarse, lo cual no hace posible determinar estos compuestos por esta por esta técnica (De Backer et al., 2009).

La cromatografía líquida de alta resolución se presenta como la técnica más completa y adecuada para este tipo de análisis, ya que permite identificar la mayor parte de los componentes de Cannabis ya que en ella es posible separar e identificar los componentes que no se pueden determinar por cromatografía de gases. Esta técnica se adapta una gran variedad de variables que permiten separar los componentes más importantes, esto es posible debido a que permite manejar diferentes variables y ajustarlas de acuerdo a lo que se requiera para el análisis, tales como; variaciones de

fase estacionaria, fase móvil y energía de radiación en el caso de detectores ultravioleta o también se puede lograr la detección a través de un espectrómetro de masas que permite identificar y cuantificar fitocannabinoides y compuestos presentes en cualquier tipo de muestra.

Actualmente en la literatura científica se reportan diferentes metodologías para la separación de los componentes básicos de Cannabis como son THC, CBD, CBN. Dichas metodologías abarcan una amplia gama de técnicas y procedimientos para la detección de estos compuestos como son el aislamiento y fraccionamiento de las muestras en sus componentes básicos a través de CLAR (Patel, Wene, & Fan, 2017). En la tabla 1 se muestran datos espectroscópicos y fragmentaciones de algunos compuestos pertenecientes a moléculas cannabinoides, de forma similar en la tabla 2 se enlistan una serie de trabajos relacionados con el aislamiento y fraccionamiento de los componentes principales de Cannabis con fines médicos y científicos.

Tabla 1. Datos espectroscópicos y fragmentaciones de algunos compuestos cannabinoides.

Autores	Nombre común	Peso molecular (g/mol)	Patrón de fragmentación	
			Ion precursor (m/z)	Iones producto (m/z)
(del Mar Ramirez Fernandez, De Boeck, Wood, Lopez-Rivadulla, & Samyn, 2008)	Tetrahidrocannabinol (THC).	314,46	315.2 	259.0 ---193 
	11- hidroxy Δ^9 - tetrahidrocannabinol (11-OH-THC)	330,461	331.2 	300.9 ---- 193.0 
	11- Nor -9- Carboxi-THC, (THC-COOH)	344,45	345.2 	192.9 ---- 119.1 
	THC - COOH	353,5	354,2	308.1

(Grauwiler, Scholer, & Drewe, 2007)	Cannabidiol (CBD)	314.4	311.2	293.2
	Cannabinol (CBN)	310.4	311.2	293.2
(Brighenti, Pellati, Steinbach, Maran, & Benvenuti, 2017)	CBDA	359	341	285, 261, 233, 219
	CBGA	361	343	261, 219
	CBG	317	---	261, 233, 207
	CBD	315	---	259, 233, 221, 207

Tabla 2. Literatura científica, aislamiento de fracciones de *Cannabis sativa*.

Titulo.	Instrumentación	Condiciones CLAR-EM	Autores
Analysis of cannabinoids in fiber hemp plant varieties (<i>Cannabis sativa</i> L) by high- performance liquid chromatography.	La CLAR se realizó en un cromatógrafo líquido Serie 4 con una bomba cuaternaria y un modelo LC-85B detector UV de longitud de onda variable. Las Separacionesse llevaron a cabo en un LiChroCART LiChrospher Columna 100-RP-18 (125 x 4 mm, 5 µm); precolumna LiChrospher 100-RP-18 (4 x 4 mm; 5 µm).	Fase móvil metanol/agua en la proporción 80:20 (v / v); el flujo fue 1.0 mL min ⁻¹ . La longitud de onda del detector en CLAR-UV ajustado a 220 nm. Para el análisis CLAR-EM El espectrómetro de masas fue operado en modo EI, energía de ionización 70 eV; fuente de iones temperatura 250 ~ corriente de filamento 200 ~ tA. Potencia de dinamo -15 kV y voltaje multiplicador de electrones 1500 V.	(Words, 1998).
Chromatographic and Spectroscopic Data of Cannabinoids from Cannabis sativa L	Columna analítica Waters XTerra MS C18 (2.1 150 mm, 3.5 mm) precol XTerra MS C18 (2.1 10 mm, 3,5 mm), λ =222nm.	Fase móvil que consiste en una mezcla de tampón acetonitrilo-fosfato (10 mM, pH 7,5). La velocidad de flujo fue de 0.3 mL / min y el tiempo de ejecución total fue de 38 minutos.	(Hazekamp, Peltenburg, Verpoorte, & Giroud, 2005)
Simultaneous quantification of delta-9-THC, THC-acid, CBN and CBD in seized drugs using	Columna analítica (Merck 1.50078), pre columna: LiChrospher 60, RP-Select B, 5 mm (Merck 50963), columna: LiChroCart 125-4, LiChrospher 60, RP-Select B, 5 mm	Las fases móviles consistieron en: A: tampón TEAP 25 mmol/L en agua Milli-Q, B: acetonitrilo, separación isocrática con 36% A y 64% B velocidad: 1.0	(Ambach et al., 2014)

Continuación **tabla 2.**

CLAR-DAD.	(Merck 50829).	mL/min. Volumen de inyección: 10 mL. La detección fue a una longitud de onda de 210nm.	
Medicinal Cannabis: Principal cannabinoids concentration and their stability evaluated by a high performance liquid chromatography coupled to diode array and quadrupole time of flight mass spectrometry method.	El análisis de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), sistema modular Modelo 1200 de Agilent Technologies (Waldbronn, Alemania). Se utilizó una columna Poroshell 120 C18 (Poroshell 120 SB-C18, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm, Agilent, Milano, Italia).	Fase móvil compuesta de ácido fórmico al 0.1% en ambos (A) agua y (B) acetonitrilo (ACN) La elución isocrática se estableció a un caudal de 0,5 ml / min. El tiempo de ejecución fue de 10 min. El volumen de inyección fue de 5μL, los cromatogramas son obtenidos a λ = 228nm.	(Citti et al., 2016)
Identification and quantification of cannabinoids in <i>Cannabis sativa</i> L. plants by high performance liquid chromatography-mass spectrometry.	Columna Kinetex C18 (2,6 μm, 150 mm × 3 mm i.d.) con una columna de protección (0.5 μm de profundidad de filtro × 0.1 mm) (Phenomenex, Torrance, CA, EE. UU).	Gradiente binario A / B (disolvente A: Agua Milli Q con ácido fórmico al 0,1% y disolvente B: MeOH con 0.1% de ácido fórmico). Para el análisis por espectrometría de masas: corriente de descarga de 5 μA, voltaje capilar de 3500 V, calentado vaporizador a 280 ° C, un caudal de nitrógeno de 7 L/min.	(Aizpurua-olaizola, Omar, & Navarro, 2014)

5 METODOLOGÍA

5.1 MUESTRAS *Cannabis sativa*.

Una de las muestras de Cannabis fue suministrada por asociaciones indígenas del Departamento del Cauca (Sannabis, muestra E) y por el resguardo (Huellas) cuyos cultivos para el procesamiento de estos productos (figura 5) se encuentran ubicados en el municipio de Corinto – Cauca, localización geográfica: latitud: 3.183, Longitud: -76.267 3° 10' 59" Norte, 76° 16' 1" Oeste (“sannabis, Cannabis medicinal, colombia,” 2018),



Figura 5. Cultivos de *Cannabis sativa*, Corinto - Departamento del Cauca

Debido a que las propiedades y composición de las especies cannabinoides depende de factores como clima, condiciones de cultivo y especie de la planta de *Cannabis sativa*, es importante conocer la procedencia y clasificación taxonómica de la planta con la cual se fabricaron estos productos, razón por la cual en el herbario Luis Sigifredo Espinal – Tascón de la Universidad del Valle, Cali – Colombia se cuenta con dos ejemplares de especies de *Cannabis sativa* de los cuales uno de ellos se presenta en la figura 6, este se presenta como referencia que apunte a la veracidad e identidad del material vegetal objeto de este estudio. Los datos de la recolección de una parte de dicho ejemplar (código de clasificación: CUVC 09248) se muestran en la tabla 3, en la sección de anexos figura 41 se muestra la distribución de cada una de las partes de esta planta.



Figura 6: Clasificación herbaria planta *Cannabis sativa*.
Tabla 3. Registro herbario, planta de la especie *Cannabis Sativa*.

Plantas de Colombia. Herbario (CUCV), Universidad de Valle, Cali.	
Departamento: Valle	Municipio: Cali
Nombre: <i>Cannabis sativa</i> Lam.	Código: 09248
Determinado: Néstor Paz.	
Familia: CANNABINACEAE.	
Descripción: Planta de aproximadamente 1.50 m, flores verdosas claras, hojas aculeadas , ternado compuestas. Corteza algo dura, frutos evaluados, se propaga por semillas. Planta alucinógena.	
Fecha: 20 de junio/79	
Colector: Néstor Paz	

La muestra D fue adquirida en las inmediaciones del Puente del Humilladero (Popayán-Cauca, Colombia) la cual es comercializada por un vendedor local.

Se cuenta con dos muestras comerciales de Cannabis (figura 7), las cuales han sido rotuladas como E y D esto es debido a que se contaba con otros tipos de muestras en el análisis, el estado físico de estas presenta apariencia oleosa, y viscosa al tacto, de color verde oscuro, aroma intensa y de sabor amargo poco soluble en saliva.

Debido a su baja solubilidad en fluidos biológicos se realizan pruebas de solubilidad donde se evalúa el comportamiento a través de ensayos físicos con diferentes solventes.



Figura 7. Muestras de *Cannabis sativa* utilizadas en el análisis.

Fuente: Johnnatan Mauricio Giraldo Ruales

5.2 EQUIPOS E INSTRUMENTACIÓN.

El análisis de las muestras se llevó a cabo en las instalaciones de la Universidad del Cauca, específicamente el equipo de (CLAR) fue suministrado por el grupo de investigaciones de química ambiental (GIQA), y el espectrómetro de masas por la unidad de análisis industrial de dicha universidad.

Para el análisis cromatográfico se utilizó un sistema CLAR Waters 1325, el cual consta de una bomba binaria y sistema de detección UV – VIS Waters 1320, la adquisición de datos se realiza mediante el software Breeze 2.0.

En el análisis de espectrometría de masas se hace uso de un sistema LCQ FLET, con ionización por Electrospray, analizador de trampa de iones, los datos son obtenidos a través del software Xcalibur 4.0.

Tanto para el lavado del material de vidrio como para la desgasificación de los solventes, y fase móvil se emplea equipo de ultrasonido Thermo scientific.

Las fracciones de las muestras son concentradas haciendo uso de liofilizador LABCONCO, temperatura de colector -50°C , capacidad de retención de hielo 2.5L, desplazamiento de la bomba de vacío 86 L/ min.

5.3 LIOFILIZACIÓN DE LAS FRACCIONES CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA.

El proceso de liofilización se realizó en el Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca (CIBUC). De cada una de las fracciones obtenidas se tomaron alícuotas de 1.5 mL y fueron colocadas en recipientes para centrifuga de 2 mL. En este proceso las muestras se dejan durante dos días hasta obtener un sólido blanco, las condiciones empleadas para el análisis fueron: presión 0,470 mbar y temperatura de -51°C

5.4 SOLVENTES Y REACTIVOS.

Los solventes utilizados: acetonitrilo, acetato de etilo, etanol, metanol ácido fórmico y ácido acético, son grado CLAR, y fueron adquiridos de Fisher Scientific, el agua destilada y desionizada empleados en el análisis fueron suministradas por el laboratorio de docencia de la Universidad del Cauca.

5.5 LAVADO DE MATERIAL.

Se debe garantizar que todo el material a utilizar debe estar completamente limpio. El material de vidrio se lava en una solución de jabón neutro o detergente no iónico donde se deja por 6 horas aproximadamente, luego se enjuaga con abundante agua de la llave y enseguida con abundante agua desionizada. Posteriormente se lleva al ultrasonido por un tiempo de 30 minutos para reducir algún tipo de interferencias en el análisis por EM.

5.6 PRUEBAS DE SOLUBILIDAD.

El inicio del análisis se dió evaluando la solubilidad de las muestras y su comportamiento en diferentes disolventes (ACN, etanol, agua, acetato de etilo y metanol), se adicionó 0.05mg de muestra en un volumen de cada uno de los solventes, donde se pudo apreciar que la mayor solubilidad se logra con el solvente ACN y metanol, sin embargo, en este último resultaba una mayor cantidad de solidos razón por la cual el solvente más adecuado para el análisis de las muestras fue el ACN.

5.7 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.

De las dos muestras de Cannabis, las cuales se designan arbitrariamente como D y E por efectos de clasificación, se prepararon disoluciones a concentraciones diferentes en la evaluación de las condiciones óptimas de trabajo. Las soluciones para el análisis cromatográfico se prepararon como se menciona a continuación.

Muestra E: debido al estado físico de la muestra la cual presenta una textura viscosa se pesan 359.9 mg y se solubilizan en 50 mL de ACN, de esta muestra se toma un volumen de 5 mL y se afora a 10 mL. Por ultimo de la anterior solución se toma una alícuota de 280 μ L y son llevados a un volumen de 10 mL para obtener una concentración final de 100ppm.

La muestra D: se prepara a partir de 297.1 mg en 50 mL de ACN, de esta solución 5mL son aforados con ACN a un volumen de 10mL y como en el caso anterior de esta muestra se toma una alícuota de 340 μ L y se llevan a un volumen final de 10 mL para una solución de Cannabis con una concentración de 100ppm. Cada una de las muestras para el análisis se pasan por un filtro de membrana de 0.22 μ m, con la finalidad de eliminar partículas que puedan interferir u obstruir algunos de los componentes del equipo como el sistema de tuberías o la columna.

5.8 CONDICIONES PARA EL ANÁLISIS CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA.

Las muestras son eluidas isocráticamente, la separación se lleva a cabo con una columna analítica Waters C₁₈ fase reversa, tipo de partícula esférica, Micro BONDAPAK 3.9 x 150 mm, tamaño de partícula 5 μ m, tamaño de poro 100Å, la fase móvil es una mezcla acetonitrilo – buffer fosfato 65/35, y el volumen de inyección 10 μ L.

5.9 CONDICIONES PARA EL ANÁLISIS ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

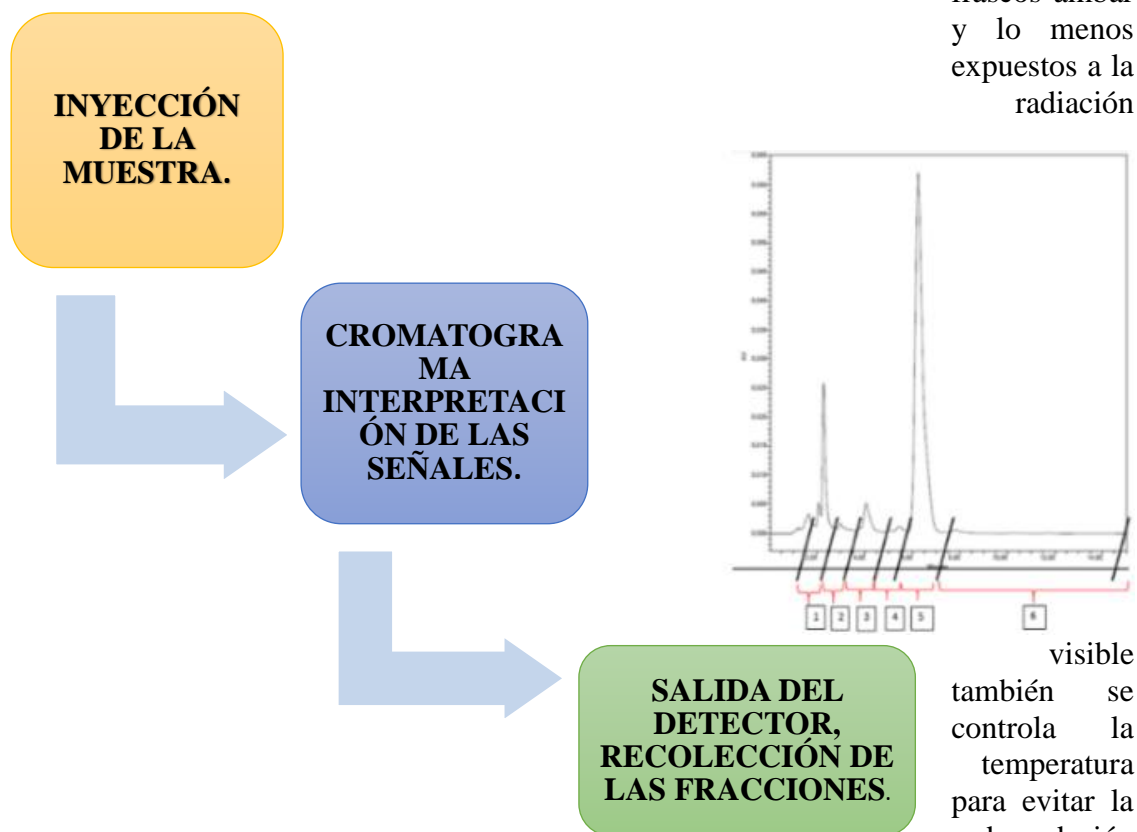
En el análisis espectroscópico las condiciones empleadas son ESI modo de ionización positivo, energía de ionización 70 V, se utiliza como agente ionizante ácido fórmico 0.1% y el volumen de inyección es de 0,2 μ L/min. Fuente de ionización por electrospray 5,89kV, corriente spray 4,27 μ A, flujo de gas Argón 31,02 L/min, flujo de gas auxiliar 5,99 L/min, voltaje de capilar 19,97V, temperatura de 240,03°C, lentes de tubo 59,97V.

5.10 RECOLECCIÓN DE FRACCIONES CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA.

Una vez se inyectan las muestras se obtiene el cromatograma respectivo, a través del cual de acuerdo a las señales que se producen se establecen intervalos de tiempo para los picos más significativos. Cada una de las fracciones son recolectadas en recipientes para centrifuga (Merk), en la figura 8 se presenta un esquema del proceso llevado a cabo para la obtención de las fracciones. En total se realizan para las muestras D y E 15 corridas cada una durante un tiempo de 15 minutos en donde se recolecta el eluato de cada separación cromatográfica.

Los recipientes con cada una de las fracciones son protegidos de la luz, para ello son

colocados en frascos ámbar y lo menos expuestos a la radiación



visible también se controla la temperatura para evitar la degradación de la muestra para su

posterior análisis por EM.

Figura 8. Esquema de inyección de muestras, recolección de fracciones.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para realizar la determinación y comparación de cannabinoides en muestras de *Cannabis sativa* se emplean dos tipos de productos en presentación para uso tópico, sublingual o la ingesta del extracto, dichas muestras se presentan como D y E respectivamente (figura 7). Para el análisis cromatográfico se adopta la metodología reportada por (Gambaro et al., 2002) donde los parámetros que se emplean son: composición de la fase móvil, la cual consta de una mezcla de acetonitrilo (ACN) y buffer fosfato (PO_4^-) a pH 5 en relación 65/35, flujo de fase móvil 1mL/min, presión 800 PSI, columna analítica C_{18} de fase reversa y la elusión de los analitos se realizó de forma isocrática.

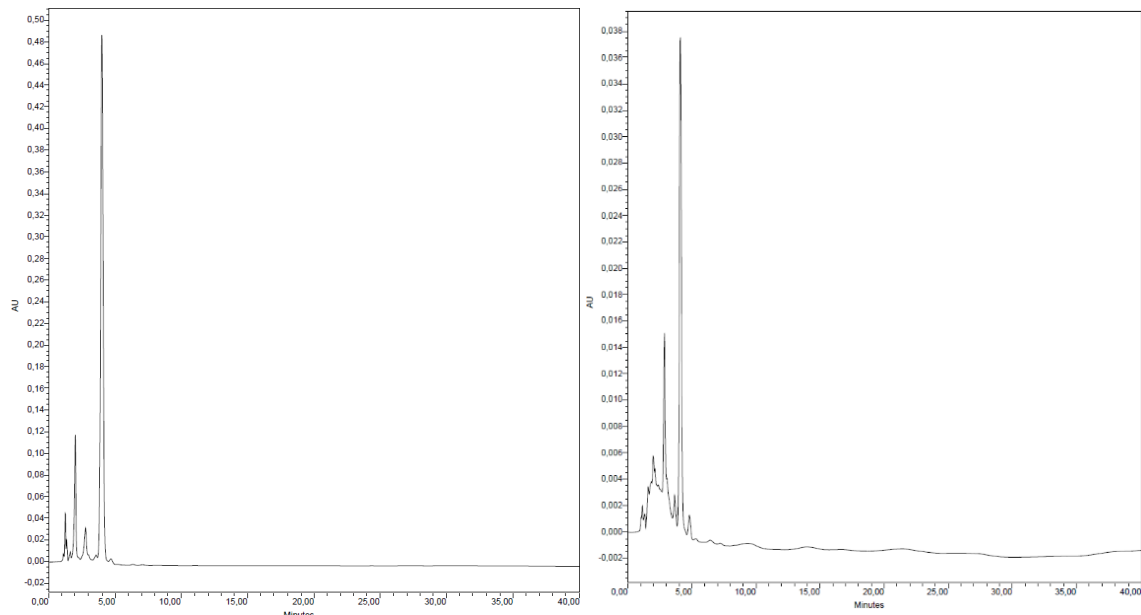
En primera instancia se inició con las condiciones reportadas en la literatura evaluando los posibles analitos que estén presentes en la muestra, por ello se procede a inyectar las muestras en un tiempo de análisis de 40 minutos con el objetivo de observar las posibles señales que se puedan presentar debido a que en el método reportado el tiempo de análisis es de 20 minutos, los resultados se muestran en la figura 9, donde no se aprecian picos después de los 10 minutos de análisis. Como se muestra a continuación para esta prueba no se evidenciaron señales de analitos en el rango de 10 a 40 minutos lo cual representa un aspecto positivo ya que permitió establecer un menor tiempo de análisis, uso de reactivos y también contribuye con los principios de la química verde, desde el punto de vista de la economía atómica. Además se observa que la resolución de los picos analíticos no es la más adecuada ya que algunos picos son muy aproximados en tiempos de retención o se produce el solapamiento de los mismos, este comportamiento se presentó en las dos muestras objeto de análisis (figura 9a y 9b).



