Caracterización analítica de *Cannabis sativa* L.: Revisión crítica de métodos de extracción y desarrollo de un protocolo de cuantificación por HPLC-DAD

Autor: Federico Martín Portilla

Tutor: Pablo Raúl Castello



Año: 2026

Carrera: Farmacia

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Universidad de Belgrano

Resumen

El control de calidad de *Cannabis sativa* L. carece de criterios metodológicos unificados. La presente tesina aborda esa problemática mediante una revisión crítica de la bibliografía sobre extracción y análisis cromatográfico de cannabinoides, y una fase experimental exploratoria de aplicación analítica.

En la primera etapa se examinaron las metodologías extractivas y cromatográficas disponibles, con particular atención a la extracción asistida por ultrasonido (UAE) y al análisis por cromatografía líquida de alta eficacia con detección por arreglo de diodos (HPLC-DAD). Esta plataforma opera a temperatura ambiente durante toda la separación y preserva por lo tanto la relación entre las formas ácidas y neutras de los cannabinoides, relación que la cromatografía gaseosa modifica en el puerto de inyección salvo que se recurra a derivatización previa.

En la fase experimental se desarrolló y evaluó de manera preliminar un procedimiento de extracción por UAE acoplado a HPLC-DAD para la separación y estimación de cannabinoides mayoritarios sin derivatización. Se analizaron tres matrices vegetales que difieren simultáneamente en origen genético, condiciones de cultivo y procesamiento postcosecha, tejido fresco sin secar, material seco y curado, y material sometido a descarboxilación térmica deliberada, extraídas en paralelo con etanol absoluto y con metanol:cloroformo 9:1 (v/v). Cada combinación de matriz y solvente fue objeto de una única extracción, a partir de la cual se realizaron inyecciones replicadas (dos o tres según el extracto); las medidas de dispersión informadas cuantifican en consecuencia repetibilidad instrumental. La calibración de Δ⁹-THC se construyó sobre un concentrado de referencia cuya pureza se estimó por normalización de áreas, de modo que los contenidos se informan como estimaciones semicuantitativas circunscriptas a un rango de trabajo verificado mediante un modelo de regresión ponderada.

El etanol absoluto produjo valores similares a los obtenidos con el sistema clorado en el material seco y curado, y valores mayores en el tejido fresco, bajo las condiciones ensayadas. Dado que se realizó una única extracción por combinación matriz–solvente, estos resultados se consideran exploratorios y no demuestran equivalencia ni una relación causal con el estado del material vegetal.

Abstract

Quality control of *Cannabis sativa* L. lacks unified methodological criteria, which hinders inter-laboratory comparison of results and product traceability. This thesis addresses the issue through a biphasic structure: a critical review of the literature on cannabinoid extraction and chromatographic analysis, and an exploratory experimental phase of analytical application.

In the first stage, available extraction and chromatographic methodologies were examined, with particular attention to ultrasound-assisted extraction (UAE) and to high-performance liquid chromatography with diode-array detection (HPLC-DAD). The latter operates at ambient temperature throughout the separation and therefore preserves the ratio between acidic and neutral cannabinoids, a ratio that gas chromatography alters in the injection port unless prior derivatisation is applied.

In the experimental phase, a UAE procedure coupled to HPLC-DAD was developed and preliminarily evaluated for the separation and estimation of major cannabinoids without derivatisation. Three plant matrices differing simultaneously in genetic origin, cultivation conditions and post-harvest processing – fresh undried tissue, dried and cured material, and deliberately decarboxylated material – were extracted in parallel with absolute ethanol and with methanol:chloroform 9:1 (v/v). Each matrix–solvent combination was subjected to a single extraction, from which replicate injections (two or three depending on the extract) were performed; reported dispersion measures therefore express instrumental repeatability and not method precision. The Δ^9-THC calibration was built on a reference concentrate whose purity was estimated by area normalisation, so that contents are reported as semi-quantitative estimates restricted to a working range verified through a weighted regression model.

Under the conditions evaluated, absolute ethanol produced values similar to those obtained with the chlorinated system in dried and cured material and higher values in fresh tissue. Because only one extraction was performed for each matrix–solvent combination, these findings are exploratory and do not demonstrate equivalence or a causal relationship with the state of the plant material.

Dedicatoria

A mi abuelo, cuya memoria me acompañó durante todo este trabajo. Nada de lo que sigue existiría sin lo que me enseñó antes de que yo supiera que lo estaba aprendiendo.

A mis padres, por haberme dado la posibilidad de elegir mi camino y las herramientas para recorrerlo, y por enseñarme, con el ejemplo antes que con palabras, el valor del esfuerzo sostenido.

A mis hermanos, mi sostén más firme y mi compañía incondicional.

A Abril María, por el amor y el impulso constante de estos años, y por compartir conmigo no solo la vida sino también la vocación por la ciencia.

Agradecimientos

Al Dr. Pablo Raúl Castello, por su dirección a lo largo de todo este trabajo, por la generosidad con la que compartió sus conocimientos.

A la Universidad, a sus autoridades y a su personal, por la formación brindada.

A los docentes de la carrera, por los saberes y la experiencia transmitidos durante la carrera.

A mis compañeros de cursada, que empezaron siendo las personas con las que compartía un aula y terminaron siendo amigos.

A Dolce Moshe Wolcoff, por las risas y las tardes de laboratorio.

Keywords: Cannabis; Cannabinoids; Extraction; GC; HPLC.

Tema

El trabajo aborda la heterogeneidad metodológica del control de calidad de *Cannabis sativa* L. La cromatografía gaseosa descarboxila las formas ácidas de los cannabinoides en el puerto de inyección, de modo que informa una relación ácido a neutro correspondiente al estado del analito tras el análisis y no antes de él, salvo que se recurra a derivatización previa; las plataformas acopladas a espectrometría de masas resuelven la selectividad, pero su implementación rutinaria se encuentra limitada por el costo de la instrumentación y la disponibilidad de estándares deuterados. El presente trabajo desarrolla y evalúa de manera preliminar un procedimiento de extracción asistida por ultrasonido acoplado a HPLC-DAD, viable con instrumentación disponible en laboratorios de rutina, para la separación y estimación de formas ácidas y neutras en una misma corrida. El eje experimental consiste en establecer si el desempeño relativo de dos sistemas de solventes constituye una propiedad de dichos solventes o depende del estado del material vegetal sobre el cual se aplican.

Tabla de contenidos

1. Introducción 9
2. Marco teórico 10
2.1 Sistema Endocannabinoide 10
2.2 Cannabinoides 12
2.3 Terpenos 15
3. Antecedentes 17
3.1 Muestreo y almacenamiento 17
3.2 Extracción de cannabinoides 18
3.2.1 A partir de partes aéreas 18
3.2.2 A partir de matrices oleosas 22
3.2.3 A partir de matrices comestibles 22
3.3 Extracción de terpenos 23
3.4 Análisis preliminar por TLC 23
3.5 Análisis mediante HPLC 24
3.6 Análisis mediante GC 27
4. Objetivo General 28
4.1 Objetivos Específicos 29
5. Materiales y métodos 29
5.1 Material vegetal 29
5.2 Equipos y materiales 31
5.3 Reactivos 32
5.4 Preparación de soluciones estándar y curvas de calibración 33
5.5 Extracción y preparación de las muestras 34
5.6 Condiciones cromatográficas (HPLC-DAD) 35
6. Resultados 36
6.1 Identificación de picos y asignación de quimiotipos 36
6.2 Discriminación entre formas ácidas y neutras 39
6.2.1 Perfiles cromatográficos y estado de descarboxilación 41
6.2.2 Formación de CBN durante el tratamiento térmico 43
6.3 Evaluación del rendimiento extractivo 44
6.4 Recuperación analítica 46
6.5 Limitaciones del estudio 47
7. Discusión 48
8. Conclusión 49
Referencias 51
Anexo. Tablas 1 y 2 73

Nomenclatura

- 1D: Primera dimensión.
- 2D: Segunda dimensión.
- AA: Ácido acético.
- CBC: Cannabicromeno.
- CBCA: Ácido cannabicroménico.
- CBCV: Cannabicromevarina.
- CBD: Cannabidiol.
- CBDA: Ácido cannabidiólico.
- CBDV: Cannabidivarina.
- CBDVA: Ácido cannabidivarínico.
- CBG: Cannabigerol.
- CBGA: Ácido cannabigerólico.
- CBGV: Cannabigerovarina.
- CBL: Cannabiciclo.
- CBLA: Ácido cannabiciclóolico.
- CBN: Cannabinol.
- CBNA: Ácido cannabinólico.
- Δ^8-THC: Delta-8-tetrahidrocannabinol.
- Δ^9-THC: Delta-9-tetrahidrocannabinol.
- FA: Ácido fórmico.
- FID: Detector de ionización de llama.
- GC: Cromatografía de gases.
- GC × GC: Cromatografía de gases bidimensional integral.
- HS: Espacio de cabeza (estático o dinámico).
- EM: Espectrometría de masas (cuadrupolo único).
- MS/MS: Espectrometría de masas en tándem (triple cuadrupolo).
- NH_4CH_3COO: Acetato de amonio.
- NH_4HCOO: Formiato de amonio.
- SHS: Espacio de cabeza estático.
- SPME: Microextracción en fase sólida.
- T inc: Temperatura de incubación.
- TFID: Temperatura del detector para FID.
- THCA: Ácido tetrahidrocannabinólico.
- THCV: Tetrahidrocannabivarina.
- THCVA: Ácido tetrahidrocannabivarínico.
- Ti: Temperatura del inyector.
- To: Temperatura del horno.
- TOFMS: Espectrometría de masas por tiempo de vuelo.
- Ts: Temperatura de la fuente para la detección por espectrometría de masas.

1. Introducción

El *Cannabis* es una planta medicinal perteneciente a la familia Cannabaceae que presenta potenciales aplicaciones terapéuticas para la epilepsia juvenil grave [1], además de poseer propiedades estimulantes del apetito [2], neuroprotectoras [3], antiinflamatorias [4] y analgésicas [5]. Tras la aprobación legal del cultivo de cannabis en algunas regiones de los Estados Unidos, se han logrado avances significativos en la investigación, centrados en las consideraciones de seguridad y el perfil terapéutico. La clasificación taxonómica sigue siendo objeto de debate. El enfoque histórico incluye tres especies principales: *Cannabis sativa*, *Cannabis ruderalis* y *Cannabis indica* [6]. Aunque en la actualidad, el cruzamiento continuo de las especies originales ha dado lugar a la clasificación del *Cannabis* como una única especie [7]. Los compuestos principales de la planta son los cannabinoides y los terpenos, los cuales son producidos por los tricomas glandulares, estructuras similares a pelos presentes en las partes aéreas y ubicadas en las inflorescencias femeninas [8,9]. Sin embargo, la densidad de los tricomas no es el único parámetro que influye en la biosíntesis de metabolitos secundarios, ya que al analizar el contenido de metabolitos también se deben tener en cuenta factores genéticos, como la longitud del tallo, el diámetro de la cabeza glandular y la maduración o factores ambientales, como la humedad, la exposición a los rayos UV, la temperatura y el estrés hídrico [10,11].

Para lograr una caracterización completa de los principios activos de *Cannabis sativa* L., resulta necesario realizar un análisis exhaustivo de los perfiles tanto de cannabinoides como de terpenos, ya que la interacción sinérgica entre estos dos grupos de metabolitos podría alterar el potencial terapéutico. Si bien es posible aplicar múltiples enfoques analíticos en el estudio de los metabolitos secundarios ya mencionados, los procedimientos cromatográficos son los más adecuados para llevar a cabo evaluaciones cualitativas y cuantitativas [12]. El desarrollo de la tecnología y las técnicas analíticas ha mejorado sustancialmente los procedimientos de análisis del cannabis, aunque uno de los principales desafíos sigue siendo la estandarización de un protocolo de extracción único y universal. Particularmente en el análisis de cannabinoides, la cromatografía de gases (GC) requiere una derivatización previa debido a la descarboxilación de los cannabinoides ácidos [13,14]. Por otra parte, en las determinaciones por HPLC, los detectores UV presentan una baja selectividad y especificidad, lo que a menudo resulta en tiempos de corrida más prolongados o en cromatogramas con escasa resolución [15]. Si bien el acoplamiento con espectrometría de masas (MS) resuelve esta falta de selectividad y sensibilidad, su uso rutinario se encuentra fuertemente limitado por el elevado costo de la

instrumentación y la escasez comercial de estándares de referencia deuterados [14]. En la **Figura 1** se muestra el flujo de trabajo del proceso analítico y la formulación farmacéutica de *Cannabis sativa* L.

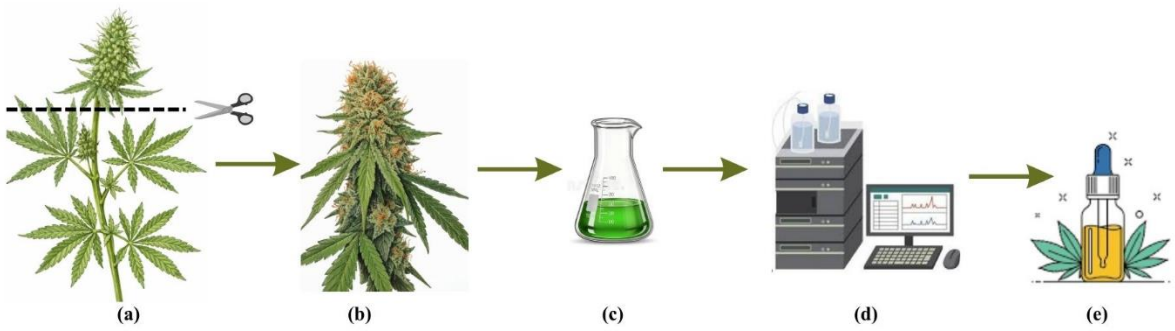


***Figura 1**. (a) Inflorescencias femeninas con tricomas (b) muestran el procesamiento postcosecha (c) método de extracción con solvente (d) Caracterización analítica (HPLC) (e) Aplicación farmacéutica*

Este estudio revela la falta de consenso y unificación de criterios analíticos a nivel internacional, lo que dificulta la comparación de resultados, afecta la trazabilidad del producto y genera un vacío regulatorio, considerándose la heterogeneidad metodológica como la limitación principal. Asimismo, en el presente trabajo se detalla que el acoplamiento de detectores MS (LC-MS/MS, GC-MS), si bien incrementa considerablemente la sensibilidad y la selectividad; su aplicación en los análisis de rutina se ve obstaculizada por los requisitos económicos y de personal de dichos detectores. Frente a este escenario, el presente trabajo se organiza en torno a la pregunta de si un procedimiento de extracción asistida por ultrasonido, ejecutado con solventes de uso corriente y acoplado a un sistema HPLC-DAD, permite separar y estimar los cannabinoides mayoritarios preservando la relación entre formas ácidas y neutras, bajo condiciones compatibles con la operación de un laboratorio de rutina.

2. Marco teórico

2.1 Sistema Endocannabinoide

El sistema endocannabinoide (ECS) es un sistema neuromodulador cuya función principal es mantener la homeostasis y participar en el equilibrio fisiológico de diversos procesos, entre ellos la temperatura corporal, el comportamiento emocional y el sistema inmunitario [16,17]. El

ECS está compuesto por dos receptores acoplados a proteínas G: el CB1, que predomina en el sistema nervioso central y en diversos órganos periféricos como los adipocitos, el páncreas exocrino, el hígado y el tracto gastrointestinal, y el receptor CB2, asociado principalmente a procesos inflamatorios debido a su expresión en células del sistema inmunitario (**Figura 2**) [18,19].

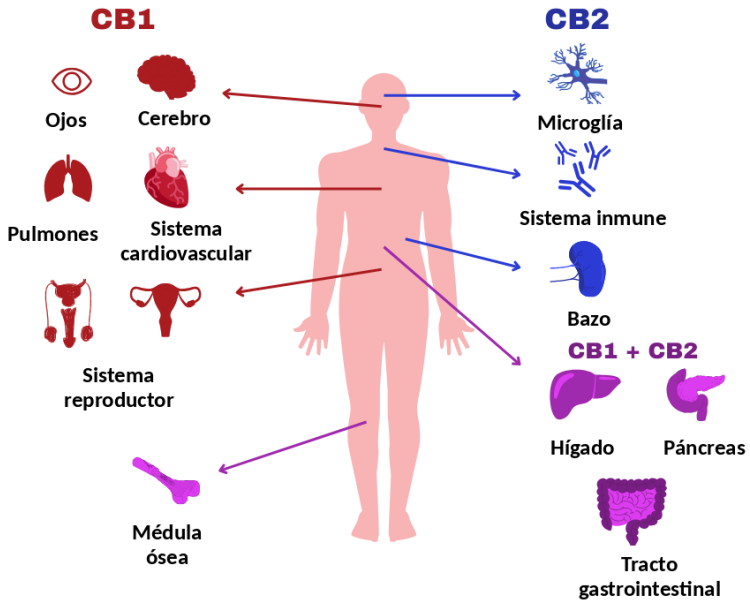


***Figura 2**. Distribución anatómica de los receptores del sistema endocannabinoide (ECS). El receptor CB1 predomina en el sistema nervioso central y diversos órganos periféricos, mientras que el CB2 se asocia principalmente al sistema inmunitario.*

En este contexto, Δ^9-THC presenta una alta afinidad agonista predominantemente por el receptor CB1. Mientras que el cannabidiol (CBD) exhibe baja afinidad directa por ambos receptores cannabinoides y una farmacología multimodal, en la que se ha descripto la modulación del receptor CB2 entre otros blancos. Recientemente se ha demostrado que los cannabinoides se unen a otros receptores, tales como el receptor vanilloide tipo 1 (TRPV1), el receptor acoplado a proteína G 55 (GPR55), así como el GPR119, el GPR18 (también conocido como receptor de NAGly) y los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR, subtipos alfa y gamma) [16,20]. Los ligandos naturales de estos receptores del ECS se denominan endocannabinoides, la anandamida (AEA) y el 2-araquidonoilglicerol (2-AG), ambos sintetizados a partir de ácidos grasos [21]. Asimismo, el 2-AG actúa como agonista pleno, mientras que la AEA funciona como agonista parcial **(Figura 3)** [22]. La combinación de la riqueza farmacológica de los compuestos activos de *Cannabis sativa* L. con los receptores del

sistema endocannabinoide y su mecanismo de acción plantea uno de los interrogantes más fascinantes en este campo.

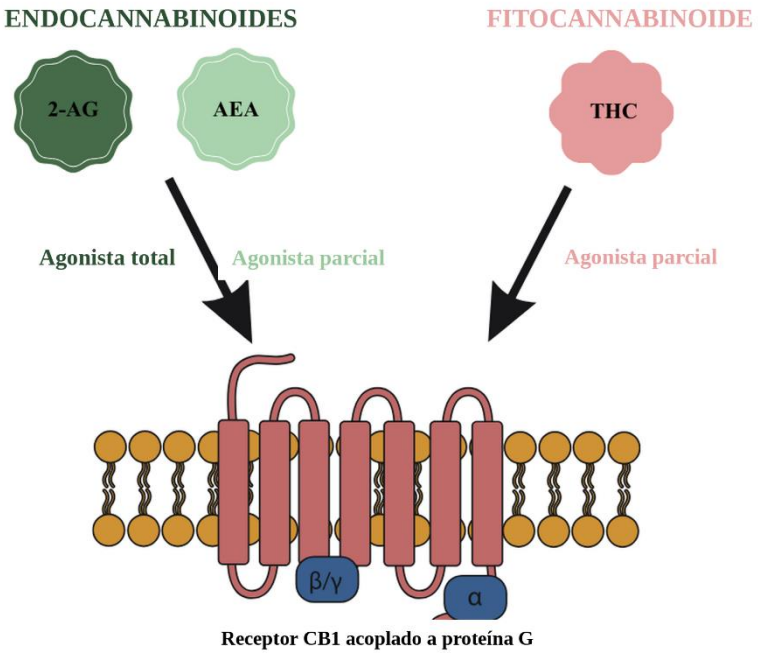


***Figura 3**. Interacción de ligandos con el receptor CB1 acoplado a proteína G. El endocannabinoide 2-AG actúa como agonista pleno, mientras que la anandamida (AEA) y el Δ^9-THC funcionan como agonistas parciales.*

2.2 Cannabinoides

Los cannabinoides son una clase de compuestos terpenofenólicos C21 característicos de la especie *Cannabis sativa* L., de los cuales se han identificado más de 180 compuestos [23]. El cannabinoide más estudiado es el Δ^9-tetrahidrocannabinol (Δ^9-THC), principal responsable de los efectos psicoactivos. Por el contrario, el cannabidiol (CBD) es un compuesto no psicoactivo que puede ofrecer beneficios medicinales [24]. Estos fitoquímicos presentan diversos efectos biológicos, la **Figura 4** muestra los principales cannabinoides y sus efectos terapéuticos más reconocidos. En la actualidad, diversas formulaciones a base de cannabinoides, como Epidyolex y Marinol se encuentran aprobadas por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) y la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), respectivamente.

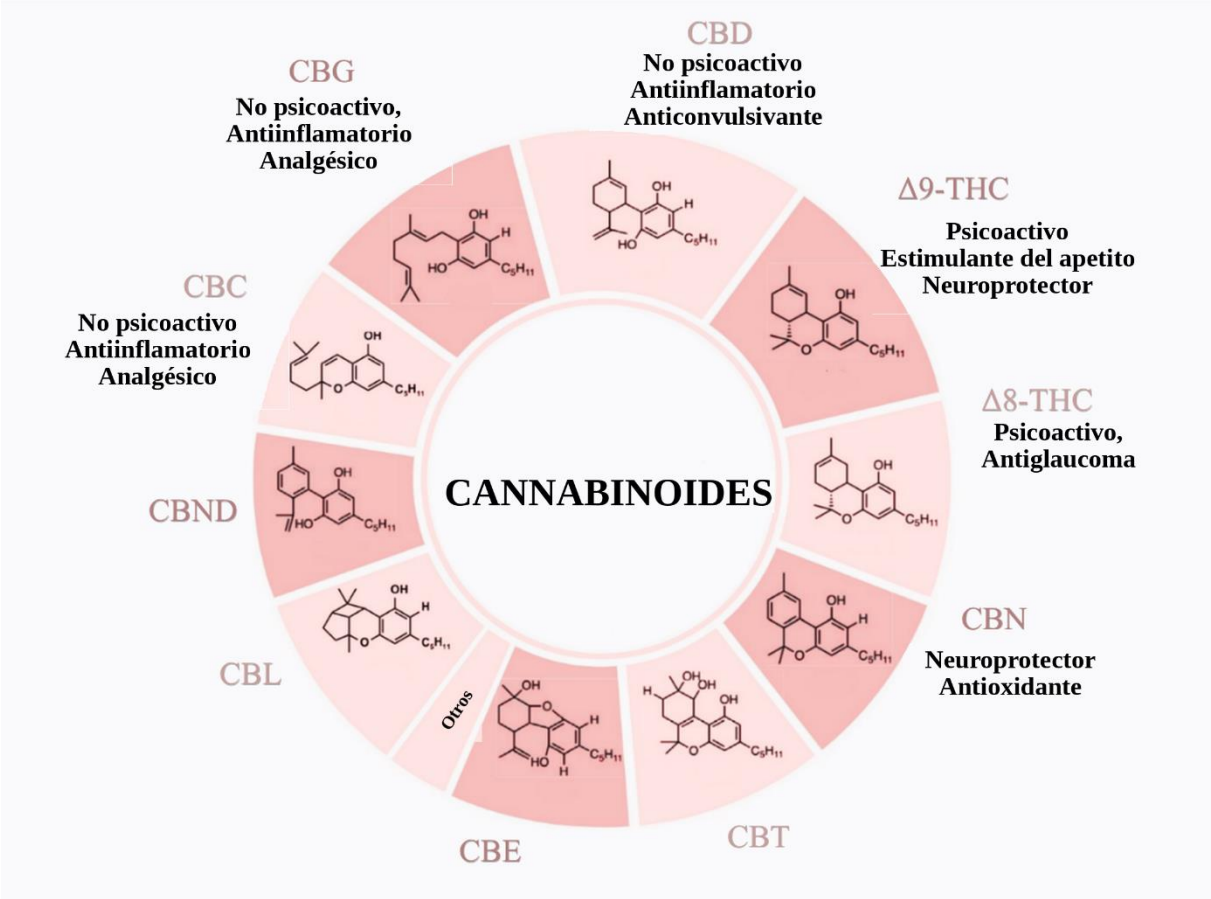


Figura 4. *Cannabinoides principales del cannabis y sus estructuras químicas, propiedades farmacológicas*.

El Δ^9-tetrahidrocannabinol (Δ^9-THC) es el principal componente psicoactivo de la planta [25] y actúa como agonista parcial del receptor CB1, ejerciendo efectos psicotrópicos [24,26]. Además de sus efectos psicoactivos, el Δ^9-THC presenta propiedades antieméticas [27], estimulantes del apetito [4], antiespasmódicas [28] y neuroprotectoras [2,3]. Se han aprobado análogos sintéticos para ciertas indicaciones clínicas [29] y resultan fundamentales en formulaciones para tratar la espasticidad asociada a la esclerosis múltiple (EM) [30–32].

El Δ^8-tetrahidrocannabinol (Δ^8-THC) es un isómero isobárico del Δ^9-THC, reconocido como un compuesto psicoactivo de menor potencia [3,33]. Este compuesto ha demostrado propiedades antiglaucomatosas [33]. Asimismo, presenta una estabilidad química superior a la de su isómero más conocido, lo que sugiere que no se oxida para convertirse en cannabinol [34,35].

El cannabidiol (CBD) es el principal componente vegetal que no produce efectos psicoactivos [5]. Presenta efectos antiinflamatorios [4,36], analgésicos [37,38], neuroprotectores y antioxidantes [32], así como ansiolíticos [39,40]. El CBD es un potente anticonvulsivo aprobado para el tratamiento de la epilepsia juvenil grave [41–44].

El cannabigerol (CBG) es un fitocannabinoide no psicoactivo con una afinidad moderada por los receptores cannabinoides [3]. Ha demostrado potentes efectos antiinflamatorios [45,46] y analgésicos [47,48]. Además, el CBG posee notables propiedades antibacterianas [49–51]. En el ámbito neurológico, actúa como agente neuroprotector, mejorando los déficits motores e influyendo en la activación de la microglía en modelos preclínicos de la enfermedad de Huntington [2,52,53].

El cannabicromeno (CBC) se clasifica como un fitocannabinoide no psicoactivo [54]. Posee propiedades antiinflamatorias y analgésicas [55–57]. El CBC también actúa como un potente agente antibacteriano [58]. Además, se ha demostrado que el CBC potencia la neurogénesis en las células madre o progenitoras del cerebro adulto, lo que indica una función neuroprotectora [59].

El cannabinol (CBN) es un producto de oxidación del Δ^9-THC; por ende, su presencia indica material vegetal envejecido o conservado de forma inadecuada, y posee una ligera actividad psicoactiva [3,22]. El CBN se asocia principalmente a una fuerte acción sedante [60], además de presentar propiedades antimicrobianas [50], estimulantes del apetito [61,62], neuroprotectoras y antioxidantes [63–65].

La clasificación actual del cannabis prescinde de la taxonomía y los parámetros botánicos, ya que todas las plantas de cannabis se categorizan como *Cannabis sativa* L. Hillig y Mahlberg (2004) propusieron una categorización quimiotaxonómica basada en la proporción de sus componentes principales. El quimiotipo I, o "plantas-droga", presenta una relación THCA/CBDA > 1,0; las plantas que exhiben una relación intermedia se designan como quimiotipo II, mientras que el quimiotipo III, o "cáñamo", posee una relación THCA/CBDA menor a 1,0 [66]. Asimismo, el quimiotipo IV se caracteriza por presentar niveles predominantes de ácido cannabigerólico (CBGA), mientras que las plantas que contienen cantidades casi indetectables de cannabinoides se clasifican como quimiotipo V.

