

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINACIÓN DE CANNABINOIDES EN CREMAS DÉRMICAS

María Mansilla

Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos (LCCM), FBCB- UNL.

Directora: Lucía Torregiani

Codirectora: María Mercedes De Zan

Área: Ciencia de la Salud

Palabras claves: Cannabinoides, Cremas, cromatografía líquida

INTRODUCCIÓN

A partir de la reglamentación de la Ley Nacional 27350, la cual regula la investigación médica y científica del uso medicinal de la planta de cannabis y sus derivados, nuestro país permite la elaboración de productos de uso medicinal con cannabinoides tanto por parte de la industria farmacéutica como también por usuarios inscriptos en el Registro del Programa de Cannabis (REPROCANN). Esta apertura ha dado lugar a la producción de cremas dérmicas que contienen cannabinoides para el tratamiento del dolor y la inflamación (Eskander, J., 2020). En cuanto a los productos derivados de cannabis para uso terapéutico que circulan en nuestro país y están disponibles para la población, los mismos tienen diferentes orígenes. Están, por un lado, aquellos que provienen de la industria farmacéutica regulada y que tienen su calidad asegurada, y por otro lado aquellos producidos artesanalmente, sin control de calidad del producto final. Es por esto la importancia de contar con métodos analíticos exactos y confiables para determinar el perfil cuali y cuantitativo de cannabinoides presentes en cremas para un uso eficiente y seguro de estos productos. Los cannabinoides presentes en la planta y productos derivados se han cuantificado generalmente por Cromatografía de Gases (CG). El análisis mediante la técnica de Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (CLAR) tiene ventajas frente al CG, ya que al trabajar con temperaturas moderadas permite diferenciar las formas ácidas y neutras de los analitos (Burnier, C., et al, 2019).

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo fue realizar la validación de un método analítico para determinar cannabinoides en muestras de cremas dérmicas. El método se basa en la extracción etanólica de los cannabinoides a partir de la matriz del producto y la separación de los mismos por CLAR con detección de arreglo de diodos para la determinación simultánea de cannabinoides neutros y ácidos (CBD, Δ^9 -THC, CBDA, THCA, CBN, CBC, CBG, CBGA y Δ^8 -THC).

Título del Proyecto: Desarrollo y validación de métodos analíticos por cromatografía líquida de alto rendimiento para la determinación de cannabinoides en productos farmacéuticos mediante calidad por diseño

Instrumento: Plan de Excelencia en Investigación Científica. Proyectos I+D (PEICD)

Año convocatoria: 2021

Organismo financiador: ASACTEI

Directora: María Mercedes De Zan

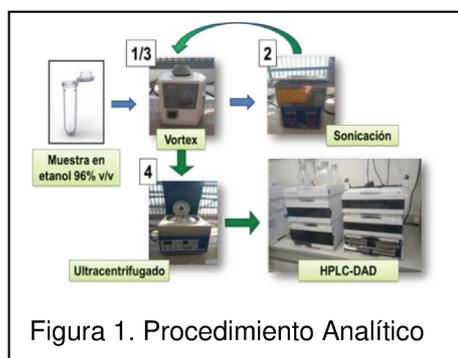
MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras y Estándares

Se emplearon muestras reales (MR) de cremas remitidas al laboratorio por cultivadores, asociaciones civiles y/o consumidores de la provincia de Santa Fe. Para la identificación se utilizaron estándares de referencia de Δ -9-THC, Δ -8-THC, CBD, CBN, CBDA y THCA adquiridos como soluciones metanólicas a RESTEK. Para la calibración y fortificación de muestras se utilizó un estándar secundario de CBD generado en el laboratorio a partir de CBD cristal materia prima, siguiendo los lineamientos de USP y guías ICH Q2(R2) (2022) y Eurachem (2016). Para selectividad se utilizaron cremas que no contienen cannabinoides (muestras blanco (MB) o matriz) provistas por los productores.

Preparación de las muestras

El procedimiento analítico (Figura 1) se desarrolló y optimizó en el laboratorio. La muestra se homogeneizó perfectamente y luego se pesó exactamente una masa aproximada a 20,0 mg en un tubo eppendorf. Se agregaron 1500 μ L de etanol 96%. Se sonicó, agitó con vortex y sonicó nuevamente para asegurar la extracción de los analitos. Finalmente se centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante (solución muestra, SM) se trasvasó a un vial de inyección. El procedimiento de extracción se verifica en el ensayo de veracidad.