Figura 9. Evaluación del tiempo ^{9a} análisis de las dos muestras comer ^{9b} 9a muestra D, 9b muestra E. Las condiciones empleadas son las reportadas por (Gambaro et al., 2002): flujo de fase móvil 1mL/min, composición de fase móvil ACN – buffer fosfato 65/35, longitud de onda $\lambda = 220\text{nm}$, tiempo de análisis 40 min.

Se inyectó las muestras D y E variando la composición de fase móvil figura 10. Inicialmente se prueba aumentando la polaridad de la fase móvil en proporción 55/45 ACN/PO₄ esto produjo que se diera la pérdida de algunas señales, también aumentó el tiempo de permanencia de los analitos en la fase estacionaria lo cual pudo ser un indicio de la poca afinidad de los compuestos presentes en la muestra con la fase móvil a estas condiciones de polaridad y flujo, presentándose un comportamiento similar en ambas muestras razón por la cual se muestran los resultados de la muestra D (figura 10a).

Debido a esto se evalúa la relación de fase móvil 75/25 ACN/PO₄ para la cual se obtiene el cromatograma de la figura 10b donde se aprecia una mejor resolución de las señales en comparación con el cromatograma 10a. Posterior a ello se prueba la relación 65/35 ACN/PO₄ reportada en la literatura, para la cual evidentemente mejora muchos de los parámetros cromatográficos presentándose un mayor número de señales, separación de los picos y resolución de los mismos (figura 10c), además lo concerniente a tiempos de retención y orden de elución son similares a los reportados en el trabajo desarrollado por (Gambaro et al., 2002) donde se muestra un cromatograma típico de una muestra de *Cannabis sativa* (figura 11), de este modo con base en las pruebas realizadas se logra establecer un tiempo de 15 minutos para el análisis de las dos muestras de Cannabis.



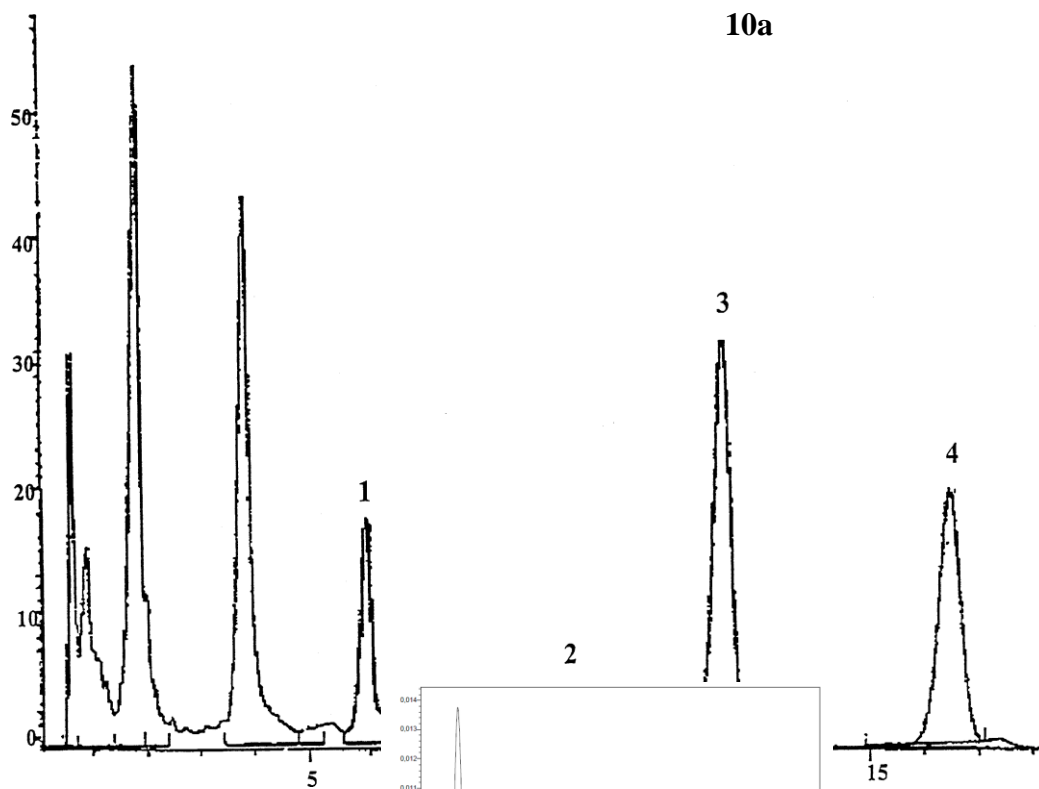
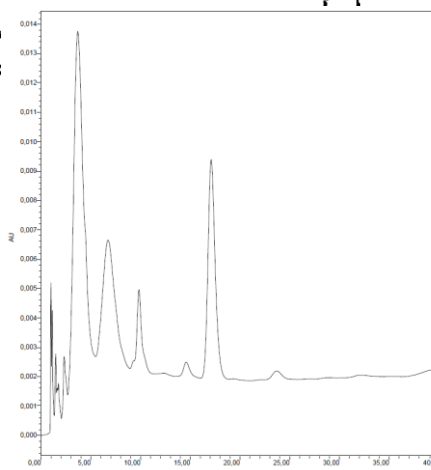
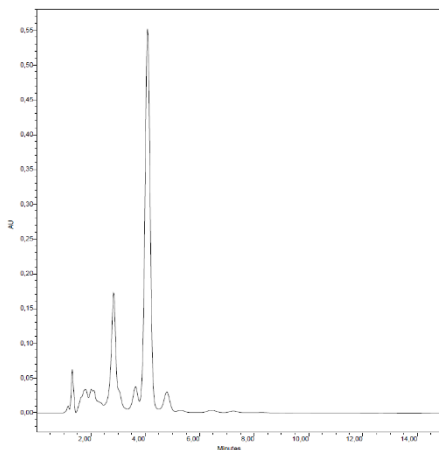


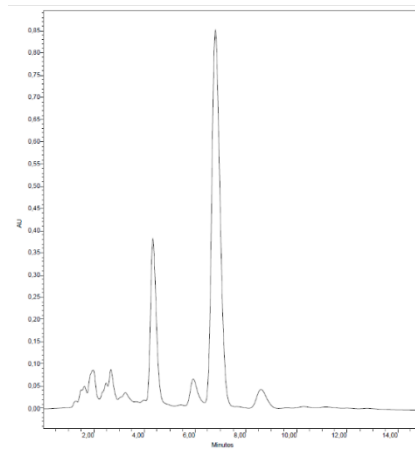
Figura 10. Prueba móvil. Las muestras se longitud de onda análisis 15 min. **10a** (ACN/PO₄: 55/45), **10b** (ACN/PO₄ : 75/25), **10c**



polaridad de la fase inyectaron a una $\lambda=220\text{nm}$, tiempo de muestra D, fase móvil muestra D fase móvil muestra D fase móvil



(ACN/P
O₄ :
65/35).



THC

CBD

IS

CBN

Figura 11. Cromatograma de muestras de *Cannabis sativa* después de la extracción: 1 CBD, 2 CBN, 3 THC, 4 IS (Gambaro et al., 2002).

Se evaluó el flujo de fase móvil (figura 12), para ello se hace un ensayo a 1.5mL/min, 1mL/min y 0,5mL/min respectivamente, para las muestras D y E las pruebas se realizan por triplicado.

Para el primer ensayo (1.5mL/min) se presenta una variabilidad significativa de la señal observándose solapamiento de los picos y poca resolución (figura 12a), la posible razón que se atribuye radica en que los analitos son arrastrados debido al alto flujo de fase móvil lo cual impide que estos interactúen de forma efectiva con la fase estacionaria y se produzca la proximidad en la elución de estos y por consiguiente el solapamiento de las señales.

Para el segundo ensayo (1mL/min) la resolución de los picos mejora significativamente presentándose mayor claridad de las señales lo cual permite identificar algunos picos con base a lo reportado por la literatura (figura 12b) estos pueden estar relacionados según el orden de elución con: a CBD, b CBN y c THC, además a este flujo se reduce el riesgo de posibles daños de tipo instrumental en el equipo debido a un flujo excesivo de fase móvil y se reduce el uso de solvente para cada análisis. Para el tercer ensayo se presenta una distorsión total de las señales con mucho solapamiento y aumentado considerablemente el tiempo de retención de los analitos (figura 12c), esto posiblemente este relacionado con el hecho de que no se produce el flujo necesario de fase móvil para que los analitos sean arrastrados de la fase estacionaria y aumente el tiempo de permanencia de estos, lo cual está directamente relacionado con el ensanchamiento de los picos. Se realizaron ensayos de flujo de fase móvil para la muestra D donde los resultados para cada uno de los ensayos arrojaron datos reproducibles y similares a los cromatogramas obtenidos para la muestra E. Por lo anterior se establece que el flujo óptimo de trabajo es de 1mL/min para ambas muestras.

12a

12c

12b

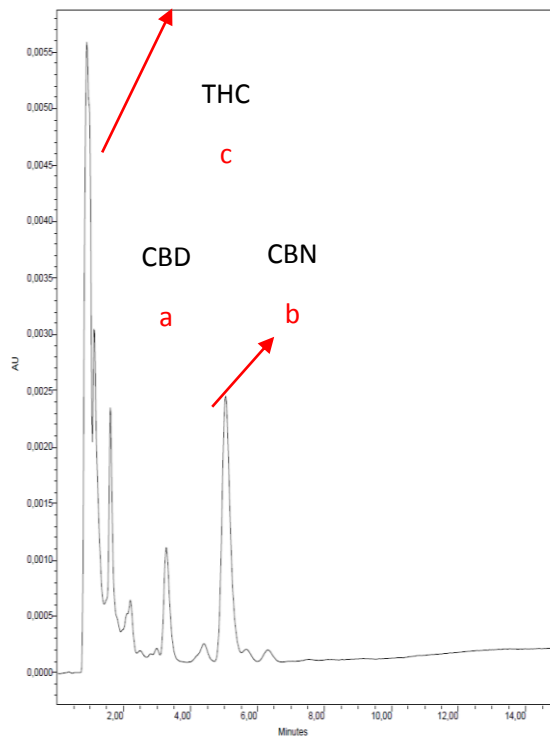
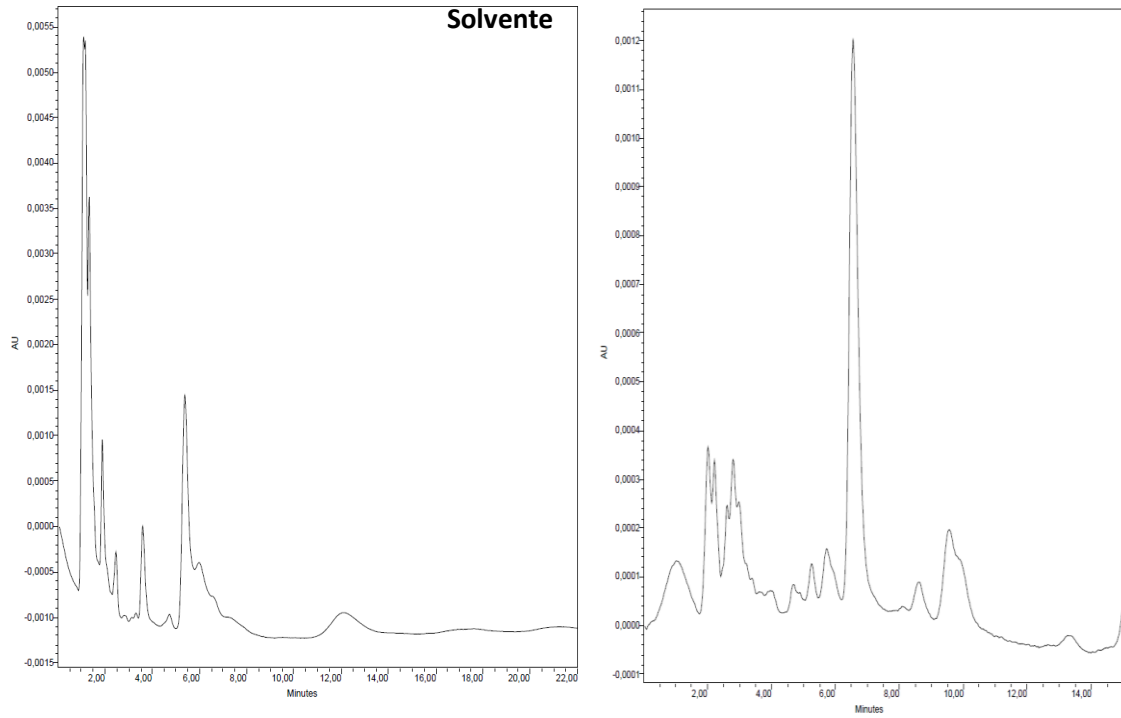


Figura 12. Prueba muestra E
248ppm, fase
65/35), $\lambda=220\text{nm}$.
móvil 1.5 mL/min.
móvil 1.0 mL/min.
móvil 0.5 mL/min.

flujo de fase móvil,
(24.8mg/100mL)
móvil (ACN/PO₄:
12a flujo de fase
12b flujo de fase
12c flujo de fase

Con el fin de encontrar las mejores condiciones de análisis se evaluó la longitud de onda con la cual las moléculas cannabinoides absorben energía, para ello se trabajó a longitud de onda de 254 nm ya que algunos autores reportan detección de algunos tipos de cannabinoides a esta energía (Hazekamp et al., 2005). Para las dos muestras las pruebas se realizaron por triplicado con el fin de evaluar la reproducibilidad de los datos. Sin embargo, los resultados demuestran que al disminuir la radiación de energía ultravioleta la señal de los picos disminuye con respecto a la intensidad figuras 13a y 13b, además disminuye considerablemente la resolución producto del ensanchamiento de los picos figura 13c tal como de muestra en la figura 13.

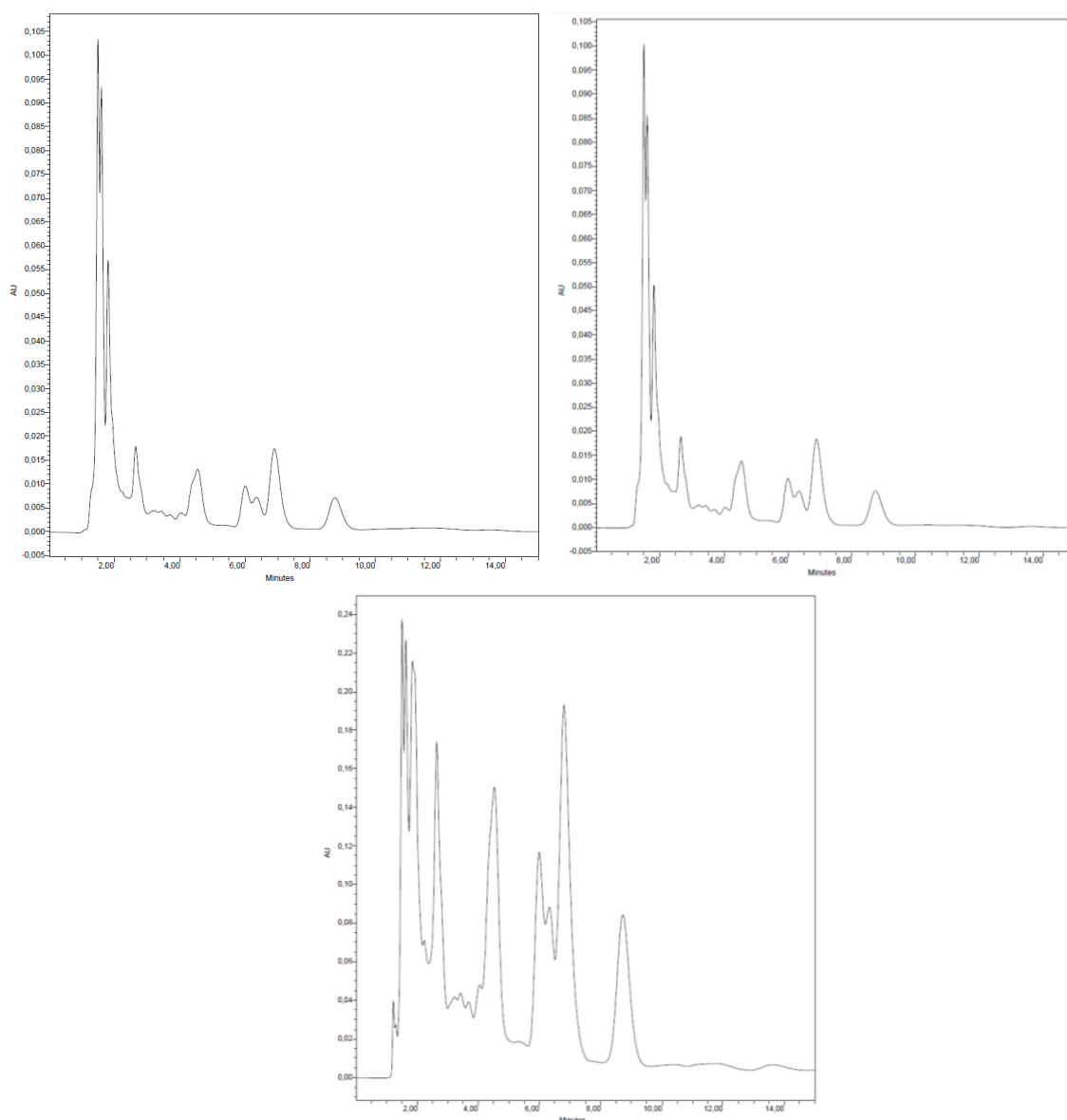
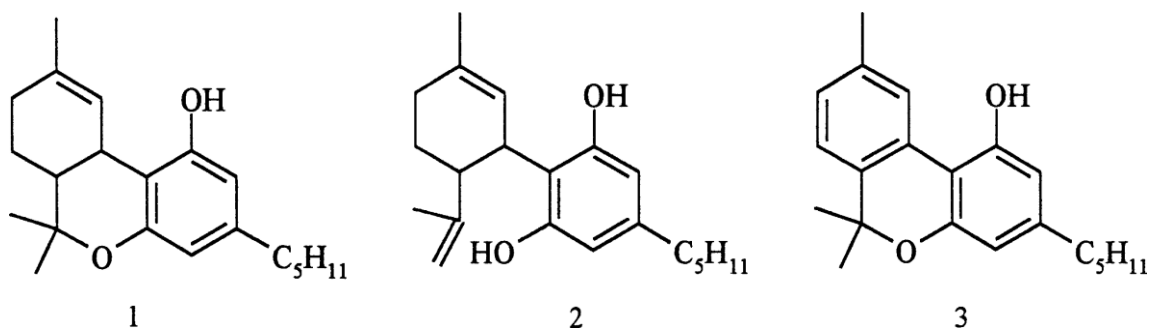


Figura 13. Prueba longitud de onda. Las muestras se analizaron bajo las siguientes condiciones: longitud de onda $\lambda=254\text{nm}$, muestra E (35 **13c** 50 mL). 7138ppm, fase móvil ACN/ PO_4 65/35, flujo de fase móvil 1mL/min. **13a** corrida 1. **13b** corrida 2. **13c** corrida 3.

Mediante estos resultados y según la metodología reportada (Gambaro et al., 2002), se comprueba que la longitud de onda a 220 nm es la energía óptima para que las moléculas cannabinoides absorban energía. Esto se debe a la estructura química de estos compuestos y el tipo de insaturaciones, propias de anillos aromáticos y dobles enlaces en las estructuras de compuestos cannabinoides figura 14.



