



FARMACOPEIA
BRASILEIRA

Monografia em consulta pública: Inflorescências de *Cannabis sativa* L. (*Cannabis flos*)



Maíra Ribeiro de Souza

Especialista em Regulação e Vigilância Sanitária

GESEF/GGMED - Anvisa

Doutorado – PPGCF/UFRGS

Processo de desenvolvimento: Visão geral



DEFINIÇÃO DO PROBLEMA

Necessidade de estabelecer especificações de qualidade harmonizadas

Complexidade inerente à espécie: requer desenvolvimento de métodos adequados

Produtos em
desenvolvimento
clínico

Produtos
comerciais

Padrões de
qualidade
harmonizados

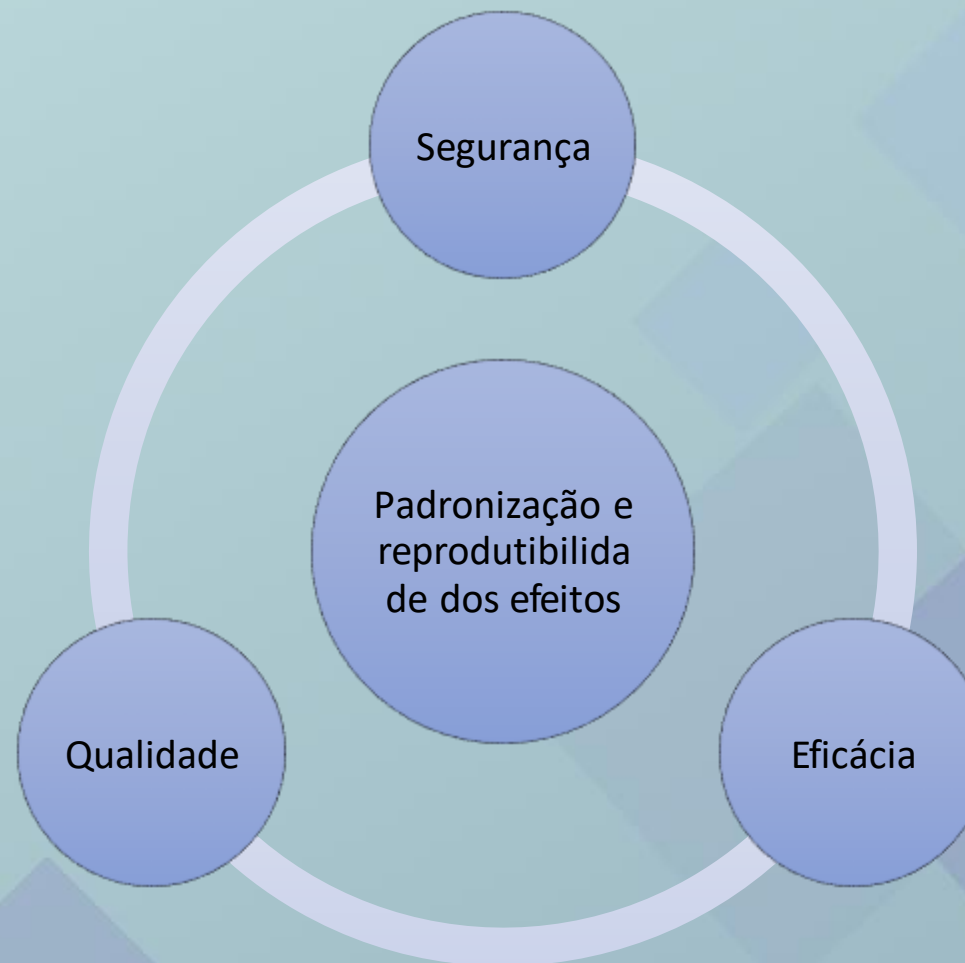
Processo de desenvolvimento: Visão geral