Sistema Cromatográfico

Se empleó un sistema de HPLC-DAD (1260 Agilent Technologies). Se registraron espectros completos de los picos de los analitos en el rango de 200 a 400 nm. Las separaciones cromatográficas se realizaron en una columna analítica Agilent InfinityLAB poroshell 120 EC-C18 (2,7 μ m; 4,6 mm \times 150 mm). El control del equipo y la adquisición de datos se realizaron con el software OpenLAB CBS. La fase móvil consistió en una mezcla de solución A (ácido fórmico 0,1% v/v en agua) y solución B (ácido fórmico 0,1% v/v en acetonitrilo) con gradiente de elución. La velocidad de flujo se fijó en 1,5 mL/min, y el volumen de inyección fue de 5 μ L. La separación se llevó a cabo a 40 °C.

Estrategia de identificación y calibración

La curva de calibrado se obtuvo a partir de soluciones de calibrado de CBD en etanol 96% en el rango de (0 – 250) μ g/mL. Cada punto de calibración se analizó por triplicado. Se aplicó regresión lineal ponderada (WLS) con el peso más conveniente entre las concentraciones nominales (CN) y las áreas del pico de CBD. Para la recta ajustada se obtuvieron: coeficiente de determinación (R^2), ordenada al origen (a) y pendiente (b) con sus correspondientes desvíos estándar e intervalos de confianza ($\alpha = 0,05$) y el desvío estándar de la regresión (RMSE). Para determinar la concentración de CBD en cremas se utilizó la curva de calibrado. La cuantificación de los demás cannabinoides se realizó mediante el uso del factor de respuesta relativo a CBD (Sarma et al, 2020). La identificación de cannabinoides se basó en los tiempos de retención relativo al CBD y espectros de absorción de los picos (coincidencia con espectros estándares).

Validación del método

El método fue validado siguiendo la guía ICH Q2(R2) (2022) y Eurachem (2016). Se realizaron ensayos de: selectividad, rango lineal, límite de cuantificación (LOQ) y límite de detección (LOD), precisión, veracidad y estabilidad de soluciones.

Selectividad: Se analizaron las señales cromatográficas de solvente de inyección (n=2), MB (n=1) y MR (n=3).

Linealidad y Rango: La linealidad se verificó mediante el análisis de la distribución de los residuos de la curva de calibrado.

Precisión: Se evaluó la precisión intraensayo del método procesando 6 veces una crema comercial de CBD en el mismo día por el mismo analista para calcular el coeficiente de variación en condiciones de repetibilidad (CVr). La precisión intermedia se determinó al procesar la misma muestra en un día diferente por otro analista para determinar el coeficiente de variación del Pool en condiciones de reproducibilidad (CVp).

Límite de Detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ): los límites se estimaron mediante la evaluación de la señal/ruido de los picos. El LOQ se validó en los ensayos de veracidad y precisión.

Veracidad: Se fortificaron MB con CBD en cuatro niveles de concentración (LOQ, 25%, 50% y 75% de la curva de calibrado) por triplicado. Se calcularon las recuperaciones (R%).

Estabilidad de los extractos: se mantuvieron las SM del ensayo de selectividad en los viales de inyección a temperatura ambiente durante 24 hs y se inyectaron nuevamente.

RESULTADOS

Los resultados de la validación se muestran en la tabla 2

Tabla 2: Resultados de los ensayos para cada parámetro estudiado en la Validación