Por otro lado, en la mayor parte de las pruebas se presentó variabilidad significativa de la intensidad de la señal, lo cual en principio se atribuyó a la estabilidad de la muestra. Debido a lo anterior se realizaron inyecciones sucesivas de muestras que fueron preparadas en un intervalo de tiempo corto e inyectadas en el menor tiempo posible con ausencia de luz, debido a la fotosensibilidad de las moléculas cannabinoides.

Sin embargo no se observaron resultados concluyentes, presentandose el mismo

Figura 14. Estructura química de los principales cannabinoides, 1 Δ^9 THC, 2 CBD, 3 CBN (Appendino et al., 2008).

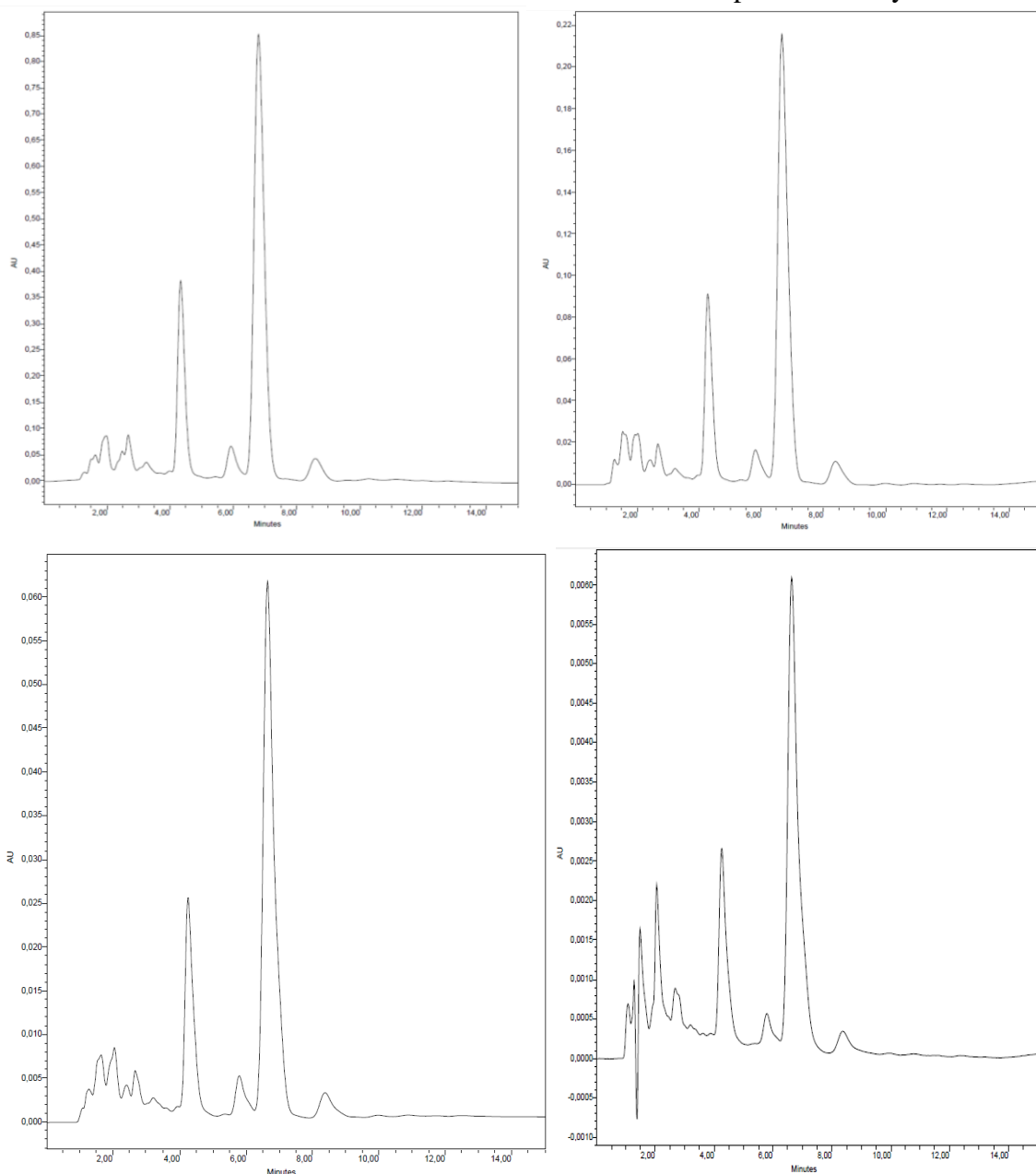
fenómeno de variabilidad de la señal, es por ello que se procedió a evaluar la concentración de la muestra (figura 15). Se inyectaron muestras a diferentes concentraciones, iniciando con una muestra a 359.9mg/50mL, figura 15a, de esta última se tomó una alícuota de 5 mL y se diluye en 10mL figura 15b, observándose la disminución de la intensidad de la señal, sin embargo, al realizar los triplicados de las inyecciones los resultados no eran reproducibles, por lo cual de esta última muestra se toma una alícuota de 0,28mL y se afora a 10mL figura 15c, haciéndose varias réplicas.

Los datos de este último ensayo mostraron reproducibilidad mayoritaria de cada uno de los cromatogramas en aspectos relacionados con tiempo de retención e intensidad de la señal, pudiendo establecer de esta manera que a una concentración de 100 ppm p/v los resultados arrojaban repetibilidad en cuanto a las dos variables cromatograficas mencionadas.

Posiblemente este comportamiento es debido a las elevadas concentraciones o también a la uniformidad de la muestra ya que estas variables pueden influir en los parámetros cromatográficos relacionados con la ley de Lambert Beer ya que esta es aplicable a soluciones diluidas, porque en disoluciones concentradas la distancia entre partículas es

tan pequeña que se produce una modificación en la distribución de cargas de las mismas lo que se traduce en una alteración de la capacidad de absorción a una longitud de onda determinada, dicho efecto pudo ser resuelto mediante la dilución de las muestras (Sierra Alonso, 2010).

De este modo este factor representa el impedimento para obtener resultados reproducibles; cabe destacar que para la muestra D también se encontró reproducibilidad de la señal para las inyecciones a



concentraciones a 100 ppm figura 15d.

15a

15b

Figura 15. Prueba concentración de la muestra. Estas son inyectadas bajo las condiciones: $\lambda = 220\text{nm}$, fase móvil ACN/ PO_4 65/35, flujo de fase móvil 1mL/min. **15a** Muestra E (359.9mg/50 mL). **15b** Muestra E (359.9mg/50mL) 7138ppm, dilución

5/10mL 3569 ppm. **15c** Muestra E 3569ppm, 0,28/10 mL 100ppm. **15d** Muestra D 297,1 mg/50mL. 100ppm.

Establecidas las condiciones óptimas de trabajo (tabla 4) como flujo, composición de fase móvil, longitud de onda, concentración de la muestra y reproducibilidad de las medidas, se calculan parámetros cromatográficos con el fin de evaluar las velocidades promedio de migración de soluto y lineal de las moléculas de fase móvil, el factor de retención y coeficiente de selectividad del analito en la fase estacionara (tabla 5), debido a que estos datos permiten comprender el comportamiento de los analitos durante la separación de los mismos. Estos datos son obtenidos de acuerdo al cromatograma que se presenta para la muestra D figura 16.

Factores como el tiempo muerto (t_m), el cual se define como el tiempo que tarda un analito no retenido en llegar al detector se determinó utilizando una solución de dicromato de potasio a una concentración de 0.1N, para el cual se estableció un tiempo de retención $t_m = 2.029$ min.

Tabla 4: Condiciones de trabajo para la detección de cannabinoides por cromatografía

Flujo de fase móvil.	1mL/min
Composición de fase móvil.	ACN – buffer (PO ₄) pH 5, 65/35
Longitud de onda.	$\lambda = 220$ nm
Concentración de la muestra.	100 ppm p/v
Presión.	800 PSI
Volumen de inyección.	10 μ L

liquida de alta resolución.

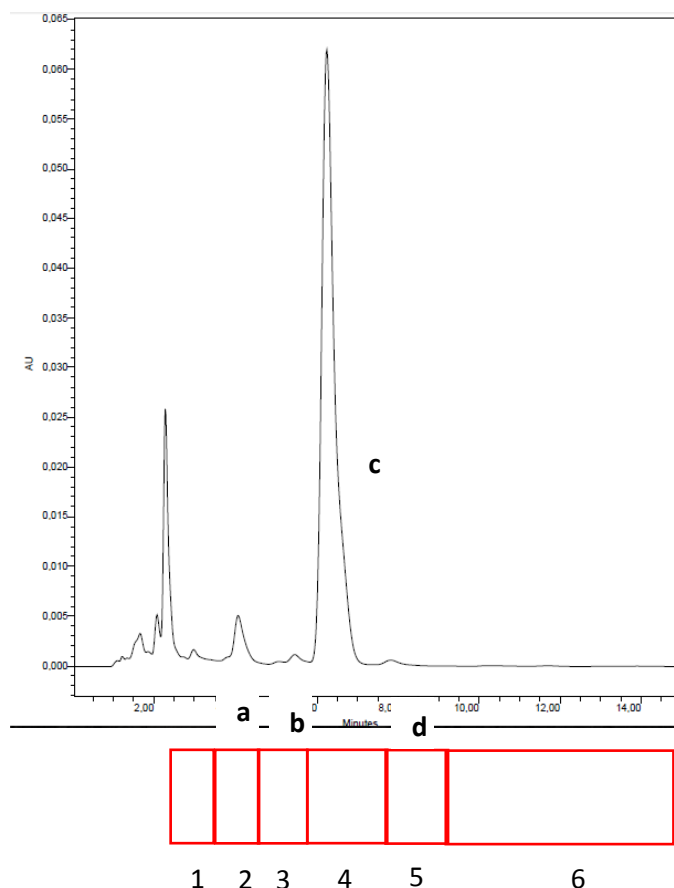


Figura 16. Cromatograma muestra D, 100 ppm. $\lambda = 220\text{nm}$ (Fase móvil ACN/PO₄ 65/35). Flujo de fase móvil 1mL /min

A continuación, se presenta el proceso para calcular los parámetros cromatográficos partiendo de los tiempos de retención para los picos más importantes, los resultados se muestran en la tabla 5.

$$v = \frac{L}{t_r} \quad \text{ecuación 1.}$$

Donde:

L: longitud de la columna

t_r : tiempo de retención

para el pico a:

$$v = \frac{15\text{cm}}{4.056\text{min}} = 3.691 \frac{\text{cm}}{\text{min}}$$

De forma análoga al procedimiento anterior se obtiene la velocidad lineal para los picos b, c y d, tabla 5.

Factor de retención.

$$K' = \frac{t_r - t_m}{t_m} \quad \text{ecuación 2}$$

Donde:

t_r = tiempo de retención

t_m = tiempo muerto

$$K'_a = \frac{(4.066 - 2.029)\text{min}}{2.029\text{min}} = 1.004$$

De forma similar se obtiene el factor de retención para cada analito, tabla 5.

Tabla 5. Resultados: Velocidad lineal promedio de migración de los solutos, factor de retención del analito, muestra D.

Número de pico	Tiempo de retención (min)	Velocidad promedio de migración del soluto (cm/min)	Factor de retención
a	4.066	3.691	0.791
b	5.450	2.753	1.412
c	6.235	2.411	1.763
d	7.785	1.932	2.455

Factor de selectividad.

$$\alpha = \frac{t_{rb}-t_m}{t_{ra}-t_m} \quad \text{ecuación 3}$$

Donde:

t_{rb} = tiempo de retención del analito menos retenido.

t_{ra} = tiempo de retención del analito mas retenido.

t_m = tiempo muerto

$$\alpha_{b-a} = \frac{(5.450-2.029)min}{(4.056-2.029)min} = 1.687$$

De la misma manera se obtiene el factor de selectividad, los resultados se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Resultados factor de selectividad muestra D.

Relación de picos	Factor de selectividad
α_{b-a}	1.687
α_{c-b}	1.229
α_{d-b}	1.368

Según los resultados obtenidos la velocidad de migración de los solutos (tabla 5) retenidos en la columna muestra un menor movimiento de las moléculas a medida que aumenta el tiempo de retención, es decir su velocidad lineal disminuye cuando estos son más retenidos lo cual indica la afinidad de estos por la fase estacionaria.

Lo mencionado anteriormente se justifica de acuerdo a los datos arrojados por el factor de retención (tabla 5) de los analitos que se observan en el cromatograma, donde la migración de los solutos presentes se encuentran un rango de 0.791 a 2.455 lo cual puede interpretarse como una óptima elusión de los analitos en la columna ya que teóricamente para la retención de una mezcla de componentes, el rango oscila entre 1 y 10 (Skoog, 2001).

El factor de selectividad como su nombre lo dice, define que tan selectiva es una columna para separar dos picos, y que de acuerdo a los datos obtenidos (tabla 6) muestra una óptima separación entre los picos a y b, sin embargo, la separación de los picos b y c, se ve un poco reducida al igual que los picos c y d.

La separación de los picos desde el punto de vista cromatográfico es razonable ya que dicho factor siempre debe ser superior a la unidad, razón por la cual fue posible separar en fracciones las señales de mayor interés en el cromatograma (figura 16). De acuerdo a los tiempos de retención se establecen intervalos para la recolección de fracciones según los picos que se aprecian en el cromatograma; esto con el fin de poder identificar

mediante (EM) los componentes que estén presentes en la muestra. Dichas fracciones son recolectadas en los intervalos que se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Fracciones y tiempos de retención para la muestra D *Cannabis sativa*.

Número de fracción	Intervalo de tiempo de retención (minutos)
1	1.5 – 2.5
2	2.5 – 3.5
3	3.5 – 4.5
4	4.5 – 5.5
5	5.5 – 7.5
6	7.5 - 15

En total se realizaron 15 inyecciones de muestra cada una con un tiempo de análisis de 15 minutos, recolectando el eluato de forma tal que la temperatura y la luz no afecten la composición de la muestra. De cada una de las fracciones recolectadas se toman alícuotas de 2mL para el análisis a través de espectrometría de masas, a las cuales le es adicionado ácido fórmico como agente ionizante de forma tal que la concentración de este en la muestra sea 0.1%. El análisis por (EM) se inicia con la inyección de un blanco el cual consta de ACN. Los resultados del análisis de algunas de las fracciones se presentan en los espectros correspondientes a las figuras 17, 18, 19 y 20 respectivamente.

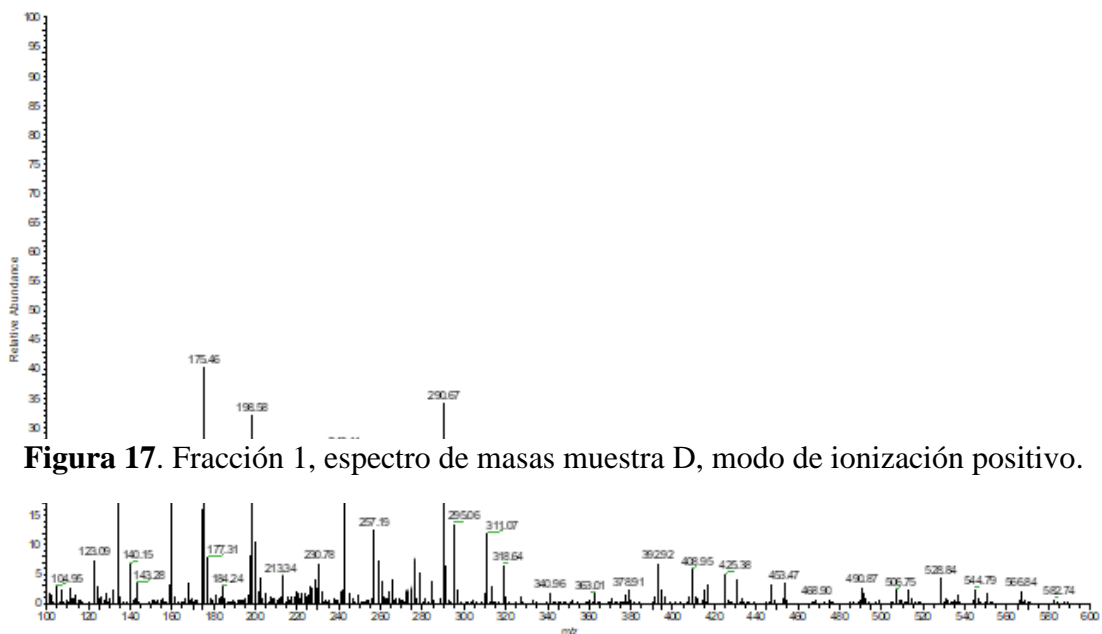
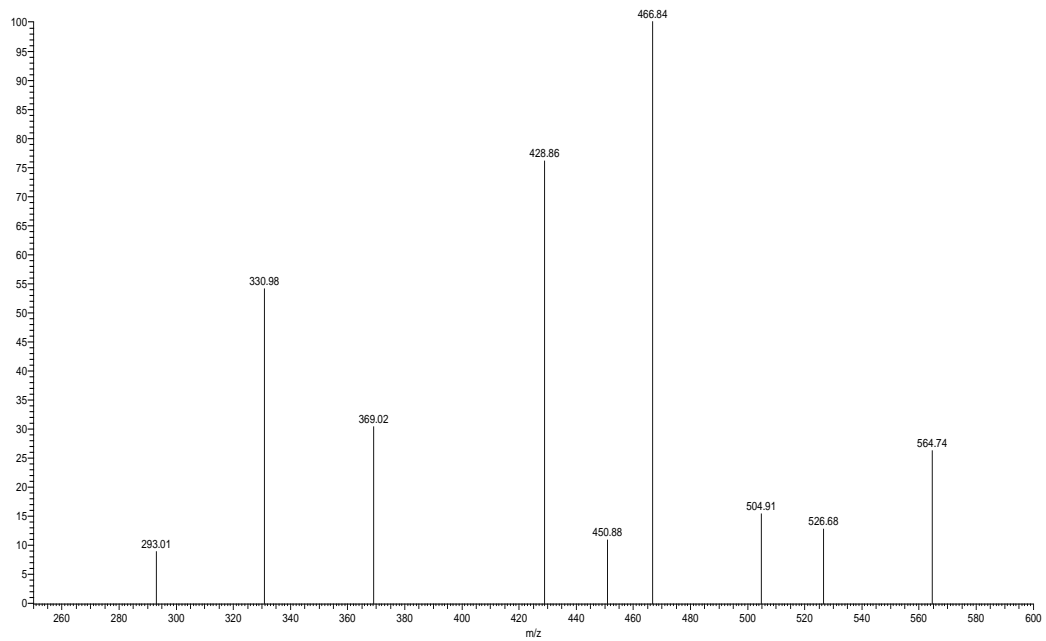


Figura 17. Fracción 1, espectro de masas muestra D, modo de ionización positivo.

Figura 18. Fracción 1, espectro de masas muestra D, modo de ionización negativo.

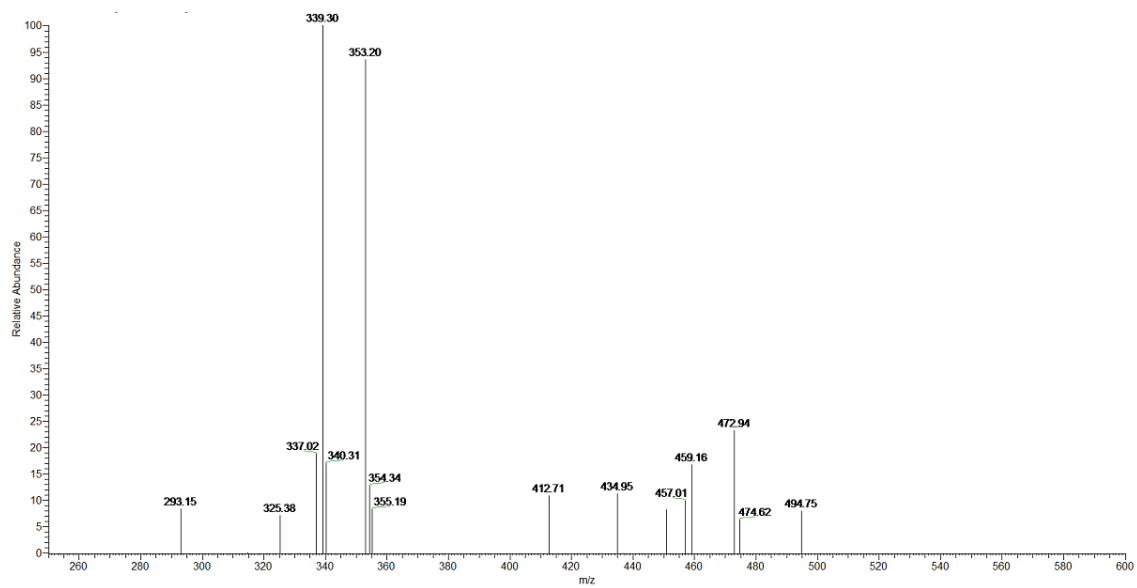


Figura 19. Fracción 5, espectro de masas muestra D, modo de ionización positivo.