La clasificación de *Cannabis sativa* L. incluye numerosas plantas y cepas, las cuales presentan diferentes características morfológicas y genéticas [67,68]. La genética no solo afecta el fenotipo de la planta [69,70]; sino también modifica la estructura celular y las concentraciones de metabolitos secundarios en los tricomas [71,72]. Por lo tanto, las variaciones en el genoma influyen y dan forma a los parámetros de la extracción, como el disolvente utilizado, la presión, la relación disolvente/muestra y la temperatura [73,74]. Es esencial registrar las condiciones de

cultivo, crecimiento, cosecha, secado, curado y transporte para tener una comprensión completa del material vegetal [75–77].

2.3 Terpenos

La diversidad de terpenos en *C. sativa* comprende más de 200 estructuras, siendo los monoterpenos (C10) y los sesquiterpenos (C15) las clases predominantes [1]. La **Figura 5** resume los principales terpenos presentes en *Cannabis sativa* L., sus propiedades farmacéuticas y fuentes naturales.

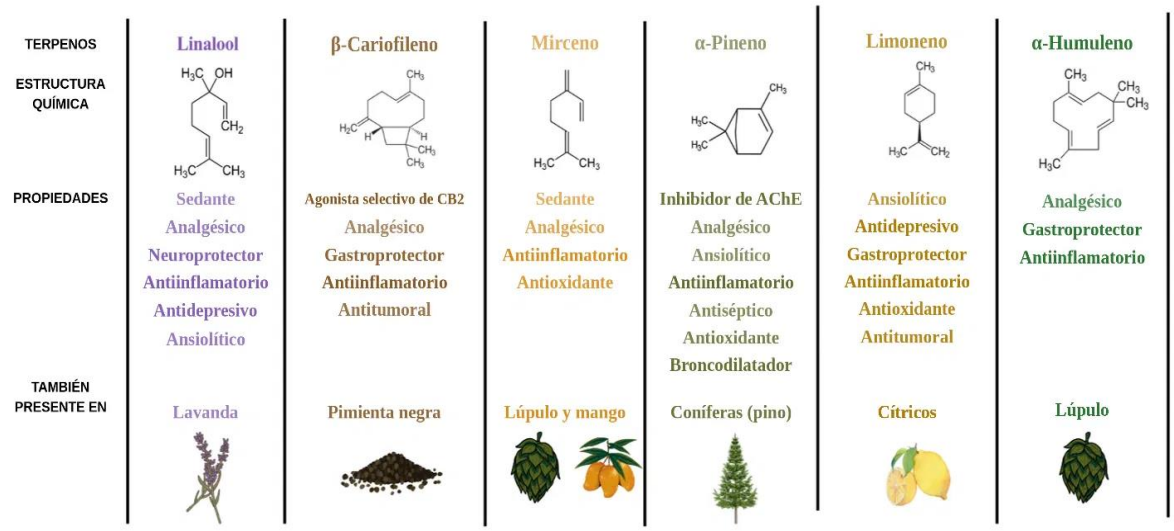


Figura 5. *Terpenos principales del cannabis y sus estructuras químicas, propiedades farmacológicas y fuentes naturales.*

Partiendo de esta diversidad, el beta-cariofileno (BCP), un sesquiterpeno abundante en la pimienta negra [78], destaca como un agonista selectivo del receptor CB2 [73,79,80], lo que le confiere efectos antiinflamatorios y analgésicos sin generar psicoactividad [81]. El beta-cariofileno posee potentes efectos antiinflamatorios [80,82,83], analgésicos [82,84], antitumorales [81,85–87] y gastroprotectores [5,83].

El α-humuleno es un isómero del β-cariofileno. Este sesquiterpeno, también denominado alfa-cariofileno, se encuentra en el lúpulo [88] y es bien conocido por su actividad antiinflamatoria [89–92]. El alfa-humuleno también muestra efectos gastroprotectores [93] y analgésicos [89,90] en estudios preclínicos.

El linalol es un monoterpeno con un aroma floral característico de la lavanda [94,95]. Es conocido por sus efectos ansiolíticos [96,97], antidepresivos [5,98] y fuertemente sedantes que promueven la

relajación [99–101]. El linalol también posee actividad analgésica [102–105] y antiinflamatoria [106–108], además de exhibir propiedades neuroprotectoras. Estas últimas están mediadas por sus efectos antioxidantes y antiisquémicos, que ayudan a proteger las neuronas frente al estrés oxidativo [109–111].

Entre los monoterpenos, el mirceno es un componente importante presente tanto en el lúpulo como en el mango [2,92,112]. Es conocido por ser un potente sedante [113,114]. El mirceno posee actividad analgésica [115,116] y, asimismo, exhibe propiedades antiinflamatorias [117–119] y antioxidantes [120–123].

Por su parte, el alfa-pineno, el terpeno más abundante en la naturaleza [124], presenta una característica bioquímica única como inhibidor de la acetilcolinesterasa (AChE) [125–127], función asociada a la mejora de la memoria y a la capacidad de contrarrestar la amnesia a corto plazo [128,129]. Sus efectos farmacológicos incluyen propiedades analgésicas [106,130], ansiolíticas [131–133], antiinflamatorias [134,135], antisépticas [136–139], antioxidantes [140,141] y broncodilatadoras [142].

Finalmente, el limoneno, abundante en los cítricos [143], se caracteriza por ser un potente ansiolítico [144–146] y antidepresivo [147–149]; asimismo, ejerce efectos antiinflamatorios [150–152], antioxidantes [153–156] y gastroprotectores [157,158], además de haber demostrado una prometedora actividad antitumoral [159–163].

Recientemente, estos compuestos han cobrado importancia debido a su contribución al efecto séquito, descrito por primera vez en 1998 por Raphael Mechoulam y Shimon Ben-Shabat [164]. Esta hipótesis se basa en el principio de sinergia, lo cual implica que los efectos terapéuticos de los diversos compuestos activos, cannabinoides, terpenos y flavonoides interactúan entre sí, dando como resultado una modificación del efecto terapéutico final [165]. Este concepto ha sido relacionado con la polifarmacia [166]. El efecto séquito puede dividirse en dos categorías: intra-séquito, que explica las interacciones entre compuestos de la misma familia, como cannabinoides con cannabinoides o terpenos con terpenos [167]. Por otra parte, el efecto inter-séquito hace referencia a las interacciones entre diferentes familias de compuestos, como los cannabinoides y los terpenos [168]. No obstante, resulta imperativo señalar que el efecto séquito constituye actualmente una hipótesis en discusión dentro de la comunidad científica, y no un mecanismo fisiológico demostrado de manera general.

3. Antecedentes

3.1 Muestreo y almacenamiento

Observar los tricomas y los estigmas proporciona las primeras pistas sobre las fases de desarrollo de las plantas en el momento de la cosecha [8]. Los tricomas son clave para comprender el metabolismo secundario de las plantas, mientras que los estigmas indican su nivel de madurez sexual [169,170]. Si el objetivo del cultivo es la producción de cannabinoides, terpenos y flavonoides, la cosecha debe basarse en la madurez de los tricomas, lo que no siempre coincide con la maduración sexual [73,76]. En el caso del cultivo para la producción de semillas, el criterio a utilizar se basará en los estigmas. Si la flor tiene tricomas glandulares que permanecen transparentes, se considera inmadura; en consecuencia, tendrá una mayor concentración de cannabinoides precursores como CBGA y CBGVA [75]. Por el contrario, los tricomas lechosos o blanquecinos indican una mayor concentración de cannabinoides como el THCA y el CBDA, lo que se considera el momento óptimo para la cosecha [171]. Los tricomas de color ámbar se asocian con niveles aumentados de CBN o CBNA [73]. Este último caso está totalmente relacionado con una cosecha tardía (lo que indica una mayor concentración de CBNA) o con la degradación de la muestra después de la cosecha debido a un manejo inadecuado, ya sea en el proceso de curado, almacenamiento o transporte [172]. Para evitar este fenómeno, es importante un secado adecuado. Se utilizan condiciones estandarizadas industrialmente, que consisten en colocar las plantas boca abajo en una habitación ventilada con aproximadamente 65% de humedad y 19°C (65°F) durante 7 a 14 días [77]. Estas condiciones dependen de la densidad de la flor y del espacio internodal [171].

La mayor parte del cannabis consumido en la etapa de floración se somete a un proceso llamado curado, que consiste en almacenarlo en un recipiente hermético a 15°C/21°C y entre un 50% y un 60% de humedad. Este proceso suele durar entre 2 semanas y 2 meses y tiene como objetivo homogeneizar las inflorescencias tanto en aroma como en humedad [77]. La mayoría de los productores de cannabis no tienen un laboratorio analítico en sus instalaciones, lo que les obliga a transportar su material al laboratorio más cercano para su posterior análisis. El almacenamiento adecuado del material es crucial durante el transporte para asegurar que llegue a su destino [173]. Se recomienda el uso de vehículos de transporte refrigerado (entre 18°C y 20°C) y el sellado al vacío de las inflorescencias [69] . La refrigeración es la opción más adecuada cuando se necesita almacenamiento a corto plazo [71]. Para el almacenamiento a largo plazo, la congelación es aceptable, pero conlleva posibles inconvenientes, como el desprendimiento de

tricomas o la condensación de humedad al descongelarse. Para minimizar estos efectos, se recomienda una transición gradual de temperatura: del congelador al refrigerador, y luego del refrigerador a temperatura ambiente. La muestra debe permanecer sellada sobre la encimera durante al menos 30 minutos antes de abrir el paquete al vacío.

3.2 Extracción de cannabinoides

3.2.1 A partir de partes aéreas

La industria del cannabis está experimentando una expansión significativa. Por lo tanto, la investigación y las innovaciones tuvieron un impacto en el desarrollo de los procesos extractivos, un paso crítico que determina la pureza, el rendimiento y la calidad final del extracto [174]. No solo la eficiencia, sino también la selectividad de las metodologías se ve influenciada e interrelacionada con factores como la naturaleza del material vegetal, las propiedades del disolvente y las condiciones operativas de temperatura, tiempo y presión [175].

La inflorescencia femenina de la planta de cannabis es la más utilizada para la extracción de cannabinoides, debido a su elevada cantidad de componentes activos principales [176]. La elección del procedimiento de extracción debe determinarse por la morfología de los tricomas. Las técnicas de extracción como la extracción con etanol y la extracción con CO_2 supercrítico ($SCCO_2$) se ven menos influenciadas por los tipos de tricomas, sin embargo, algunos protocolos, principalmente los protocolos sin solventes dependen estrictamente de la morfología de los tricomas para lograr los rendimientos estimados. La **Figura 6** muestra las técnicas más comunes utilizadas para extraer cannabinoides.

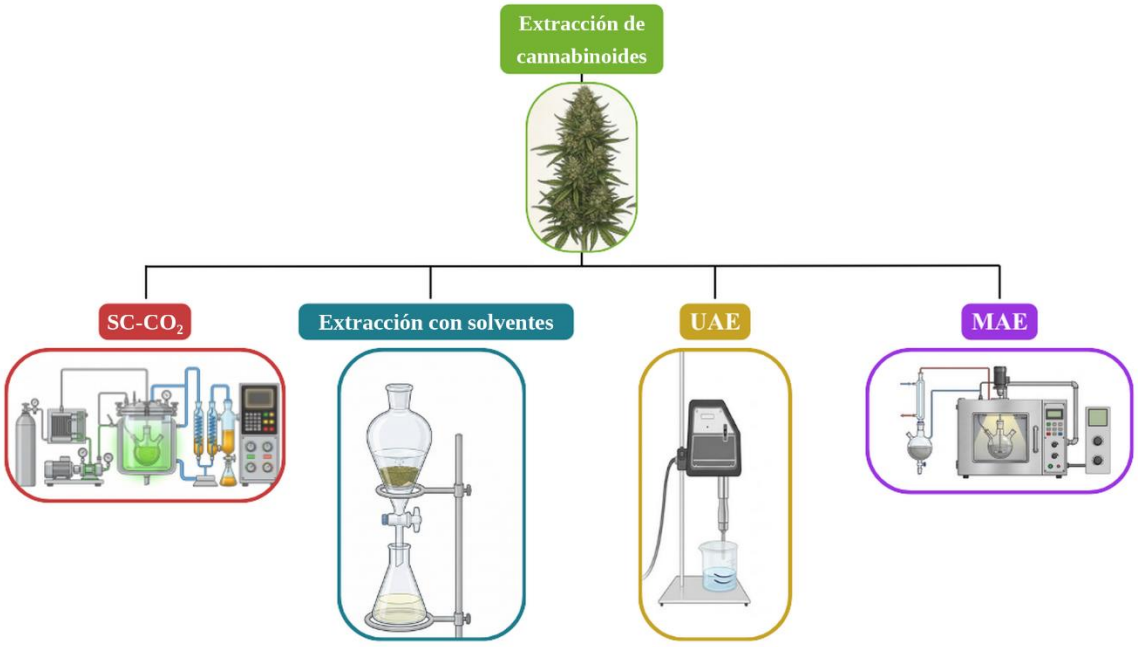


***Figura 6**. Visión general de las técnicas más utilizadas para la extracción de cannabinoides de las inflorescencias de Cannabis sativa L., incluyendo la extracción con CO_2 supercrítico ($SCCCO_2$), la extracción con disolventes, la extracción asistida por ultrasonidos (UAE) y la extracción asistida por microondas (MAE).*

En **extracción con solventes** el etanol es el reactivo más utilizado para la extracción de cannabinoides debido a su capacidad para extraer no solo cannabinoides neutros sino también ácidos, su bajo coste y su baja toxicidad. Sin embargo, también co-extrae otros componentes como clorofila, triglicéridos y ceras [177]. Malabadi et al., 2024 concluyeron que esta desventaja puede superarse disminuyendo la temperatura de extracción (5°C a -80°C), aunque tales frías temperaturas pueden disminuir el rendimiento de la extracción [178]. Namdar et al., 2018 demostraron que una mezcla de disolventes polares y no polares puede ser eficiente, como etanol:hexano (3:7, v/v) [179]. El metanol se utiliza comúnmente como solvente de extracción debido a su polaridad y capacidad de solubilización universal, aunque carece de especificidad por el analito. Por lo tanto, las mezclas de metanol y cloroformo se emplean con frecuencia [180]. Sin embargo, el cloroformo presenta la desventaja de que ha sido probado que el CBD es inestable en presencia de este disolvente [172,181]. El butano y el propano se emplean típicamente como solventes en la extracción con hidrocarburos. Las propiedades lipofílicas de estos compuestos permiten extraer tanto cannabinoides como terpenos de manera eficiente del material vegetal, evitando la coextracción de la indeseable clorofila [182]. Además, estos alcanos se caracterizan por una cadena corta de carbono que facilita la evaporación una vez finalizada la extracción; en consecuencia, el butano y el propano se prefieren a otros disolventes hidrocarbonados. El n-hexano también se menciona en la literatura porque no extrae clorofila

y se evapora fácilmente [183]. Aunque López-Olmos et al., 2022 informaron que el uso de hexano es limitado en aplicaciones farmacéuticas debido a su toxicidad [182].

Un fluido supercrítico (SCF) es una sustancia sometida a presiones y temperaturas que superan su punto crítico. La extracción con fluidos supercríticos (SFE) ha ganado prominencia en los últimos años debido a las numerosas ventajas que ofrece. Las variaciones en las condiciones de temperatura y presión modulan las propiedades del disolvente, como la densidad, y, en consecuencia, la interacción disolvente-analito y el proceso de extracción [184,185]. Durante los protocolos basados en SFE, las fases gaseosa y líquida son indistinguibles [186,187], ya que el fluido exhibe simultáneamente una fase gaseosa y una fase líquida, por lo tanto posee una baja viscosidad y difusividad de masa [185]. El solvente más popular empleado para este método de extracción es el dióxido de carbono (CO_2) [178]. La extracción con CO_2 Supercrítico ($SCCO_2$) exhibe una selectividad considerable por los cannabinoides dada la polaridad de este gas [188]. Samuel et al., 2023 revelaron que el dióxido de carbono alcanza un estado crítico a una temperatura (31°C) y presión (7.38 MPa) relativamente bajas, lo que también permite la extracción de compuestos sensibles al calor como los terpenos [189]. La **Figura 7** muestra el diagrama del punto triple del dióxido de carbono. El CO_2 es no inflamable y se considera un disolvente no tóxico, inerte, renovable y verde [190,191]. Las desventajas de estos métodos residen en los requisitos específicos de equipamiento y personal capacitado que limitan la aplicabilidad de esta técnica en pequeñas industrias y entornos de investigación [182,192].

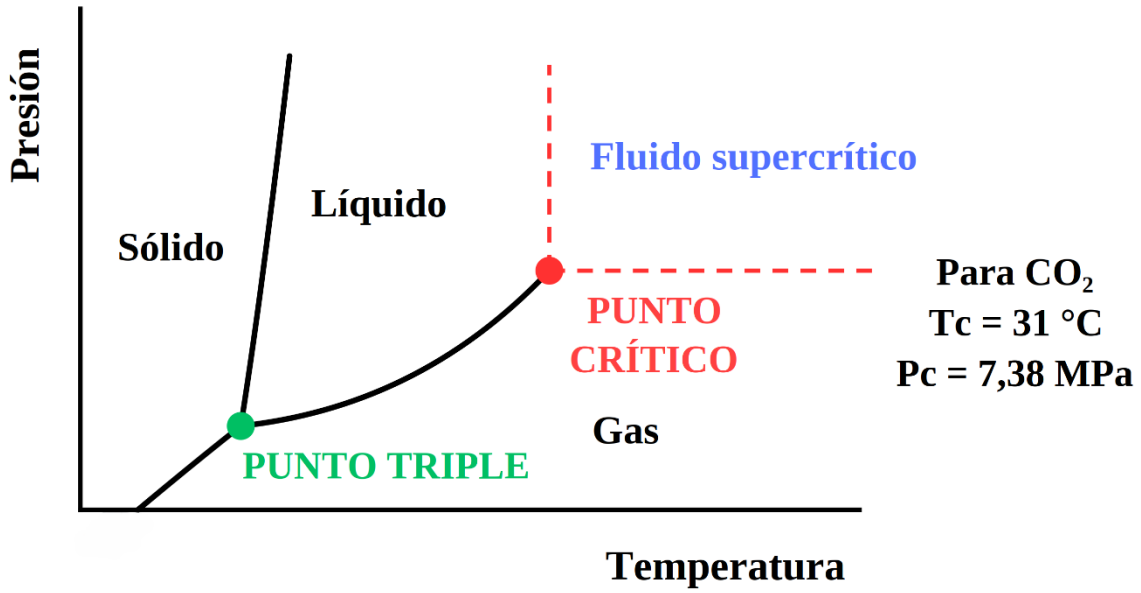


Figura 7. *Diagrama de equilibrio de fases que muestra el punto crítico y el estado supercrítico*

La extracción asistida por ultrasonido (UAE) utiliza ondas sonoras de alta frecuencia (20-100 kHz) que pueden favorecer la disrupción de estructuras celulares y glandulares y aumentar la transferencia de masa, lo que acelera el proceso de extracción [175,186]. Los principales factores que influyen en la eficiencia de la UAE son la temperatura, las características del disolvente, el tiempo y la potencia y frecuencia de los ultrasonidos [193]. La UAE es una técnica de extracción sencilla, económica y respetuosa con el medio ambiente debido a la pequeña cantidad de solvente que requiere [194]. Este enfoque permite no solo aumentar el rendimiento de la extracción en comparación con los métodos tradicionales, como la maceración dinámica, sino también evitar la degradación de compuestos termolábiles como los terpenos debido a las bajas temperaturas (20–70ºC) de operación [176,195]. Además, los UAE requieren tiempos de extracción más cortos, generalmente hasta 30 minutos. Agarwal et al., 2018 demostraron que la sonicación prolongada no es deseable porque tiende a aumentar la temperatura y, en consecuencia, producir una posible degradación de los compuestos sensibles al calor [193]. Por lo tanto, aumentar la temperatura de funcionamiento de los UAE no proporciona beneficios adicionales [182]. A pesar de los beneficios de la extracción basada en ultrasonido, por ahora, este método se limita a la investigación de laboratorio, ya que aún no es factible para la producción industrial [187,196]. Algunos protocolos utilizan la UAE como método de pretratamiento, antes de un método de extracción principal como la técnica Soxhlet, la maceración dinámica o el $SSCo_2$, para maximizar el rendimiento [194,195]. Fathordoobady et al., 2019 demostraron que al agregar UAE con Soxhlet, el rendimiento inicial de compuestos lipídicos aumentó en más del 24% [175].

La extracción asistida por microondas (MAE) consiste en ondas (de 150 a 450 W) que penetran la matriz de biomasa y aumentan la temperatura y la presión de las células vegetales, lo que facilita la transferencia de masa (pop-corn effect) y promueve la disolución de metabolitos secundarios en el solvente de extracción [197–199] . Las principales variables a modificar son la naturaleza del solvente, la temperatura, el tiempo, la potencia de irradiación y el área superficial de contacto [190,200]. La MAE es un método de extracción rápido y respetuoso con el medio ambiente que optimiza el consumo de energía y disolventes [201,202]. Otra gran ventaja de este método de extracción es que se evita la necesidad de secar el material vegetal. [203]. En contraste con la UAE, se ha demostrado que la MAE es aplicable y práctico a una escala industrial [198,201]. La literatura muestra que las temperaturas óptimas de extracción varían de 60ºC a 109ºC para controlar la descarboxilación y degradación de los cannabinoides [186,204]. Cavalloro et al., 2021 informaron que la potencia de equipo de microondas debe calibrarse

meticulosamente, ya que el rendimiento de extracción aumenta hasta alcanzar la temperatura ideal, más allá de ese límite, el rendimiento disminuye, dada la descomposición térmica de los analitos [205]. De hecho, generalmente se evitan los tiempos de extracción superiores a 30 minutos debido al aumento de temperatura causado por el exceso de microondas [195]. Chang et al., 2017 compararon MAE con otros métodos de extracción convencionales como UAE, Soxhlet y SFE, y MAE logró un mayor rendimiento de extracción de cannabinoides en menos tiempo [201].

3.2.2 A partir de matrices oleosas

El término "resina" se utiliza ampliamente y se refiere frecuentemente a varios tipos de extractos, como los de espectro completo (extractos que contienen la gama completa de compuestos), los aislados de CBD (extractos de cannabidiol puro), el BHO (aceite de hachís de butano), los destilados (extractos altamente refinados), el rosin (extracto sin solventes) y los extractos crudos (extractos mínimamente procesados) [206,207]. El tipo de matriz juega un papel vital en el diseño de un proceso de extracción, ya que determina la metodología de extracción. Posteriormente, se elige el solvente adecuado [208,209]. Solventes como el metanol (MeOH), el etanol (EtOH) y el isopropanol se utilizan comúnmente en procesos de extracción para aislar compuestos bioactivos de muestras de cannabis [210]. Alternativamente, Silva et al., 2025 mencionaron un sistema de solvente bifásico (de dos fases) más intrincado llamado n-Hexano: Acetato de etilo: Acetonitrilo: Metanol (8:2:8:2, v/v) puede usarse para la partición, que separa los compuestos según su solubilidad [176]. La extracción líquido-líquido asistida por ultrasonido (US-SLE), utilizando MeOH o una combinación de MeOH y cloroformo ($CHCl_3$), es el método principal empleado para la extracción de cannabis cuando las resinas sirven como matriz [208,211].

3.2.3 A partir de matrices comestibles

Con el aumento del consumo de cannabis, muchas personas pueden sentirse intimidadas por fumar o simplemente buscan una alternativa más saludable. Por ello, ha habido un aumento de productos comestibles a base de cannabis. Estos productos varían desde helado, miel, galletas, caramelos, gominolas y chocolates hasta té, café y zumos. Como las matrices alimentarias son heterogéneas, los procedimientos de extracción deben modificarse para garantizar una recuperación eficaz de cannabinoides [212]. Diferentes estudios han puesto el foco en matrices gomosas [213,214]. La literatura indica que el enfoque de extracción preferencial es la utilización

de agua, o una combinación de este disolvente con MeOH, MTBE (metil terbutil éter) o ACN, en técnicas de extracción por ultrasonido o agitación [176,215,216]. Por su parte, Melchert et al., 2024 emplearon una técnica de US-SLE (extracción sólido-líquido asistida por ultrasonido) con una mezcla de MeOH:H_2O (1:1, v/v) para analizar ositos de goma enriquecidos con CBD [215]. Huang et al., (2024), lograron la disolución completa de una gominola en una solución de MTBE:H_2O (1:1, v/v) en 40 minutos mediante el uso de un baño de ultrasonido en hielo [216].

3.3 Extracción de terpenos

Los terpenos pueden extraerse mediante diversos métodos, como la extracción convencional con disolventes [217] y la hidrodestilación (arrastre por vapor) [218]. El acetato de etilo [219] y el hexano [220,221] son los disolventes más utilizados, logrando una elevada tasa de recuperación. Sin embargo, la extracción tradicional con disolventes suele requerir una etapa de evaporación que puede provocar la pérdida de monoterpenos altamente volátiles, lo que podría resultar en un rendimiento global inferior de los terpenos deseados en comparación con otros métodos de extracción.En la literatura se mencionan ampliamente técnicas de extracción sin disolventes; entre ellas, el espacio de cabeza estático (SHS, por sus siglas en inglés) se emplea frecuentemente para introducir terpenos en sistemas de cromatografía de gases (GC) debido a su simplicidad, a una menor posibilidad de contaminación y a su idoneidad para la automatización [222,223]. Hanuš, 2024 señala que la técnica SHS-GC/MS/MS ofrece una elevada selectividad y sensibilidad para los monoterpenos, si bien la señal puede verse reducida en el caso de los sesquiterpenos [221]. Para solucionar este inconveniente, Shapira et al., 2019 desarrollaron la técnica de evaporación completa (FET) dentro del SHS con el fin de captar el espectro completo de compuestos volátiles [224]. Myers et al., 2021 informaron que interfaces alternativas, como la HS-SPME (microextracción en fase sólida del espacio de cabeza) y la DI-SPME Arrow (microextracción en fase sólida por inmersión directa), mejoran la detección de terpenoides de mayor peso molecular [222].

3.4 Análisis preliminar por TLC

La cromatografía en capa fina (TLC) y su versión de alto rendimiento (HPTLC) son métodos analíticos rápidos y de bajo costo, ideales para un análisis preliminar y la semicuantificación de cannabinoides, y ofrecen una alternativa a las técnicas convencionales como HPLC-UV y GC-MS [225,226]. Huang et al., 2022 informaron que la principal utilidad de la cromatografía en capa

fina (TLC) reside en su capacidad para separar clases de cannabinoides estructuralmente diferentes, típicamente análogos de Δ^9-THC -potencialmente psicoactivos- de análogos de CBD -no psicoactivos- [227]. Este principio es fundamental para distinguir entre variedades de cannabis con alto (marihuana) y bajo (cáñamo) contenido de THC. Entre las estrategias analíticas más utilizadas, se emplean fases estacionarias como gel de sílice 60 F254 (fase normal) o RP-C18 (fase reversa) [226]. En cuanto a la fase móvil, el uso de mezclas como hexano:éter etílico (8:2 v:v) es uno de los métodos empleados por su gran capacidad de separación de analitos [228] . Una estrategia clave para superar la dificultad de separar isómeros es la modificación de la placa con iones Ag(I) (Ag(I)-TLC), que aprovecha las diferentes afinidades para lograr una separación cromatográfica digital de los dos grupos con resoluciones significativamente mayores [227]. La detección se realiza utilizando reactivos cromogénicos como el Azul Rápido BB (FBBB) o el Azul Rápido RR (FBRR) en solución acidificada, seguida de la cuantificación por densitometría (en HPTLC) [228]. Sin embargo, la cromatografía en capa fina tiene limitaciones, principalmente la baja resolución entre isómeros en placas no modificadas, la subjetividad del analista al designar los colores de las manchas desarrolladas y el desafío de las placas modificadas, que requieren almacenamiento en condiciones específicas para mantener su rendimiento de separación a largo plazo [227,228].