Parámetro		Criterio de Aceptación	Resultados
Selectividad	Solvente de inyección	Ausencia de señal en el tiempo de retención del analito.	Cumple
	MB	No debe producir señal > 20% del LOQ en el tiempo de retención de cada uno de los analitos.	Cumple
	MR	Tiempos de retención relativos y espectros de absorción coincidentes con estándares. Resoluciones entre picos adyacentes > 1.0	Cumple
Precisión	Intraensayo	CVr < 5,0%	Analista 1: CVr = 2,3% Analista 2: CVr = 3,5%
	Intermedia	CVp < 7,5%	Pool: CVp = 3,0%
Veracidad	Nivel LOQ	R (%) = 85,0 – 115,0	Cumple
	Nivel 2	R (%) = 90,0 – 110,0	Cumple
	Nivel 3	R (%) = 90,0 – 110,0	Cumple
	Nivel 4	R (%) = 95,0 – 105,0	Cumple
Estabilidad	Extractos	La concentración predicha a 24 hs entre el 95.0 y 105.0 % de la concentración predicha inicial.	Cumple
Límites	LOQ	Cumplir con criterios de precisión y veracidad	0,01%p/p
	LOD		0,003% p/p

La curva de calibración se ajustó a un modelo de regresión lineal ponderada WLS con peso $1/x$ presentándose una distribución homocedástica de los residuos sin tendencia evidente. El valor de R^2 obtenido fue de 99,96%. La curva presenta un comportamiento lineal en el rango de concentración estudiado. La ecuación de regresión se muestra en la Ecuación 1:

Ecuación 1
$$y = 10,06 X + 3,71$$

Análisis de muestras reales

Utilizando el procedimiento validado se analizaron 5 muestras de cremas: 2 comerciales y 3 artesanales. En las muestras comerciales se observó la presencia de CBD en concentraciones $<0,3\%$ p/p. De las muestras artesanales 2 de ellas contenían THC y CBD como cannabinoides mayoritarios y se determinó la presencia de otros cannabinoides minoritarios. En una muestra artesanal no se observó ningún cannabinoide. La única muestra con concentración de cannabinoides declarada por el fabricante presentó una concentración 10 veces menor a lo esperado. En la Figura 2 se muestra un cromatograma de una muestra de crema artesanal.

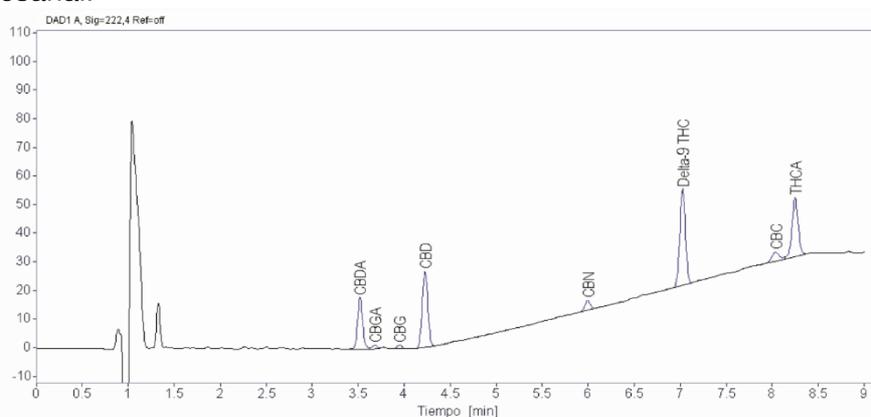


Figura 2. Cromatograma de una muestra de crema

CONCLUSIONES

Se ha validado un método analítico mediante CLAR sencillo, rápido y preciso para la determinación de nueve cannabinoides en cremas de uso dérmico. Esta herramienta analítica generada permite conocer el perfil cuali y cuantitativo de cannabinoides presentes en cremas que se producen en la región para uso medicinal. Esta información resulta útil para llevar a cabo tratamientos personalizados, ya que cada paciente requiere un ajuste de la composición y dosis de cannabinoides a utilizar en función de su patología específica.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

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

Eskander, MD, MBA, J. P., Spall, BS, J., Spall, BA, A., Shah, MD, MBA, R. V., & Kaye, MD, PhD, A. D. (2020). Cannabidiol (CBD) as a treatment of acute and chronic back pain: A case series and literature review. *Journal of Opioid Management*, 16(3), 215–218.

Guía Eurachem: “La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados”, Primera Edición (2016) Eurolab España.

Sarma, N. D. et al., 2020. Cannabis inflorescence for medical purposes: USP considerations for quality attributes. *Journal of Natural Products*, 83 (4), 1334-1351

USP <1225> Validation of compendial procedures.

Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 2022. ICH Q2 (R 2)