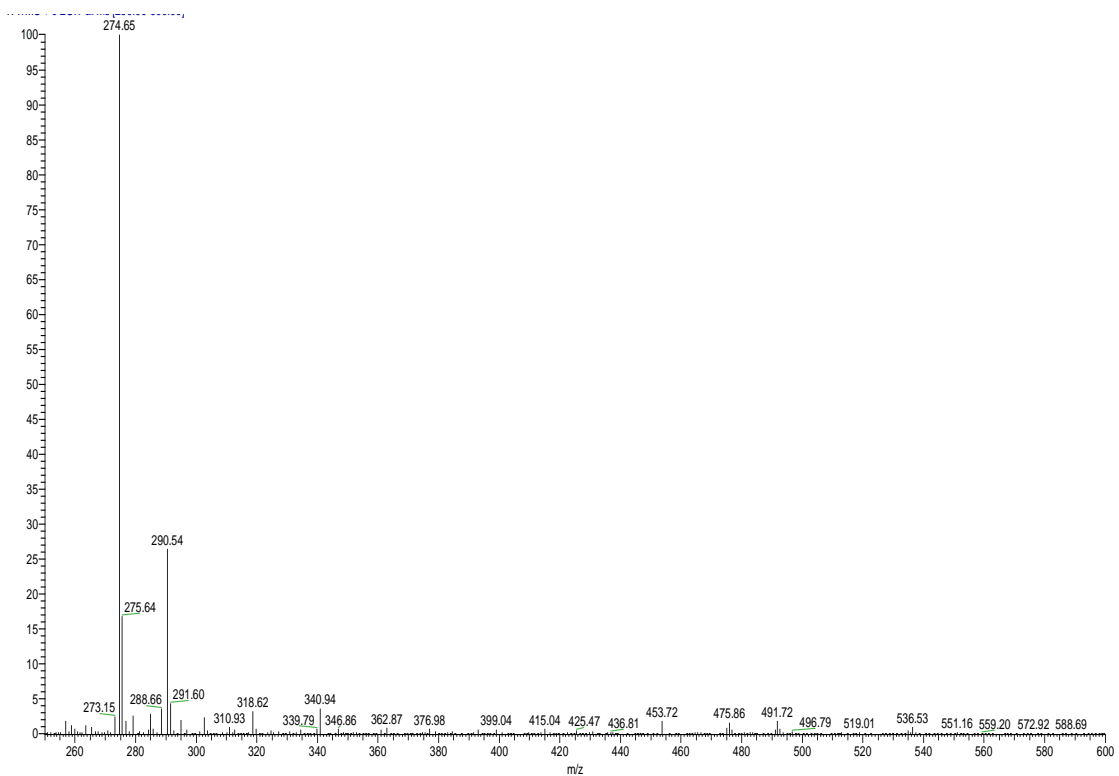


Figura 20. Fracción 5, espectro de masas muestra D, modo de ionización negativo.

Como se muestra en la figura 17, para la fracción 1 no se evidencia picos con m/z relacionados a compuestos cannabinoides. La base para las comparaciones de los pesos moleculares se justifica de acuerdo a los datos reportados en el trabajo realizado por (Tassi, González, Steffens, Scorsatto, & Pereira, 2017) donde se muestra una compilación de datos relacionados con la masa de compuestos de Cannabis. El espectro de la fracción 1 guarda relación con los datos obtenidos en el cromatograma, teniendo en cuenta que para este intervalo de tiempo esta señal pertenece al solvente (ACN), debido a que en cada inyección de muestra se realizaron inyecciones de solvente con el objetivo de que no quedara muestra y esta no interfiera en la siguiente inyección. De esta manera las inyecciones de solvente mostraban esta misma señal en el mismo intervalo de tiempo pudiendo establecer que esta señal posiblemente corresponde al ACN.

Sin embargo, es posible que estén presentes otro tipo de moléculas orgánicas tales como clorofilas, carotenoides, terpenos u otro tipo de compuestos presentes en la muestra (Aizpurua-Olaizola et al., 2016). Con base en lo ya descrito se evalúa la muestra mediante la ionización modo negativo (figura 18), de forma tal que permita claramente descartar la presencia de compuestos cannabinoides de interés para el análisis. Al evaluar la fracción 1 mediante la ionización en modo negativo los picos observados no corresponden a las formas desprotonadas de los principales cannabinoides buscados, sin embargo dichos picos probablemente corresponden a otros tipos de compuestos presentes en la matriz de la muestra tales como flavonoides o formas ácidas del Cannabis tal como se reporta en los trabajos realizados por (Borille et al., 2017; Nascimento et al., 2015) para este caso en especial se puede identificar picos a $m/z = 330.36$ y 295 los cuales posiblemente correspondan a la forma ácida del cannabinoide CBN y su respectivo fragmento.

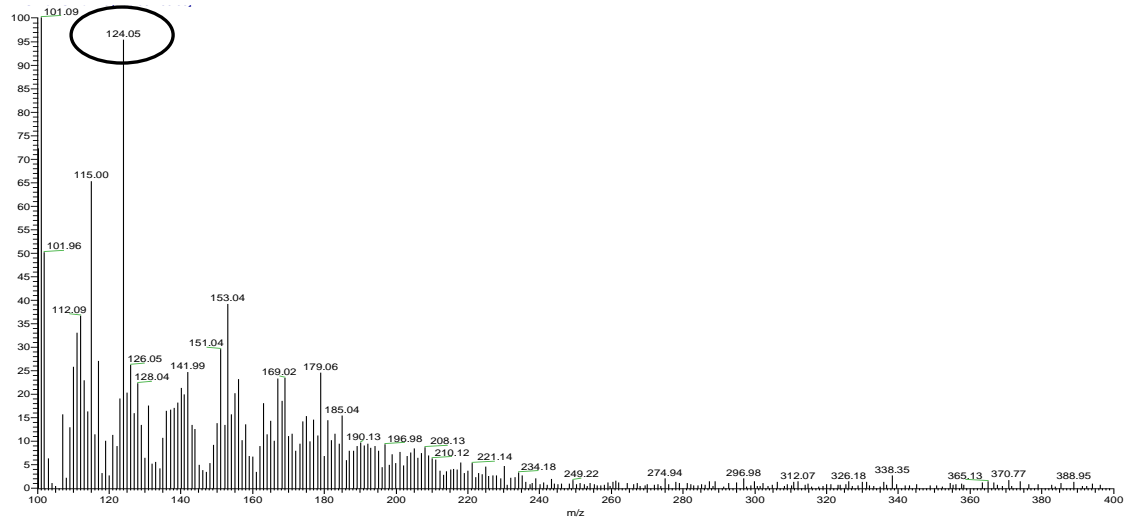
Debido a que no se presentaron picos de interés en los espectros de las fracciones sucesivas, se evalúa la fracción 5, la cual es la que se esperaría arrojará resultados teniendo en cuenta que representa la señal con mayor intensidad en el cromatograma (figura 16). De acuerdo a lo anterior se realiza la inyección de la fracción en el espectrómetro de masas efectuando el análisis en modo de ionización positivo y negativo obteniendo los espectros de la figura 19 y 20.

En este punto para el modo de ionización positivo (figura 19) no se encuentran picos asociados a cannabinoides, específicamente THC el cual de acuerdo a los resultados cromatográficos es el compuesto que debería estar presente en esta fracción y de forma similar en el modo de ionización negativo (figura 20), pero para este último espectro es posible identificar un pico de baja abundancia a $m/z = 355.19$ el cual probablemente corresponda al compuesto Δ^9 THCA-A y sus posibles fragmentos a $m/z = 353.20$, 325.38 , 293.15 , este hecho se suma a los posibles factores por los cuales no se evidencian señales de las formas neutras de cannabinoides lo cual se atribuye a la baja concentración de estos en la muestra. Sin embargo, teniendo en cuenta la alta sensibilidad del espectrómetro de masas puede llevar a pensar que este inconveniente este asociado a otro problema asociado con la separación cromatográfica.

Como se muestra en los espectros para las fracciones 1 y 5, aparentemente no hay evidencia de la existencia de los compuestos cannabinoides en sus formas neutras en estas fracciones como tampoco en cada una de las fracciones recolectadas. Posiblemente el problema como se mencionó anteriormente está asociado a la concentración o degradabilidad química de los cannabinoides en la muestra, teniendo en cuenta que dicha concentración depende de diversos factores como edad de la planta y estructuras de las cuales estos compuestos sean extraídos tales como tallo, hojas y donde se encuentran en mayor proporción en la inflorescencia de la planta (ElSohly & Slade, 2005). Lo anterior se fundamenta debido a que en cada inyección de muestra (100 ppm p/p) pasa a la columna una cantidad de 10 μ L los cuales son diluidos en 15mL (siendo este el tiempo total de análisis), teniendo en cuenta que se estima según reportes que solo un 9,55% corresponde a THC como componente mayoritario en la planta (Souleman, Gaafar, Abdel-Salam, & ElShebiney, 2017) se cree que dicha concentración en la muestra es muy baja razón por la cual no se aprecian picos correspondientes a cannabinoides en los espectros de masas en modo positivo en este punto.

De las 15 inyecciones realizadas la concentración antes mencionada se encuentra diluida en aproximadamente 15mL para la fracción 1 y en 30mL para la fracción 5 razón por la cual posiblemente no se presentó en el caso de la fracción 5 el pico a m/z 315 que corresponde a las moléculas de THC o posiblemente CBD. Con el objetivo de concentrar la muestra y además asegurar que esta no se degrade por efectos de temperatura se hace uso de la técnica de liofilización. Mediante esta técnica se logró concentrar las muestras hasta obtener una pequeña cantidad de sólido en todos los casos, los cuales fueron diluidos para el análisis por espectrometría de masas, de esta forma se permitió establecer claramente señales para los compuestos buscados.

Para el análisis de EM el sólido se solubilizó en 1 mL de fase móvil. Para cada una de las fracciones, las muestras son filtradas utilizando filtro de membrana de 0.22µm y se adiciona ácido fórmico como ionizante 5µL. las condiciones para el análisis espectrométrico se mencionan anteriormente, se inyectan 50µL de la muestra, el análisis para cada fracción se programa a 5min. Inicialmente se inyecta una muestra blanco la



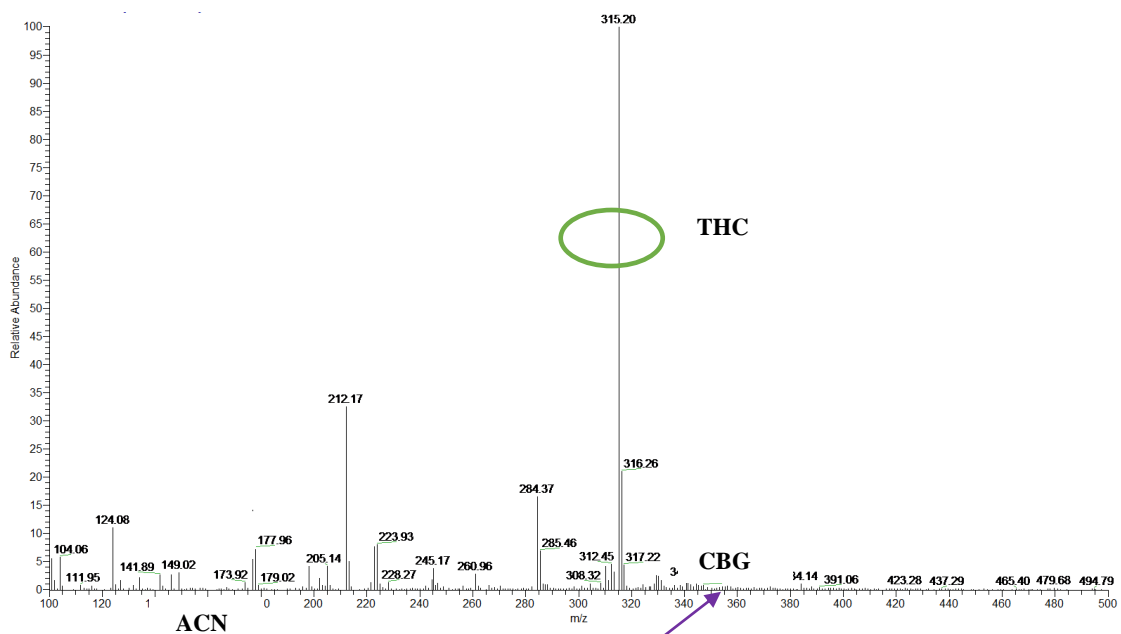
cual consta de ACN con el propósito de descartar todos aquellos posibles interferentes

Figura 21. Espectro de masas blanco ACN.

que se puedan dar en el análisis. En el espectro (figura 21) se presenta un pico con m/z 124.05 el cual está relacionado con ACN.

ACN

Posteriormente se inyecta una muestra del extracto de Cannabis 10 ppm (muestra D) con el objetivo de comprobar la presencia de compuestos pertenecientes a Cannabis. Esta prueba arrojó resultados claros donde se puede apreciar en mayor abundancia un



pico con m/z 315.20 (figura 22) el cual posiblemente puede corresponder a los

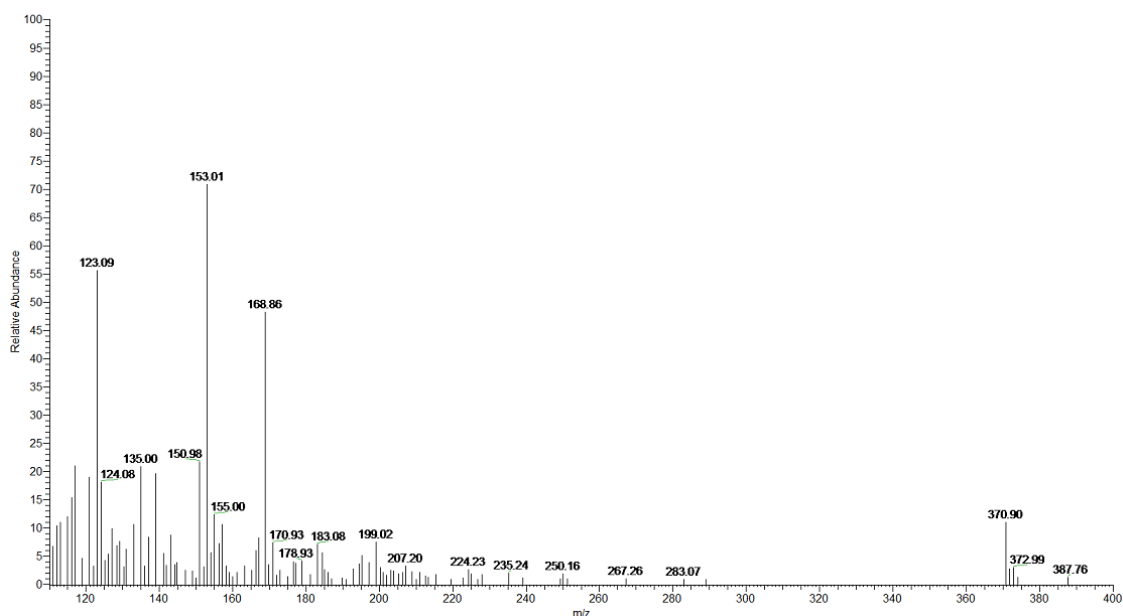


compuestos THC o CBD, también aparece un pico a m/z 316.26 que corresponde probablemente al compuesto CBG, esto de acuerdo a lo reportado por (Tassi et al., 2017) y otra señal a m/z 124.08 el cual corresponde al solvente utilizado (ACN).

Figura 22. Espectro de masas, muestra D Cannabis 10 ppm.

Como se puede apreciar en el espectro de la figura 22, la muestra D contiene compuestos de tipo cannabinoides, como THC o posiblemente CBD, los cuales por su estructura poseen el mismo peso molecular siendo el patrón de fragmentación el parámetro que permita diferenciar entre estos dos compuestos o mezcla racémica de los mismos (Deimler et al., 2014).

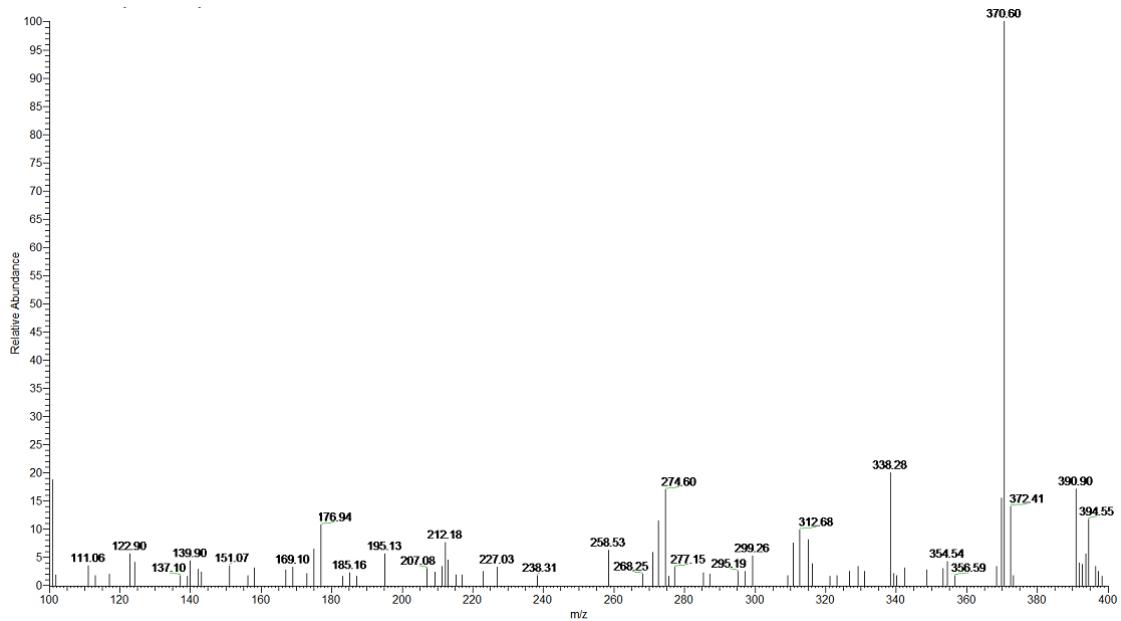
Debido a los problemas antes mencionados relacionados aparentemente con la concentración de la muestra, este ensayo permite establecer la presencia de dichos compuestos y de cierta manera comprobar que el proceso de concentración ayuda a encontrar cada compuesto o en menor medida algunos de los componentes que puedan estar presentes en las fracciones de las separaciones cromatográficas. De las fracciones recolectadas ya liofilizadas son inyectadas en el espectrómetro de masas desde la fracción 1 hasta la fracción 6 de la muestra D. Los resultados del análisis



espectroscópico se muestran a continuación, cuyos espectros de masas corresponden a las figuras 23, a la figura 28 respectivamente.

En el análisis de la fracción 1 para la cual se estableció el tiempo de retención estimado en el rango de 1.5 – 2.5 minutos tal como se muestra en el cromatograma (figura 16). De esta fracción se obtiene el espectro de masas figura 23, donde evidentemente no hay presencia de los principales compuestos cannabinoides, sin embargo, se pueden presentar diferentes tipos de moléculas correspondientes a otros analitos presentes en la

Figura 23. Fracción 1, espectro de masas muestra D

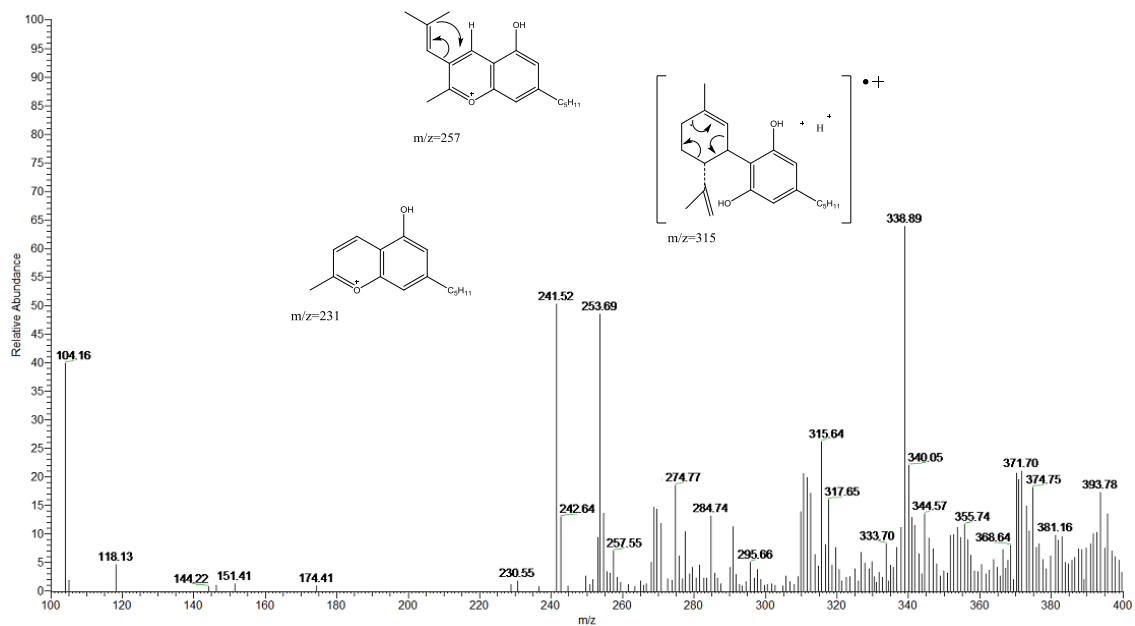


muestra que no absorben energía en este rango y por ende no son visibles en el cromatograma.