3.5 Análisis mediante HPLC

La técnica convencional más utilizada para la determinación y cuantificación de cannabinoides es la cromatografía líquida, especialmente la HPLC y más recientemente la UHPLC [229,230]. Esta posición se ha consolidado hasta el punto que en 2024, se incorporó una monografía de cannabis a la Farmacopea Europea y por ende se estableció un método oficial de HPLC-UV para la cuantificación de algunos cannabinoides claves [231]. Dado que el método LC permite el análisis simultáneo de las formas ácida y neutra de cada cannabinoide, es una mejor opción para medir cannabinoides que el método de cromatografía de gases (GC) [232]. En contraste con el análisis por cromatografía de gases, la determinación de cannabinoides por cromatografía líquida de alta resolución ofrece algunas ventajas significativas. En primer lugar, elude los posibles inconvenientes causados por la alta temperatura del análisis GC, que afecta principalmente a los resultados durante la fase de inyección de la muestra e indirectamente al análisis en sí [233].

La revisión bibliográfica muestra que las condiciones de entrada en caliente y el horno del GC hacen que los cannabinoides ácidos se descompongan en sus análogos neutros, mientras que las

condiciones analíticas de la LC mantienen los ácidos en su forma original [7,232]. Es decir, durante el análisis por GC, los cannabinoides ácidos se convierten en compuestos neutros, sin embargo, este proceso no es cuantitativo [234]. Para cuantificar con precisión los analitos ácidos mediante cromatografía de gases, es necesario un paso de derivatización adicional [14,235]. Zekic et al., 2020 informaron que, aunque el método GC todavía se utiliza, esto se debe tanto a razones tradicionales como a consideraciones prácticas, ya que la instrumentación de GC es más sencilla, menos costosa que la HPLC y, a veces, la única opción disponible, a pesar de sus desventajas señaladas [233].

La separación cromatográfica de cannabinoides por LC representa un desafío analítico debido a la coelución y los eventos de superposición de picos que dificultan la identificación y cuantificación precisas de cada compuesto [236,237]. Dado que la elución por gradiente permite mayores velocidades de flujo, tiempos de ejecución más cortos y una mejor resolución de picos, es el enfoque preferido para aislar los principales cannabinoides utilizando LC [217,230]. Sin embargo, las condiciones isocráticas también se reportan en la literatura como se muestra en **Tabla 1** en el anexo [179,238]. La porción orgánica de las fases móviles está compuesta principalmente por metanol o ACN, siendo este último el solvente más ampliamente elegido [176]. ACN presenta varias ventajas en comparación con los alcoholes, incluyendo una viscosidad reducida que conduce a una menor contrapresión del sistema y permite mayores flujos, así como una menor absorbancia UV a longitudes de onda que se utilizan a menudo para el análisis de cannabis, lo que puede mejorar la sensibilidad de la técnica y la consistencia de la línea base [239]. Por otro lado, el ACN exhibe propiedades dipolares, mientras que el metanol exhibe propiedades ácidas [240]. Franklin et al., 2019 demostraron que una mezcla de ACN y MeOH es una opción viable [241]. Las fases acuosas se tratan típicamente con ácidos para mejorar la resolución [204]. El orden de elución y los tiempos de retención relativos para los cannabinoides neutros permanecen constantes cuando se altera el pH, mientras que los tiempos de retención de los cannabinoides ácidos varían [27,242]. Krizman, 2020 informó que los valores de pKa de los cannabinoides ácidos son aproximadamente 3.4 [238]. A la hora de acidificar la fase móvil, el ácido fórmico emerge frecuentemente como la opción preferida [176]; sin embargo, el ácido acético y buffers, como el acetato de amonio y el formiato de amonio, también se presentan como una alternativa viable [243]. **Figura 8** muestra el flujo de trabajo de un HPLC, mostrando la fase móvil, el detector y la fase estacionaria.

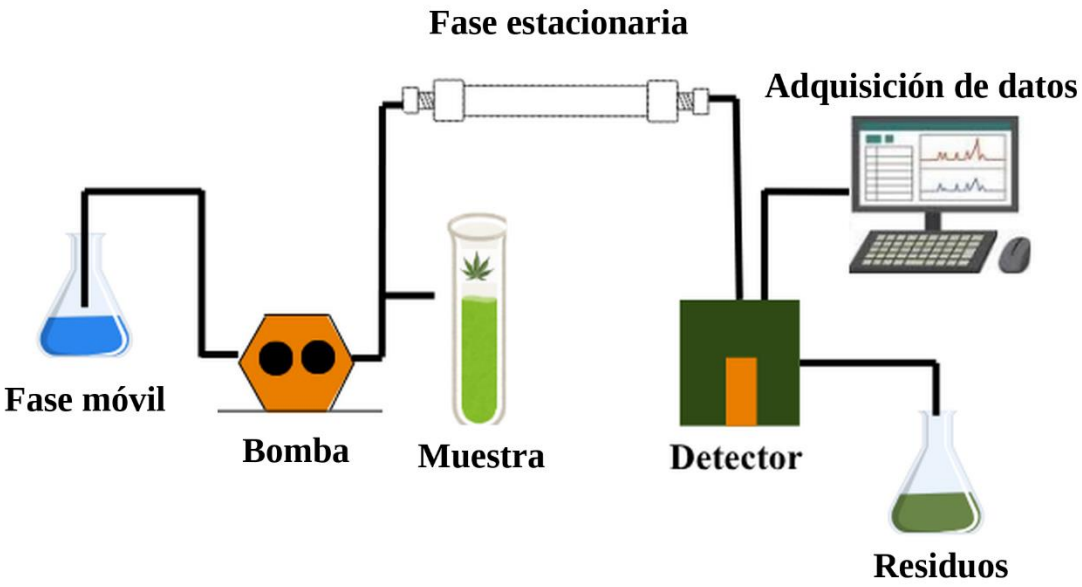


Figura 8. *Un esquema que muestra el flujo de trabajo simplificado del sistema HPLC con cannabinoides como analito objetivo.*

Con respecto a la fase estacionaria, las columnas más utilizadas son las de fase reversa (RP) C18 [237]. Recientemente, se han desarrollado diferentes métodos basados en el uso de UPLC (partícula de diámetro sub-2 m), que presentan las ventajas de permitir análisis más rápidos y una mayor eficiencia de separación [244]. El espectro de absorción UV de los cannabinoides se ve particularmente afectado por el anillo fenólico sustituido, que actúa como el principal cromóforo. Dicho espectro también puede verse afectado por la ciclación de la parte no fenólica, lo que lleva a la formación de un segundo anillo de fenilo (CBN y CBNA) o un doble enlace conjugado (CBC y CBCA). Por lo tanto, muchos cannabinoides exhiben espectros UV similares. Los cannabinoides neutros se pueden detectar a unos 220 nm, mientras que a longitudes de onda más largas, como 270 nm y 310 nm, se encuentran los picos de absorción de los cannabinoides ácidos [217]. La longitud de onda utilizada para el análisis de cannabinoides tanto ácidos como neutros es de aproximadamente 228 nm [237]. Patel et al., 2017 seleccionaron la señal UV de 235 nm para la cuantificación, ya que el punto de corte UV del metanol es de 220 nm y estaba presente en la fase móvil [232].

La técnica de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS), y especialmente en tándem (LC-MS/MS), se considera el método de elección para analizar cannabinoides en muestras biológicas complejas como sangre, orina, cabello y fluidos orales

[245,246]. Esto se debe a que las concentraciones de analitos en muestras biológicas suelen ser muy bajas, típicamente en el rango de nanogramos o incluso picogramos por mililitro, por lo que se requieren detectores más sensibles y selectivos [247]. Para la cuantificación en matrices biológicas, el triple cuadrupolo (QqQ o MS/MS) es el analizador más común [12], aunque el espectrómetro de masas de tiempo de vuelo cuadrupolar (Q-ToF) [248]; Ion Trap (Ion Trap or IT-MSn) [249]; Orbitrap [217] o cuadrupolo simple (qMS) también son utilizados [191]. Como resultado, el detector MS/MS se utiliza frecuentemente, y la electroespray (ESI) y la ionización química a presión atmosférica (APCI) se encuentran generalmente como métodos de ionización [243]. Finalmente, es necesario enfatizar que, para el análisis de rutina en matrices no biológicas, como material vegetal, el uso de detectores de espectrometría de masas no es viable debido a sus costos, requerimientos y complejidades. En contraste, el uso de detectores más simples y económicos como el DAD (detector de matriz de diodos) emerge como la opción más adecuada para análisis rutinarios. Además, Citti et al., 2016 señalaron que, en estas condiciones, no se observan diferencias significativas en comparación con otros detectores más sofisticados [250].

3.6 Análisis mediante GC

En el análisis de cannabinoides por GC, las formas ácidas sufren una descarboxilación [251]. Para evaluar el contenido total de un compuesto, la muestra se puede calentar a 150 °C durante 5 minutos, promoviendo así su conversión a la forma neutra [217]. La limitación analítica de este enfoque no es solo que no se pueden detectar los cannabinoides ácidos, sino también que su descarboxilación a altas temperaturas es incompleta [252]. Por lo tanto, cuando se requiere un análisis cuantitativo, un paso de derivatización previo es esencial. Grupos funcionales como COOH u OH pueden convertirse en compuestos más estables y volátiles. TMS (trimetilsilil), BSTFA (N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida), MSTFA (N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida) y MTBSTFA (N-metil-N-(tert-butildimetilsilil)trifluoroacetamida) han sido identificados como agentes para la derivatización de cannabinoides [78,253]. Este proceso implica la presencia de un catalizador, siendo el TMCS el más frecuentemente citado. La derivatización también mejora la forma de los picos [214]. Las fases estacionarias más comunes son columnas no polares como 95% dimetilsiloxano / 5% fenil. El gas portador más utilizado es el helio, y en menor medida el hidrógeno, con caudales generalmente entre 0,5 y 1,6 mL, como se muestra en la **Tabla 2** en el anexo. [243]

Aunque el equipo de cromatografía de gases no es óptimo para el análisis de cannabinoides, sigue siendo esencial en la caracterización de los principios activos de *Cannabis sativa* L.

Específicamente, es el equipamiento ideal para el análisis de terpenos [254]. Esta ventaja analítica radica en el hecho de que los terpenos, especialmente los monoterpenos, son compuestos altamente volátiles [255]. Esta característica también es una desventaja en los procedimientos de extracción, ya que es necesario evitar la evaporación del disolvente para evitar pérdidas significativas de estos analitos volátiles [233]. El análisis de terpenos requiere rampas de temperatura lentas y el uso de columnas de cromatografía de gases quirales (con una fase estacionaria a base de ciclodextrina) para lograr una separación adecuada de los enantiómeros [256,257]. La adición de estándares internos (ISTD) directamente al solvente de extracción es una práctica habitual en este tipo de análisis, ya que facilita la cuantificación y compensa los errores relacionados con la inyección y la extracción [258,259]. El tridecano es el más común de estos estándares porque el tiempo de retención de estos compuestos se sitúa entre los monoterpenos (C10) y los sesquiterpenos (C15) [218,220].

Los detectores de ionización por llama (FID) y los espectrómetros de masas (MS) son los detectores más utilizados para el análisis de cannabinoides y terpenos. La espectrometría de masas ofrece mayor sensibilidad y selectividad [260]. Además, permite la determinación de la estructura molecular [220]. Para la cuantificación de rutina, el FID ofrece una respuesta robusta, un intervalo dinámico amplio y un costo operativo relativamente bajo, y no depende de la disponibilidad de estándares marcados isotópicamente, que la cuantificación por MS suele requerir y que son costosos y no están disponibles para todos los cannabinoides [183,237]. En consecuencia, con tales ventajas, el FID es más adecuado para análisis rutinarios rápidos [261]. Por otro lado, configuraciones como GC × GC proporciona una separación mejorada y, por lo tanto, una identificación superior de compuestos que de otro modo podrían haber coeluido en el análisis de GC o de sustancias en una mezcla compleja [20,262,263].

4. Objetivo General

Desarrollar y evaluar preliminarmente un procedimiento de extracción asistida por ultrasonido acoplado a HPLC-DAD para la separación de señales cannabinoides y la estimación semicuantitativa de Δ^9-THC en matrices vegetales contrastantes de *Cannabis sativa* L, delimitando sus alcances y limitaciones.

4.1 Objetivos Específicos

- Seleccionar y describir, sobre la base de la bibliografía disponible, un procedimiento de pretratamiento y extracción que opere sin inducir degradación térmica de los analitos.
- Analizar las limitaciones operativas de las técnicas analíticas convencionales, detallando específicamente el problema de la descarboxilación térmica que sufren los cannabinoides ácidos en el puerto de inyección de la Cromatografía de Gases (GC).
- Desarrollar y seleccionar empíricamente condiciones cromatográficas para la separación de las señales de interés mediante HPLC-DAD, justificando la composición de la fase móvil y el programa de gradiente.
- Evaluar longitudes de onda cercanas a 220 nm para la detección de las señales cromatográficas y su diferenciación espectral preliminar mediante DAD.
- Evaluar la repetibilidad instrumental de la secuencia mediante inyecciones replicadas de cada extracto (dos o tres según el extracto).
- Explorar si el patrón observado en el desempeño relativo de los solventes es compatible con diferencias en las características de las matrices estudiadas, que difieren simultáneamente en origen genético, cultivo y procesamiento.

5. Materiales y métodos

5.1 Material vegetal

El material analizado consistió en tres especímenes de *Cannabis sativa* L. seleccionados por diferir de manera deliberada en su historia postcosecha.

La primera de ellas, identificada internamente como M1, corresponde a inflorescencias femeninas de la genética Desfran, provista por el banco de semillas Erks Genetics y cultivada en exterior bajo fotoperiodo natural. Su rasgo distintivo no es genético sino de manejo. El material fue molido y extraído el mismo día de la cosecha, sin secado, curado ni tratamiento térmico de ninguna clase. Constituye el extremo de tejido fresco del conjunto.

El segundo espécimen, designado CBN por razones de trazabilidad interna del laboratorio y sin relación con el cannabinol como analito, proviene de la genética Kilimanjaro del banco World of Seeds, también cultivada en exterior. A diferencia de M1, recorrió la trayectoria postcosecha completa, con secado controlado durante diez días, curado de dos semanas en recipiente hermético. La muestra de CBN fue sometida a un tratamiento térmico deliberadamente severo

de 260 °C durante 6 min en la cámara de calentamiento de acero inoxidable de un vaporizador portátil por conducción, con el objetivo de forzar la descarboxilación de cannabinoides ácidos. El material resultante presenta perfil en el extremo opuesto a M1, con un claro oscurecimiento del material vegetal y un aspecto seco característico.

Entre ambos se ubica KMH, el híbrido Kush Mintz × Cheese provisto por Barney's Farm, cultivado en interior bajo sistema hidropónico con iluminación artificial. El régimen lumínico sostuvo una densidad de flujo de fotones fotosintéticos de entre 1000 y 1100 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, conforme a la especificación de la luminaria empleada; no se realizó una medición independiente en el dosel. El material fue secado y curado, pero no descarboxilado, de manera que su estado de procesamiento es intermedio, aunque su perfil, como se verá, se aproxima al de M1 antes que al de CBN.

A estas tres matrices se sumó una cuarta preparación, M2, que no constituye material vegetal independiente sino una dilución 1:10 del extracto etanólico de M1. Su incorporación respondió a dos necesidades. Por un lado, permitió disponer de una preparación cuya respuesta cayera con holgura dentro del intervalo de calibración, y por lo tanto cuantificar el extracto de M1 sin recurrir a extrapolación. Por otro, ofreció una matriz de fondo realista para el ensayo de recuperación, dado que una solución de estándar en solvente puro no habría reproducido las interferencias por coelución que presenta un extracto vegetal.

El diseño experimental resultante es simple. Cada una de las tres matrices fue extraída con etanol absoluto y con la mezcla metanol:cloroformo 9:1 (v/v), generando seis extractos; el sufijo MC identifica en adelante la rama clorada. La replicación se situó en la inyección y no en la extracción. Se realizó una única extracción por condición. Para la mayoría de los extractos se efectuaron tres inyecciones; en M1 se dispuso de dos inyecciones consecutivas para el cálculo de repetibilidad, mientras que una medición realizada en otra jornada se conservó en el registro pero se excluyó de ese cálculo. Por lo tanto, las desviaciones estándar informadas describen repetibilidad instrumental y no precisión del procedimiento completo.

Muestras auxiliares para la asignación de señales. Ante la imposibilidad de disponer de estándares primarios certificados, la asignación de los picos se apoyó en dos materiales de perfil cannabinoide contrastante, identificados internamente como CBD1 y THC2, seleccionados por su predominio conocido de CBD y de Δ^9-THC respectivamente. No se dispone de trazabilidad documentada sobre su origen genético ni sobre sus condiciones de cultivo, de modo que se emplean exclusivamente como material de contraste cualitativo y no como referencia

cuantitativa. Se prepararon y extrajeron con el mismo protocolo descripto y se inyectaron por triplicado. La correspondencia con los quimiotipos III y I del esquema de Hillig y Mahlberg se establece a partir del perfil obtenido y se informa como descripción del material analizado, no como criterio independiente de clasificación. Las muestras CBD1 y THC2 fueron analizadas 18 meses luego de su extracción, por ende no se comparó el rendimiento de la extracción de dichas muestras a nivel cuantitativo.

El protocolo extractivo fue común a las tres matrices. Se pesaron con exactitud alrededor de 0,200 g de material molido, se añadieron 10,0 mL del solvente correspondiente y la mezcla se sonicó a 40 kHz por 20 minutos, manteniendo el baño a 20 °C. El extracto se clarificó y se filtró por membrana de 0,22 µm antes de inyectarse. Las masas exactas registradas fueron 0,2003 g y 0,2007 g para M1 en etanol y en mezcla clorada, 0,2007 g y 0,2003 g para CBN, y 0,1994 g y 0,1995 g para KMH. La proximidad fue buscada y resulta relevante para la interpretación de los resultados. Dentro de cada combinación de matriz y analito, las respuestas se corrigieron por masa exacta, volumen de extracción y factor de dilución. Las comparaciones entre M1, KMH y CBN se consideran exploratorias, porque M1 se expresa en base húmeda y las matrices difieren en origen y procesamiento; no se efectuó una normalización común a base seca. Adicionalmente se realizó una única extracción en etanol para las muestras CBD1 y THC2, cuyas masas fueron 0,1999 g y 0,2005 g, respectivamente.

5.2 Equipos y materiales

- Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (HPLC) Shimadzu Prominence (Shimadzu Corporation, Kioto, Japón), equipado con bomba cuaternaria LC-20AT, inyector automático SIL-20AC HT, horno de columna CTO-10ASvp, desgasificador en línea DGU-20A5, controlador de sistema CBM-20A y detector de arreglo de diodos (DAD) SPD-M20A. La adquisición y el procesamiento de los cromatogramas se realizaron con el software LabSolutions versión 5.97 (Shimadzu).
- Balanza analítica Shimadzu modelo AUW220D (resolución 0,01 mg, capacidad 220 g; Shimadzu Corporation, Kioto, Japón).
- Baño ultrasónico Branson modelo CPX2800H (40 kHz, 110 W; Branson Ultrasonics, Danbury, CT, EE. UU.).
- Centrífuga de mesa refrigerada Hettich Universal 320R (Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen, Alemania), con rotor para tubos Falcon de 15 y 50 mL.

- Micropipetas de volumen variable Eppendorf Research plus (10–100 µL y 100–1000 µL; Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania), calibradas anualmente conforme a ISO 8655.
- Material volumétrico de vidrio Clase A (matraces aforados, pipetas y probetas) marca IVA Argentina, con certificado de calibración.
- Tubos de polipropileno tipo Falcon de 15 mL y 50 mL (Corning Life Sciences, Corning, NY, EE. UU.).
- Viales de vidrio ámbar de 1.5 mL con tapa de rosca y septo de PTFE/silicona para HPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.).
- Jeringas descartables de polipropileno de 5 mL (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.) y filtros de jeringa de membrana de PTFE de 13 mm de diámetro y 0,22 µm de tamaño de poro (Millex®-LG, Merck Millipore, Burlington, MA, EE. UU.).
- PAX 2 (PAX Labs Inc., San Francisco, CA, EE. UU.), equipado con cámara de calentamiento por conducción de acero inoxidable de grado médico y sistema de control térmico electrónico.

5.3 Reactivos

- Acetonitrilo (ACN) grado HPLC isocrático LiChrosolv® (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Agua ultrapura tipo I (resistividad ≥ 18,2 MΩ·cm a 25 °C, COT < 5 ppb) obtenida de un sistema Milli-Q® Advantage A10 (Merck Millipore, Burlington, MA, EE. UU.).
- Ácido fosfórico (H_3PO_4) ≥ 85 % LiChropur™ (Merck, Darmstadt, Alemania), utilizado como modificador de fase móvil.
- Etanol absoluto ≥ 99,8 % grado analítico, EMSURE® (Merck, Darmstadt, Alemania);
- Metanol (MeOH) grado HPLC LiChrosolv® (Merck, Darmstadt, Alemania) empleado como componente del sistema extractivo metanol:cloroformo 9:1 (v/v).
- Cloroformo ($CHCl_3$) grado analítico, estabilizado con etanol, Sintorgan (Buenos Aires, Argentina), empleado como componente del sistema extractivo metanol:cloroformo 9:1 (v/v).

5.4 Preparación de soluciones estándar y curvas de calibración

Para la estimación semicuantitativa se empleó un concentrado de Δ⁹-THC como calibrante de trabajo. Dado que no se trataba de un estándar primario certificado, se estimó mediante HPLC-DAD la fracción relativa de área del pico asignado a Δ⁹-THC. Con una suma de áreas consideradas de 9.116.846 unidades y un área del pico principal (tR = 9,603 min) de 8.507.392 unidades, la fracción relativa de área fue 93,31 %.

Este procedimiento no determina pureza química ni aporta trazabilidad metrológica; por ello, las concentraciones calculadas se informan como estimaciones semicuantitativas.



***Figura 9**. Cromatograma obtenido a 220 nm de la solución calibrante de Δ⁹-THC.*

Se pesaron aproximadamente 30 mg (0,03 g) del estándar y se llevaron a volumen en un matraz aforado de 10,0 mL con etanol absoluto grado HPLC. La disolución se facilitó mediante sonicación en baño ultrasónico durante 20 minutos. Se obtuvo una concentración de 2,82 mg/ml, que constituyó la solución madre de la serie de calibración. La **Figura 9** reproduce uno de los cromatogramas obtenidos del calibrante de trabajo de Δ⁹-THC.

La evaluación de la homogeneidad espectral no evidenció heterogeneidad espectral detectable a lo largo del pico, determinándose un índice de pureza de pico (*peak purity index*) de 0,99999, parámetro que resulta compatible con la ausencia de coeluyentes de espectro distinto, véase la **Figura 10**.

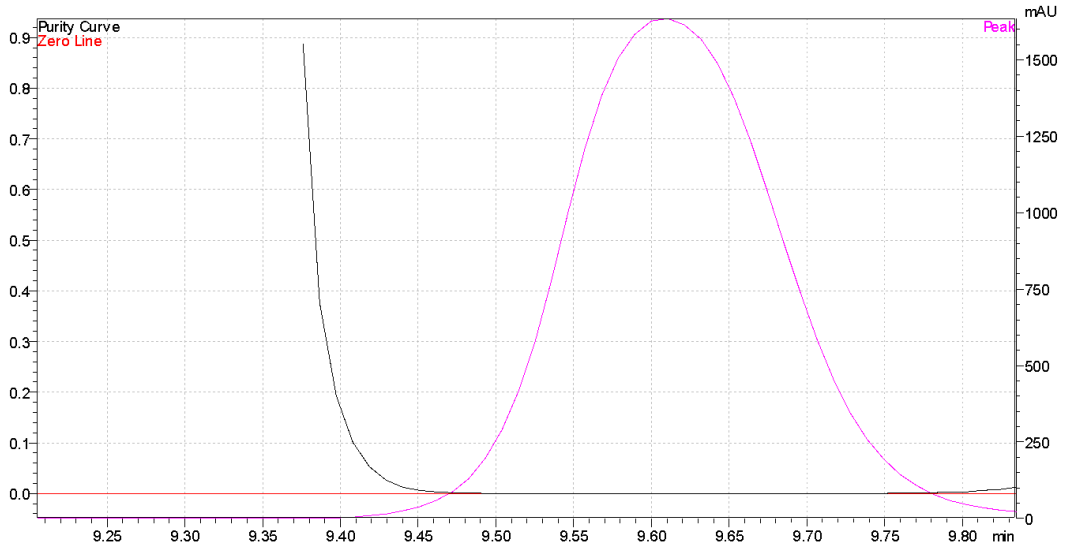


***Figura 10**. Análisis de pureza espectral del pico cromatográfico, se evidencia la homogeneidad espectral a lo largo de todo el ancho del pico, peak purity index = 0,99999.*

A partir de esta solución madre, se construyó una curva de calibración de cuatro niveles aplicando un factor de dilución seriado de 1:2,5. Las diluciones se ejecutaron transfiriendo alícuotas exactas de 2 ml desde la solución precedente hacia matraces aforados de 5 ml, llevando a volumen final. El rango de trabajo quedó establecido entre 0,0289 y 0,4512 mg/mL sobre cuatro niveles de concentración. Sobre ese conjunto se evaluaron tres modelos de regresión: mínimos cuadrados ordinarios, ponderación 1/x y ponderación $1/x^2$. Se seleccionó la ponderación $1/x^2$ porque produjo una distribución de residuales sin tendencia sistemática con la concentración, acotados entre −4,5 % y +5,9 %, y mantuvo el sesgo de la concentración recalculada de todos los niveles incluidos dentro de ±6 %, frente a un sesgo de +10,7 % para la ponderación 1/x y de +26,5 % para el modelo sin ponderar, ambos en el nivel inferior del rango. El modelo adoptado fue $y = 3{,}367 \times 10^6\, x - 1{,}38 \times 10^4$. El coeficiente de determinación $r^2 = 0{,}9906$, correspondiente al ajuste sin ponderar, se informa como descriptor del ajuste y no como prueba suficiente de linealidad ni de aptitud cuantitativa.

5.5 Extracción y preparación de las muestras

El procedimiento de extracción de los analitos desde la matriz vegetal se ejecutó siguiendo un protocolo de extracción asistida por ultrasonido (UAE) a temperatura controlada para la evaluación preliminar de las muestras. En primer lugar, se pesaron aproximadamente 200 mg de material vegetal previamente molido y tamizado, registrándose la masa exacta de cada preparación. A una alícuota de material vegetal se añadieron 10,0 mL de etanol absoluto y a otra 10,0 mL de metanol:cloroformo 9:1 (v/v). Ambas extracciones se sometieron a idénticos tiempos de sonicación, centrifugación y filtración.

La mezcla se sometió a sonicación durante 20 minutos a una frecuencia de 40 kHz. Con el fin de evitar la descarboxilación espontánea y la degradación térmica de los analitos, la temperatura del baño ultrasónico se monitoreó constantemente con un termómetro y se mantuvo a 20 °C. Finalizado el ciclo de extracción, las muestras se centrifugaron a 1000 × g durante 10 minutos para asegurar la precipitación completa del material particulado.

A partir del sobrenadante clarificado, se procedió directamente al filtrado de la muestra empleando filtros de jeringa con membrana de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,22 µm de tamaño de poro. Durante este paso, se descartaron sistemáticamente los primeros 0,5 mL del filtrado. Finalmente, el extracto filtrado se recogió hasta llenar por completo los viales de vidrio de 1,5 mL, quedando las muestras acondicionadas y listas para su inyección directa en el sistema HPLC-DAD.

5.6 Condiciones cromatográficas (HPLC-DAD)

La separación se realizó en una columna de fase reversa Kinetex® C18 *core-shell* (2,6 µm; 150 mm × 4,6 mm; Phenomenex, Torrance, CA, EE. UU.), con agua ultrapura como fase móvil A y acetonitrilo como fase móvil B, ambas acidificadas con ácido fosfórico al 0,085 % (v/v). Las dos fases se desgasificaron en baño ultrasónico durante 10 min y se filtraron por membrana de nylon de 0,45 µm antes de su uso. La acidificación se adoptó para favorecer que los cannabinoides ácidos permanezcan predominantemente en su forma no ionizada durante la cromatografía.

El programa de elución se ejecutó a un caudal de 1,0 mL/min sobre un tiempo total de corrida de 17,50 min. La composición inicial, 60 % de fase B, se mantuvo durante los primeros 1,50 min, tras lo cual la proporción orgánica se elevó de manera lineal hasta el 75 % a los 8,50 min y hasta el 80 % a los 9,50 min. Un tercer tramo la llevó al 95 % a los 11,00 min, condición que se sostuvo hasta los 12,50 min; el retorno a la composición inicial se completó en 0,50 min y el reequilibrado al 60 % se extendió desde los 13,00 min hasta el final de la corrida. La segmentación del tramo ascendente, con dos cambios de pendiente entre el 60 % y el 80 %, se ajustó de manera empírica durante el desarrollo con el objeto de distribuir la elución de los cannabinoides neutros a lo largo del cromatograma, mientras que el tramo al 95 % sitúa la elución de las formas ácidas dentro de la ventana de adquisición. Los 4,50 min de reequilibrado resultaron suficientes para restituir la condición inicial entre inyecciones, según lo confirma la estabilidad de los tiempos de retención documentada en la sección 6.1.

El volumen de inyección fue de 1 µL, con la columna termostatizada a 30 ± 1 °C y el carrusel de muestras a 10 ± 1 °C. La detección se realizó por arreglo de diodos, con la longitud de onda de cuantificación fijada en 220 nm (ancho de banda 4 nm; longitud de onda de referencia 360 nm con ancho de banda 100 nm) y adquisición simultánea del espectro completo entre 200 y 400 nm. Esta última prestación resultó determinante para el trabajo, dado que permitió examinar cada señal a 310 nm y discriminar sobre esa base las formas ácidas de las neutras conforme al criterio que desarrolla la sección 6.2, sin necesidad de ensayos adicionales ni de una segunda inyección. El método se configuró con un umbral de pureza espectral de 990/1000 como criterio de aceptación de la homogeneidad de cada pico.

6. Resultados

6.1 Identificación de picos y asignación de quimiotipos

La primera exigencia sobre el método fue separar e identificar los cannabinoides mayoritarios con criterios verificables. No se dispuso de estándares primarios certificados, de modo que la identificación no pudo apoyarse con una coinyección. La asignación se construyó en consecuencia sobre tres criterios convergentes, la posición de elución, el comportamiento espectral y la respuesta de cada señal al tratamiento térmico. Asimismo, para facilitar la identificación de los picos principales se utilizaron muestras provenientes de diferentes quimiotipos.

La muestra CBD1, de un quimiotipo III, es decir material rico en CBD, distribuyó su respuesta entre dos señales mayoritarias a 5,51 y 5,96 minutos, distribución que reproduce la coexistencia esperable entre un cannabinoide y su precursor ácido. La muestra THC2, perteneciente al quimiotipo I, es decir un material rico en THC, presentó en cambio una señal predominante a 9,60 minutos, cuya elución más tardía sobre la fase estacionaria octadecilsilano resulta consistente con una mayor lipofilia. El concentrado empleado como calibrante, material descarboxilado, concentró su respuesta en esa misma señal a 9,60 minutos y careció por completo de señal a 11,9 minutos, comportamiento que la sección siguiente retoma.

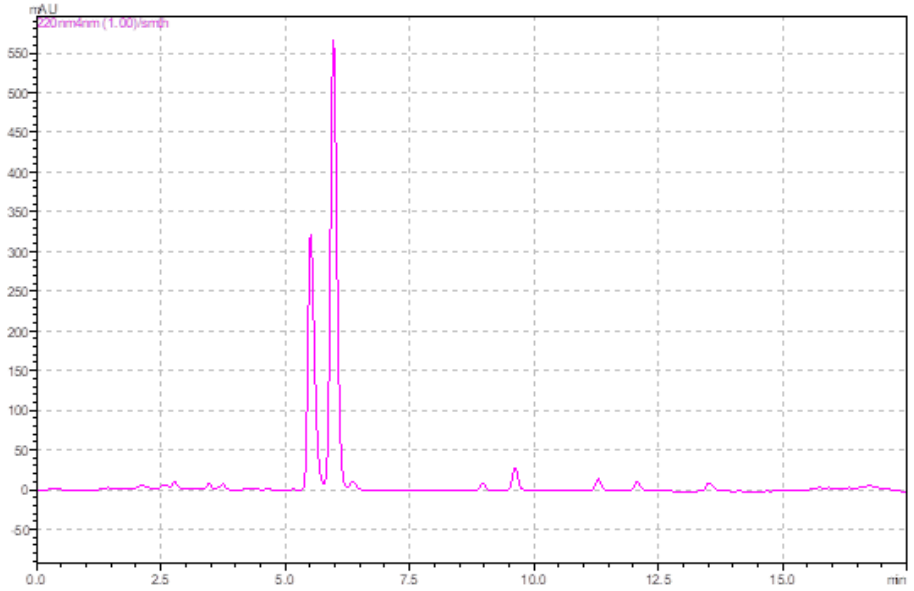


Figura 11. *Cromatograma obtenido a 220 nm de la muestra CBD1, rica en CBD.*

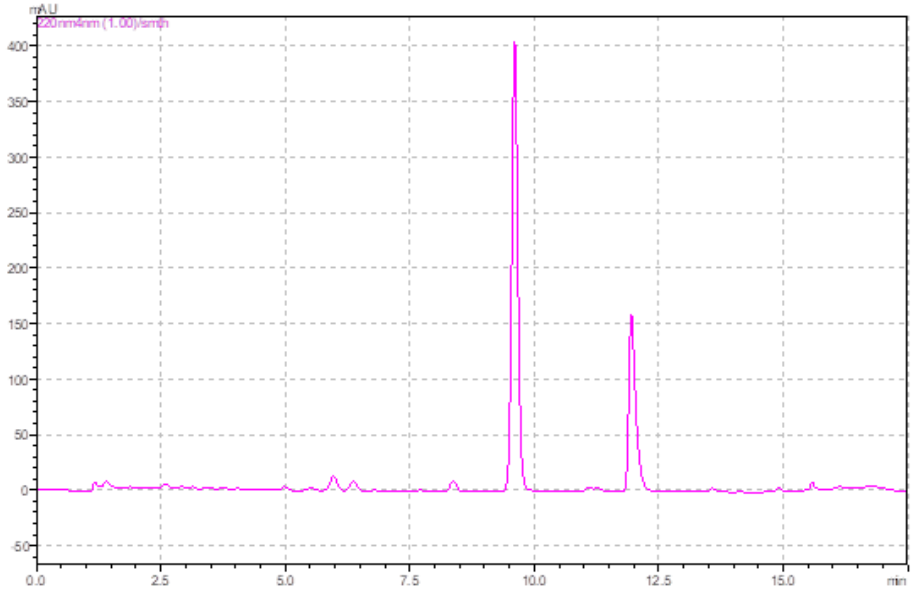


Figura 12. *Cromatograma obtenido a 220 nm de la muestra THC2, rica en THC.*

La **Tabla 3** reúne los parámetros de retención y separación de las cinco señales asignadas, calculados sobre el conjunto de inyecciones de extractos vegetales.

Señal	tR medio (min)	tR RSD (%)	k′	α	Rs rango
CBDA	5,518	0,78	3,34	–	1,07–10,38
CBD	5,985	0,46	3,71	1,11	1,32–1,73
CBN	8,364	0,38	5,59	1,51	1,32–9,43
Δ⁹-THC	9,620	0,22	6,58	1,18	2,90–5,21
THCA	11,906	0,77	8,38	1,27	1,15–9,72

***Tabla 3**. Parámetros de retención y separación de las señales asignadas a 220 nm. k', factor de retención; α, selectividad respecto de la señal precedente en la tabla. La resolución se informa contra el pico integrado inmediatamente precedente, que no siempre corresponde a la fila anterior.*

Los factores de retención se distribuyeron entre 3,34 y 8,38, intervalo característico de una separación en fase reversa correctamente planteada, con retención suficiente para apartar las señales del frente de elución sin prolongar la corrida, y las selectividades entre señales consecutivas se mantuvieron por encima de 1,11 en todos los pares evaluados. La retención resultó estable a lo largo de la totalidad de la secuencia analítica, con desviaciones estándar relativas comprendidas entre 0,22 % y 0,78 %, valores compatibles con un reequilibrado completo de la columna entre inyecciones. El tiempo muerto se estimó en 1,27 min mediante la expresión $t_0 = \varepsilon \cdot \pi \cdot (d/2)^2 \cdot L / F$, con un volumen geométrico de columna de 2,49 mL correspondiente a las dimensiones 150 × 4,6 mm, una porosidad total asumida de 0,51 conforme al valor característico de las partículas core-shell , y un caudal de 1,0 mL/min. Esta estimación fue necesaria porque el software adopta como referencia el primer pico integrado de cada corrida, criterio que no resulta comparable entre inyecciones de composición distinta. En ausencia de un marcador no retenido, y dado que la estimación geométrica omite el volumen extracolumna del sistema, los factores de retención se consideran aproximados y se informan con carácter orientativo; una variación de la porosidad asumida entre 0,51 y 0,65 desplazaría el factor de retención del Δ⁹-THC entre 6,57 y 4,94. Las selectividades entre señales consecutivas, en cambio, resultan prácticamente insensibles a esa suposición, con desplazamientos inferiores al 1,5 % sobre el mismo intervalo de porosidad, de modo que la evidencia de separación que aportan no depende de la estimación del tiempo muerto.

La resolución acompañó ese comportamiento sobre el analito que sustenta las determinaciones cuantitativas. El Δ⁹-THC se separó de la señal precedente con valores nunca inferiores a 2,90, esto es holgadamente por encima del umbral de 1,5, y ese margen se mantuvo en la totalidad de las matrices e inyecciones. Los valores observados favorecen una integración reproducible

bajo el criterio empleado, aunque no aseguran por sí solos exactitud cuantitativa. El THCA alcanzó valores de hasta 9,72 en las matrices donde constituye un componente menor, y descendió al intervalo comprendido entre 1,15 y 1,35 en M1 y KMH, esto es precisamente en aquellas donde concentra la mayor parte de la respuesta cromatográfica y la señal contigua queda parcialmente solapada sobre su flanco ascendente. Corresponde por lo tanto describir su separación en esas dos matrices como aparente antes que basal.

Ninguna de las asignaciones alcanza el nivel de identidad confirmada, que requeriría coinyección con estándar auténtico certificado. Las señales de CBDA, CBD, CBN, Δ^9-THC y THCA se informan como asignaciones probables, sustentadas en la convergencia de los tres criterios enunciados. La señal a 5,96 minutos admite una salvedad adicional, ya que se informa como cannabidiol con posible coelución de cannabigerol, par crítico del método cuya resolución no superó 1,73. El método resuelve además otras señales que no fueron asignadas y que este trabajo no discute.

6.2 Discriminación entre formas ácidas y neutras

La distinción entre un cannabinoide y su precursor ácido constituye el problema analítico central de este trabajo, y es también aquello que justifica la elección del detector. Los cannabinoides ácidos conservan absorbancia apreciable hacia el ultravioleta cercano, comportamiento atribuible a la conjugación adicional que el grupo carboxilo introduce sobre el anillo aromático, mientras que sus homólogos neutros no absorben de manera apreciable en esa región. Un detector de arreglo de diodos registra el espectro completo de cada pico durante la elución y permite explotar esa diferencia sin ensayos adicionales.

La comparación de un mismo cromatograma a dos longitudes de onda ilustra el criterio. En la muestra CBD1, la señal a 5,51 minutos conserva respuesta a 310 nm mientras la señal a 5,96 minutos se pierde en la línea de base. En la muestra THC2 ocurre lo propio entre las señales de 11,9 y 9,6 minutos. En ambos casos el comportamiento resulta compatible con la asignación de la señal más retenida a la forma ácida.

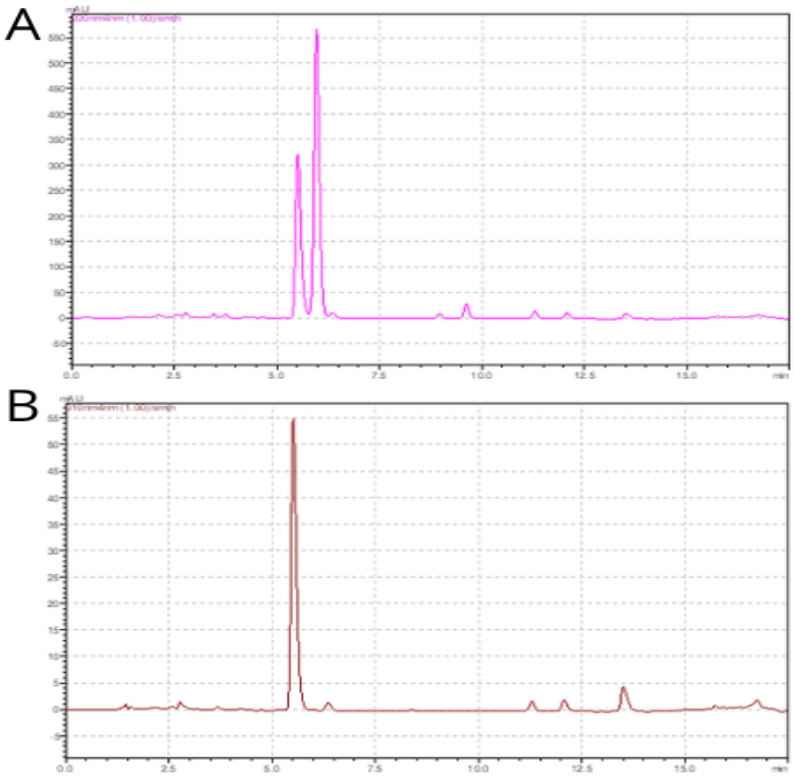


Figura 13. *Perfiles cromatográficos de la muestra CBD1. (A) Cromatograma a 220 nm. (B) Cromatograma a 310 nm.*

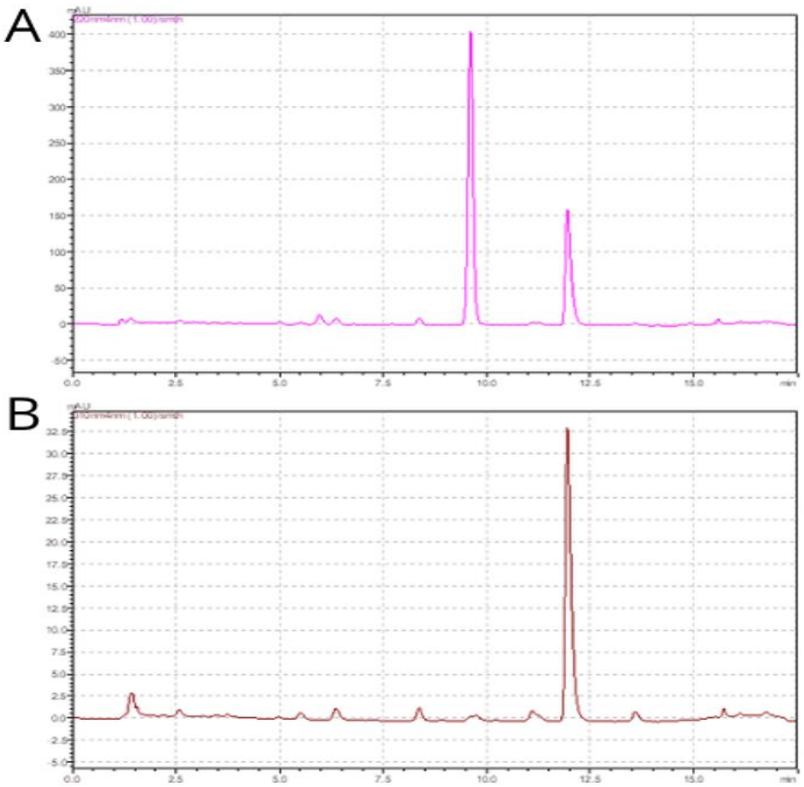


Figura 14. *Perfiles cromatográficos de la muestra THC2. (A) Cromatograma a 220 nm. (B) Cromatograma a 310 nm.*

El alcance del criterio es no obstante acotado. La absorbancia diferencial establece el carácter ácido o neutro de una señal, pero no identifica por sí sola cuál compuesto en particular la origina.

6.2.1 Perfiles cromatográficos y estado de descarboxilación

Las tres matrices produjeron cromatogramas que se distinguen a simple vista, y esa diferencia se corresponde con su historia postcosecha.

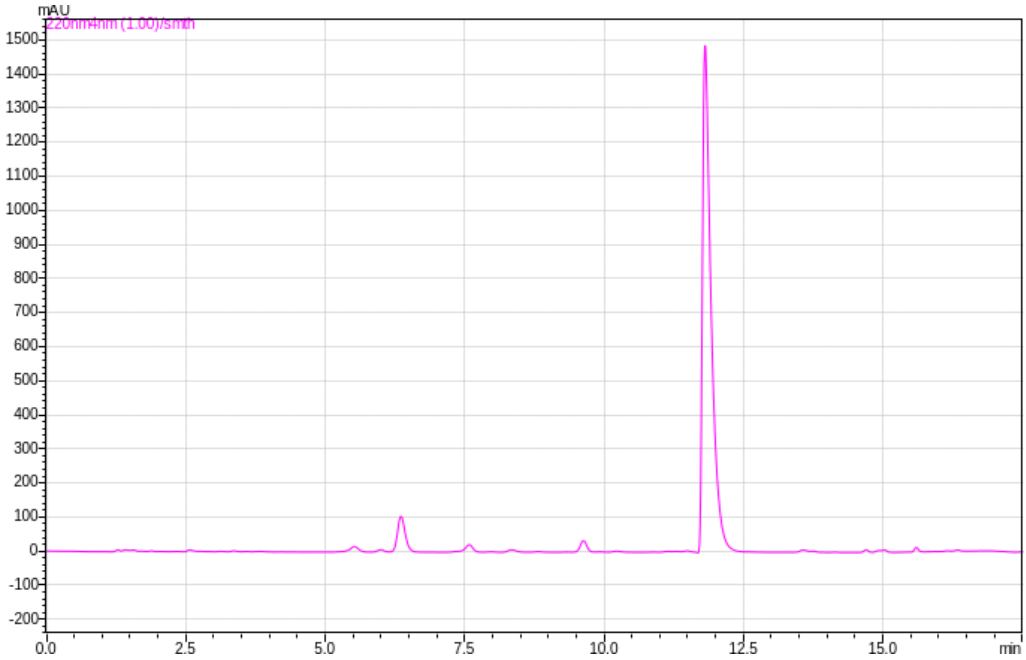


Figura 15. *Extracto etanólico de la muestra KMH a 220 nm. El material seco y curado, no descarboxilado, presenta una única señal dominante a 11,9.*

KMH, seca y curada pero nunca sometida a calor dirigido, presentó un cromatograma prácticamente de un solo pico, con la señal del THCA y la de la forma neutra (9,6 min) apenas distinguible de la línea de base. El secado y el curado, aun prolongados, no bastaron para desplazar de manera apreciable el equilibrio entre ambas formas. Esta genética de cultivo en interior concentró además la mayor respuesta del estudio en un único cannabinoide.

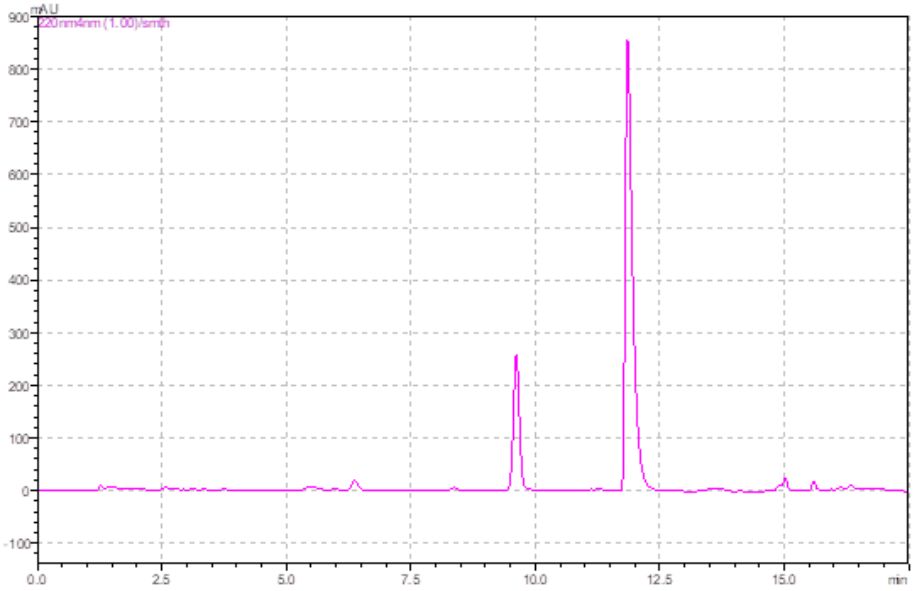


***Figura 16**. Extracto etanólico de la muestra M1 a 220 nm. El tejido fresco sin procesar presenta dos señales resueltas, THCA a 11,9 min y la forma neutra a 9,6 min.*

M1 presentó en cambio dos señales netamente resueltas. La presencia de una fracción neutra apreciable en material que nunca recibió tratamiento térmico resulta compatible con la descarboxilación espontánea que ocurre durante el desarrollo de la planta y su manipulación previa.

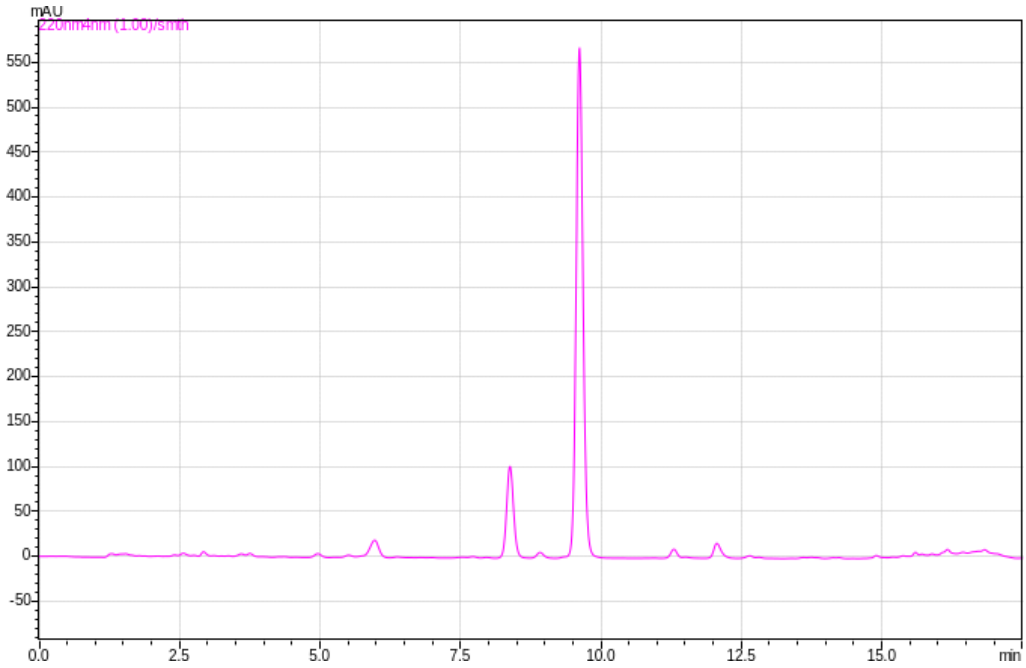


***Figura 17**. Extracto etanólico de la muestra CBN a 220 nm, tras el tratamiento a 260 °C durante 6 minutos. La relación entre formas se invierte y el pico a 8,4 min, asignado a cannabinol, pasa a constituir un componente principal del perfil.*

CBN exhibió la relación inversa. El tratamiento a 260 °C invirtió por completo el perfil y produjo además una señal a 8,4 minutos que en las otras matrices resultaba marginal. La **Tabla 4** expresa esta progresión en términos cuantitativos.

Matriz	Estado postcosecha	Índice de descarboxilación (%)	Área del pico de cannabinol (u.a.)
KMH	Seca y curada	1,8	83.789
M1	Fresca, sin procesar	22,6	76.209
CBN	Descarboxilada, 260 °C, 6 min	96,8	905.620

***Tabla 4**. Índice de descarboxilación y área del pico de cannabinol en el extracto etanólico de cada matriz. El índice se calcula como el área de Δ⁹-THC dividida por la suma de las áreas de Δ⁹-THC y THCA. La comparación se establece sobre material tal cual, sin corrección a base seca; los valores de M1 corresponden a tejido fresco.*

El índice ordena las tres matrices de manera monótona conforme a su historia postcosecha, desde el 1,8 % del material seco y curado hasta el 96,8 % del acondicionado térmicamente, con el tejido fresco en posición intermedia. Se calculó un índice de descarboxilación como cociente entre las áreas de las señales asignadas a las formas ácida y neutra. Dado que no se determinó un factor de respuesta relativo, este índice describe la respuesta DAD a 220 nm y no se interpreta como cociente molar ni como concentración relativa.

Este ordenamiento constituye la verificación más sólida de la discriminación espectral descripta más arriba. La descarboxilación convierte de manera específica las formas ácidas en sus homólogas neutras sin alterar el sistema de anillos, de modo que un tratamiento térmico de resultado conocido opera como un experimento de conversión. El comportamiento observado apoya fuertemente la asignación de la señal más retenida a la forma ácida, sin constituir por sí solo una confirmación de identidad molecular.

6.2.2 Formación de CBN durante el tratamiento térmico

El área del pico asignado al CBN en la matriz tratada superó en aproximadamente once veces la registrada en las dos matrices no tratadas. La comparación es legítima porque las masas extraídas y los volúmenes de solvente y de inyección fueron equivalentes. Este enriquecimiento merece atención porque no constituye un subproducto trivial del proceso.

El CBN no deriva de la descarboxilación. Esa reacción convierte el THCA en Δ⁹-THC mediante la pérdida no enzimática de un grupo carboxilo en forma de dióxido de carbono, sin modificar el esqueleto carbonado. El CBN procede en cambio de la aromatización oxidativa del producto neutro ya formado, una vía que requiere oxígeno y que el calor, la luz y el tiempo favorecen.