Figura 24. Fracción 2, espectro de mas: Contaminante



Para la fracción 2 en el cromatograma se observa un pequeño pico, tiempo de retención comprendido entre 2.5 – 3.5 minutos, se obtiene el espectro de masas (figura 24) donde no se encontró correspondencia con algún metabolito cannabinoide. El anterior

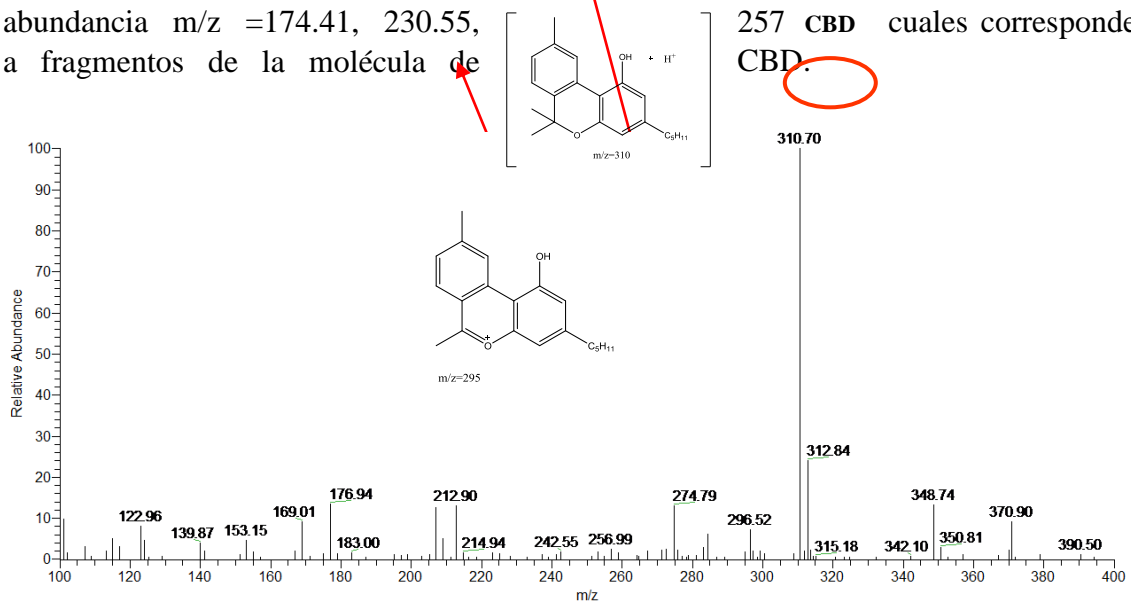


resultado es coherente ya que la intensidad de la señal en el cromatograma es muy poca

Figura 25. Fracción 3, espectro de mas muestra D.

lo que indica que no se refiera a algún compuesto de interés o perteneciente a Cannabis. Con relación al pico $m/z = 370.80$ se ha identificado según la base de datos Nist como un posible contaminante presente en la muestra el cual puede tratarse del compuesto IOXYNIL $C_7H_3I_2NO$, $m/z = 370,9138$ (Nist, 2018).

De acuerdo al cromatograma de la muestra D, la fracción comprendida en el intervalo entre 3.5 – 4.5 minutos (fracción 3), aparece un pico el cual puede ser relacionado según el cromatograma reportado para muestras cannabinoides y de acuerdo al orden de elución de los analitos, con la molécula de CBD. En la figura 25 se muestra el espectro de masas para esta fracción donde se puede apreciar un pico con $m/z = 315.64$ el cual según lo reportado por (Tassi et al., 2017) puede tratarse de la molécula de THC o CBD. Esta discrepancia puede resolverse desde el punto de vista de los posibles fragmentos que se puedan generar, al analizar este factor se pueden ver picos con una pequeña abundancia $m/z = 174.41, 230.55,$ a fragmentos de la molécula de

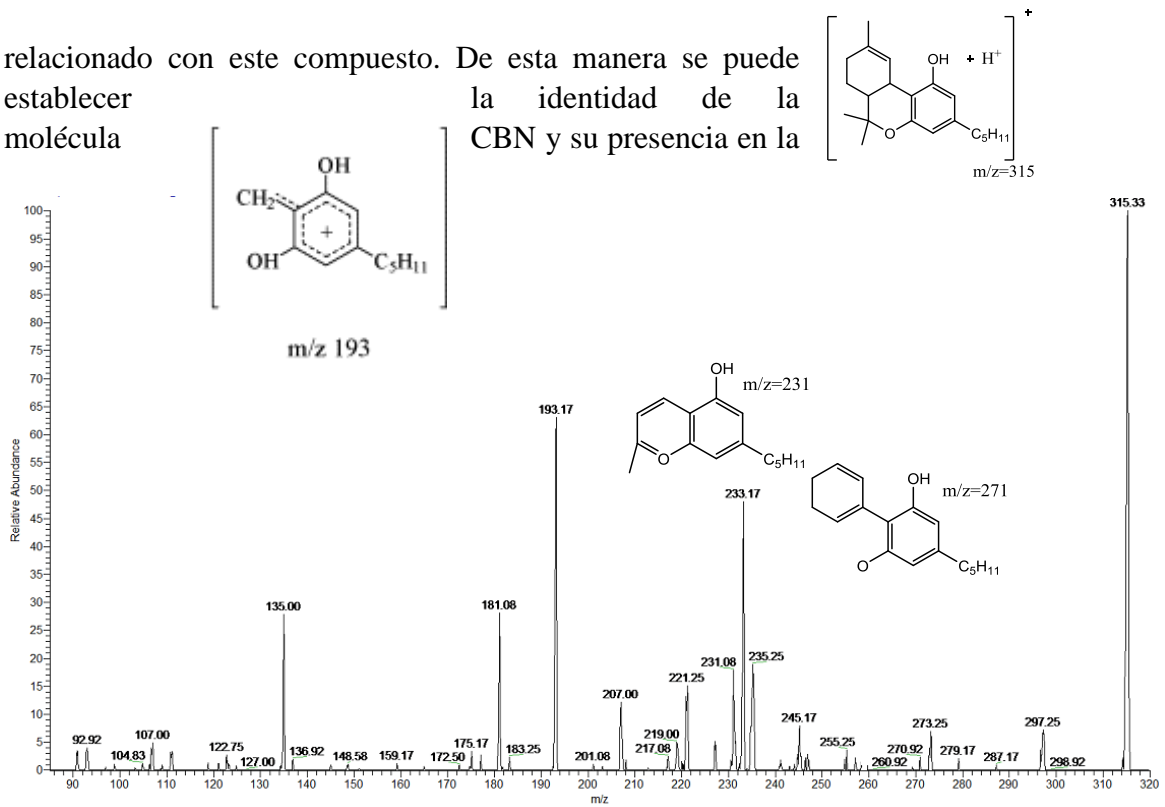


Este hecho sugiere basado en el patrón de fragmentación para esta molécula (figura 31) que posiblemente en la muestra D se encuentre presente el compuesto CBD en una pequeña cantidad lo cual está de acuerdo a la baja señal observada en el cromatograma y la pequeña abundancia de los picos en el espectro de masas.

Figura 26. Fracción 4, espectro de masas muestras CBN

En la fracción 4 del cromatograma se tiene un pico pequeño el cual puede ser asociado a la molécula de CBN (figura 16), el espectro de masas de esta muestra (figura 26) corrobora este hecho ya que se obtiene una señal a $m/z = 310.70$ y otro pico muy importante para $m/z = 296.52$ el cual corresponde al patrón de fraccionamiento (figura 30) de la molécula de CBN, esto está de acuerdo al cromatograma para esta fracción ya que el pequeño pico correspondiente al tiempo de retención 4.5 – 5.5 minutos está

relacionado con este compuesto. De esta manera se puede establecer la identidad de la molécula



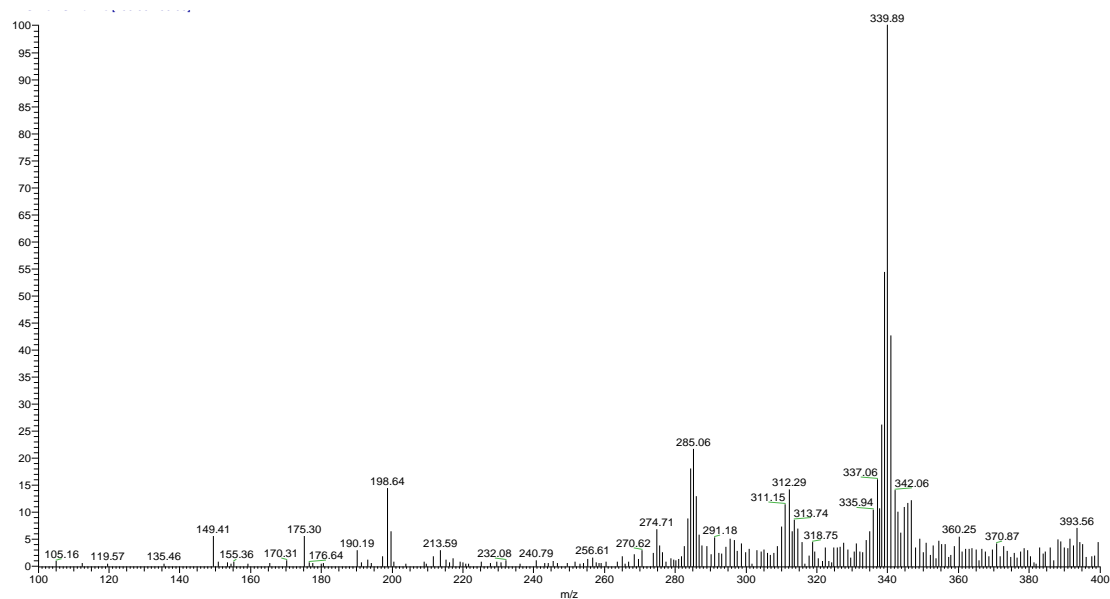
muestra. También está presente un pico de una abundancia relativamente pequeña $m/z = 315.18$ esto se puede explicar desde el punto de vista de la proximidad de los picos en la separación cromatográfica o también por el hecho que el THC por sus características termolábiles y fotolábiles o por el almacenamiento prolongado de la muestra conduce a una disminución del contenido de THC a través de la oxidación a CBN (Bruci et al., 2012).

THC

Para la fracción 5 tiempo de retención en el intervalo comprendido entre 5.5 – 7.5 minutos se tiene el pico con mayor intensidad en el Cromatograma, y que de acuerdo a los trabajos realizados por (Gambaro et al., 2002; Jamwal, Topletz, Ramratnam, & Akhlaghi, 2017; Mechtler, Bailer, & De Hueber, 2004) corresponde a la molécula de THC. Lo anterior se fundamenta desde el punto de vista que en muestras de Cannabis el componente mayoritario es el THC, este hecho se pudo comprobar con el espectro de masas obtenido para esta fracción (figura 27) donde se presenta un pico con $m/z = 315.02$. Como ya se mencionó hay dos alternativas que se trate de THC o CBD.

Como en los casos anteriores el parámetro que permite identificar la molécula son las fragmentaciones características para que se puedan presentar para cada una de ellas, en este caso para el compuesto THC existen dos tipos de isómeros para este compuesto, uno el Δ 1-2 THC, y el Δ 1-6 THC.

Figura 27. Fracción 5, espectro de masas muestra D. ■ Fragmentos molécula THC.



Como se puede apreciar en el espectro de masas para esta fracción se presentan picos a m/z 270.92, 231.08 y el más importante a considerar $m/z = 193.17$ los cuales guardan relación con el patrón de fragmentación perteneciente a THC (figura 29) lo cual permite deducir que en la muestra posiblemente se encuentra presente el isómero Δ 1-6 THC.

Figura 28. Fracción 6, espectro de masas muestra D.

La fracción 6 de la separación cromatográfica, comprendida en el intervalo 7.5–15 minutos no se presentan aparentemente compuestos cannabinoides. Se observa un pico prominente a $m/z = 339.89$ (figura 28) el cual posiblemente puede corresponder a algún tipo de compuesto presente en la muestra y que debido a la amplia gama de compuestos no solo cannabinoides no ha sido identificado. Debido a esto no es clara la presencia de cannabinoides el cual de cierta forma ratifica el hecho de que la separación cromatográfica en este punto no contiene compuestos cannabinoides de interés en el rango restante del cromatograma.

De acuerdo a los resultados de cada una de las fracciones las cuales fueron analizadas por espectrometría de masas, se puede afirmar que la muestra D presenta los metabolitos cannabinoides asociados a posibles efectos benéficos sobre la salud en el tratamiento de diferentes patologías como ha sido reportado a través de diversos estudios a nivel mundial (Baker, Pryce, Giovannoni, & Thompson, 2003; Ben Amar, 2006; Felli, Martello, & Chiarotti, 2011; Ganzera & Sturm, 2018; Velasco, Hernández-Tiedra, Dávila, & Lorente, 2016).

En este caso se encontró que la muestra contiene los compuestos CBD, CBN y en mayor cantidad THC como era de esperarse según lo reportado por la literatura, además como se mostró se pudo verificar en el análisis cromatográfico y comprobar en la espectrometría de masas que en la muestra se presenta una mayor abundancia para el compuesto con $m/z = 315$ el cual corresponde a la molécula de THC. Sin embargo, desde otro punto de vista, esto representaría un punto de controversia ya que el compuesto THC a pesar de tener efectos beneficiosos sobre la salud tiene un elevado efecto psicotrópico, lo cual puede ser interpretado desde el punto de vista legal como una limitante para la fabricación de este tipo de productos y más aún si estos no cuentan con ningún tipo de prescripción médica ni contenido de la composición detallada de los compuestos de tipo cannabinoides que presente el producto.

6.1 PATRONES DE FRAGMENTACIÓN EM DE COMPUESTOS CANNABINOIDES.

Patrón de fragmentación Δ 1-2 THC

Patrón de fragmentación Δ 1-6 THC

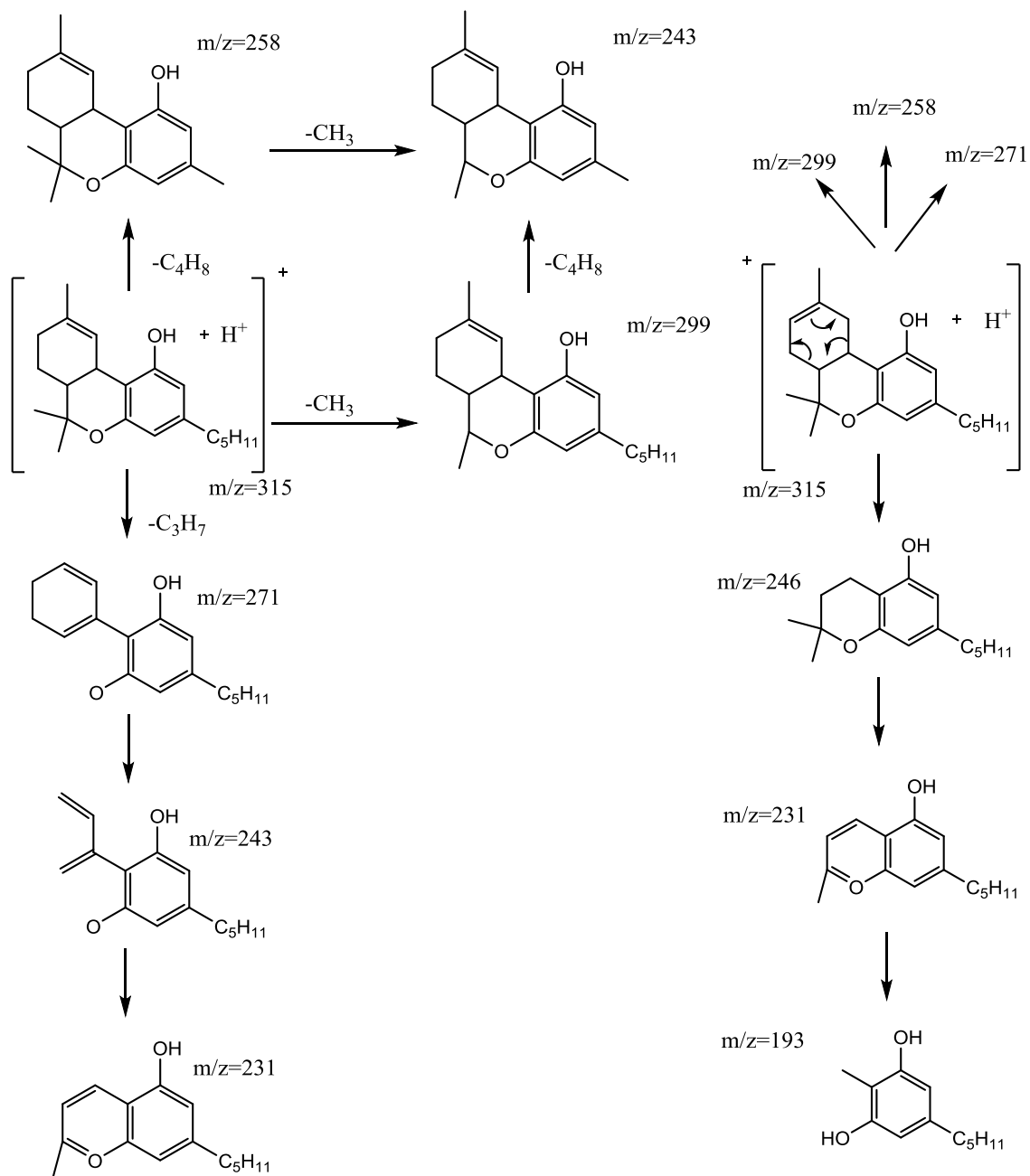


Figura 29. Patrón de fragmentación 1-2 THC, 1-6 THC (Coulter, Garnier, & Moore, 2012; Vree et al., 1971).

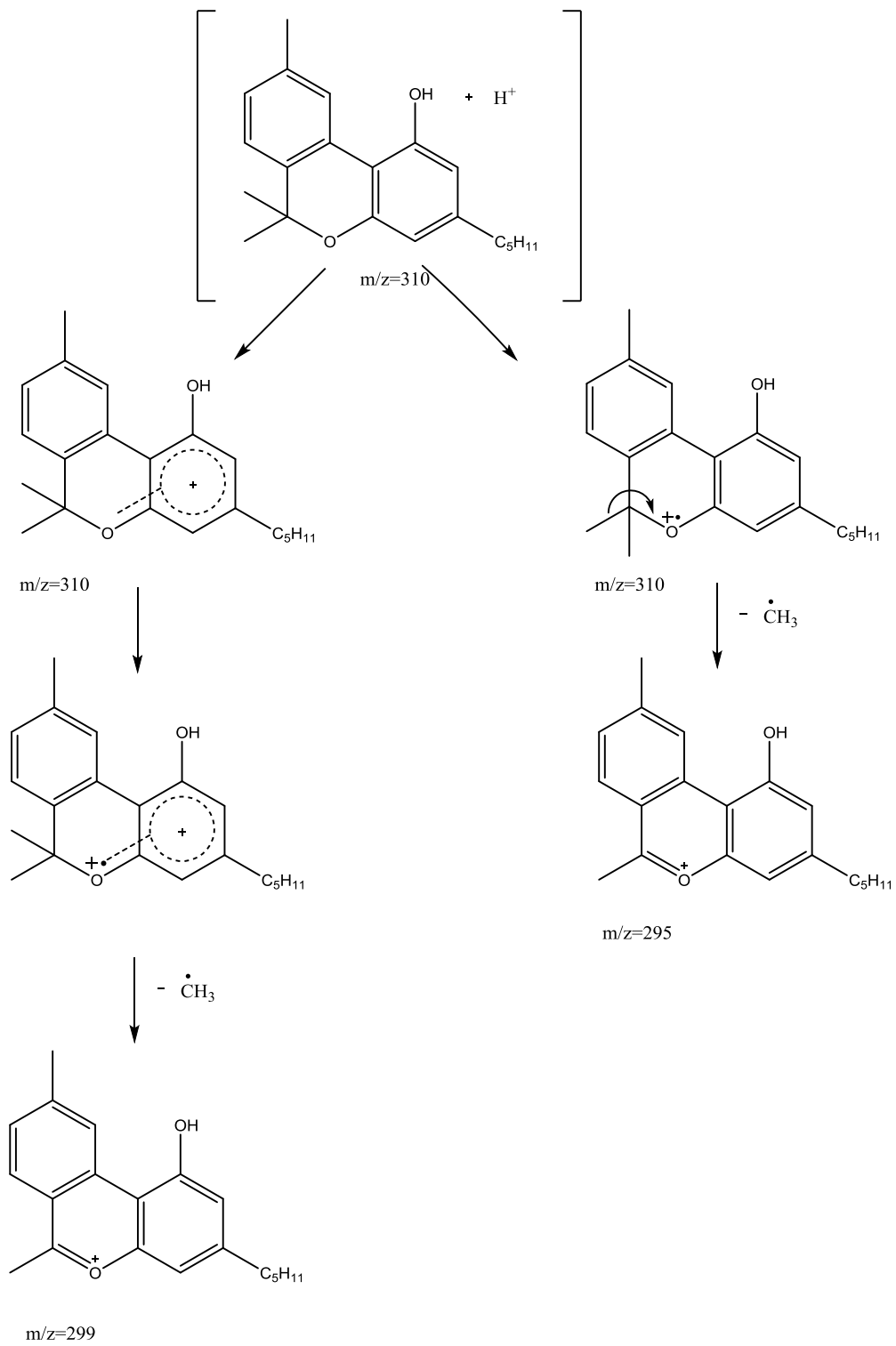


Figura 30. Patrón de fragmentación CBN (Vree, 1977).