Un tratamiento dirigido a completar la descarboxilación promueve por lo tanto ambas reacciones de manera simultánea, y la segunda consume aquello que la primera produce.

El enriquecimiento observado resulta compatible con esa vía, tanto más cuanto que 260 °C constituye una condición severa frente a los intervalos habitualmente descriptos para la descarboxilación controlada. No se determinó el contenido de CBN de esta matriz antes del tratamiento, de modo que no puede atribuirse la totalidad del enriquecimiento al calor aplicado ni descartarse una contribución de la historia previa del material. Con esa salvedad, la observación sugiere que la temperatura de acondicionamiento merece ser controlada por sí misma y no solo ajustada hasta que la forma ácida desaparezca del cromatograma. La identidad del CBN requiere confirmación por coinyección, por lo que la señal se informa como asignación presuntiva y no se cuantifica.

6.3 Evaluación del rendimiento extractivo

La transferencia del analito desde la matriz vegetal hacia la fase líquida constituye la etapa limitante de cualquier procedimiento de cuantificación, y la elección del solvente afecta directamente al rendimiento de la extracción. Las metodologías clásicas han recurrido tradicionalmente a mezclas cloradas por su capacidad de solvatación de resinas lipofílicas. El presente ensayo contrastó ese sistema, metanol:cloroformo 9:1 (v/v), frente al etanol absoluto, manteniendo constantes la masa vegetal, el volumen de solvente y las condiciones de sonicación.

La comparación se estableció sobre el Δ⁹-THC, único analito con calibración propia, y se restringió a las dos matrices cuyas respuestas cayeron dentro del rango verificado en ambas ramas. El contenido en el material vegetal se obtuvo mediante la expresión general

$$\text{contenido (mg/g)} = C \times V \times FD / m$$

donde C es la concentración del extracto obtenida por interpolación en el modelo adoptado, en mg/mL, V el volumen de solvente dispensado, 10,0 mL en todos los casos, FD el factor de dilución previo a la inyección y m la masa exacta de material vegetal, en gramos. A modo de ejemplo trazable, el área media de la preparación M2 interpola una concentración de 0,0939 mg/mL. Restituido el factor de dilución 10, referida a los 10,0 mL de solvente y a los 0,2003 g extraídos, resulta un contenido de 46,87 mg/g para el extracto etanólico de M1.

Matriz	Etanol absoluto (mg/g)	MeOH:$CHCl_3$ 9:1 (mg/g)	Cociente EtOH / MC
M1, fresca	46,87	17,95	2,61
KMH, seca y curada	4,56	4,62	0,99

***Tabla 5**. Contenido semicuantitativo de Δ⁹-THC, a partir de las mediciones comprendidas dentro del rango de trabajo verificado. Los valores de M1 corresponden a material fresco, sin corrección a base seca.*

Sobre tejido fresco el extracto etanólico rindió 46,87 mg/g frente a 17,95 mg/g del clorofórmico, cociente de 2,61 a favor del etanol. Sobre material seco y curado se obtuvieron 4,56 mg/g con etanol y 4,62 mg/g con metanol:cloroformo 9:1, cociente 0,99. Estos valores fueron similares a nivel de la respuesta instrumental del único extracto analizado; no constituyen una prueba de equivalencia entre solventes ni incorporan la variabilidad de extracción. El desempeño relativo de ambos solventes no resultó por lo tanto uniforme entre matrices.

La comparación entre sistemas se expresa como cociente y no como diferencia porcentual. Una diferencia porcentual depende de cuál de los dos sistemas ocupe el denominador y arroja magnitudes distintas según la dirección en que se la lea, mientras que el cociente es simétrico frente a esa inversión y admite lectura directa contra la unidad, valor que representa la equivalencia entre solventes. El extracto etanólico de M1 excedió el límite superior del rango en lectura directa, razón por la cual se cuantificó a través de M2, dilución 1:10 de ese mismo extracto.

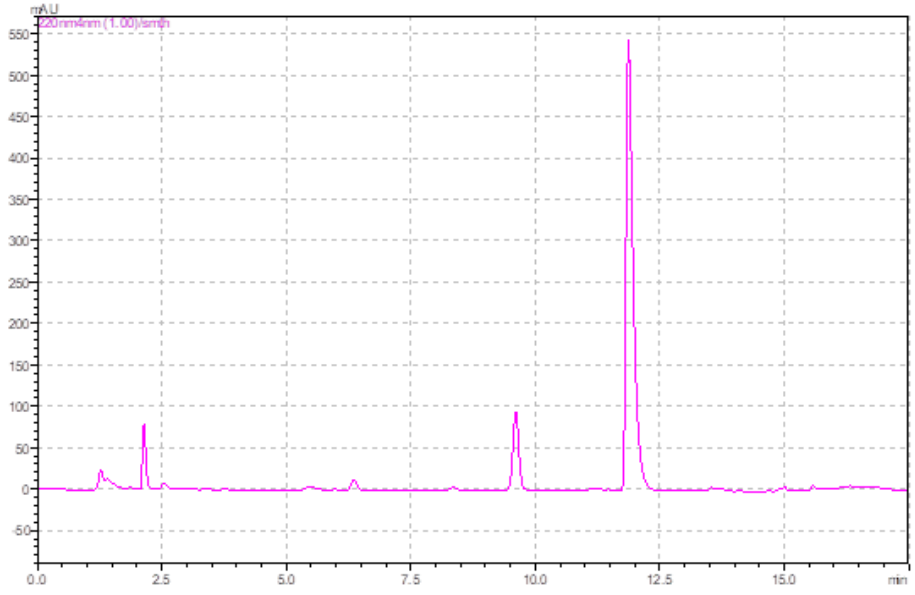


***Figura 18.** Extracto M1 MC, obtenido con metanol:cloroformo 9:1, a 220 nm. Se recuperan los mismos analitos que con etanol (Figura 16).*

La comparación de las **Figuras 16 y 18** muestra que ambos solventes recuperan cualitativamente los mismos analitos y conservan la integridad del perfil quimiotípico. Lo que

difiere es la magnitud de la respuesta, y esa diferencia no fue uniforme entre compuestos. El examen del conjunto de picos comunes a ambos cromatogramas de M1 arrojó cocientes que van desde valores inferiores a la unidad hasta valores superiores a cinco según el analito considerado.

La matriz CBN quedó fuera de esta comparación, dado que sus respuestas no cayeron dentro del rango de trabajo verificado en ambas ramas. En consecuencia, su perfil se utilizó sólo con finalidad cualitativa y para el cálculo del índice cromatográfico aparente. Además, debido a la profunda modificación estructural y fisicoquímica de la matriz provocada por el tratamiento térmico, se desestimó la comparación de los rendimientos de extracción. Contrastar estos valores con los del material vegetal en su estado natural no resulta pertinente. Por ende, la comparación cuantitativa entre solventes se restringió exploratoriamente a M1 y KMH.

6.4 Recuperación analítica

Las diferencias de respuesta observadas entre sistemas extractivos admiten en principio una explicación alternativa, que no reflejen una eficiencia extractiva distinta sino interferencias por coelución de compuestos endógenos capaces de comprometer la integración. Para acotar esa posibilidad se ejecutó un ensayo de recuperación por adición de estándar posterior a la extracción, con la preparación M2 como matriz base y adición en proporción volumétrica 1:1 de la solución estándar correspondiente al nivel E3. El área esperada se calculó como la semisuma del área media del blanco de matriz y la del nivel adicionado. Tanto la preparación fortificada como el blanco situaron su respuesta dentro del rango verificado.

Parámetro	Inyección 1	Inyección 2	Inyección 3	Media
Área observada, muestra fortificada (u.a.)	829.671	858.810	855.078	847.853
Área esperada (u.a.)	948.464	948.464	948.464	948.464
Recuperación global (%)	87,5	90,5	90,2	89,4
Recuperación de la fracción adicionada (%)	85,1	88,8	88,3	87,4

***Tabla 6**. Ensayo de recuperación por adición de estándar posterior a la extracción. Desviación estándar relativa de las áreas entre inyecciones, 1,87 %. Los valores corresponden a la respuesta del analito en el extracto ya obtenido y no a la etapa extractiva.*

La recuperación aparente fue 89,4 % para el balance global y 87,4 % para la fracción adicionada, con una dispersión inferior al 2 % entre inyecciones. Al tratarse de una fortificación posterior a la extracción, evaluada a un único nivel y con replicación de inyección, este ensayo

constituye una comprobación exploratoria de la respuesta en matriz y no evalúa la recuperación del proceso extractivo ni representa una validación de exactitud.

6.5 Limitaciones del estudio

Un conjunto de limitaciones acota el alcance de las conclusiones que anteceden. La principal es el nivel de replicación. Cada combinación de matriz y solvente fue objeto de una única extracción, las inyecciones replicadas de cada extracto (dos o tres según el extracto) miden repetibilidad instrumental. El diseño no permite por lo tanto estimar la variabilidad del proceso extractivo ni someter las diferencias observadas a contraste estadístico, de modo que corresponde hablar de diferencias observadas en un ensayo exploratorio y no de un efecto reproducible. Su confirmación requiere al menos tres extracciones independientes por condición sobre alícuotas de un mismo material homogeneizado.

En el plano de la cuantificación, el calibrante fue un concentrado cuya pureza se estimó por normalización de áreas y no un material de referencia certificado, razón por la cual todos los contenidos se informan como estimaciones semicuantitativas. El rango verificado se sustenta en cuatro niveles y varias determinaciones lo excedieron. No se determinó un factor de respuesta relativo entre las formas ácida y neutra, de modo que no se informan contenidos de THCA ni valores de THC total, y las relaciones de áreas entre ambas formas se denominan índices cromatográficos aparentes.

En cuanto a la identificación, la asignación de los picos se apoyó en retención, comportamiento espectral y coherencia con el tratamiento térmico, pero no en coinyección con estándares certificados.

Las condiciones de sonicación se aplicaron según el protocolo adoptado pero no fueron objeto de optimización ni de caracterización, de modo que no corresponde afirmar un mecanismo de ruptura celular ni la existencia de una meseta extractiva. El trabajo no incluyó ensayos de robustez ni la incorporación de un estándar interno. Y dado que las tres matrices difieren de manera simultánea en genética, condiciones de cultivo y procesamiento postcosecha, el estudio no permite atribuir las diferencias observadas entre ellas a un único factor.

7. Discusión

Los resultados experimentales admiten tres lecturas que exceden el caso particular de las muestras analizadas. La primera concierne a la capacidad del procedimiento para leer la historia de un material vegetal. Los tres perfiles obtenidos se ordenaron sobre el eje que va de las formas ácidas a las neutras exactamente como su procesamiento permitía anticipar, y lo hicieron con una separación amplia entre extremos, desde un índice de descarboxilación del 1,8 % en el material seco y curado hasta el 96,8 % en el acondicionado térmicamente. Esta capacidad no es un accesorio del método sino su consecuencia directa. La acidificación uniforme de ambas fases móviles suprime la ionización del grupo carboxilo y permite retener las formas ácidas sin derivatización, mientras que la absorbancia diferencial a 310 nm las distingue de las neutras dentro de una misma inyección. Un procedimiento que operase a temperatura elevada durante la separación no conservaría esa información, ya que la cromatografía de gases descarboxila los cannabinoides ácidos en el puerto de inyección y, sin derivatización previa, habría informado perfiles semejantes para matrices cuyo estado real es opuesto.

La segunda lectura concierne al tratamiento térmico. El acondicionamiento a 260 °C cumplió su objetivo nominal con holgura, dado que prácticamente toda la forma ácida desapareció del cromatograma. Sin embargo, el mismo perfil que documenta esa conversión exhibe un pico de CBN once veces mayor que el de las matrices no tratadas. Dado que el CBN no procede de la descarboxilación sino de la aromatización oxidativa del producto neutro, ese enriquecimiento resulta compatible con la degradación de una fracción del principio activo durante el propio acondicionamiento. La temperatura merece por lo tanto ser tratada como una variable a controlar por sí misma, y su efecto sobre la relación entre producto y subproducto exige un ensayo específico con control pretratamiento y varias temperaturas.

La tercera concierne al desempeño de los sistemas extractivos, que no resultó uniforme entre matrices. El etanol absoluto rindió sobre material seco y curado un contenido similar al de la mezcla clorada, con un cociente de 0,99, mientras que sobre tejido fresco lo excedió con un cociente de 2,61. Una interpretación compatible con este comportamiento vincularía la divergencia con el contenido de agua del tejido y su efecto sobre el acceso del solvente al analito. Los cannabinoides se acumulan en la cavidad secretora de los tricomas glandulares, embebidos en una resina lipofílica y confinados por una cutícula. En material desecado la contracción del tejido facilitaría la ruptura de esa barrera durante la molienda y la cavitación, mientras que en tejido fresco la resina se encontraría rodeada por una fase acuosa que el solvente

debe atravesar. El etanol, miscible con agua en toda proporción, podría formar con el agua tisular una fase única de polaridad intermedia capaz de penetrar la matriz, mientras que la mezcla metanol:cloroformo, cuya capacidad de solvatación reside en un componente inmiscible con el agua, tendería a separar fases sobre la superficie del material. Esta lectura ordena los datos de manera económica, pero el diseño no moduló de forma controlada el contenido de humedad de una misma matriz, de modo que la contribución del agua tisular no puede aislarse de las restantes diferencias entre los especímenes. La hipótesis orienta la interpretación sin quedar demostrada por ella.

Con esa salvedad, la observación tiene consecuencias prácticas al considerarse junto con criterios ajenos al rendimiento. La bibliografía ha señalado la inestabilidad estructural de ciertos cannabinoides en presencia de solventes halogenados, a lo que se suman el perfil toxicológico del cloroformo, los requerimientos de manipulación y disposición que impone y su costo. En las condiciones exploratorias de este estudio el etanol mostró un desempeño aparente comparable en KMH y una respuesta mayor en M1, además de ventajas operativas y ambientales frente al sistema metanol:cloroformo. La comparación requiere confirmación mediante extracciones independientes antes de generalizarse a otras matrices o condiciones.

8. Conclusión

El presente trabajo desarrolló y evaluó preliminarmente un procedimiento de extracción asistida por ultrasonido acoplado a HPLC-DAD para la separación de señales cannabinoides y la estimación semicuantitativa de Δ^9-THC en tres matrices contrastantes. No se presenta un método validado ni de aplicabilidad general, sino un desarrollo exploratorio cuyo alcance queda delimitado por las limitaciones enunciadas con anterioridad.

El gradiente propuesto separó las formas neutra y ácida del tetrahidrocannabinol con retención reproducible, con desviaciones estándar relativas comprendidas entre 0,22 % y 0,78 % para las cinco señales asignadas y con una resolución no inferior a 2,90 para la forma neutra. En las matrices dominadas por la forma ácida, la resolución de ese analito descendió a valores comprendidos entre 1,15 y 1,35, de modo que su separación debe describirse como aparente y no como basal.

La acidificación uniforme de ambas fases móviles permitió retener las formas ácidas sin recurrir a derivatización, y la absorbancia diferencial a 310 nm sustentó su diferenciación respecto de las neutras. La inversión del perfil a través del tratamiento térmico aplicado a una de las matrices

apoya esa asignación de manera independiente, sin constituir una confirmación de identidad molecular, que requeriría coinyección con estándares certificados.

El procedimiento permitió caracterizar el estado de descarboxilación de las tres matrices y ordenarlas conforme a su historia postcosecha, mediante un índice cromatográfico aparente que varió entre el 1,8 % del material seco y curado y el 96,8 % del acondicionado a 260 °C durante 6 minutos. Esta última matriz presentó además un pico de CBN once veces mayor que el de las matrices no tratadas, observación compatible con la aromatización oxidativa del producto neutro durante el acondicionamiento, cuya atribución causal requiere un control previo al tratamiento que este trabajo no incluyó.

Sobre las mediciones comprendidas dentro del rango de trabajo verificado, el etanol absoluto rindió un contenido similar al del sistema metanol:cloroformo 9:1 sobre material seco y curado, con 4,56 y 4,62 mg/g, y un contenido mayor sobre tejido fresco, con 46,87 frente a 17,95 mg/g. Dado que se dispuso de una única extracción por condición, estas diferencias se informan como observadas y no como un efecto reproducible, y su confirmación requiere réplicas extractivas independientes. Con esa salvedad, los resultados sugieren que el estado del material vegetal puede modificar el comportamiento relativo de los sistemas extractivos y que debería considerarse de manera explícita durante el desarrollo de métodos analíticos.

El ensayo de recuperación por adición de estándar posterior a la extracción arrojó valores del 89,4 % y 87,4 % según se considere el balance global o la fracción adicionada, con una dispersión inferior al 2 %. Este resultado informa sobre la respuesta analítica del analito en presencia del fondo matricial del extracto ensayado y no valida el proceso extractivo, cuyo control exigiría fortificación previa a la extracción.

Finalmente, el procedimiento permitió separar señales asignadas de manera presuntiva a cannabinoides y estimar semicuantitativamente Δ^9-THC con la instrumentación disponible. Los resultados constituyen una base exploratoria y deben interpretarse dentro de las limitaciones del diseño experimental y del calibrante utilizado.

Referencias

[1] F. T. Chacon, W. M. Raup-Konsavage, K. E. Vrana, J. J. Kellogg. Secondary Terpenes in Cannabis sativa L.: Synthesis and Synergy. *Biomedicines*, **2022**, *10*, DOI 10.3390/biomedicines10123142.

[2] A. K. Al-Khazaleh, X. Zhou, D. J. Bhuyan, G. W. Münch, E. A. Al-Dalabeeh, K. Jaye, D. Chang. The Neurotherapeutic Arsenal in Cannabis sativa: Insights into Anti-Neuroinflammatory and Neuroprotective Activity and Potential Entourage Effects. *Molecules*, **2024**, *29*, DOI 10.3390/molecules29020410.

[3] C. Pagano, G. Navarra, L. Coppola, G. Avilia, M. Bifulco, C. Laezza. Cannabinoids: Therapeutic Use in Clinical Practice. *Int. J. Mol. Sci.*, **2022**, *23*, DOI 10.3390/ijms23063344.

[4] R. B. Zurier, S. H. Burstein. Cannabinoids, inflammation, and fibrosis. *FASEB Journal*, **2016**, *30*, 3682–3689.

[5] E. P. Baron. *Medicinal Properties of Cannabinoids, Terpenes, and Flavonoids in Cannabis, and Benefits in Migraine, Headache, and Pain: An Update on Current Evidence and Cannabis Science*, **2018**.

[6] S. Montserrat-De La Paz, F. Marín-Aguilar, M. D. García-Giménez, M. A. Fernández-Arche. Hemp (Cannabis sativa L.) seed oil: Analytical and phytochemical characterization of the unsaponifiable fraction. *J. Agric. Food Chem.*, **2014**, *62*, 1105–1110.

[7] M. Mandrioli, M. Tura, S. Scotti, T. G. Toschi. Fast Detection of 10 Cannabinoids by RP-HPLC-UV Method in Cannabis sativa L. *Molecules*, **2019**, *24*, DOI 10.3390/molecules24112113.

[8] T. Alberti, F. Didaran, S. Sharma, R. De Sarandy Raposo, A. A. Diatta, M. Maraschin, J. F. Da Cunha Leme Filho. Bracts, Buds, and Biases: Uncovering Gaps in Trichome Density Quantification and Cannabinoid Concentration in Cannabis sativa L. *Plants*, **2025**, *14*, DOI 10.3390/plants14142220.

[9] S. J. Livingston, T. D. Quilichini, J. K. Booth, D. C. J. Wong, K. H. Rensing, J. Laflamme-Yonkman, S. D. Castellarin, J. Bohlmann, J. E. Page, A. L. Samuels. Cannabis glandular trichomes alter morphology and metabolite content during flower maturation. *Plant Journal*, **2020**, *101*, 37–56.

[10] A. Saloner, N. Bernstein. Nitrogen supply affects cannabinoid and terpenoid profile in medical cannabis (Cannabis sativa L.). *Ind. Crops Prod.*, **2021**, *167*, DOI 10.1016/j.indcrop.2021.113516.

[11] S. Eichhorn Bilodeau, B. Sen Wu, A. S. Rufyikiri, S. MacPherson, M. Lefsrud. An update on plant photobiology and implications for cannabis production. *Front. Plant Sci.*, **2019**, *10*, DOI 10.3389/fpls.2019.00296.

[12] J. G. Herrera, L. A. Rolim, R. S. Honorato, M. F. Pimentel. Analysis of Cannabinoids in Medicinal Cannabis Products: A Comprehensive Review. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2024**, *35*, DOI 10.21577/0103-5053.20240129.

[13] C. Burnier, P. Esseiva, C. Roussel. Quantification of THC in Cannabis plants by fast-HPLC-DAD: A promising method for routine analyses. *Talanta*, **2019**, *192*, 135–141.

[14] M. Pourseyed Lazarjani, S. Torres, T. Hooker, C. Fowlie, O. Young, A. Seyfoddin. Methods for quantification of cannabinoids: A narrative review. *J. Cannabis Res.*, **2020**, *2*, DOI 10.1186/s42238-020-00040-2.

[15] J. Tran, A. C. Elkins, G. C. Spangenberg, S. J. Rochfort. High-Throughput Quantitation of Cannabinoids by Liquid Chromatography Triple-Quadrupole Mass Spectrometry. *Molecules*, **2022**, *27*, DOI 10.3390/molecules27030742.

[16] H. C. Lu, K. MacKie. An introduction to the endogenous cannabinoid system. *Biol. Psychiatry*, **2016**, *79*, 516–525.

[17] O. Aizpurua-Olaizola, I. Elezgarai, I. Rico-Barrio, I. Zarandona, N. Etxebarria, A. Usobiaga. Targeting the endocannabinoid system: future therapeutic strategies. *Drug Discov. Today*, **2017**, *22*, 105–110.

[18] L. Cristino, T. Bisogno, V. Di Marzo. Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nat. Rev. Neurol.*, **2020**, *16*, 9–29.

[19] M. Udoh, M. Santiago, S. Devenish, I. S. McGregor, M. Connor. Cannabichromene is a cannabinoid CB2 receptor agonist. *Br. J. Pharmacol.*, **2019**, *176*, 4537–4547.

[20] H. Lowe, N. Toyang, B. Steele, J. Bryant, W. Ngwa. The endocannabinoid system: A potential target for the treatment of various diseases. *Int. J. Mol. Sci.*, **2021**, *22*, DOI 10.3390/ijms22179472.

[21] J. L. Capodice, S. A. Kaplan. The endocannabinoid system, cannabis, and cannabidiol: Implications in urology and men's health. *Curr. Urol.*, **2021**, *15*, 95–100.

[22] K. B. Walsh, A. E. McKinney, A. E. Holmes. Minor Cannabinoids: Biosynthesis, Molecular Pharmacology and Potential Therapeutic Uses. *Front. Pharmacol.*, **2021**, *12*, DOI 10.3389/fphar.2021.777804.

[23] M. M. Radwan, S. Chandra, S. Gul, M. A. Elsohly. Cannabinoids, phenolics, terpenes and alkaloids of cannabis. *Molecules*, **2021**, *26*, DOI 10.3390/molecules26092774.

[24] A. Cortez-Resendiz, T. J. Leiter, S. M. Riela, N. M. Graziane, W. M. Raup-Konsavage, K. E. Vrana. The Pharmacology of Cannabinoids in Chronic Pain. *Med. Cannabis Cannabinoids*, **2025**, 31–46.

[25] C. E. Turner, M. A. ElSohly, E. G. Boeren. *CONSTITUENTS OF CANNABIS SATIVA L. XVII. A REVIEW OF NATURAL CONSTITUENTS*, **1980**.

[26] R. G. Pertwee. The diverse CB 1 and CB 2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: Δ 9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and Δ 9-tetrahydrocannabivarin. *Br. J. Pharmacol.*, **2008**, *153*, 199–215.

[27] C. Hazekamp. *Cannabis: Extracting the Medicine*, **2007**.

[28] E. B. Russo. Current therapeutic cannabis controversies and clinical trial design issues. *Front. Pharmacol.*, **2016**, *7*, DOI 10.3389/fphar.2016.00309.

[29] T. F. Plasse, R. W. Gorter, S. H. Krasnow, M. Lane, K. V Shepard, R. G. Wadleigh, R. W. Gorter, S. H. Krasnow, M. Lane, K. V Shepard, R. G. Wadleigh. *Recent Clinical Experience With Dronabinol I*, **1991**.

[30] C. Collin, P. Davies, I. K. Mutiboko, S. Ratcliffe. Randomized controlled trial of cannabis-based medicine in spasticity caused by multiple sclerosis. *Eur. J. Neurol.*, **2007**, *14*, 290–296.

[31] C. Collin, E. Ehler, G. Waberzinek, Z. Alsindi, P. Davies, K. Powell, W. Notcutt, C. O'leary, S. Ratcliffe, I. Nováková, O. Zapletalova, J. Piková, Z. Ambler. A double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group study of Sativex, in subjects with symptoms of spasticity due to multiple sclerosis. *Neurol. Res.*, **2010**, *32*, 451–459.

[32] A. J. Hampson, M. Grimaldi, J. Axelrod, D. Wink. *Cannabidiol and () 9-Tetrahydrocannabinol Are Neuroprotective Antioxidants*, **1998**.

[33] S. Muchtar, S. Almog, M.T. Torracca, M.F. Saettone, S. Benita. A submicron emulsion as ocular vehicle for delta-8-tetrahydrocannabinol: effect on intraocular pressure in rabbits. **1992**, DOI 10.1159/000267160.

[34] L. O. Hanuš, S. M. Meyer, E. Muñoz, O. Taglialatela-Scafati, G. Appendino. Phytocannabinoids: A unified critical inventory. *Nat. Prod. Rep.*, **2016**, *33*, 1357–1392.

[35] K. Hippalgaonkar, W. Gul, M. A. ElSohly, M. A. Repka, S. Majumdar. Enhanced solubility, stability, and transcorneal permeability of δ-8-tetrahydrocannabinol in the presence of cyclodextrins. *AAPS PharmSciTech*, **2011**, *12*, 723–731.

[36] A. M. Malfait, R. Gallily, P. F. Sumariwalla, A. S. Malik, E. Andreakos, R. Mechoulam, M. Feldmann. *The Nonpsychoactive Cannabis Constituent Cannabidiol Is an Oral Anti-Arthritic Therapeutic in Murine Collagen-Induced Arthritis*, **2000**.

[37] H. Wong, B. E. Cairns. Cannabidiol, cannabinol and their combinations act as peripheral analgesics in a rat model of myofascial pain. *Arch. Oral Biol.*, **2019**, *104*, 33–39.

[38] D. De Gregorio, R. J. McLaughlin, L. Posa, R. Ochoa-Sanchez, J. Enns, M. Lopez-Canul, M. Aboud, S. Maione, S. Comai, G. Gobbi. Cannabidiol modulates serotonergic transmission and reverses both allodynia and anxiety-like behavior in a model of neuropathic pain. *Pain*, **2019**, *160*, 136–150.

[39] J. A. S. Crippa, G. Nogueira Derenusson, T. Borduqui Ferrari, L. Wichert-Ana, F. L. S. Duran, R. Martin-Santos, M. Vinícius Simões, S. Bhattacharyya, P. Fusar-Poli, Z. Atakan, A. Santos Filho, M. C. Freitas-Ferrari, P. K. McGuire, A. W. Zuardi, G. F. Busatto, J. E. C. Hallak. Neural basis of anxiolytic effects of cannabidiol (CBD) in generalized social anxiety disorder: A preliminary report. *Journal of Psychopharmacology*, **2011**, *25*, 121–130.