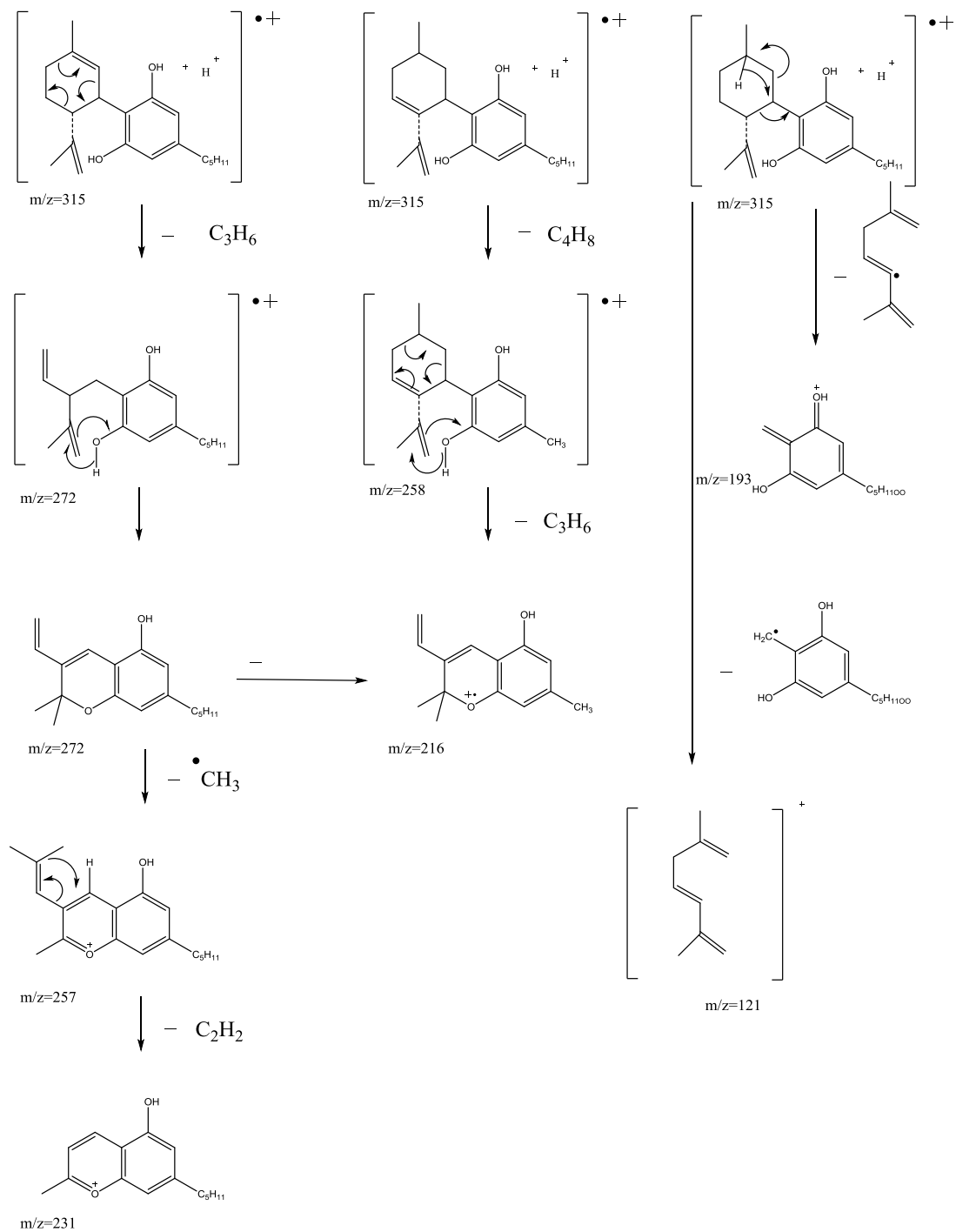


Figura 31. Patrón de fragmentación CDB (Kuppers, Bercht, Salemink, Terlouw, & Heerma, 1975).

Posteriormente se procede al análisis de la muestra E, siguiendo las mismas condiciones cromatográficas y espectrométricas ya mencionadas anteriormente. De manera similar a la muestra D se realizan inyecciones sucesivas de la muestra previamente filtrada la cual es preparada a una concentración de 100 ppm p/v. El Cromatograma respectivo se muestra en la (figura 32) donde presenta características similares al Cromatograma de la muestra D, sin embargo, puede apreciarse una diferencia en cuanto a la intensidad de los picos con relación al compuesto CBD ya que su intensidad es considerablemente más pequeña que al obtenido en la muestra D, esto puede ser indicativo de una menor cantidad de este compuesto en la muestra. Cabe destacar que cada una de las inyecciones para la recolección de las fracciones presentó reproducibilidad de las señales y tiempos de retención, los cuales fueron definidos para la obtención de las fracciones.

De forma similar a lo realizado con la muestra D se calculan los parámetros cromatográficos con base en el cromatograma obtenido para la muestra E (figura 32).

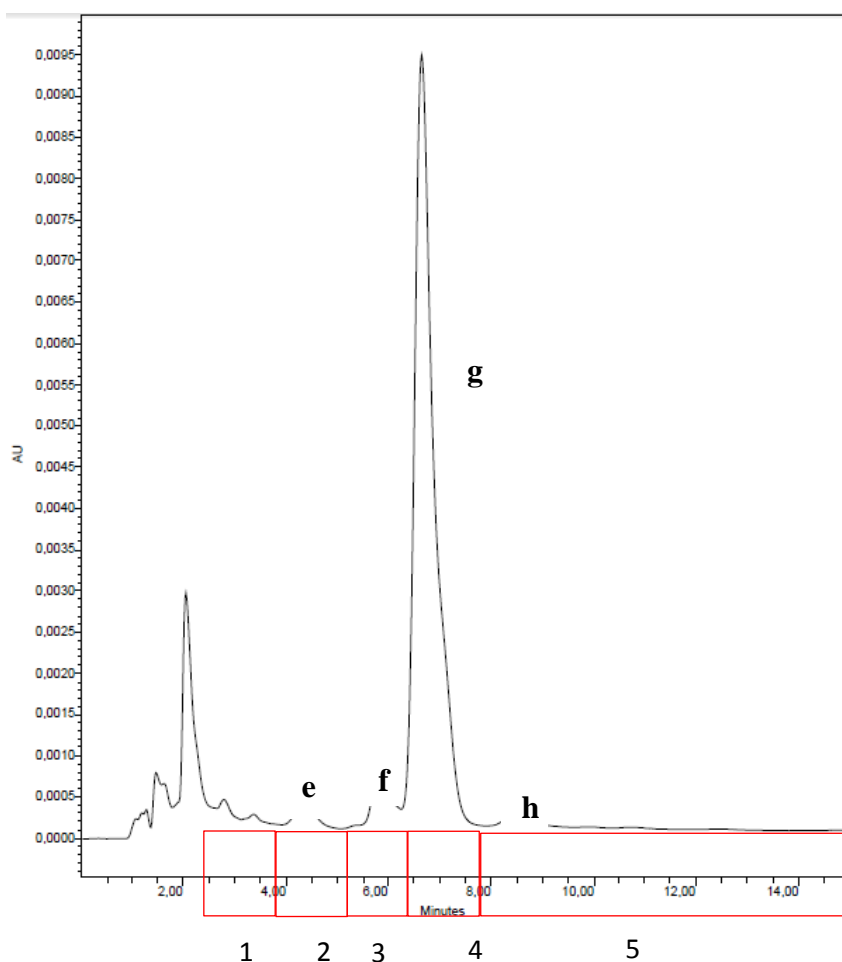


Figura 32. Cromatograma y fracciones recolectadas para el análisis por EM. Muestra E (31.6mg/10mL) 3160ppm. Se toma alícuota hasta llevar a 10 ppm. $\lambda= 220\text{nm}$ (Fase móvil ACN/ PO_4 65/35). Flujo de fase móvil 1mL /min.

Los parámetros cromatográficos: Velocidad lineal promedio de migración de solutos factor de retencion se calculan mediante la ecuación 1 y 2. Los resultados se muestran en la tabla 8

Tabla 8. Resultados: Velocidad lineal promedio de migración de los solutos, factor de retención del analito muestra D.

Número de pico	Tiempo de retención (min)	Velocidad promedio de migración del soluto (cm/min)	Factor de retención
e	4.271	3.512	1.105
f	5.773	2.598	1.845
g	6.615	2.267	2.260
h	7.361	2.037	3.120

Relación de picos	Factor de selectividad
α_{f-e}	1.669
α_{g-f}	1.224
α_{h-f}	1.381

El factor de selectividad se calcula mediante la ecuación 3.

Bajo el mismo procedimiento se obtiene el factor de selectividad, los resultados se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Resultados factor de selectividad muestra E.

Respecto a los datos obtenidos, estos son muy similares a los de la muestra D en relación a magnitud ya que en ambas muestras los cromatogramas son similares. Sin embargo, se muestra una ligera variación en cuanto a la retencion relativa de la muestra E ya que para el último pico este se encontraría más retenido a la fase estacionaria lo

cual puede ser explicado de acuerdo a la polaridad de la especie presente en esta parte del cromatograma.

En cuanto al factor de selectividad la separación de los picos es aceptable ya que como en el caso anterior es superior a 1, aunque hay cierta proximidad entre los picos f y g lo cual no representó inconveniente para la recolección de las fracciones. Mediante estos datos se procede a la recolección de las fracciones pertenecientes a la muestra E. Cabe resaltar que para esta muestra se recolectaron 5 fracciones y se determinó que la señal presentada en el intervalo de 1.5 a 2.5 minutos al igual que en la muestra D corresponde al ACN debido a su confirmación con el espectro de masas, fracción 1 de la muestra D, (figura 17 y 23). Se realizaron 15 inyecciones sucesivas de las cuales se recolectan alícuotas de 2mL y estas son llevadas al igual que en el caso anterior al liofilizador durante 2 días obteniendo un sólido blanquecino con la misma apariencia de la muestra D. Cada una de las muestras en estado sólido son diluidas en un volumen de 1mL de fase móvil y le es adicionado 5 μ L de ácido fórmico 0.1 % en la muestra.

Ya establecidas las condiciones de análisis se inyectan 50 μ L de muestra durante 5 minutos para cada análisis en el espectrómetro de masas.

Tabla 10. Fracciones y tiempos de retención para la muestra E *Cannabis sativa*.

Número de fracción	Intervalo de tiempo de retención (minutos)
1	2.5 – 3.5
2	3.5 – 5.0
3	5.0 – 6.0
4	6.0 – 8.0
5	8.0 – 15

El análisis espectroscópico de la muestra E se inicia con la inyección de un blanco el cual consta básicamente de ACN, siendo esta la fase móvil de trabajo, en este punto como muestra la (figura 33) no se observa picos de importancia a excepción del pico con $m/z = 124.08$ el cual como ya se mencionó corresponde al solvente. Estos resultados para esta fracción son de esperarse teniendo en cuenta que el cromatograma de la muestra E (figura 32) los picos son de una intensidad muy baja e incluso menores en intensidad a la señal del solvente.

○ ACN

De forma similar a lo experimentado con la muestra D, se efectúa la inyección de una muestra de Cannabis (muestra E) con el fin de identificar los componentes que estén presentes, siendo este un indicio para la recolección de las fracciones. A partir de lo experimentado con la muestra anterior donde se realizó este mismo proceso, siendo este necesario ya que a partir de los datos de los posibles picos que puedan estar presentes permite tener certeza del proceso que se lleva a cabo en la identificación de los compuestos cannabinoides. Los resultados se muestran en la (figura 34) donde se presenta un pico a $m/z = 315.72$ para el cual existe la posibilidad que se trate de las moléculas THC o CBD. También se pueden ver picos para $m/z = 316.79$ y 310.80 los

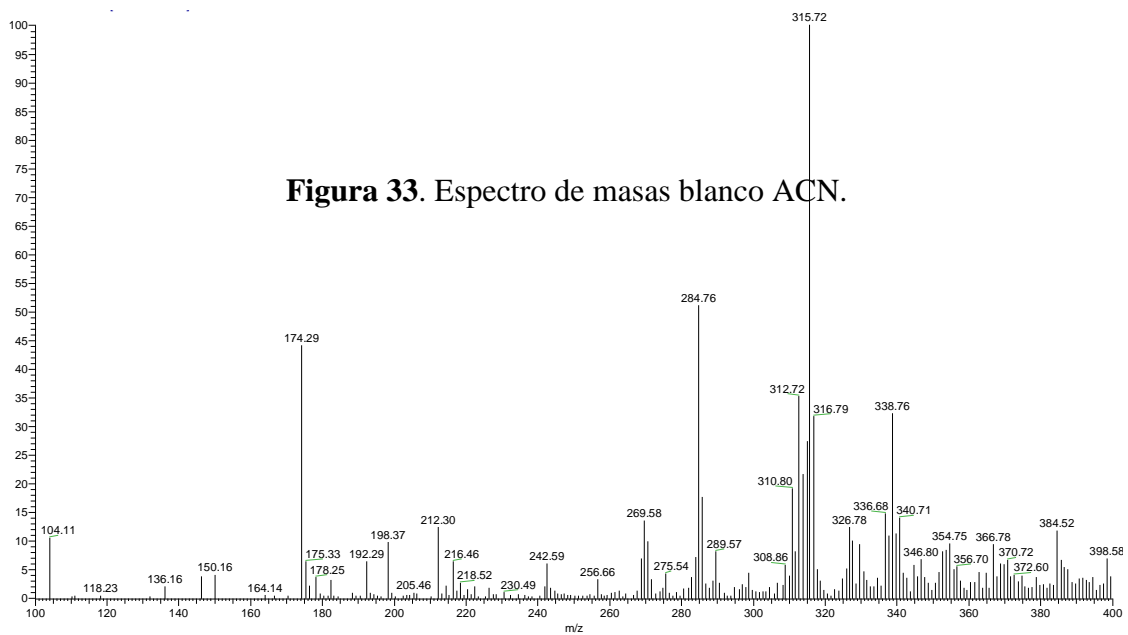


Figura 33. Espectro de masas blanco ACN.



Figura 34. Espectro de masas muestra E Cannabis.

cuales están asociados a CBG y CBN respectivamente.

○ THC o CBD

Como se muestra en la figura 34 para la muestra E es posible identificar algunos de los posibles componentes presentes en la muestra, sin embargo existe una incógnita en cuanto a la identidad del pico para $m/z=315$, ya que como se ha mencionado puede tratarse de los compuestos THC o CBD, además el objetivo es identificar los posibles compuestos presentes en cada una de las fracciones que se obtuvieron de la separación cromatográfica de la muestra E, es por ello que de forma similar a lo realizado con la muestra D se experimenta inyectando cada una de las fracciones bajo las mismas condiciones de trabajo en el espectrómetro de masas. Los resultados y espectros de masas para cada una de las muestras, iniciando desde la fracción 1 hasta fracción 5 (figuras 35 - 39) se muestran a continuación.

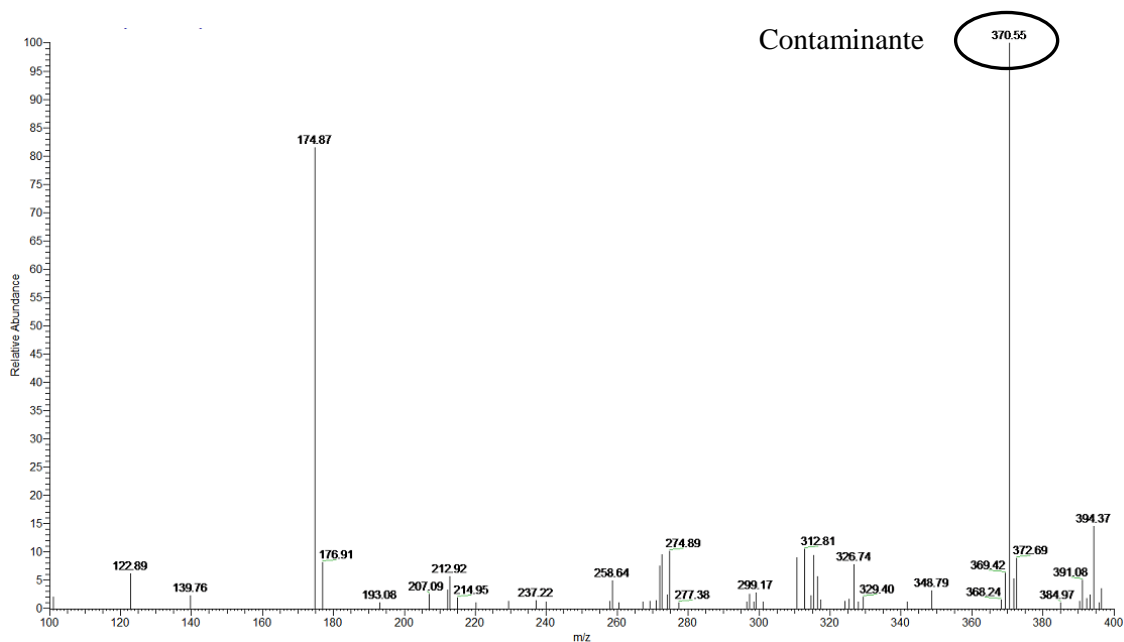


Figura 35. Fracción 1 muestra E Cannabis.

Con base en los resultados del espectro de masas de la muestra E (figura 34), el espectro de la fracción 1 (figura 35) muestra un pico prominente a $m/z = 370.55$ el cual posiblemente este asociado a un contaminante como se mencionó anteriormente. De acuerdo a los resultados para esta fracción son coherentes con los picos presentes en el Cromatograma para la muestra E ya que no se presenta un tipo de pico con una absorción intensa en esta región del cromatograma 2.5 – 3.5 minutos.