[40] Lafaye G, Karila L, Blecha L, Benyamina A. Cannabis, cannabinoids, and health. *Dialogues Clin Neurosci.*, **2017**, 309–316.

[41] O. Devinsky, J. H. Cross, L. Laux, E. Marsh, I. Miller, R. Nabbout, I. E. Scheffer, E. A. Thiele, S. Wright. Trial of Cannabidiol for Drug-Resistant Seizures in the Dravet Syndrome. *New England Journal of Medicine*, **2017**, *376*, 2011–2020.

[42] O. Devinsky, A. D. Patel, J. H. Cross, V. Villanueva, E. C. Wirrell, M. Privitera, S. M. Greenwood, C. Roberts, D. Checketts, K. E. VanLandingham, S. M. Zuberi. Effect of Cannabidiol on Drop Seizures in the Lennox–Gastaut Syndrome. *New England Journal of Medicine*, **2018**, *378*, 1888–1897.

[43] M. Tzadok, S. Uliel-Siboni, I. Linder, U. Kramer, O. Epstein, S. Menascu, A. Nissenkorn, O. B. Yosef, E. Hyman, D. Granot, M. Dor, T. Lerman-Sagie, B. Ben-Zeev. CBD-enriched medical cannabis for intractable pediatric epilepsy: The current Israeli experience. *Seizure*, **2016**, *35*, 41–44.

[44] E. A. Thiele, E. D. Marsh, J. A. French, M. B. Mazurkiewicz, S. R. Benbadis, C. Joshi, P. D. Lyons, A. Taylor, C. Roberts, K. Sommerville, B. Gunning, J. Gawlowicz, P. Lisewski, K. Mitosek Szewczyk, B. Steinborn, M. Zolnowska, E. Hughes, A. McLellan, S. Benbadis, M. Ciliberto, G. Clark, D. Dlugos, F. Filloux, R. Flamini, J. French, M. Frost, S. Haut, C. Joshi, S. Kapoor, S. Kessler, L. Laux, P. Lyons, E. Marsh, D. Moore, R. Morse, V. Nagaraddi, W. Rosenfeld, L. Seltzer, R. Shellhaas, E. Thiele, L. L. Thio, D. Wang, A. Wilfong. Cannabidiol in patients with seizures associated with Lennox-Gastaut syndrome (GWPCARE4): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *The Lancet*, **2018**, *391*, 1085–1096.

[45] F. J. Carrillo-Salinas, C. Navarrete, M. Mecha, A. Feliú, J. A. Collado, I. Cantarero, M. L. Bellido, E. Muñoz, C. Guaza. A cannabigerol derivative suppresses immune responses and protects mice from experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One*, **2014**, *9*, DOI 10.1371/journal.pone.0094733.

[46] F. Borrelli, I. Fasolino, B. Romano, R. Capasso, F. Maiello, D. Coppola, P. Orlando, G. Battista, E. Pagano, V. Di Marzo, A. A. Izzo. Beneficial effect of the non-psychotropic plant cannabinoid cannabigerol on experimental inflammatory bowel disease. *Biochem. Pharmacol.*, **2013**, *85*, 1306–1316.

[47] Y. Wen, Z. Wang, R. Zhang, Y. Zhu, G. Lin, R. Li, J. Zhang. The antinociceptive activity and mechanism of action of cannabigerol. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, **2023**, *158*, DOI 10.1016/j.biopha.2022.114163.

[48] D. E. Sepulveda, D. P. Morris, W. M. Raup-Konsavage, D. Sun, K. E. Vrana, N. M. Graziane. Cannabigerol (CBG) attenuates mechanical hypersensitivity elicited by chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *European Journal of Pain (United Kingdom)*, **2022**, *26*, 1950–1966.

[49] R. Nachnani, W. M. Raup-Konsavage, K. E. Vrana. The pharmacological case for cannabigerol. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **2021**, *376*, 204–212.

[50] G. Appendino, S. Gibbons, A. Giana, A. Pagani, G. Grassi, M. Stavri, E. Smith, M. M. Rahman. Antibacterial cannabinoids from Cannabis sativa: A structure-activity study. *J. Nat. Prod.*, **2008**, *71*, 1427–1430.

[51] H. N. Elsohly, C. E. Turner, A. M. Clark, M. A. Elsohly. *Synthesis and Antimicrobial Activities of Certain Cannabichromene and Cannabigerol Related Compounds*, **1982**.

[52] J. Díaz-Alonso, J. Paraíso-Luna, C. Navarrete, C. Del Río, I. Cantarero, B. Palomares, J. Aguareles, J. Fernández-Ruiz, M. L. Bellido, F. Pollastro, G. Appendino, M. A. Calzado, I. Galve-Roperh, E. Muñoz. VCE-003.2, a novel cannabigerol derivative, enhances neuronal progenitor cell survival and alleviates symptomatology in murine models of Huntington's disease. *Sci. Rep.*, **2016**, *6*, DOI 10.1038/srep29789.

[53] S. Valdeolivas, C. Navarrete, I. Cantarero, M. L. Bellido, E. Muñoz, O. Sagredo. Neuroprotective Properties of Cannabigerol in Huntington's Disease: Studies in R6/2 Mice and 3-Nitropropionate-lesioned Mice. *Neurotherapeutics*, **2015**, *12*, 185–199.

[54] T. Gülck, B. L. Møller. Phytocannabinoids: Origins and Biosynthesis. *Trends Plant Sci.*, **2020**, *25*, 985–1004.

[55] W. M. Raup-Konsavage, D. E. Sepulveda, J. Wang, N. V. Dokholyan, K. E. Vrana, N. M. Graziane. Antinociceptive Effects of Cannabichromene (CBC) in Mice: Insights from von Frey, Tail-Flick, Formalin, and Acetone Tests. *Biomedicines*, **2024**, *12*, DOI 10.3390/biomedicines12010083.

[56] A. A. G. Stoco, P. G. Mazzola. Therapeutic potential of cannabinoids for treating atopic dermatitis. *J. Cannabis Res.*, **2025**, *7*, DOI 10.1186/s42238-025-00317-4.

[57] S. Maione, F. Piscitelli, L. Gatta, D. Vita, L. De Petrocellis, E. Palazzo, V. De Novellis, V. Di Marzo. Non-psychoactive cannabinoids modulate the descending pathway of antinociception in anaesthetized rats through several mechanisms of action. *Br. J. Pharmacol.*, **2011**, *162*, 584–596.

[58] D. E. Sepulveda, K. E. Vrana, J. J. Kellogg, J. E. Bisanz, D. Desai, N. M. Graziane, W. M. Raup-Konsavage. The Potential of Cannabichromene (CBC) as a Therapeutic Agent. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **2024**, *391*, 206–213.

[59] N. Shinjyo, V. Di Marzo. The effect of cannabichromene on adult neural stem/progenitor cells. *Neurochem. Int.*, **2013**, *63*, 432–437.

[60] Karniol IG, Shirakawa I, Kasinski N, Pfeferman A, Carlini EA. Cannabidiol interferes with the effects of delta 9 - tetrahydrocannabinol in man. *Eur J Pharmacol.*, **1974**, *28(1)*, 172–7.

[61] J. A. Farrimond, B. J. Whalley, C. M. Williams. Cannabinol and cannabidiol exert opposing effects on rat feeding patterns. *Psychopharmacology (Berl).*, **2012**, *223*, 117–129.

[62] J. A. Farrimond, B. J. Whalley, C. M. Williams. Non-Δ 9tetrahydrocannabinol phytocannabinoids stimulate feeding in rats. *Behavioural Pharmacology*, **2012**, *23*, 113–117.

[63] N. L. Stone, A. J. Murphy, T. J. England, S. E. O'Sullivan. A systematic review of minor phytocannabinoids with promising neuroprotective potential. *Br. J. Pharmacol.*, **2020**, *177*, 4330–4352.

[64] C. T. Aiken, A. J. Tobin, E. S. Schweitzer. A cell-based screen for drugs to treat Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.*, **2004**, *16*, 546–555.

[65] N. J. Dar, A. Currais, T. Taguchi, N. Andrews, P. Maher. Cannabinol (CBN) alleviates age-related cognitive decline by improving synaptic and mitochondrial health. *Redox Biol.*, **2025**, *84*, DOI 10.1016/j.redox.2025.103692.

[66] K. W. Hillig, P. G. Mahlberg. A chemotaxonomic analysis of cannabinoid variation in Cannabis (Cannabaceae). *Am. J. Bot.*, **2004**, *91*, 966–975.

[67] E. Small. Classification of Cannabis sativa L.: In relation to agricultural, biotechnological, medical and recreational utilization, in *Cannabis Sativa L. - Botany and Biotechnology*, Springer International Publishing, **2017**, pp. 1–62.

[68] M. de Ronne, É. Lapierre, D. Torkamaneh. Genetic insights into agronomic and morphological traits of drug-type cannabis revealed by genome-wide association studies. *Sci. Rep.*, **2024**, *14*, DOI 10.1038/s41598-024-58931-w.

[69] J. Kanabus, M. Bryła, M. Roszko. Effect of Selected Drying Methods on the Cannabinoid Profile of Cannabis sativa L. var. sativa Inflorescences and Leaves. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, **2024**, *74*, 408–418.

[70] D. B. Sutton, Z. K. Punja, G. Hamarneh. Characterization of trichome phenotypes to assess maturation and flower development in Cannabis sativa L. (cannabis) by automatic trichome gland analysis. *Smart Agricultural Technology*, **2023**, *3*, DOI 10.1016/j.atech.2022.100111.

[71] P. C. Das, A. R. Vista, L. G. Tabil, O. D. Baik. Postharvest Operations of Cannabis and Their Effect on Cannabinoid Content: A Review. *Bioengineering*, **2022**, *9*, DOI 10.3390/bioengineering9080364.

[72] D. C. Simiyu, J. H. Jang, O. R. Lee. Understanding Cannabis sativa L.: Current Status of Propagation, Use, Legalization, and Haploid-Inducer-Mediated Genetic Engineering. *Plants*, **2022**, *11*, DOI 10.3390/plants11091236.

[73] F. Zandkarimi, J. Decatur, J. Casali, T. Gordon, C. Skibola, C. Nuckolls. Comparison of the Cannabinoid and Terpene Profiles in Commercial Cannabis from Natural and Artificial Cultivation. *Molecules*, **2023**, *28*, DOI 10.3390/molecules28020833.

[74] I. Trancoso, G. A. R. de Souza, P. R. Dos Santos, K. D. Dos Santos, R. M. D. S. N. de Miranda, A. L. P. M. da Silva, D. Z. Santos, I. F. García-Tejero, E. Campostrini. Cannabis sativa L.: Crop Management and Abiotic Factors That Affect Phytocannabinoid Production. *Agronomy*, **2022**, *12*, DOI 10.3390/agronomy12071492.

[75] N. Dimopoulos, Q. Guo, L. Liu, R. A. Halimi, L. Garcia-de Heer, M. Nolan, J. C. Mieog, B. J. Barkla, T. Kretzschmar. Regulation of secondary metabolism in Cannabis sativa glandular trichomes by abscisic acid and water deficit stress during late flowering development. *Plant Stress*, **2025**, *15*, DOI 10.1016/j.stress.2025.100799.

[76] Z. K. Punja, D. B. Sutton, T. Kim. Glandular trichome development, morphology, and maturation are influenced by plant age and genotype in high THC-containing cannabis (Cannabis sativa L.) inflorescences. *J. Cannabis Res.*, **2023**, *5*, DOI 10.1186/s42238-023-00178-9.

[77] M. Birenboim, N. Brikenstein, D. Duanis-Assaf, D. Maurer, D. Chalupowicz, D. Kenigsbuch, J. A. Shimshoni. In Pursuit of Optimal Quality: Cultivar-Specific Drying Approaches for Medicinal Cannabis. *Plants*, **2024**, *13*, DOI 10.3390/plants13071049.

[78] S. R. Sommano, C. Chittasupho, W. Ruksiriwanich, P. Jantrawut. The Cannabis Terpenes. *Molecules*, **2020**, *25*, DOI 10.3390/MOLECULES25245792.

[79] J. rg Gertsch, M. Leonti, S. Raduner, I. Racz, J.-Z. Chen, X.-Q. Xie, K.-H. Altmann, M. Karsak, A. Zimmer. *Beta-Caryophyllene Is a Dietary Cannabinoid*, **2008**.

[80] A. F. Bento, R. Marcon, R. C. Dutra, R. F. Claudino, M. Cola, D. F. P. Leite, J. B. Calixto. β-caryophyllene inhibits dextran sulfate sodium-induced colitis in mice through CB2 receptor activation and PPARγ pathway. *American Journal of Pathology*, **2011**, *178*, 1153–1166.

[81] K. Fidyt, A. Fiedorowicz, L. Strządała, A. Szumny. β-caryophyllene and β-caryophyllene oxide—natural compounds of anticancer and analgesic properties. *Cancer Med.*, **2016**, *5*, 3007–3017.

[82] A. L. Klauke, I. Racz, B. Pradier, A. Markert, A. M. Zimmer, J. Gertsch, A. Zimmer. The cannabinoid CB2 receptor-selective phytocannabinoid beta-caryophyllene exerts analgesic effects in mouse models of inflammatory and neuropathic pain. *European Neuropsychopharmacology*, **2014**, *24*, 608–620.

[83] Y. Tambe, H. Tsujiuchi', G. Honda1, Y. Ikeshiro2, S. Tanaka1. *Letters Gastric Cytoprotection of the Non-Steroidal Anti-Inflammatory Sesquiterpene, /J-Caryophyllene*, **1996**.

[84] C. Ghelardini, N. Galeotti, L. Di, C. Mannelli, G. Mazzanti, A. Bartolini. *Local Anaesthetic Activity of B-Caryophyllene*, **2001**.

[85] C. Kim, S. K. Cho, K. D. Kim, D. Nam, W. S. Chung, H. J. Jang, S. G. Lee, B. S. Shim, G. Sethi, K. S. Ahn. β-Caryophyllene oxide potentiates TNFα-induced apoptosis and inhibits invasion through down-modulation of NF-κB-regulated gene products. *Apoptosis*, **2014**, *19*, 708–718.

[86] I. Lampronti, A. M. Saab, R. Gambari. Antiproliferative activity of essential oils derived from plants belonging to the Magnoliophyta division. *Int. J. Oncol.*, **2006**, *29*, 989–995.

[87] K. R. Park, D. Nam, H. M. Yun, S. G. Lee, H. J. Jang, G. Sethi, S. K. Cho, K. S. Ahn. β-Caryophyllene oxide inhibits growth and induces apoptosis through the suppression of PI3K/AKT/mTOR/S6K1 pathways and ROS-mediated MAPKs activation. *Cancer Lett.*, **2011**, *312*, 178–188.

[88] N. Dalavaye, M. Nicholas, M. Pillai, S. Erridge, M. H. Sodergen. The Clinical Translation of α-humulene - A Scoping Review. *Planta Med.*, **2023**, DOI 10.1055/a-2307-8183.

[89] E. S. Fernandes, G. F. Passos, R. Medeiros, F. M. da Cunha, J. Ferreira, M. M. Campos, L. F. Pianowski, J. B. Calixto. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of Cordia verbenacea. *Eur. J. Pharmacol.*, **2007**, *569*, 228–236.

[90] J. S. Chaves, P. C. Leal, L. Pianowisky, J. B. Calixto. Pharmacokinetics and tissue distribution of the sesquiterpene α-humulene in mice. *Planta Med.*, **2008**, *74*, 1678–1683.

[91] A. P. Rogerio, E. L. Andrade, D. F. P. Leite, C. P. Figueiredo, J. B. Calixto. Preventive and therapeutic anti-inflammatory properties of the sesquiterpene α-humulene in experimental airways allergic inflammation. *Br. J. Pharmacol.*, **2009**, *158*, 1074–1087.

[92] E. Liktor-Busa, A. Keresztes, J. Lavigne, J. M. Streicher, T. M. Largent-Milnes. Analgesic Potential of Terpenes Derived from Cannabis sativa. *Pharmacol. Rev.*, **2021**, *73*, 1270–1297.

[93] D. Yeo, S. J. Hwang, Y. S. Song, H. J. Lee. Humulene inhibits acute gastric mucosal injury by enhancing mucosal integrity. *Antioxidants*, **2021**, *10*, DOI 10.3390/antiox10050761.

[94] M. Hashimoto, K. Takahashi, T. Ohta. Inhibitory effects of linalool, an essential oil component of lavender, on nociceptive TRPA1 and voltage-gated Ca2+ channels in mouse sensory neurons. *Biochem. Biophys. Rep.*, **2023**, *34*, DOI 10.1016/j.bbrep.2023.101468.

[95] K. Weston-Green, H. Clunas, C. Jimenez Naranjo. A Review of the Potential Use of Pinene and Linalool as Terpene-Based Medicines for Brain Health: Discovering Novel Therapeutics in the Flavours and Fragrances of Cannabis. *Front. Psychiatry*, **2021**, *12*, DOI 10.3389/fpsyt.2021.583211.

[96] A. Nakamura, S. Fujiwara, I. Matsumoto, K. Abe. Stress repression in restrained rats by (R)-(-)-Linalool inhalation and gene expression profiling of their whole blood cells. *J. Agric. Food Chem.*, **2009**, *57*, 5480–5485.

[97] G. Buchbauer, L. Jirovetz, W. Alter Jäger. *Aromatherapy: Evidence for Sedative Effects of the Essential Oil of Lavender after Inhalation*, **1991**.

[98] S. L. Guzmán-Gutiérrez, H. Bonilla-Jaime, R. Gómez-Cansino, R. Reyes-Chilpa. Linalool and β-pinene exert their antidepressant-like activity through the monoaminergic pathway. *Life Sci.*, **2015**, *128*, 24–29.

[99] V. M. Linck, A. L. da Silva, M. Figueiró, E. B. Caramão, P. R. H. Moreno, E. Elisabetsky. Effects of inhaled Linalool in anxiety, social interaction and aggressive behavior in mice. *Phytomedicine*, **2010**, *17*, 679–683.

[100] F. N. Souto-Maior, F. L. D. De Carvalho, L. C. S. L. De Morais, S. M. Netto, D. P. De Sousa, R. N. De Almeida. Anxiolytic-like effects of inhaled linalool oxide in experimental mouse anxiety models. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **2011**, *100*, 259–263.

[101] G. Buchbauer, L. Jirovetz, W. Jager, C. Plank, H. Dietrich. *Fragrance Compounds and Essential Oils with Sedative Effects upon Inhalation Accepted for Publication*, **1992**.

[102] A. T. Peana, P. S. D'Aquila, M. L. Chessa, M. D. L. Moretti, G. Serra, P. Pippia. (-)-Linalool produces antinociception in two experimental models of pain. *Eur. J. Pharmacol.*, **2003**, *460*, 37–41.

[103] A. T. Peana, M. G. De Montis, E. Nieddu, M. T. Spano, P. S. D'Aquila, P. Pippia. Profile of spinal and supra-spinal antinociception of (-)-linalool. *Eur. J. Pharmacol.*, **2004**, *485*, 165–174.

[104] A. T. Peana, P. Rubattu, G. G. Piga, S. Fumagalli, G. Boatto, P. Pippia, M. G. De Montis. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors in (-)-linalool-induced antinociception. *Life Sci.*, **2006**, *78*, 2471–2474.

[105] S. Katsuyama, H. Kuwahata, T. Yagi, Y. Kishikawa, T. Komatsu, T. Sakurada, H. Nakamura. *Intraplantar Injection of Linalool Reduces Paclitaxel-Induced Acute Pain in Mice*, **2012**.

[106] X. J. Li, Y. J. Yang, Y. S. Li, W. K. Zhang, H. Bin Tang. α-Pinene, linalool, and 1-octanol contribute to the topical anti-inflammatory and analgesic activities of frankincense by inhibiting COX-2. *J. Ethnopharmacol.*, **2016**, *179*, 22–26.

[107] A. T. Peana, M. Graziella De Montis, S. Sechi, G. Sircana, P. S. D'Aquila, P. Pippia. Effects of (-)-linalool in the acute hyperalgesia induced by carrageenan, L-glutamate and prostaglandin E2. *Eur. J. Pharmacol.*, **2004**, *497*, 279–284.

[108] Y. Li, O. Lv, F. Zhou, Q. Li, Z. Wu, Y. Zheng. Linalool Inhibits LPS-Induced Inflammation in BV2 Microglia Cells by Activating Nrf2. *Neurochem. Res.*, **2015**, *40*, 1520–1525.

[109] A. M. Sabogal-Guáqueta, F. Hobbie, A. Keerthi, A. Oun, A. Kortholt, E. Boddeke, A. Dolga. Linalool attenuates oxidative stress and mitochondrial dysfunction mediated by glutamate and NMDA toxicity. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, **2019**, *118*, DOI 10.1016/j.biopha.2019.109295.

[110] A. M. Barrera-Sandoval, E. Osorio, G. P. Cardona-Gómez. Microglial-targeting induced by intranasal linalool during neurological protection postischemia. *Eur. J. Pharmacol.*, **2019**, *857*, DOI 10.1016/j.ejphar.2019.172420.

[111] H. Park, G. H. Seol, S. Ryu, I. Y. Choi. Neuroprotective effects of (-)-linalool against oxygen-glucose deprivation-induced neuronal injury. *Arch. Pharm. Res.*, **2016**, *39*, 555–564.

[112] S. Surendran, F. Qassadi, G. Surendran, D. Lilley, M. Heinrich. Myrcene—What Are the Potential Health Benefits of This Flavouring and Aroma Agent? *Front. Nutr.*, **2021**, *8*, DOI 10.3389/fnut.2021.699666.

[113] L. Chen, Y. Liu, D. Xu, N. Zhang, Y. Chen, J. Yang, L. Sun. Beta-Myrcene as a Sedative–Hypnotic Component from Lavender Essential Oil in DL-4-Chlorophenylalanine-Induced-Insomnia Mice. *Pharmaceuticals*, **2024**, *17*, DOI 10.3390/ph17091161.

[114] do Vale TG, Furtado EC, Santos JG Jr, Viana GS. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from Lippia alba (Mill.) n.e. Brown. *Phytomedicine*, **2002**, *9(8)*, 709–14.

[115] C. Jansen, L. M. N. Shimoda, J. K. Kawakami, L. Ang, A. J. Bacani, J. D. Baker, C. Badowski, M. Speck, A. J. Stokes, A. L. Small-Howard, H. Turner. Myrcene and terpene regulation of TRPV1. *Channels*, **2019**, *13*, 344–366.

[116] B. B. Lorenzetti, E. P. Souza, S. J. Sarti, D. Santos Filho, S. H. Ferreira. *Myrcene Mimics the Peripheral Analgesic Activity of Lemongrass Tea*, **1991**.

[117] J. J. McDougall, M. K. McKenna. Anti-Inflammatory and Analgesic Properties of the Cannabis Terpene Myrcene in Rat Adjuvant Monoarthritis. *Int. J. Mol. Sci.*, **2022**, *23*, DOI 10.3390/ijms23147891.

[118] M. C. Souza, A. C. Siani, M. F. S. Ramos, O. Menezes-De-Lima, M. G. M. O. Henriques, A. C. Siani. *Evaluation of Anti-Inflammatory Activity of Essential Oils from Two Asteraceae Species*, **n.d.**

[119] A. T. Rufino, M. Ribeiro, C. Sousa, F. Judas, L. Salgueiro, C. Cavaleiro, A. F. Mendes. Evaluation of the anti-inflammatory, anti-catabolic and pro-anabolic effects of E-caryophyllene, myrcene and limonene in a cell model of osteoarthritis. *Eur. J. Pharmacol.*, **2015**, *750*, 141–150.

[120] S. M. Hoseini, M. Yousefi, S. H. Hoseinifar, H. Van Doan. Antioxidant, enzymatic and hematological responses of common carp (Cyprinus carpio) fed with myrcene- or menthol-supplemented diets and exposed to ambient ammonia. *Aquaculture*, **2019**, *506*, 246–255.

[121] O. Ciftci, M. N. Oztanir, A. Cetin. Neuroprotective Effects of β-Myrcene Following Global Cerebral Ischemia/Reperfusion-Mediated Oxidative and Neuronal Damage in a C57BL/J6 Mouse. *Neurochem. Res.*, **2014**, *39*, 1717–1723.

[122] O. Ciftci, I. Ozdemir, S. Tanyildizi, S. Yildiz, H. Oguzturk. Antioxidative effects of curcumin, β-myrcene and 1,8-cineole against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced oxidative stress in rats liver. *Toxicol. Ind. Health*, **2011**, *27*, 447–453.

[123] V. Xanthis, E. Fitsiou, G. P. Voulgaridou, A. Bogadakis, K. Chlichlia, A. Galanis, A. Pappa. Antioxidant and cytoprotective potential of the essential oil pistacia lentiscus var. Chia and its major components myrcene and α-pinene. *Antioxidants*, **2021**, *10*, 1–19.

[124] Y. Noma, Y. Asakawa. Biotransformation of Monoterpenoids. *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology*, **2010**, *3*.

[125] M. Miyazawa, C. Yamafuji. Inhibition of acetylcholinesterase activity by bicyclic monoterpenoids. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, *53*, 1765–1768.

[126] D. O. Kennedy, F. L. Dodd, B. C. Robertson, E. J. Okello, J. L. Reay, A. B. Scholey, C. F. Haskell. Monoterpenoid extract of sage (Salvia lavandulaefolia) with cholinesterase inhibiting properties improves cognitive performance and mood in healthy adults. *Journal of Psychopharmacology*, **2011**, *25*, 1088–1100.

[127] N. S. L. Perry, P. J. Houghton, A. Theobald, P. Jenner, E. K. Perry. In-vitro Inhibition of Human Erythrocyte Acetylcholinesterase by Salvia lavandulaefolia Essential Oil and Constituent Terpenes . *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **2000**, *52*, 895–902.

[128] Q. Huang, C. Liao, F. Ge, J. Ao, T. Liu. Acetylcholine bidirectionally regulates learning and memory. *Journal of Neurorestoratology*, **2022**, *10*, DOI 10.1016/j.jnrt.2022.100002.

[129] Ł. J. Walczak-Nowicka, M. Herbet. Acetylcholinesterase inhibitors in the treatment of neurodegenerative diseases and the role of acetylcholinesterase in their pathogenesis. *Int. J. Mol. Sci.*, **2021**, *22*, DOI 10.3390/ijms22179290.

[130] I. Rahbar, M. Abbasnejad, J. Haghani, M. Raoof, R. Kooshki, S. Esmaeili-Mahani. The effect of central administration of alpha-pinene on capsaicin-induced dental pulp nociception. *Int. Endod. J.*, **2019**, *52*, 307–317.

[131] H. Yang, J. Woo, A. N. Pae, M. Y. Um, N. C. Cho, K. D. Park, M. Yoon, J. Kim, C. J. Lee, S. Cho. α-pinene, a major constituent of pine tree oils, enhances non-rapid eye movement sleep in mice through GABAA-benzodiazepine receptors. *Mol. Pharmacol.*, **2016**, *90*, 530–539.

[132] H. Kasuya, N. Okada, M. Kubohara, T. Satou, Y. Masuo, K. Koike. Expression of BDNF and TH mRNA in the brain following inhaled administration of α-Pinene. *Phytotherapy Research*, **2015**, *29*, 43–47.

[133] H. Kasuya, S. Iida, K. Ono, T. Satou, K. Koike. Intracerebral Distribution of α-Pinene and the Anxiolytic-like Effect in Mice Following Inhaled Administration of Essential Oil from Chamaecyparis obtusa. *Nat Prod Commun.*, **2015**, *10(8)*, 1479–82.