El espectro de masas de la fracción 2 se muestra en la figura 36, para el cual aparece un

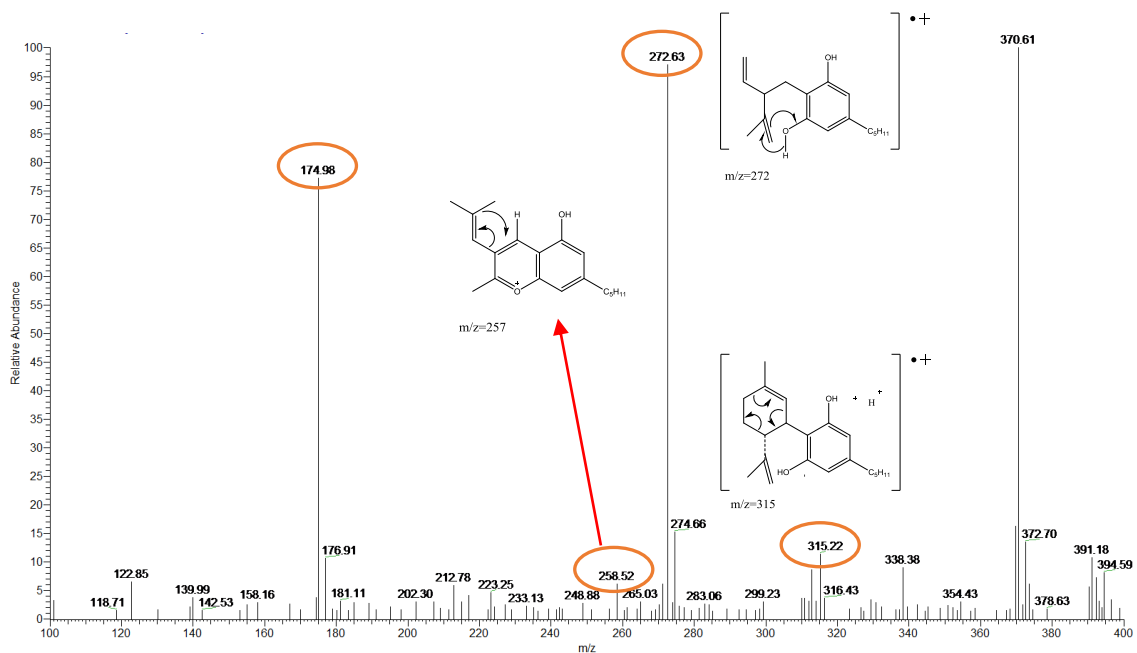


Figura 36. Fracción 2 muestra E Cannabis.

pico para $m/z = 315$ el que puede tratarse de la molécula de THC o CBD, sin embargo, de acuerdo al cromatograma para esta muestra, indica que para la fracción 2 probablemente esté presente el compuesto CBD de acuerdo al orden de elución ya analizado. Lo anterior se pudo comprobar al estudiar su espectro de masas ya que se presentan fragmentaciones típicas para este compuesto a $m/z = 174.98, 258.52, 272.63$, lo cual permite comprobar la existencia de este compuesto en la muestra, lo anterior se asume de acuerdo a su patrón de fragmentación.

Respecto a los espectros de la fracción 3 muestra D y la fracción 2 muestra E los cuales están relacionados con la misma molécula CBD se puede apreciar que para el primero aparentemente habría una mayor cantidad del cannabinoide debido a que la señal es más abundante para el pico a $m/z = 315$, sin embargo, las fragmentaciones de este son de poca intensidad si se relacionan con la muestra E, fracción 2, para la cual la intensidad de $m/z = 315$ es inferior, esto puede ser indicativo de que la mayor parte de la molécula se rompe para generar este tipo de iones. Al comparar estos resultados se obtiene una mayor abundancia del cannabinoide CBD en la muestra D lo cual puede estar asociado a diversos factores como la edad de la planta, condiciones ambientales, condiciones de extracción o el almacenamiento que haya tenido el material vegetal hasta la elaboración del producto.

Desde el punto de vista terapéutico esto es importante ya que la muestra D a pesar del alto contenido de THC tiene mayor cantidad de CBD en comparación con la muestra E, ya que es conocido que el CBD no presenta efectos de droga sobre el consumidor, pero si presenta efectos beneficiosos sobre pacientes con problemas como falta de sueño, pérdida de apetito y también en enfermedades como la esclerosis múltiple (Ben Amar, 2006).

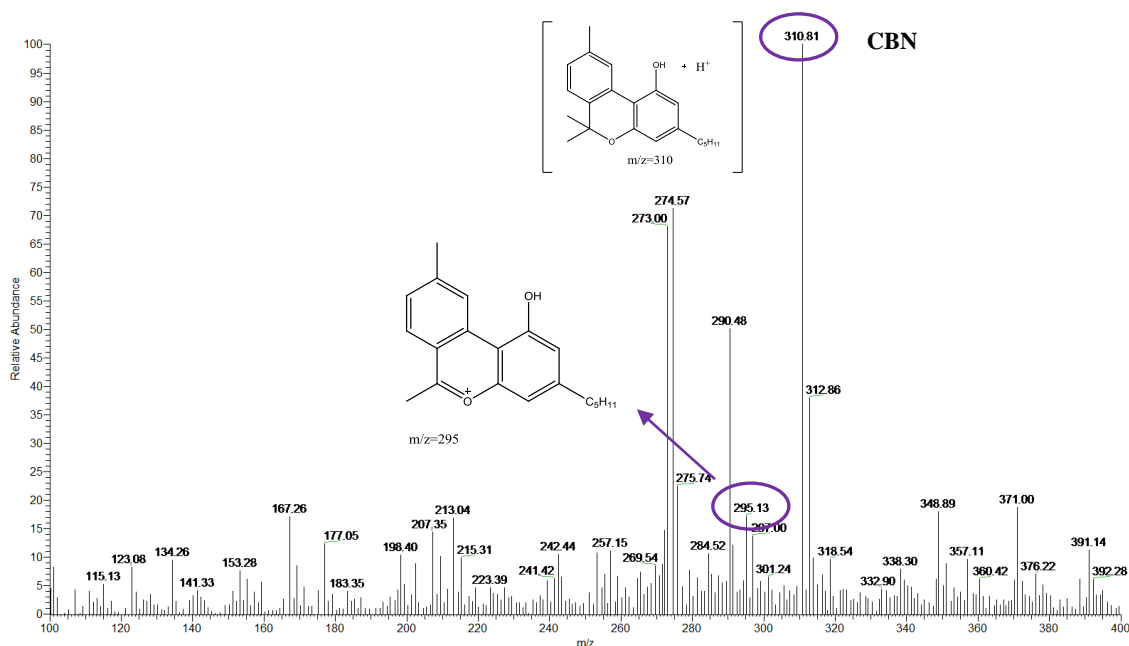
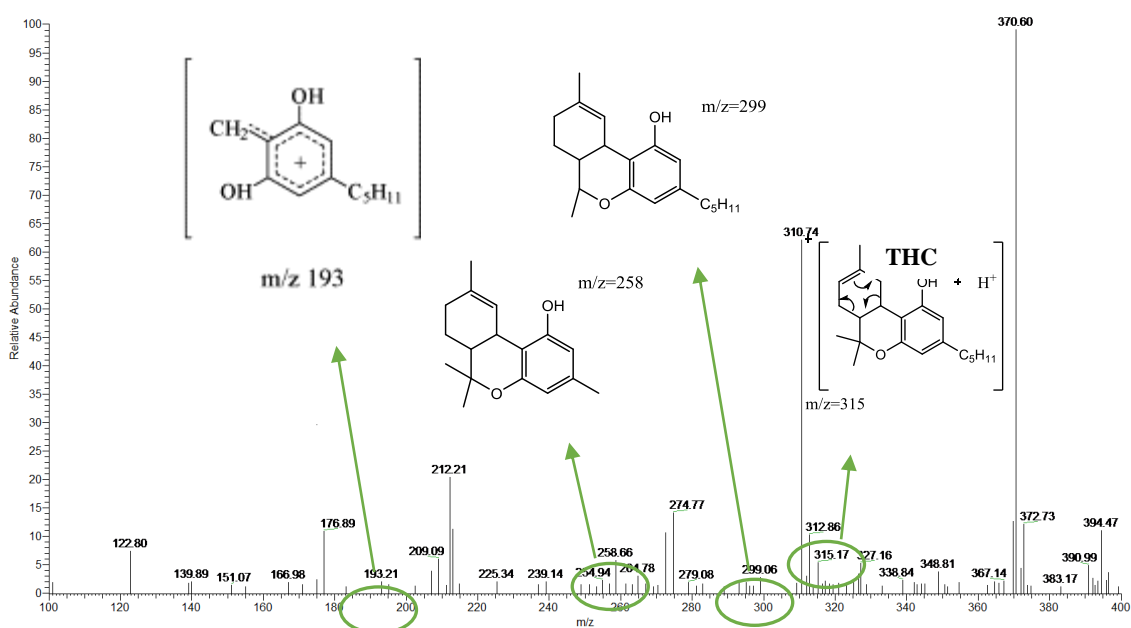


Figura 37. Fracción 3 muestra E Cannabis.

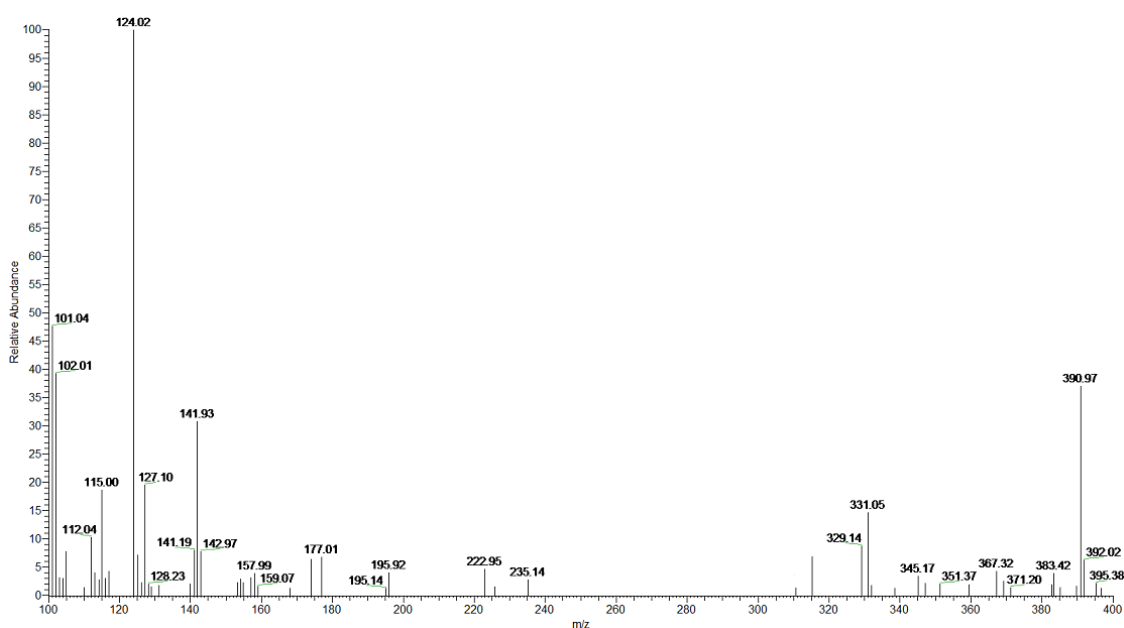
En la fracción 3 de la muestra E cuyo espectro de masas se muestra en la figura 37 presenta un pico con $m/z = 310.81$ este corresponde a la molécula de CBN, y un pico con $m/z = 295.13$ el cual guarda relación con este compuesto ya que es una fragmentación del mismo, este tipo de comportamiento valida el hecho de que la fracción obtenida por CLAR en el intervalo de 5 – 6 minutos se encuentra presente el compuesto CBN y que dicha señal cromatográfica está relacionada con esta biomolécula. En este orden de ideas si se compara los resultados de las muestras E y D para el compuesto CBN, el cromatograma para la muestra E muestra una mayor intensidad de pico lo cual se ve reflejado en el espectro de masas para la fracción 3 figura 37 mostrando mayor abundancia del pico característico y la fragmentación perteneciente a este compuesto, esto representa posiblemente una mayor abundancia de CBN en la muestra E.



La figura número 38 representa el espectro de masas de la fracción 4 del análisis cromatográfico en el intervalo de tiempo que abarca de 6 - 8 minutos, para el que se encuentra picos correspondientes a la molécula de THC con $m/z = 315.17$ y los tipos de fragmentaciones que confirman la presencia de este compuesto a $m/z = 193.21$, 258.66 , 299.06 , comprobando de esta manera que en la fracción se encuentra el compuesto THC y que de acuerdo a este patrón de fragmentación se trataría del isómero Δ 1-6 THC (Vree et al., 1971).

Con respecto a la abundancia de los picos es muy baja lo cual puede ser indicativo de una menor cantidad del compuesto THC en la muestra E, lo cual desde el punto de vista cromatográfico no está de acuerdo con la intensidad de dicho pico en este intervalo de tiempo de retención, ya que se presenta como un pico agudo y de un área relativamente superior al resto de señales, lo cual lleva a pensar la influencia de la estabilidad de la

muestra ya que parte del THC se transforma a CBN con la exposición prolongada de este compuesto, esto tendría sentido ya que como se analizó la cantidad de CBN es considerablemente alta para la muestra E si se tiene en cuenta la señal que se presenta, o simplemente la cantidad de este compuesto en la muestra E es inferior en comparación como ya que como se vio en la muestra D. Lo anterior es una variable de gran importancia a considerar ya que el producto tendría una menor eficiencia sobre el tratamiento para el cual es formulado teniendo en cuenta que el THC a pesar de su efecto psicoactivo tiene una acción sinérgica con el compuesto CBD sobre el tratamiento de algunas enfermedades específicas como falta de sueño, pérdida del apetito entre otras (Alexander, 2016). De acuerdo a esto representaría una limitante desde el punto de vista que este producto no cumpliría con la acción y efecto con el cual es comercializado.



ACN

Figura 39. Fracción 5 muestra E Cannabis.

Para la fracción 5 se tiene el espectro de la figura 39 donde aparentemente no se presentan compuestos de tipo cannabinoides, pero se tienen picos para $m/z = 124.02$ el cual corresponde a la fase móvil ACN.

Estos resultados en contraste con los de la fracción 6 de la muestra D son similares desde el punto de vista cromatográfico ya que en este punto no se presentan picos con intensidad considerable que represente la existencia de algún compuesto de interés.

Partiendo del hecho de que los resultados del análisis espectrométrico sugiere que posiblemente estaría presente el isómero Δ 1-6 THC en las dos muestras comerciales

estudiadas, esto implicaría que dichas muestras tendrían un efecto sobre el tratamiento de patologías cardíacas como también sobre trastornos como la falta de apetito o pérdida del sueño según estudios realizados por (Grotenhermen & Russo, 2002; Li & Ng, 1984), lo cual representa un aspecto positivo sobre el uso de estos productos.

Teniendo en cuenta que los cromatogramas para las dos muestras son similares en cuanto a variables como intensidad y tiempos de retención, se pudo encontrar a través del análisis de espectrometría de masas que se presentan variaciones en cuanto al contenido de THC, CBD y CBN en las muestras estudiadas, específicamente para la muestra D que tiene aparentemente el mayor contenido de Δ 1-6 THC y CBD, lo cual implicaría que esta muestra presente un mayor potencial terapéutico en comparación con la muestra E.

La variación del contenido de cannabinoides en las dos muestras posiblemente esté relacionado con factores limitantes como lo son las condiciones de extracción, temperatura exposición continua a la luz, o el almacenamiento prolongado del producto, generando un cambio en su composición final. Esto representa un tema de relevancia ya que estos productos son comercializados sin algún tipo de información sobre el contenido real de cannabinoides siendo esto muy importante ya que de ello depende el uso para el cual sea destinado, como en este caso se comercializa como tratamiento para aliviar diferentes enfermedades

Con base en los resultados ya mencionados relacionados con la presencia de compuestos de tipo cannabinoides en las dos muestras estudiadas, para hacer más claro el análisis realizado para cada una de las fracciones obtenidas por CLAR en la tabla 11 se presentan las masas específicas y fragmentaciones obtenidas para cada compuesto.

Tabla 11. Cannabinoides presentes en las muestras D y E. "x" = cannabinoide presente.

m/z	THC 315	Iones producto	CBD 315	Iones producto	CBN 310	Iones producto	CBG 316	Iones producto
Muestra D	x	----					x	----
Fracción 1	----	----					----	----
Fracción 2	----	----					----	----
Fracción 3		----	x	174.41, 230.55, 257.56	----			
Fracción 4				----	x	256.52	----	
Fracción 5	x	193.17,231.08, 270.92	----	----	----			
Fracción 6	----	----	----	----				
Muestra E	x	----	----	174.29	x	----	x	----
Fracción 1	----		----		----		----	
Fracción 2		----	x	174.98, 258.52, 272.63	----			
Fracción 3				----	x	296.13		

Fracción 4	x	193.21, 258.86, 299.06	----					
Fracción 5	----	----	----					

7 CONCLUSIONES

- ✓ Se logró identificar mediante la implementación de cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas los compuestos THC, CBD, CBN, representando una buena aproximación para conocer la composición real en dos muestras comerciales de *Cannabis sativa* producidos en el Departamento del Cauca.
- ✓ El análisis de las muestras comerciales de Cannabis arrojó datos sobre la presencia de algunos de los compuestos cannabinoides, sin embargo, no fue posible cuantificar el contenido de estos metabolitos debido a que no se contó en el análisis con un patrón de referencia que permitiera determinar la proporción o el contenido de THC, CBD y CBN en la muestra.
- ✓ Los cromatogramas obtenidos para las dos muestras estudiadas al ser comparados con el reportado en la literatura fue el primer indicio para determinar la identidad de los compuestos cannabinoides, ya que proporcionó las bases que permitieron relacionar datos con los obtenidos experimentalmente y de esta manera poder establecer en primera medida la existencia de estos compuestos.
- ✓ El análisis espectroscópico fue el pilar fundamental para la identificación de los compuestos cannabinoides ya que mostró señales en el espectro de masas características para estos metabolitos, lo cual permitió establecer criterios a partir de la masa específica para cada compuesto y las fragmentaciones que son como la huella dactilar que permiten elucidar la estructura de una molécula, siendo esto un punto clave que afirma la existencia y de cierta forma permite estimar la abundancia de estos compuestos en la muestra.
- ✓ Se pudo determinar cualitativamente de acuerdo a los patrones de fragmentación y la abundancia de los picos para THC, que la muestra D posiblemente presenta un mayor contenido de este cannabinoide, pero en menor proporción CBD.
- ✓ De acuerdo a los estudios y datos encontrados en la literatura, un mayor contenido de CBD en la muestra E puede representar efectos beneficiosos en el tratamiento de diferentes enfermedades teniendo en cuenta su baja actividad como agente psicotrópico.
- ✓ Según los patrones de fragmentación se tiene que en las dos muestras analizadas posiblemente se encuentre el isómero Δ 1-6 THC el cual según estudios

reportados presenta actividad sobre enfermedades cardiacas y en específico sobre afecciones sobre el sistema circulatorio, por lo tanto, las muestras analizadas posiblemente tendrían algún efecto sobre el tratamiento de estas enfermedades.

- ✓ Se logró identificar mediante el patrón de fragmentación que el compuesto CBN, al igual que THC y CBD están presentes en ambas muestras, sin embargo, de acuerdo con la abundancia de los picos para CBN este compuesto estaría presente en mayor proporción en la muestra E lo que implicaría que esta muestra presente mayor actividad para este metabolito en comparación con la muestra D.

- ✓ La estabilidad de la muestra puede ser indicativo de la menor cantidad de THC en la muestra E, teniendo en cuenta que no hay una correspondencia lógica entre la intensidad del pico en el cromatograma y una menor abundancia en el espectro de masas.

- ✓ Se lograron establecer las condiciones óptimas para el análisis por CLAR, las cuales arrojaron cromatogramas reproducibles en tiempo de retención e intensidad de las señales, estas condiciones son; flujo de fase móvil 1mL/min, longitud de onda $\lambda=220$ nm, polaridad de fase móvil ACN - buffer fosfato 1N 65/35 y concentración de la muestra 100ppm p/v.

8 BIBLIOGRAFÍA

- Aizpurua-olaizola, O., Omar, J., & Navarro, P. (2014). Identification and quantification of cannabinoids in *Cannabis sativa* L. plants by high performance liquid chromatography-mass spectrometry, 7549–7560. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8177-x>
- Aizpurua-Olaizola, O., Soydaner, U., Öztürk, E., Schibano, D., Simsir, Y., Navarro, P., ... Usobiaga, A. (2016). Evolution of the Cannabinoid and Terpene Content during the Growth of *Cannabis sativa* Plants from Different Chemotypes. *Journal of Natural Products*, 79(2), 324–331. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00949>
- Alexander, S. P. H. (2016). Therapeutic potential of cannabis-related drugs. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 64, 157–166. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.07.001>
- Ambach, L., Penitschka, F., Broillet, A., König, S., Weinmann, W., & Bernhard, W. (2014). Simultaneous quantification of delta-9-THC, THC-acid A, CBN and CBD in seized drugs using HPLC-DAD. *Forensic Science International*, 243, 107–111. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.06.008>
- Appendino, G., Gibbons, S., Giana, A., Pagani, A., Grassi, G., Stavri, M., ... Rahman, M. M. (2008). Antibacterial cannabinoids from *Cannabis sativa*: A structure-activity study. *Journal of Natural Products*, 71(8), 1427–1430. <https://doi.org/10.1021/np8002673>
- Baker, D., Pryce, G., Giovannoni, G., & Thompson, A. J. (2003). The therapeutic potential of cannabis. *Lancet Neurology*, 2(5), 291–298. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(03\)00381-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(03)00381-8)
- Ben Amar, M. (2006). Cannabinoids in medicine: A review of their therapeutic potential. *Journal of Ethnopharmacology*, 105(1–2), 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.02.001>
- Benito, C., Núñez, E., Tolón, R. M., Carrier, E. J., Rábano, A., Hillard, C. J., & Romero, J. (2003). Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(35), 11136–11141. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14657172>
- Benito Sastre, C. (2010). Estudio Neuropatológico Y Funcional Del Sistema Endocannabinoide Glial En Procesos Neuroinflamatorios. *Tesis Universidad Complutense de Madrid*, 1–55. <https://doi.org/ISBN:978-84-693-1123-3>

- Berrendero, F. (2002). Elementos que forman el sistema cannabinoide endógeno. Guía básica sobre los Cannabinoides. Sociedad Española de Investigación sobre Cannabinoides (SEIC). I.S.B.N.: 84-699-8658-9.
- Borille, B. T., Ortiz, R. S., Mariotti, K. C., Vanini, G., Tose, L. V., Filgueiras, P. R., ... Romão, W. (2017). Chemical profiling and classification of cannabis through electrospray ionization coupled to Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and chemometrics. *Analytical Methods*, 9(27), 4070–4081. <https://doi.org/10.1039/c7ay01294b>
- Brighenti, V., Pellati, F., Steinbach, M., Maran, D., & Benvenuti, S. (2017). Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Development of a new extraction technique and HPLC method for the analysis of non-psychoactive cannabinoids in fibre-type Cannabis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 143, 228–236. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.05.049>
- Bruçi, Z., Papoutsis, I., Athanaselis, S., Nikolaou, P., Pazari, E., Spiliopoulou, C., & Vyshka, G. (2012). First systematic evaluation of the potency of Cannabis sativa plants grown in Albania. *Forensic Science International*, 222(1–3), 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2012.04.032>
- Carranza, R. R. (2012). Los productos de cannabis sativa: Situación actual y perspectivas en medicina. *Salud Mental*, 35(3), 247–256.
- Citti, C., Ciccarella, G., Braghiroli, D., Parenti, C., Vandelli, M. A., & Cannazza, G. (2016). Medicinal cannabis: Principal cannabinoids concentration and their stability evaluated by a high performance liquid chromatography coupled to diode array and quadrupole time of flight mass spectrometry method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 128, 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.05.033>
- Coulter, C., Garnier, M., & Moore, C. (2012). Analysis of tetrahydrocannabinol and its metabolite, 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid, in oral fluid using liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, 36(6), 413–417. <https://doi.org/10.1093/jat/bks039>
- De Backer, B., Debrus, B., Lebrun, P., Theunis, L., Dubois, N., Decock, L., ... Charlier, C. (2009). Innovative development and validation of an HPLC/DAD method for the qualitative and quantitative determination of major cannabinoids in cannabis plant material. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 877(32), 4115–4124. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.11.004>
- Deimler, R. E., Razunguzwa, T. T., Reschke, B. R., Walsh, C. M., Powell, M. J., & Jackson, G. P. (2014). Direct analysis of drugs in forensic applications using laser ablation electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LAESI-MS/MS). *Analytical Methods*, 6(13), 4810–4817. <https://doi.org/10.1039/c4ay01043d>
- del Mar Ramirez Fernandez, M., De Boeck, G., Wood, M., Lopez-Rivadulla, M., & Samyn, N. (2008). Simultaneous analysis of THC and its metabolites in blood using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 875(2), 465–470. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.09.032>

- Devane, W. A., Dysarz, F. A., Johnson, M. R., Melvin, L. S., & Howlett, A. C. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molecular Pharmacology*, *34*(5), 605–613. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2848184>
- ElSohly, M. A., & Slade, D. (2005). Chemical constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sciences*, *78*(5), 539–548. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.09.011>
- Felli, M., Martello, S., & Chiarotti, M. (2011). LC-MS-MS method for simultaneous determination of THCCOOH and THCCOOH-glucuronide in urine: Application to workplace confirmation tests. *Forensic Science International*, *204*(1–3), 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.05.004>
- Gambaro, V., Dell'Acqua, L., Farè, F., Froidi, R., Saligari, E., & Tassoni, G. (2002). Determination of primary active constituents in Cannabis preparations by high-resolution gas chromatography/flame ionization detection and high-performance liquid chromatography/UV detection. *Analytica Chimica Acta*, *468*(2), 245–254. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00660-8](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00660-8)
- Ganzer, M., & Sturm, S. (2018). Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis—An update covering 2011–2016. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *147*, 211–233. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.038>
- Gennaro, A. R., Remington, J. P. (Joseph P., & Belluci, S. (2003). *Remington farmacia*. Editorial Médica Panamericana.
- Grauwiler, S. B., Scholer, A., & Drewe, J. (2007). Development of a LC/MS/MS method for the analysis of cannabinoids in human EDTA-plasma and urine after small doses of Cannabis sativa extracts. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *850*(1–2), 515–522. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.12.045>
- Grotenhermen, F., & Russo, E. (2002). *Cannabis and cannabinoids : pharmacology, toxicology, and therapeutic potential*. Haworth Integrative Healing Press.
- Grucza, R. A., Vuolo, M., Krauss, M. J., Plunk, A. D., Agrawal, A., Chaloupka, F. J., & Bierut, L. J. (2018). Cannabis decriminalization: A study of recent policy change in five U.S. states. *International Journal of Drug Policy*, *59*(January), 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.drugpo.2018.06.016>
- Hazekamp, A., Peltenburg, A., Verpoorte, R., & Giroud, C. (2005). Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies Chromatographic and Spectroscopic Data of Cannabinoids from Cannabis, (July 2013), 37–41. <https://doi.org/10.1080/10826070500187558>
- Jamwal, R., Topletz, A. R., Ramratnam, B., & Akhlaghi, F. (2017). Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass-spectrometry for simple and simultaneous quantification of cannabinoids. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *1048*, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.02.007>
- Jose Angel Corcho de Juan. (2008). Desarrollo de un método para espectrometría de masas en tándem para la ... - José Ángel Cocho de Juan - Google Books. Retrieved August 23, 2018, from

- <https://books.google.com.co/books?id=4u9O5JXQf3wC&pg=PA27&dq=espectrometria+de+masas&hl=en&sa=X&ved=0ahUKEwjht-2ZxoPdAhUB0VMKHTB9C9YQ6AEIKjAA#v=onepage&q=espectrometria de masas&f=false>
- Kuppers, F. J. E. M., Bercht, C. A. L., Salemink, C. A., Terlouw, J. K., & Heerma, W. (1975). and J. K. TERLOUW and W. HEERMA, 458, 3669–3684.
- Li, D. M., & Ng, C. K. (1984). Effects of delta 1- and delta 6-tetrahydrocannabinol on the adenylate cyclase activity in ventricular tissue of the rat heart. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 11(1), 81–85.
- López, Á., Esther, G., & Niizawa, C. (2014). Cannabis sativa L., una planta singular. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 45(4).
- Mechtler, K., Bailer, J., & De Hueber, K. (2004). Variations of Δ^9 -THC content in single plants of hemp varieties. *Industrial Crops and Products*.
[https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(03\)00077-3](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(03)00077-3)
- Ministerio de Justicia. (2016). *Ley 1787 6 de Julio 2016*. Retrieved from <http://www.minjusticia.gov.co/Portals/0/Cannabis/Page/LEY 1787 DE 2016.pdf>
- Ministerio de Justicia. (2018). Normatividad Cannabis. Retrieved August 21, 2018, from <http://www.minjusticia.gov.co/CannabisConFinesMedicinalesyCientificos/NormatividadCannabis.aspx>
- Moldoveanu, S. C., & David, V. (2017). The Practice of HPLC. *Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis*, 463–470. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803684-6.00015-9>
- Nascimento, I. R., Costa, H. B., Souza, L. M., Soprani, L. C., Merlo, B. B., & Romão, W. (2015). Chemical identification of cannabinoids in street marijuana samples using electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry. *Analytical Methods*, 7(4), 1415–1424. <https://doi.org/10.1039/c4ay02355b>
- Nist. (2018). Loxynil. Retrieved from <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?Name=ioxynil&Units=SI>
- Nováková, L., Matysová, L., & Solich, P. (2006). Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. *Talanta*, 68(3), 908–918. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.06.035>
- Patel, B., Wene, D., & Fan, Z. (Tina). (2017). Qualitative and quantitative measurement of cannabinoids in cannabis using modified HPLC/DAD method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 146, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.021>
- Russo, E. B. (2007). History of cannabis and its preparations in saga, science, and sobriquet. *Chemistry and Biodiversity*, 4(8), 1614–1648. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200790144>
- sannabis, cannabis medicinal, colombia. (2018). Retrieved November 7, 2018, from <http://www.sannabis.co/>
- Sierra Alonso, I. (2010). *Análisis instrumental : algunas herramientas de enseñanza-*

aprendizaje adaptadas al Espacio Europeo de Educación Superior. Netbiblo.

- Skaper, S. D., Buriani, A., Dal Toso, R., Petrelli, L., Romanello, S., Facci, L., & Leon, A. (1996). The ALIAMide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(9), 3984–3989. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8633002>
- Skoog, D. A. (2001). *Pirncipios de Análisis Instrumental*, 5ta edición, 736–748.
- Sol, A., & Juan, S. (n.d.). Esi-Maldi-Tof.
- Souleman, A. M. A., Gaafar, A. E. D. M., Abdel-Salam, O. M., & ElShebiney, S. A. (2017). Determination of delta-9-tetrahydrocannabinol content of cannabis seizures in Egypt. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, *10*(3), 311–314. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.03.011>
- Stolker, A. A. M., Van Schoonhoven, J., De Vries, A. J., Bobeldijk-Pastorova, I., Vaes, W. H. J., & Van Den Berg, R. (2004). Determination of cannabinoids in cannabis products using liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1058*(1–2), 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.089>
- Tassi, B., González, M., Steffens, L., Scorsatto, R., & Pereira, R. (2017). Cannabis sativa : A systematic review of plant analysis, 1–23.
- Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ingeniería., L., Mendoza, N., Vega, C., & Mora, R. (2009). *Revista de la Facultad de Ingeniería. Revista de la Facultad de Ingeniería Universidad Central de Venezuela* (Vol. 24). La Universidad. Retrieved from http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-40652009000400007
- Velasco, G., Hernández-Tiedra, S., Dávila, D., & Lorente, M. (2016). The use of cannabinoids as anticancer agents. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *64*, 259–266. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.05.010>
- Vree, T. B. (1977). Mass spectrometry of cannabinoids. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *66*(10), 1444–1450. <https://doi.org/10.1002/jps.2600661025>
- Vree, T. B., Breimer, D. D., Van Ginneken, C. A. M., Van Rossum, J. M., De Zeeuw, R. A., & Witte, A. H. (1971). Identification of cannabivarin in hashish by a new method of combined gas chromatography-mass-spectrometry. *Clinica Chimica Acta*, *34*(2), 365–372. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(71\)90190-2](https://doi.org/10.1016/0009-8981(71)90190-2)
- Words, K. (1998). Analysis of Cannabinoids in Fiber Hemp Plant Varieties (Cannabis Sativa L .) by High-Performance Liquid Chromatography ", *47*(3), 215–222.

9 ANEXOS.

Una vez establecidas las condiciones de flujo y composición de fase móvil se emplea un patrón de metilparabeno el cual se realiza por triplicado mostrando en todos los casos tiempos de retención e intensidad de señal similares, este ensayo se realizó con el fin de verificar la reproducibilidad de los datos. Las condiciones de trabajo como longitud de onda y otros parámetros son tomados de acuerdo a (Nováková, Matysová, & Solich, 2006) el cromatograma correspondiente se muestran en la figura 40.

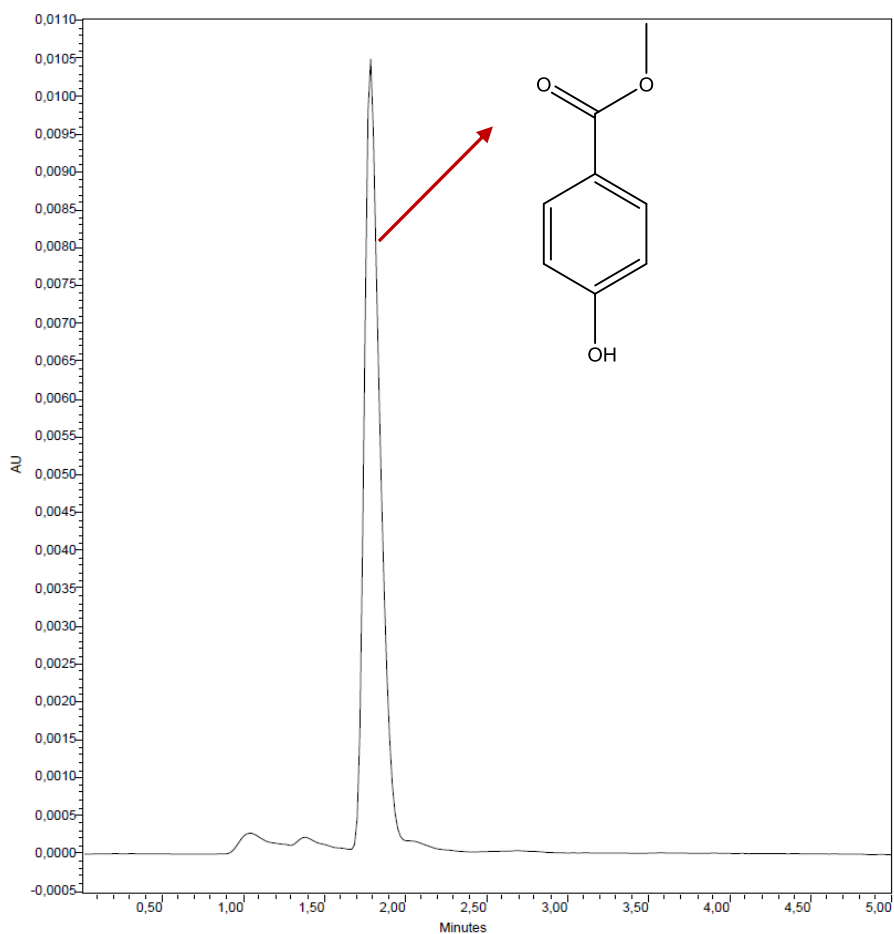


Figura 40. Cromatograma patrón metilparabeno utilizado como control en la evaluación de la reproducibilidad de los datos, 5ppm. $\lambda = 240\text{nm}$ (Fase móvil ACN/ PO_4 65/35). Flujo de fase móvil 1mL /min.

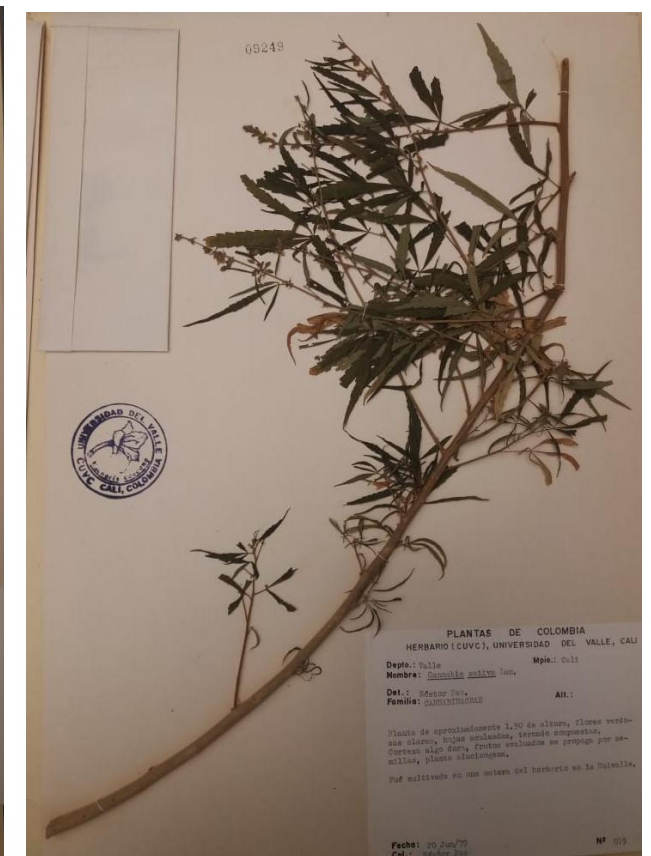
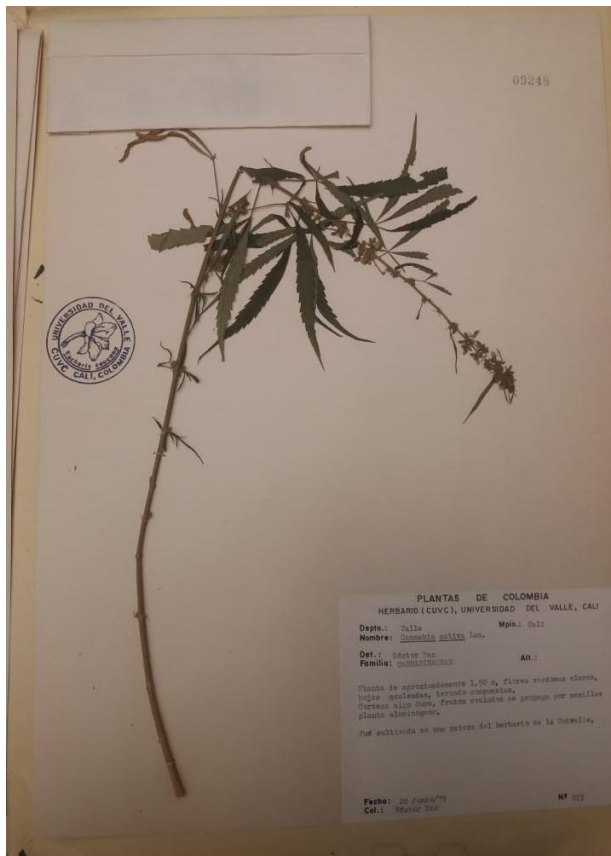
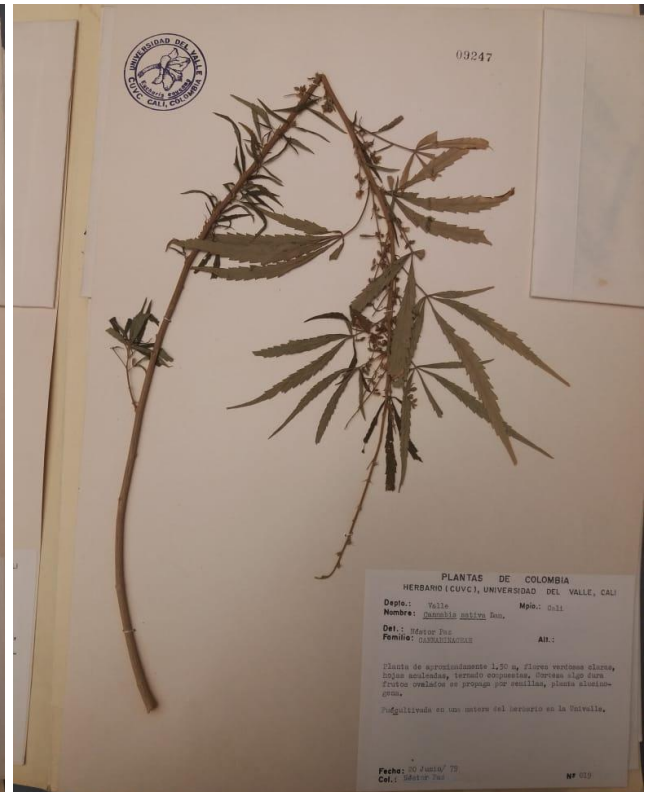
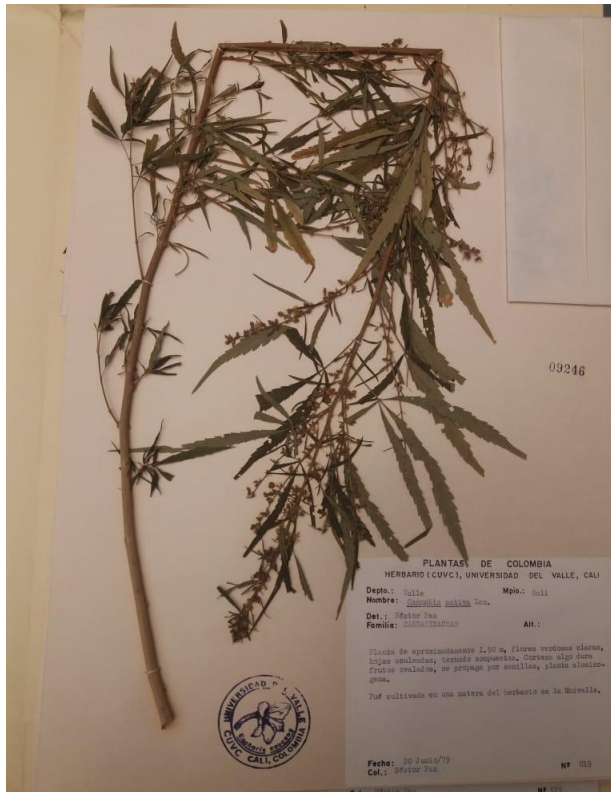


Figura 41. Registro herbario, planta de la especie *Cannabis sativa*. Plantas de Colombia. Herbario (CUCV), Universidad de Valle, Cali.