[134] D. S. Kim, H. J. Lee, Y. D. Jeon, Y. H. Han, J. Y. Kee, H. J. Kim, H. J. Shin, J. Kang, B. S. Lee, S. H. Kim, S. J. Kim, S. H. Park, B. M. Choi, S. J. Park, J. Y. Um, S. H. Hong. Alpha-Pinene Exhibits Anti-Inflammatory Activity Through the Suppression of MAPKs and the NF-κB Pathway in Mouse Peritoneal Macrophages. *American Journal of Chinese Medicine*, **2015**, *43*, 731–742.

[135] A. T. Rufino, M. Ribeiro, F. Judas, L. Salgueiro, M. C. Lopes, C. Cavaleiro, A. F. Mendes. Anti-inflammatory and chondroprotective activity of (+)-α-pinene: Structural and enantiomeric selectivity. *J. Nat. Prod.*, **2014**, *77*, 264–269.

[136] M. Sandasi, C. M. Leonard, A. M. Viljoen. The effect of five common essential oil components on Listeria monocytogenes biofilms. *Food Control*, **2008**, *19*, 1070–1075.

[137] A. Pichette, P. L. Larouche, M. Lebrun, J. Legault. Composition and antibacterial activity of Abies balsamea essential oil. *Phytotherapy Research*, **2006**, *20*, 371–373.

[138] A. Medeiros Leite, E. De Oliveira Lima, E. Leite De Souza, M. De Fátima, F. Melo Diniz, V. Nogueira Trajano, I. Almeida De Medeiros, E. L. Souza. *Inhibitory Effect of β β β β β-Pinene, α α α α α-Pinene and Eugenol on the Growth of Potential Infectious Endocarditis Causing Gram-Positive Bacteria*, **2007**.

[139] J. Kovač, K. Šimunović, Z. Wu, A. Klančnik, F. Bucar, Q. Zhang, S. S. Možina. Antibiotic resistance modulation and modes of action of (-)-α-Pinene in Campylobacter jejuni. *PLoS One*, **2015**, *10*, DOI 10.1371/journal.pone.0122871.

[140] M. Porres-Martínez, E. González-Burgos, M. E. Carretero, M. Pilar Gómez-Serranillos. In vitro neuroprotective potential of the monoterpenes α-pinene and 1,8-cineole against H2O2-induced oxidative stress in PC12 cells. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, **2016**, *71*, 191–199.

[141] H. Türkez, E. Aydın. In vitro assessment of cytogenetic and oxidative effects of α-pinene. *Toxicol. Ind. Health*, **2016**, *32*, 168–176.

[142] B. Salehi, S. Upadhyay, I. E. Orhan, A. K. Jugran, S. L. D. Jayaweera, D. A. Dias, F. Sharopov, Y. Taheri, N. Martins, N. Baghalpour, W. C. Cho, J. Sharifi-Rad. Therapeutic potential of α-and β-pinene: A miracle gift of nature. *Biomolecules*, **2019**, *9*, DOI 10.3390/biom9110738.

[143] P. Anandakumar, S. Kamaraj, M. K. Vanitha. D-limonene: A multifunctional compound with potent therapeutic effects. *J. Food Biochem.*, **2021**, *45*, DOI 10.1111/jfbc.13566.

[144] N. G. P. B. Lima, D. P. De Sousa, F. C. F. Pimenta, M. F. Alves, F. S. De Souza, R. O. MacEdo, R. B. Cardoso, L. C. S. L. De Morais, M. D. F. F. Melo Diniz, R. N. De Almeida. Anxiolytic-like activity and GC-MS analysis of (R)-(+)-limonene fragrance, a natural compound found in foods and plants. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **2013**, *103*, 450–454.

[145] Y. Song, S. Seo, S. Lamichhane, J. Seo, J. T. Hong, H. J. Cha, J. Yun. Limonene has anti-anxiety activity via adenosine A2A receptor-mediated regulation of dopaminergic and GABAergic neuronal function in the striatum. *Phytomedicine*, **2021**, *83*, DOI 10.1016/j.phymed.2021.153474.

[146] T. R. Spindle, C. A. Zamarripa, E. Russo, L. Pollak, G. Bigelow, A. M. Ward, B. Tomspon, C. Sempio, T. Shokati, J. Klawitter, U. Christians, R. Vandrey. *Vaporized D-Limonene Selectively Mitigates the Acute Anxiogenic Effects of Δ9-Tetrahydrocannabinol in Healthy Adults Who Intermittently Use Cannabis*, **2024**.

[147] C. W. Hao, W. S. Lai, C. T. Ho, L. Y. Sheen. Antidepressant-like effect of lemon essential oil is through a modulation in the levels of norepinephrine, dopamine, and serotonin in mice: Use of the tail suspension test. *J. Funct. Foods*, **2013**, *5*, 370–379.

[148] M. Komiya, T. Takeuchi, E. Harada. Lemon oil vapor causes an anti-stress effect via modulating the 5-HT and DA activities in mice. *Behavioural Brain Research*, **2006**, *172*, 240–249.

[149] X. ping Tang, X. hua Guo, D. Geng, L. J. Weng. D-Limonene protects PC12 cells against corticosterone-induced neurotoxicity by activating the AMPK pathway. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **2019**, *70*, DOI 10.1016/j.etap.2019.05.001.

[150] G. Chi, M. Wei, X. Xie, L. W. Soromou, F. Liu, S. Zhao. Suppression of MAPK and NF-κB pathways by limonene contributes to attenuation of lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in acute lung injury. *Inflammation*, **2013**, *36*, 501–511.

[151] R. Amini, M. Asle-Rousta, S. Aghazadeh. Hepatoprotective effect of limonene against chronic immobilization induced liver damage in rats. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.*, **2020**, *393*, 2053–2059.

[152] P. A. D'Alessio, R. Ostan, J. F. Bisson, J. D. Schulzke, M. V. Ursini, M. C. Béné. Oral administration of d-Limonene controls inflammation in rat colitis and displays anti-inflammatory properties as diet supplementation in humans. *Life Sci.*, **2013**, *92*, 1151–1156.

[153] I. Piccialli, V. Tedeschi, L. Caputo, G. Amato, L. De Martino, V. De Feo, A. Secondo, A. Pannaccione. The antioxidant activity of limonene counteracts neurotoxicity triggered byaβ1-42 oligomers in primary cortical neurons. *Antioxidants*, **2021**, *10*, DOI 10.3390/antiox10060937.

[154] M. Bacanli, A. A. Başaran, N. Başaran. The antioxidant and antigenotoxic properties of citrus phenolics limonene and naringin. *Food and Chemical Toxicology*, **2015**, *81*, 160–170.

[155] L. Yu, J. Yan, Z. Sun. D-limonene exhibits anti-inflammatory and antioxidant properties in an ulcerative colitis rat model via regulation of iNOS, COX-2, PGE2 and ERK signaling pathways. *Mol. Med. Rep.*, **2017**, *15*, 2339–2346.

[156] K. Rakoczy, N. Szymańska, J. Stecko, M. Kisiel, M. Maruszak, M. Niedziela, J. Kulbacka. Applications of Limonene in Neoplasms and Non-Neoplastic Diseases. *Int. J. Mol. Sci.*, **2025**, *26*, DOI 10.3390/ijms26136359.

[157] M. C. de Souza, A. J. Vieira, F. P. Beserra, C. H. Pellizzon, R. H. Nóbrega, A. L. Rozza. Gastroprotective effect of limonene in rats: Influence on oxidative stress, inflammation and gene expression. *Phytomedicine*, **2019**, *53*, 37–42.

[158] T. M. Moraes, A. L. Rozza, H. Kushima, C. H. Pellizzon, L. R. M. H. Rocha, C. A. Hiruma-Lima. Healing actions of essential oils from citrus aurantium and d-limonene in the Gastric Mucosa: The roles of VEGF, PCNA, and COX-2 in cell proliferation. *J. Med. Food*, **2013**, *16*, 1162–1167.

[159] X. Yu, H. Lin, Y. Wang, W. Lv, S. Zhang, Y. Qian, X. Deng, N. Feng, H. Yu, B. Qian. D-limonene exhibits antitumor activity by inducing autophagy and apoptosis in lung cancer. *Onco. Targets. Ther.*, **2018**, *11*, 1833–1847.

[160] J. A. Miller, J. E. Lang, M. Ley, R. Nagle, C. H. Hsu, P. A. Thompson, C. Cordova, A. Waer, H. H. S. Chow. Human breast tissue disposition and bioactivity of limonene in women with early-stage breast cancer. *Cancer Prevention Research*, **2013**, *6*, 577–584.

[161] J. A. Miller, K. Pappan, P. A. Thompson, E. J. Want, A. P. Siskos, H. C. Keun, J. Wulff, C. Hu, J. E. Lang, H. H. S. Chow. Plasma metabolomic profiles of breast cancer patients after short-term limonene intervention. *Cancer Prevention Research*, **2015**, *8*, 86–93.

[162] Z. Ye, Z. Liang, Q. Mi, Y. Guo. Limonene terpenoid obstructs human bladder cancer cell (T24 cell line) growth by inducing cellular apoptosis, caspase activation, G2/M phase cell cycle arrest and stops cancer metastasis. *JBUON*, **2020**, *25*, 280–285.

[163] H. G. de Araújo-Filho, J. F. dos Santos, M. T. B. Carvalho, L. Picot, I. Fruitier-Arnaudin, H. Groult, L. J. Quintans-Júnior, J. S. S. Quintans. Anticancer activity of limonene: A systematic review of target signaling pathways. *Phytotherapy Research*, **2021**, *35*, 4957–4970.

[164] S. Ben-Shabat, E. Fride, T. Sheskin, T. Tamiri, M.-H. Rhee, Z. Vogel, T. Bisogno, L. De Petrocellis, V. Di Marzo, R. Mechoulam. *An Entourage Effect: Inactive Endogenous Fatty Acid Glycerol Esters Enhance 2-Arachidonoyl-Glycerol Cannabinoid Activity*, **1998**.

[165] R. André, A. P. Gomes, C. Pereira-Leite, A. Marques-da-Costa, L. Monteiro Rodrigues, M. Sassano, P. Rijo, M. do C. Costa. The Entourage Effect in Cannabis Medicinal Products: A Comprehensive Review. *Pharmaceuticals*, **2024**, *17*, DOI 10.3390/ph17111543.

[166] C. Christensen, M. Rose, C. Cornett, M. Allesø. Decoding the Postulated Entourage Effect of Medicinal Cannabis: What It Is and What It Isn't. *Biomedicines*, **2023**, *11*, DOI 10.3390/biomedicines11082323.

[167] H. Koltai, D. Namdar. Cannabis Phytomolecule "Entourage": From Domestication to Medical Use. *Trends Plant Sci.*, **2020**, *25*, 976–984.

[168] S. G. Ferber, D. Namdar, D. Hen-Shoval, G. Eger, H. Koltai, G. Shoval, L. Shbiro, A. Weller. The "Entourage Effect": Terpenes Coupled with Cannabinoids for the Treatment of Mood Disorders and Anxiety Disorders. *Curr. Neuropharmacol.*, **2019**, *18*, 87–96.

[169] Z. Xie, Y. Mi, L. Kong, M. Gao, S. Chen, W. Chen, X. Meng, W. Sun, S. Chen, Z. Xu. Cannabis sativa: origin and history, glandular trichome development, and cannabinoid biosynthesis. *Hortic. Res.*, **2023**, *10*, DOI 10.1093/hr/uhad150.

[170] C. A. S. Tanney, R. Backer, A. Geitmann, D. L. Smith. Cannabis Glandular Trichomes: A Cellular Metabolite Factory. *Front. Plant Sci.*, **2021**, *12*, DOI 10.3389/fpls.2021.721986.

[171] J. Kanabus, M. Bryła, M. Roszko. The Development, Validation, and Application of a UHPLC-HESI-MS Method for the Determination of 17 Cannabinoids in Cannabis sativa L. var. sativa Plant Material. *Molecules*, **2023**, *28*, DOI 10.3390/molecules28248008.

[172] J. W. Fairbairn, J. A. Liebmann, M. G. Rowan. The stability of cannabis and its preparations on storage. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **1976**, *28*, 1–7.

[173] L. Zamengo, C. Bettin, D. Badocco, V. Di Marco, G. Miolo, G. Frison. The role of time and storage conditions on the composition of hashish and marijuana samples: A four-year study. *Forensic Sci. Int.*, **2019**, *298*, 131–137.

[174] H. M. S. Al Ubeed, D. J. Bhuyan, M. A. Alsherbiny, A. Basu, Q. V. Vuong. A Comprehensive Review on the Techniques for Extraction of Bioactive Compounds from Medicinal Cannabis. *Molecules*, **2022**, *27*, DOI 10.3390/molecules27030604.

[175] F. Fathordoobady, A. Singh, D. D. Kitts, A. Pratap Singh. Hemp (Cannabis Sativa L.) Extract: Anti-Microbial Properties, Methods of Extraction, and Potential Oral Delivery. *Food Reviews International*, **2019**, *35*, 664–684.

[176] E. M. P. Silva, A. Vitiello, A. Miro, C. J. A. Ribeiro. Recent HPLC-UV Approaches for Cannabinoid Analysis: From Extraction to Method Validation and Quantification Compliance. *Pharmaceuticals*, **2025**, *18*, DOI 10.3390/ph18060786.

[177] M. Hädener, S. König, W. Weinmann. Quantitative determination of CBD and THC and their acid precursors in confiscated cannabis samples by HPLC-DAD. *Forensic Sci. Int.*, **2019**, *299*, 142–150.

[178] Ravindra B. Malabadi, Kiran P. Kolkar, Raju K. Chalannavar, Himansu Baijnath. Cannabis sativa: Extraction Methods for Phytocannabinoids -An Update. *World Journal of Biology Pharmacy and Health Sciences*, **2024**, *20*, 018–058.

[179] D. Namdar, M. Mazuz, A. Ion, H. Koltai. Variation in the compositions of cannabinoid and terpenoids in Cannabis sativa derived from inflorescence position along the stem and extraction methods. *Ind. Crops Prod.*, **2018**, *113*, 376–382.

[180] B. De Backer, B. Debrus, P. Lebrun, L. Theunis, N. Dubois, L. Decock, A. Verstraete, P. Hubert, C. Charlier. Innovative development and validation of an HPLC/DAD method for the qualitative and quantitative determination of major cannabinoids in cannabis plant material. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **2009**, *877*, 4115–4124.

[181] Parker JM, Borke ML, Block LH, Cochran TG. Decomposition of cannabidiol in chloroform solution. *J Pharm Sci*, **1974**, *63(6)*, 970–1.

[182] C. López-Olmos, M. T. García-Valverde, J. Hidalgo, C. Ferrerio-Vera, V. Sánchez de Medina. Comprehensive comparison of industrial cannabinoid extraction techniques: Evaluation of the most relevant patents and studies at pilot scale. *Frontiers in Natural Products*, **2022**, *1*, DOI 10.3389/fntpr.2022.1043147.

[183] A. Hazekamp, R. Simons, A. Peltenburg-Looman, M. Sengers, R. Van Zweden, R. Verpoorte. Preparative isolation of cannabinoids from Cannabis sativa by centrifugal partition chromatography. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **2009**, *27*, 2421–2439.

[184] S. Qamar, Y. J. M. Torres, H. S. Parekh, J. R. Falconer. Supercritical Carbon Dioxide Technologies: A Review Extraction of medicinal cannabinoids through supercritical carbon dioxide technologies: A review. *Journal of Chromatography B*, **2021**, *1167*, 122581.

[185] M. Rantaša, G. Slaček, Ž. Knez, M. Knez Marevci. Supercritical fluid extraction of cannabinoids and their analysis by liquid chromatography and supercritical fluid chromatography: A short review. *Journal of CO2 Utilization*, **2024**, *86*, DOI 10.1016/j.jcou.2024.102907.

[186] M. P. Lazarjani, O. Young, L. Kebede, A. Seyfoddin. Processing and extraction methods of medicinal cannabis: a narrative review. *J. Cannabis Res.*, **2021**, *3*, DOI 10.1186/s42238-021-00087-9.

[187] L. Baldino, M. Scognamiglio, E. Reverchon. Supercritical fluid technologies applied to the extraction of compounds of industrial interest from Cannabis sativa L. and to their pharmaceutical formulations: A review. *Journal of Supercritical Fluids*, **2020**, *165*, DOI 10.1016/j.supflu.2020.104960.

[188] F. Pattnaik, N. Hans, B. R. Patra, S. Nanda, V. Kumar, S. N. Naik, A. K. Dalai. Valorization of Wild-Type Cannabis indica by Supercritical CO2 Extraction and Insights into the Utilization of Raffinate Biomass. *Molecules*, **2023**, *28*, DOI 10.3390/molecules28010207.

[189] Samuel H. Sam, Nweke-Maraizu U., Etim E. E. Supercritical Fluids: Properties, Formation and Applications. *Formation and Applications. J. Eng. Ind. Res.*, **2023**, *4(3)*, 176–188.

[190] M. Valizadehderakhshan, A. Shahbazi, M. Kazem-Rostami, M. S. Todd, A. Bhowmik, L. Wang. Extraction of cannabinoids from Cannabis sativa L. (hemp)-review. *Agriculture (Switzerland)*, **2021**, *11*, DOI 10.3390/agriculture11050384.

[191] L. Nahar, A. Onder, S. D. Sarker. A review on the recent advances in HPLC, UHPLC and UPLC analyses of naturally occurring cannabinoids (2010–2019). *Phytochemical Analysis*, **2020**, *31*, 413–457.

[192] V. Devi, S. Khanam. Comparative study of different extraction processes for hemp (Cannabis sativa) seed oil considering physical, chemical and industrial-scale economic aspects. *J. Clean. Prod.*, **2019**, *207*, 645–657.

[193] C. Agarwal, K. Máthé, T. Hofmann, L. Csóka. Ultrasound-Assisted Extraction of Cannabinoids from Cannabis Sativa L. Optimized by Response Surface Methodology. *J. Food Sci.*, **2018**, *83*, 700–710.

[194] F. Chemat, N. Rombaut, A. G. Sicaire, A. Meullemiestre, A. S. Fabiano-Tixier, M. Abert-Vian. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrason. Sonochem.*, **2017**, *34*, 540–560.

[195] A. Sainz Martinez, O. Lanaridi, K. Stagel, H. Halbwirth, M. Schnürch, K. Bica-Schröder. Extraction techniques for bioactive compounds of cannabis. *Nat. Prod. Rep.*, **2023**, *40*, 676–717.

[196] C. Wen, J. Zhang, H. Zhang, C. S. Dzah, M. Zandile, Y. Duan, H. Ma, X. Luo. Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops – A review. *Ultrason. Sonochem.*, **2018**, *48*, 538–549.

[197] D. T. Xie, Y. Q. Wang, Y. Kang, Q. F. Hu, N. Y. Su, J. M. Huang, C. T. Che, J. X. Guo. Microwave-assisted extraction of bioactive alkaloids from Stephania sinica. *Sep. Purif. Technol.*, **2014**, *130*, 173–181.

[198] M. Radoiu, H. Kaur, A. Bakowska-Barczak, S. Splinter. Microwave-Assisted Industrial Scale Cannabis Extraction. *Technologies (Basel).*, **2020**, *8*, DOI 10.3390/technologies8030045.

[199] A. Rezvankhah, Z. Emam-Djomeh, M. Safari, G. Askari, M. Salami. Microwave-assisted extraction of hempseed oil: studying and comparing of fatty acid composition, antioxidant activity, physiochemical and thermal properties with Soxhlet extraction. *J. Food Sci. Technol.*, **2019**, *56*, 4198–4210.

[200] W. Routray, V. Orsat. Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids: A Review. *Food Bioproc. Tech.*, **2012**, *5*, 409–424.

[201] C. W. Chang, C. C. Yen, M. T. Wu, M. C. Hsu, T. Y. Wu. Microwave-assisted extraction of cannabinoids in hemp nut using response surface methodology: Optimization and comparative study. *Molecules*, **2017**, *22*, DOI 10.3390/molecules22111894.

[202] Z. Drinić, J. Vladić, A. Koren, T. Zeremski, N. Stojanov, B. Kiprovski, S. Vidović. Microwave-assisted extraction of cannabinoids and antioxidants from Cannabis sativa aerial parts and process modeling. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **2020**, *95*, 831–839.

[203] C. D. Stalikas. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sci.*, **2007**, *30*, 3268–3295.

[204] V. Brighenti, F. Pellati, M. Steinbach, D. Maran, S. Benvenuti. Development of a new extraction technique and HPLC method for the analysis of non-psychoactive cannabinoids in fibre-type Cannabis sativa L. (hemp). *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2017**, *143*, 228–236.

[205] V. Cavalloro, E. Martino, P. Linciano, S. Collina. Microwave-Assisted Solid Extraction from Natural Matrices, in *Microwave Heating - Electromagnetic Fields Causing Thermal and Non-Thermal Effects*, IntechOpen, **2021**.

[206] V. Brighenti, M. Marani, C. Caroli, L. Bertarini, A. Gaggiotti, F. Pollastro, C. Durante, G. Cannazza, F. Pellati. A new HPLC method with multiple detection systems for impurity analysis and discrimination of natural versus synthetic cannabidiol. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2024**, *416*, 4555–4569.

[207] R. G. Vida, L. V. Strauss, Á. Bajtel, T. Kiss, D. Csupor, A. Fittler. Safety and risks of CBD oils purchased online: unveiling uncertain quality and vague health claims. *Front. Pharmacol.*, **2023**, *14*, DOI 10.3389/fphar.2023.1273540.

[208] C. Durante, L. Anceschi, V. Brighenti, C. Caroli, C. Afezolli, A. Marchetti, M. Cocchi, S. Salamone, F. Pollastro, F. Pellati. Application of experimental design in HPLC method optimisation for the simultaneous determination of multiple bioactive cannabinoids. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2022**, *221*, DOI 10.1016/j.jpba.2022.115037.

[209] L. Vaclavik, F. Benes, M. Fenclova, J. Hricko, A. Krmela, V. Svobodova, J. Hajslova, K. Mastovska. Quantitation of cannabinoids in cannabis dried plant materials, concentrates, and oils using liquid chromatography-diode array detection technique with optional mass spectrometric detection: Single-laboratory validation study, first action 2018.11. *J. AOAC Int.*, **2019**, *102*, 1822–1833.

[210] M. Kalinowska, A. Płońska, M. Trusiak, E. Gołębiewska, A. Gorlewska-Pietluszenko. Comparing the extraction methods, chemical composition, phenolic contents and antioxidant activity of edible oils from Cannabis sativa and Silybum marianu seeds. *Sci. Rep.*, **2022**, *12*, DOI 10.1038/s41598-022-25030-7.

[211] T. Fućak, S. Kreft, Ž. M. Svedružić, E. Tavčar. Mechanism and kinetics of CBDA decarboxylation into CBD in hemp. *J. Plant Biochem. Biotechnol.*, **2023**, *32*, 608–621.

[212] H. Peng, F. Shahidi. Cannabis and Cannabis Edibles: A Review. *J. Agric. Food Chem.*, **2021**, *69*, 1751–1774.

[213] A. Blake, I. Nahtigal. The evolving landscape of cannabis edibles. *Curr. Opin. Food Sci.*, **2019**, *28*, 25–31.

[214] A. Leghissa, Z. L. Hildenbrand, K. A. Schug. The imperatives and challenges of analyzing Cannabis edibles. *Curr. Opin. Food Sci.*, **2019**, *28*, 18–24.

[215] D. Melchert, F. Schaare, P. Winterhalter, T. Beuerle. CBD products: Labeling accuracy of an obscure niche market. *Food Control*, **2024**, *160*, DOI 10.1016/j.foodcont.2024.110375.

[216] S. Huang, T. A. van Beek, F. W. Claassen, H. G. Janssen, M. Ma, B. Chen, H. Zuilhof, G. I. Salentijn. Comprehensive cannabinoid profiling of acid-treated CBD samples and Δ8-THC-infused edibles. *Food Chem.*, **2024**, *440*, DOI 10.1016/j.foodchem.2023.138187.

[217] G. Micalizzi, F. Vento, F. Alibrando, D. Donnarumma, P. Dugo, L. Mondello. Cannabis Sativa L.: a comprehensive review on the analytical methodologies for cannabinoids and terpenes characterization. *J. Chromatogr. A*, **2021**, *1637*, DOI 10.1016/j.chroma.2020.461864.

[218] N. Joy, D. Jackson, T. Coolong. A Validated GC-MS Method for Major Terpenes Quantification in Hydrodistilled Cannabis sativa Essential oil. *Phytochemical Analysis*, **2025**, DOI 10.1002/pca.3526.

[219] E. A. Ibrahim, M. Wang, M. M. Radwan, A. S. Wanas, C. G. Majumdar, B. Avula, Y. H. Wang, I. A. Khan, S. Chandra, H. Lata, G. M. Hadad, R. A. Abdel Salam, A. K. Ibrahim, S. A. Ahmed, M. A. Elsohly. Analysis of Terpenes in Cannabis sativa LUsing GC/MS: Method Development, Validation, and Application. *Planta Med.*, **2019**, *85*, 431–438.

[220] V. Pereira Francisco, M. Cerny, R. Valentin, F. Milone-Delacourt, A. Paillard, M. Alignan. Development of GC–MS coupled to GC–FID method for the quantification of cannabis terpenes and terpenoids: Application to the analysis of five commercial varieties of medicinal cannabis. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **2024**, *1247*, DOI 10.1016/j.jchromb.2024.124316.

[221] L. O. Hanuš. Comparison of Three Gas Chromatographic Methods—Identification of Terpenes and Terpenoids in Cannabis sativa L. *Applied Sciences (Switzerland)*, **2024**, *14*, DOI 10.3390/app14156476.

[222] C. Myers, J. S. Herrington, P. Hamrah, K. Anderson. Accelerated Solvent Extraction of Terpenes in Cannabis Coupled With Various Injection Techniques for GC-MS Analysis. *Front. Chem.*, **2021**, *9*, DOI 10.3389/fchem.2021.619770.

[223] E. D. Rocha, V. E. A. Silva, F. C. S. Pereira, V. M. Jean, F. L. Costa Souza, L. C. Baratto, A. C. M. Vieira, V. M. Carvalho. Qualitative terpene profiling of Cannabis varieties cultivated for medical purposes. *Rodriguesia*, **2020**, *7*, DOI 10.1590/2175-7860202071040.

[224] A. Shapira, P. Berman, K. Futoran, O. Guberman, D. Meiri. Tandem Mass Spectrometric Quantification of 93 Terpenoids in Cannabis Using Static Headspace Injections. *Anal. Chem.*, **2019**, *91*, 11425–11432.

[225] Y. Liu, T. A. Brettell, J. Victoria, M. R. Wood, M. E. Staretz. High performance thin-layer chromatography (HPTLC) analysis of cannabinoids in cannabis extracts. *Forensic Chemistry*, **2020**, *19*, DOI 10.1016/j.forc.2020.100249.

[226] J. Sherma, F. Rabel. Thin layer chromatography in the analysis of cannabis and its components and synthetic cannabinoids. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **2019**, *42*, 613–628.

[227] S. Huang, R. Qiu, Z. Fang, K. Min, T. A. Van Beek, M. Ma, B. Chen, H. Zuilhof, G. I. J. Salentijn. Semiquantitative Screening of THC Analogues by Silica Gel TLC with an Ag(I) Retention Zone and Chromogenic Smartphone Detection. *Anal. Chem.*, **2022**, *94*, 13710–13718.

[228] B. J. Mano-Sousa, G. A. S. Maia, P. L. Lima, V. A. Campos, G. Negri, F. M. D. Chequer, J. M. Duarte-Almeida. Color determination method and evaluation of methods for the detection of cannabinoids by thin-layer chromatography (TLC). *J. Forensic Sci.*, **2021**, *66*, 854–865.

[229] F. M. Silva Sofrás, M. F. Desimone. Entourage Effect and Analytical Chemistry: Chromatography as a Tool in the Analysis of the Secondary Metabolism of Cannabis sativa L. *Curr. Pharm. Des.*, **2022**, *29*, 394–406.

[230] E. Tejada Rodríguez, J. V. Szijj, A. Serracino Inglott, L. M. Azzopardi. Analytical Techniques Used for Analysis of Cannabinoids. *cannabis science and technology*, **2021**, *4*, 34–46.

[231] European Pharmacopeia Comission. Cannabis flower, in *EUROPEAN PHARMACOPOEIA 11.5*, Council Of Europe, Strasbourg, **2024**, pp. 5909–12.

[232] B. Patel, D. Wene, Z. (Tina) Fan. Qualitative and quantitative measurement of cannabinoids in cannabis using modified HPLC/DAD method. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2017**, *146*, 15–23.

[233] J. Zekič, M. Križman. Development of Gas-Chromatographic Method for Simultaneous Determination of Cannabinoids and Terpenes in Hemp. *Molecules*, **2020**, *25*, DOI 10.3390/MOLECULES25245872.

[234] M. Franzin, R. Di Lenardo, R. Ruoso, R. Addobbati. Incomplete Decarboxylation of Acidic Cannabinoids in GC-MS Leads to Underestimation of the Total Cannabinoid Content in Cannabis Oils Without Derivatization. *Pharmaceutics*, **2025**, *17*, DOI 10.3390/pharmaceutics17030334.

[235] F. E. Dussy, C. Hamberg, M. Luginbühl, T. Schwerzmann, T. A. Briellmann. Isolation of Δ9-THCA-A from hemp and analytical aspects concerning the determination of Δ9-THC in cannabis products. *Forensic Sci. Int.*, **2005**, *149*, 3–10.

[236] P. Galettis, M. Williams, R. Gordon, J. H. Martin. A Simple Isocratic HPLC Method for the Quantitation of 17 Cannabinoids. *Aust. J. Chem.*, **2021**, *74*, 453–462.

[237] C. Citti, D. Braghiroli, M. A. Vandelli, G. Cannazza. Pharmaceutical and biomedical analysis of cannabinoids: A critical review. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2018**, *147*, 565–579.

[238] M. Križman. A simplified approach for isocratic HPLC analysis of cannabinoids by fine tuning chromatographic selectivity. *European Food Research and Technology*, **2020**, *246*, 315–322.

[239] C. J. Welch, T. Brkovic, W. Schafer, X. Gong. Performance to burn? Re-evaluating the choice of acetonitrile as the platform solvent for analytical HPLC. *Green Chemistry*, **2009**, *11*, 1232–1238.

[240] John W. Dolan. Selectivity in Reversed-Phase LC Separations, Part I: Solvent-Type Selectivity. *LCGC North America*, **2010**, *28*, 581–584.

[241] E. Franklin, M. Wilcox. Gradient HPLC-UV Method for Cannabinoid Profiling. *Chromatography Today*, **2019**, *12*.

[242] A. Hazekamp, A. Peltenburg, R. Verpoorte, C. Giroud. Chromatographic and spectroscopic data of cannabinoids from Cannabis sativa L. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **2005**, *28*, 2361–2382.

[243] C. Duchateau, C. Stévigny, J. Waeytens, E. Deconinck. Chromatographic and Spectroscopic Analyses of Cannabinoids: A Narrative Review Focused on Cannabis Herbs and Oily Products. *Molecules*, **2025**, *30*, DOI 10.3390/molecules30030490.

[244] A. Duzan, D. Reinken, M. M. Basti. Quality Control of 11 Cannabinoids by Ultraperformance Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS). *J. Anal. Methods Chem.*, **2023**, *2023*, DOI 10.1155/2023/3753083.

[245] B. Nie, J. Henion, I. Ryona. The Role of Mass Spectrometry in the Cannabis Industry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2019**, *30*, 719–730.

[246] L. Calò, L. Anzillotti, C. Maccari, R. Cecchi, R. Andreoli. Validation of a bioanalytical method for the determination of synthetic and natural cannabinoids (New psychoactive substances) in oral fluid samples by means of hplc-ms/ms. *Front. Chem.*, **2020**, *8*, DOI 10.3389/fchem.2020.00439.

[247] M. Antunes, M. Barroso, E. Gallardo. Analysis of Cannabinoids in Biological Specimens: An Update. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **2023**, *20*, DOI 10.3390/ijerph20032312.

[248] A. K. Hewavitharana, F. Gloerfelt-Tarp, M. Nolan, B. J. Barkla, S. Purdy, T. Kretzschmar. Simultaneous Quantification of 17 Cannabinoids in Cannabis Inflorescence by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Separations*, **2022**, *9*, DOI 10.3390/separations9040085.

[249] A. A. M. Stolker, J. Van Schoonhoven, A. J. De Vries, I. Bobeldijk-Pastorova, W. H. J. Vaes, R. Van Den Berg. Determination of cannabinoids in cannabis products using liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **2004**, *1058*, 143–151.

[250] C. Citti, G. Ciccarella, D. Braghiroli, C. Parenti, M. A. Vandelli, G. Cannazza. Medicinal cannabis: Principal cannabinoids concentration and their stability evaluated by a high performance liquid chromatography coupled to diode array and quadrupole time of flight mass spectrometry method. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2016**, *128*, 201–209.

[251] L. L. Romano, A. Hazekamp. *Cannabis Oil: Chemical Evaluation of an Upcoming Cannabis-Based Medicine*, **2013**.

[252] F. A. Franchina, L. M. Dubois, J. F. Focant. In-Depth Cannabis Multiclass Metabolite Profiling Using Sorptive Extraction and Multidimensional Gas Chromatography with Low- A nd High-Resolution Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, **2020**, *92*, 10512–10520.

[253] V. Desaulniers Brousseau, B. Sen Wu, S. MacPherson, V. Morello, M. Lefsrud. Cannabinoids and Terpenes: How Production of Photo-Protectants Can Be Manipulated to Enhance Cannabis sativa L. Phytochemistry. *Front. Plant Sci.*, **2021**, *12*, DOI 10.3389/fpls.2021.620021.

[254] T. D. Nguyen, S. Riordan-Short, T. T. T. Dang, R. O'Brien, M. Noestheden. Quantitation of Select Terpenes/Terpenoids and Nicotine Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry with High-Temperature Headspace Sampling. *ACS Omega*, **2020**, *5*, 5565–5573.

[255] L. O. Hanuš, Y. Hod. Terpenes/Terpenoids in Cannabis: Are They Important? *Med. Cannabis Cannabinoids*, **2020**, *3*, 61–73.

[256] A. Leghissa, Z. L. Hildenbrand, K. A. Schug. A review of methods for the chemical characterization of cannabis natural products. *J. Sep. Sci.*, **2018**, *41*, 398–415.

[257] J. K. Booth, J. Bohlmann. Terpenes in Cannabis sativa – From plant genome to humans. *Plant Science*, **2019**, *284*, 67–72.

[258] M. Haczkiewicz, M. Świtalska, J. Łyczko, M. Pluta, J. Wietrzyk, A. Gliszczyńska. Extraction of Cannabinoids and Terpenes from Hemp Flowers and Leaves (Cannabis sativa L., Futura 75): Chemical Profiling and Evaluation of Anticancer Properties. *Molecules*, **2025**, *30*, DOI 10.3390/molecules30061325.

[259] M. W. Giese, M. A. Lewis, L. Giese, K. M. Smith. Development and validation of a reliable and robust method for the analysis of cannabinoids and terpenes in cannabis. *J. AOAC Int.*, **2015**, *98*, 1503–1522.

[260] S. Lee, E. J. Kim, E. Kwon, S. J. Oh, M. Cho, C. M. Kim, W. Lee, J. Hong. Identification of Terpene Compositions in the Leaves and Inflorescences of Hybrid Cannabis Species Using Headspace-Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Molecules*, **2023**, *28*, DOI 10.3390/molecules28248082.

[261] L. Bajda, M. M. Amaro, G. A. Bongiovanni. Métodos cromatográficos optimizados para la identificación y cuantificación de terpenos en aceite de Cannabis sativa de uso medicinal. *Rev. Fac. Cienc. Med. Cordoba*, **2023**, *80*, 99–105.

[262] C. Moore, C. Coulter, S. Rana, M. Vincent, J. Snares. *Ana!.Yticai Procedure for the Determination of the MariJuana Metabolite 11-nor-Ag-Tetrahydrocannabinoi-9-Carboxylic Acid in Oral Fluid Specimens*, **2006**.

[263] J. Kaur, N. Sun, J. E. Hill. Comprehensive Profiling of Terpenes and Terpenoids in Different Cannabis Strains Using GC × GC-TOFMS. *Separations*, **2023**, *10*, DOI 10.3390/separations10090500.

[264] W. Saingam, A. Sakunpak. Development and validation of reverse phase high performance liquid chromatography method for the determination of delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol in oromucosal spray from cannabis extract. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **2018**, *28*, 669–672.

[265] M. K. Pittiglio, G. A. Ramirez, T. T. Tesfatsion, K. P. Ray, W. Cruces. HPLC Method for Better Separation of THC Isomers to Ensure Safety and Compliance in the Hemp Market. *ACS Omega*, **2024**, *9*, 25390–25394.

[266] S. Analakkattillam, V. K. Langsi, J. P. Hanrahan, E. Moore. Analytical method validation for assay determination of cannabidiol and tetrahydrocannabinol in hemp oil infused products by RP-HPLC. *Sci. Rep.*, **2022**, *12*, DOI 10.1038/s41598-022-13737-6.

[267] N. M. Blebea, D. Rambu, T. Costache, S. Negreș. Very fast RP–UHPLC–PDA method for identification and quantification of the cannabinoids from hemp oil. *Applied Sciences (Switzerland)*, **2021**, *11*, DOI 10.3390/app11209414.

[268] D. Jin, S. Jin, Y. Yu, C. Lee, J. Chen. Classification of Cannabis Cultivars Marketed in Canada for Medical Purposes by Quantification of Cannabinoids and Terpenes Using HPLC-DAD and GC-MS. *J. Anal. Bioanal. Tech.*, **2017**, *08*, DOI 10.4172/2155-9872.1000349.

[269] L. A. Ciolino, T. L. Ranieri, A. M. Taylor. Commercial cannabis consumer products part 2: HPLC-DAD quantitative analysis of cannabis cannabinoids. *Forensic Sci. Int.*, **2018**, *289*, 438–447.

[270] W. Gul, S. W. Gul, M. M. Radwan, A. S. Wanas, Z. Mehmedic, I. I. Khan, M. H. M. Sharaf, M. A. ElSohly. Determination of 11 cannabinoids in biomass and extracts of different varieties of cannabis using high-performance liquid chromatography. *J. AOAC Int.*, **2015**, *98*, 1523–1528.

[271] Z. Hajrulai-Musliu, E. Dimitreska Stojkovikj, D. Gusheski, D. Musliu, D. Velkovski. High-Performance Liquid Chromatography with DAD Detection for the Determination of Cannabinoids in Commercial Veterinary CBD Oil. *Pharmacy*, **2024**, *12*, 181.

[272] K. Madej, A. Chmiołek, K. Szlachta, W. Piekoszewski. Hplc-dad analysis of hemp oil supplements for determination of four cannabinoids: Cannabidiol, cannabidiolic acid, cannabinol and delta 9-tetrahydrocannabinol. *Separations*, **2021**, *8*, DOI 10.3390/separations8120227.

[273] E. M. Mudge, S. J. Murch, P. N. Brown. Leaner and greener analysis of cannabinoids. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2017**, *409*, 3153–3163.

[274] G. McRae, J. E. Melanson. Quantitative determination and validation of 17 cannabinoids in cannabis and hemp using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2020**, *412*, 7381–7393.

[275] J. T. Fischedick, A. Hazekamp, T. Erkelens, Y. H. Choi, R. Verpoorte. Metabolic fingerprinting of Cannabis sativa L., cannabinoids and terpenoids for chemotaxonomic and drug standardization purposes. *Phytochemistry*, **2010**, *71*, 2058–2073.

[276] E. A. Ibrahim, M. M. Radwan, W. Gul, C. G. Majumdar, G. M. Hadad, R. A. A. Salam, A. K. Ibrahim, S. A. Ahmed, S. Chandra, H. Lata, M. A. ElSohly, A. S. Wanas. Quantitative Determination of Cannabis Terpenes Using Gas Chromatography-Flame Ionization Detector. *Cannabis Cannabinoid Res.*, **2023**, *8*, 899–910.

Anexo. Tablas 1 y 2

Tabla 1. Estudio bibliográfico reciente que muestra las aplicaciones de la LC en el análisis de cannabinoides

Referencias (Año)	Técnica analítica (λ en nm)	Analito	Fase Estacionaria	Fase Móvil	Tiempo (min)	Flujo (mL/min)
Patel (2017) [232]	HPLC-DAD (UV 235 nm)	8 (CBDA, CBGA, CBD, CBG, THCA, CBN, Δ^9THC & Δ^8THC)	Poroshell 120 SB-C18 (3×75 mm, 2.7 µm)	A: 25 mM NH_4CH_3COO B: MeOH Gradiente	10	0.70
Saingam (2018) [264]	HPLC-DAD (220 nm)	2 (THC & CBD)	Zorbax C18 (4.6×100 mm, 3.5 µm)	A: MeOH B: H_2O Isocratico (85:15)	9	1.0
Stolker	LC–IT-MSn	5	Hypersil BDS C18	A: 10 mM NH_4CH_3COO + 0.2% FA + MeOH	35	0.2

(2004) [249]		(CBD, CBDA, CBN, THC, Δ^9THC & THCA)		B	10 mM NH_4CH_3COO + 0.2% FA + H_2O		
					Gradiente		
Pittiglio (2024) [265]	HPLC-DAD (220 nm)	2 (Δ^9THC & Δ^8THC)	Raptor C18 (150×4.6 mm, 2.7 µm)	A	H_2O + 0.1% H_3PO_4	27	1.5
				B	ACN + 0.1% H_3PO_4		
					Gradiente		
Analakkattillam (2022) [266]	HPLC-UV (214/228 nm)	2 (CBD & THC)	SOLAS C18 (150×4.6 mm, 5 µm)	A	ACN	20	1.5
				B	H_2O		
					Isocratico (75:25)		
Blebea (2021) [267]	HPLC–DAD (228 nm)	10 (CBDV, CBDA, CBGA, CBG, CBD, CBN, Δ^9THC, Δ^8THC, CBC & THCA).	PerkinElmer Brownlee SPP C18 (150×3.0 mm, 2.7 µm)	A	H_2O + 0.1 % FA	11	1
				B	ACN + 0.1% FA		

					Gradiente		
Burnier (2019) [13]	HPLC-DAD (211 nm)	4 (CBN, CBD, THCA & Δ^9THC)	Nucleodur C18 Gravity Column (250 x 4.6 µm)	A	50 mM H_3PO_4	5	3
				B	ACN		
					Isocratico (15:85)		
Jin (2017) [268]	HPLC-DAD	10 (CBDA, CBGA, CBG, CBD, THCV, CBN, THCA, Δ^8THC, Δ^9THC & CBC)	ZORBAX RX-C18 (4.6×150 mm, 3.5 µm)	A	50 mM NH_4HCOO	30	1
				B	ACN		
					Gradiente		
Ciolino (2018) [269]	HPLC-DAD (220 nm)	11 (CBDV, CBDA, CBGA, CBG, CBD, THCV, CBN, Δ^8THC, Δ^9THC, CBC & THCA).	ACE 5 C18-AR (250, 4.6 mm, 5 µm)	A	ACN	50	1
				B	0.5% AA		
					Isocratico (66:34)		
Galettis	HPLC-UV	17		A	5 mM NH_4HCOO + 0.1% FA	11	-

(2021) [236]	(228 nm)	(CBDVA, CBDV, CBDA, CBGA, CBG, CBD, THCV, THCVA, CBN, CBNA, Δ^8THC, Δ^9THC, CBL, CBC, THCA, CBLA & CBCA).	Raptor ARC-18 (150x4.6 mm, 2.7 µm).	B	ACN + 0.1 % FA		
				Isocratico (25:75)			
Gul (2015) [270]	HPLC-DAD (210-240 nm)	11 (CBDA, CBGA, CBG, CBD, THCV, CBN, Δ^8THC, Δ^9THC, CBL, CBC & THCA)	Luna C18 (150×4.60 mm, 3 µm)	A	0.1% FA	22	1.2
				B	ACN + 0.1% FA		
				Gradiente			
Križman (2020) [238]	HPLC-DAD (275 nm)	11 (CBDV, CBDA, CBGA, CBG, CBD, THCV, CBN, Δ^8THC, Δ^9THC, THCA & CBC)	Luna C18 (150×3 mm, 3 µm)	A	H_2O + 0.1% FA + 10 mM NH_4HCOO	8.5	0.8
				B	ACN + 0.1% FA + 10 mM NH_4HCOO		
				Isocratico (9:31)			
Musliu	HPLC-DAD (228 nm)	12		A	H_2O + 0.1% FA	12	0.6

(2024) [271]		(CBDV, CBDA, CBGA, CBG, CBD, THCV, CBN, Δ^8THC, Δ^9THC, CBC & THCA)	Poroshell 120 EC-18 (150×3 mm, 2.7 µm)	B	ACN + 0.1% FA		
				Isocratico (75:25)			
Madej (2021) [272]	HPLC-DAD (220/240 nm)	4 (CBDA, CBD, CBN & Δ^9THC)	Spheri-5 C18 (250×4.6 mm, 5 µm)	A	0.5 % AA + H_2O	20	1
				B	0.5 % AA + ACN		
				Gradiente			
Mandrioli (2019) [7]	RP-HPLC-UV (220 nm)	10 (CBDA, CBGA, CBG, CBD, THCV, CBN, Δ^8THC, Δ^9THC, CBC & THCA)	Nex-Leaf CBX C18 (150×4.6 mm, 2.7 µm)	A	0.085% H_3PO_4 + H_2O	8	1.6
				B	0.085% H_3PO_4 + ACN		
				Gradiente			
Mudge (2017) [273]	HPLC-DAD (220 nm)	8 (CBDA, THCV, CBD, CBG, CBN, THCA, Δ^8THC, Δ^9THC & CBC)	Kinetex C18 (100×3.0 mm, 1.7 µm)	A	10 mM NH_4HCOO	15	0.6
				B	ACN		
				Gradiente			

De Backer (2009) [180]	HPLC-DAD (200-400 nm)	8 (CBDA, CBGA, CBD, CBG, THCA, CBN, Δ^8THC & Δ^9THC)	Xterra MS C18 (250 x2.1 mm, 5 µm)	A	50 mM NH_4HCOO + MeOH	36	0.3
				B	50 mM NH_4HCOO + H_2O		
				Gradiente			
Durante (2022) [208]	HPLC-ESI-MS/MS (210 & 220 nm)	14 (CBGV, CBDV, CBDA, CBGA, CBG, CBNR, CBD, CBCV, CBN, CBCA, Δ^8THC, Δ^9THC, CBC & THCA)	Ascentis Express C18 (150×3 mm, 2.7 µm)	A	0.1% AA + 2 mM NH_4HCOO + H_2O	20	0.30
				B	0.1% AA + ACN		
				Gradiente			
Calò (2020) [246]	HPLC-MS/MS	15 (CBN. CBD, THCA, THC and synthetic cannabinoids)	Pursuit XRs Ultra C18 (100×2.0 mm, 2.8 µm)	A	10 mM FA + H_2O	25	0.2
				B	0.1% FA+ MeOH + ACN (95/5)		
				Gradiente			
McRae (2020) [274]	HPLC-MS/MS	17 (CBDV, THCV, CBDVA, CBD, CBG, THCVA, CBN, Δ^8THC,	Ace-3 C18-amide (100x2.1mm, 2 µm	A	0.1% FA + H_2O	21	n/s
				B	0.1% FA + ACN		

		Δ^9THC, CBC, CBDA, CBL, CBNA, THCA, CBGA, CBCA & CBLA)		Gradiente			
Kanabus (2023) [171]	UHPLC-HESI-MS	17 (CBDVA, CBDV, CBDA, CBGA, CBG, CBD, CBN, THCVA, THCV, CBN, CBCA, Δ^8THC, Δ^9THC, THCA, CBL, CBLA & CBC)	Cortecs C18 (2.1×100 mm, 1.6 µm)	A B	0.02% AA + ACN 5 mM NH_4HCOO + H_2O	10	0.3
				Isocratico (75:25)			

Tabla 2. Estudio bibliográfico reciente que muestra las aplicaciones de la GC en el análisis de cannabinoides y terpenos.

Referencia (Año)	Técnica Analítica	Fase Estacionaria	Carrier Gas Flujo (mL/min)	Analitos	Tiempo (minutes)	Condiciones críticas de temperatura (°C)
Fischedick (2010) [275]	GC–FID	DB5 (30 m x 0.25 mm, 0.25 µm)	Nitrógeno 1.2	36 E.g.,CBD, CBG,Δ^8THC, Δ^9THC, CBC, CBN, linalool α-humulene, limonene, myrcene, α-terpinene.	65	To: 60 - 240 Ti: 230 T_{FID}: 250
	GC–MS	HP5-ms (30 m x 0.25 mm, 0.25 µm)	Helio 1.2	36 E.g.,CBD, CBG,Δ^8THC, Δ^9THC, CBC, CBN, linalool α-humulene, limonene, myrcene, α-terpinene.	65	To: 60 - 240 Ti: 230 Ts: 280
Zekic (2020) [233]	GC–FID	Rtx-50 (30 m x 0.25mm, 0.25 µm)	Helio 2	12 CBD, CBG,Δ^8THC, Δ^9THC, CBC, CBN, α-humulene, limonene, myrcene, α-terpinene, β-pinene, and α-terpinene.	22.5	To: 60 - 290 Ti: 310 T_{FID}: 310
Giese (2015) [259]	GC–FID	Elite 5MS (30m x 0.25mm, 0.25µm)	Hidrogeno 1.3	17 E.g., α-pinene, camphene, β-pinene, myrcene, α-phellandrene, 3-carene, α-terpinene, limonene, β-ocimene, γ-terpinene, terpinolene, linalool, fenchol, α-	35	To: 60 - 300 Ti: 230 T_{FID}: -

				terpineol, *β*-caryophyllene, *α*-humulene, caryophyllene oxide.		
Bajda (2023) [261]	GC–FID	HP-5 (30 m × 0.32 mm, 0.25 µm)	Nitrógeno 1.2	8 *β*-pinene, myrcene, p-cymene, limonene, linalool, *α*-terpineol, nerol, and geraniol.	21	To: 60 - 114 Ti: 250 T_{FID}: 280
Ibrahim (2023) [276]	GC–FID	DB5-MS (30 m × 0.25 mm, 0.25 µm)	Helio 1.2	10 *α*-pinene, *β*-pinene, *β*-myrcene, limonene, terpinolene, linalool, *α*-terpineol, *β*-caryophyllene, *α*-humulene, and caryophyllene oxide.	60	To: 60 - 250 Ti: 250 T_{FID}: 300
Ibrahim (2019) [219]	GC/MS	DB-5MS (30 m × 0.25 mm, 0.25 µm)	Helio 1.0	10 *α*-pinene, *β*-pinene, *β*-myrcene, limonene, terpinolene, linalool, *α*-terpineol, *β*-caryophyllene, *α*-humulene, and caryophyllene oxide.	46	To: 50 - 165 Ti: 250 Ts: 230
Rocha (2021) [223]	HS-SPME GC-MS	HP-5MS (30 m × 0.25 mm, 0.25 µm)	Helio 1.21	30 E-g., *α*-pinene, β-pinene, *β*-myrcene, D-limonene, terpinolene, linalool, caryophyllene, *α*-bergamotene, and humulene.	20	To: 60 - 260 Ti: 250 Ts: 230

Nguyen (2020) [254]	HS−GC−MS (SIM)	TG-624SilMS (30 m × 0.25 mm, 1.4 µm)	Helio 1.5	30 E.g., α-pinene, camphene, *β*-myrcene, *β*-pinene, *δ*-3-carene, *α*-terpinene, limonene, p-cymene, and terpinolene.	16.5	To: 60 - 280 Ti: 125 Ts: 300
Kaur (2023) [263]	GC×GC-TOFMS	Rxi-5ms (30 m × 0.25 mm, 0.50 µm) (1D) / DB-HeavyWax 5 m × 0.25 mm, 0.20 µm) (2D)	Helio 0.7 (1D) 21.0 (2D)	146 E.g., α-pinene, β-pinene, β-myrcene, D-limonene, terpinolene, linalool, β-caryophyllene, α-humulene, guaiol, and α-bisabolo.	128	To: 50 - 280 Ti: 280 Ts. 280
Hanuš (2024) [221]	GC/MS (liquid extracion)	HP-5MS UI (30 m × 0.25 mm, 0.25 µm)	Helio 1.0	38 E.g., β-myrcene, limonene, β-caryophyllene, α-humulene, γ-elemene, α-bulnesene, and γ-selinene.	34.7	To: 35 - 250 Ti: 250 Ts: 280
	HS GC/MS	HP-5MS UI (30 m × 0.25 mm, 0.25 µm)	Helio 1.0	74 E.g., α-pinene, β-pinene, β-myrcene, limonene, and terpinolene.	34.7	To: 35 - 250 Ti: 250 T inc: 80 Ts: 280
	SPME GC/MS	HP-5MS UI (30 m × 0.25 mm, 0.25 µm)	Helio 1.0	57 E.g., *β*-caryophyllene, *α*-humulene, selina-3,7(11)-diene, *γ*-selinene, *β*-myrcene y limonene.	34.7	To: 35 - 250 Ti: 250 T inc: 60 Ts: 280

Pereira Francisco (2024) [220]	GC–MS *(identification)*	DB-5MS (30 m × 0.25 mm, 0.25 µm)	Helio 1.3	56 E.g., *α*-pinene, camphene, *β*-pinene, *β*-myrcene, α-terpinene, p-cymene, D-limonene, and eucalyptol.	40.6	To: 50 - 260 Ti: 270 Ts: 230
	GC–FID *(quantification)*	VF-5MS (30 m × 0.25 mm, 0.25 µm)	Helio 1.3	56 E.g., *α*-pinene, camphene, *β*-pinene, *β*-myrcene, *α*-terpinene, p-cymene, D-limonene, and eucalyptol.	40	To: 50 - 300 Ti: 270 T_{FID}: 300
Joy (2025) [218]	GC-MS (SIM)	HP-5 MS (60 × 0.25 mm, 0.25 µm)	Helio 1.2	18 E.g., *β*-myrcene, *β*-caryophyllene, *α*-humulene, limonene, and *α*-bisabolol.	33.0	To: 115 - 280 Ti: 250 Ts: 250
Lee (2023) [260]	HS-GC/MS	DB-5MS (30 m × 0.25 mm, 0.25 µm)	Helio 1.0	26 E.g., α-pinene, *β*-pinene, myrcene, limonene. eucalyptol, (E)-*β*-ocimene, and *γ*-terpinene.	34	To: 60 - 250 Ti: 250 Ts: 250
Haczkiewicz (2025) [258]	HS-SPME-GC-MS	Zebron ZB-5 MSi (30 m × 0.25 mm, 0.25 µm)	Helio 1.07	59 E.g., *β*-caryophyllene, *α*-humulene, sesquisabinene, p-cymene-8-ol, *α-trans*-bergamotene, myrcene, and *o*-cymene.	42	To: 50 - 280 Ti: 250 Ts: 250