DEFINIÇÃO DO PROBLEMA

Necessidade de estabelecer especificações de qualidade harmonizadas

Complexidade inerente à espécie: requer desenvolvimento de métodos adequados



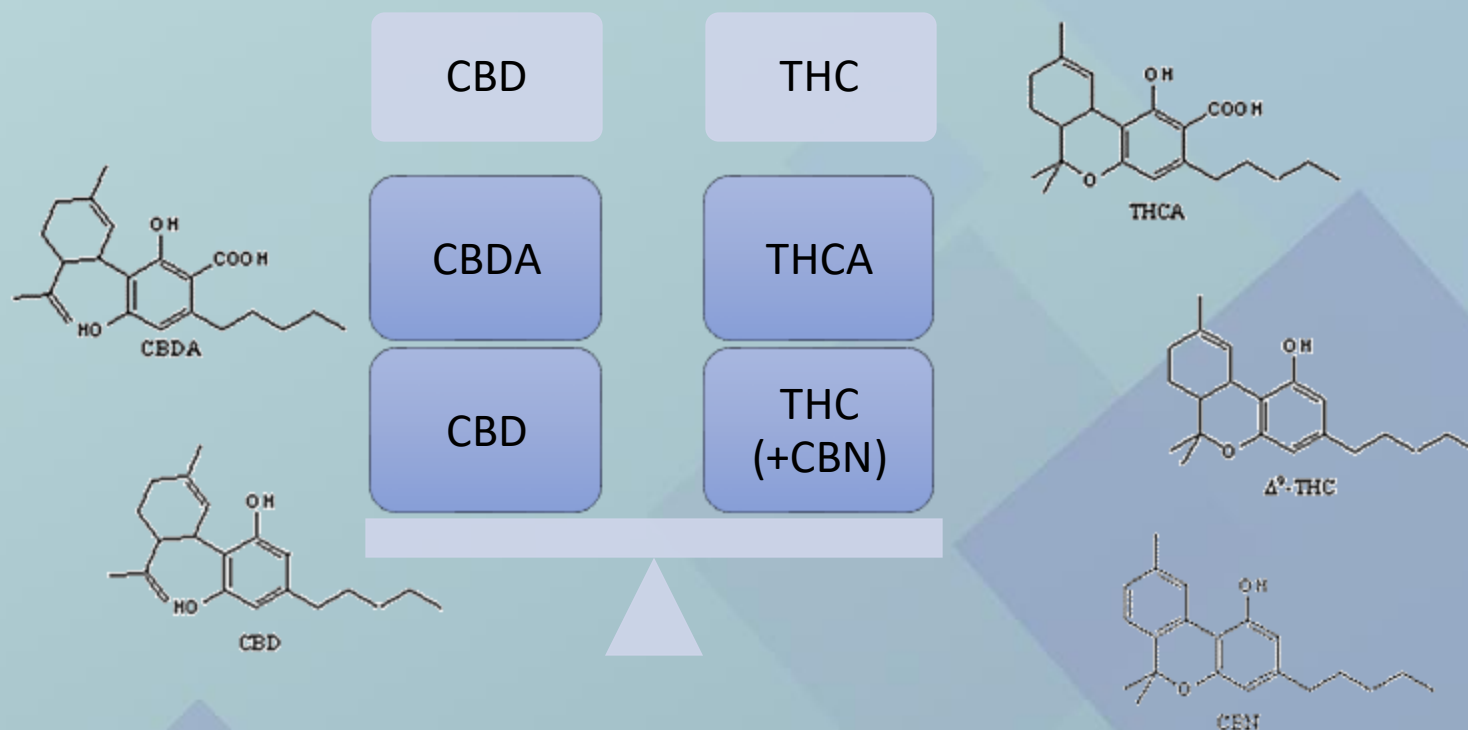
Processo de desenvolvimento: Visão geral



DEFINIÇÃO DO PROBLEMA

Necessidade de estabelecer especificações de qualidade harmonizadas

Complexidade inerente à espécie: requer desenvolvimento de métodos adequados



Processo de desenvolvimento: Visão geral



DEFINIÇÃO DO PROBLEMA

Necessidade de estabelecer especificações de qualidade harmonizadas

Complexidade inerente à espécie: requer desenvolvimento de métodos adequados



REVISÃO DA LITERATURA

Levantamento do conjunto de testes relevantes

Referências para definição de critérios de aceitação

Embasamento de condições para desenvolvimento dos métodos originais



DESENVOLVIMENTO DOS MÉTODOS ORIGINAIS

IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

IDENTIFICAÇÃO: PERFIL CROMATOGRÁFICO (CCD e CLAE)

TEOR DE CANABINOIDES – (CLAE)



ELABORAÇÃO DA MINUTA FINAL

Estrutura básica da monografia

Métodos
originais

Identificação

- Identificação botânica
- Perfil cromatográfico (CCD)
- Perfil cromatográfico (CLAE-DAD)

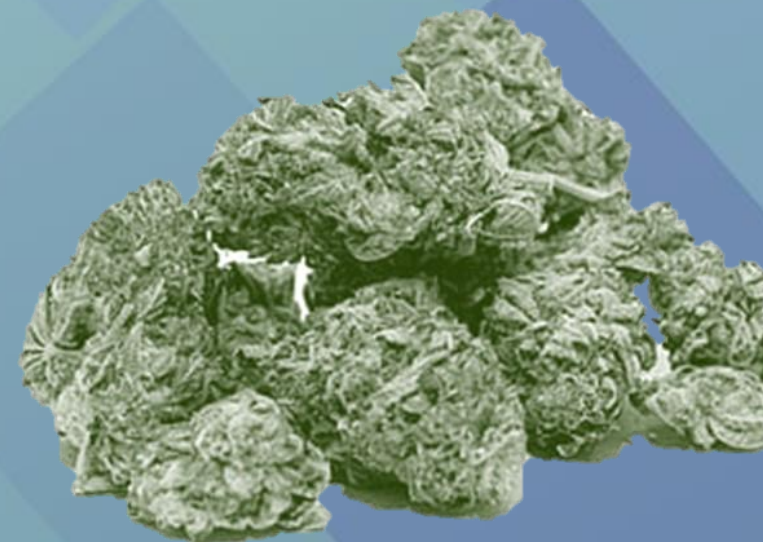
Teor (CLAE-DAD)

- CBDA, THCA, CBD e Δ^9 -THC

Pureza

Métodos
gerais

- CBN (impureza específica)
- Matérias estranhas
- Metais pesados
- Micotoxinas
- Pesticidas
- Cinzas
- Água
- Limites microbianos



Estrutura básica da monografia

Identificação

- Identificação botânica
- Perfil cromatográfico (CCD)
- Perfil cromatográfico (CLAE-DAD)

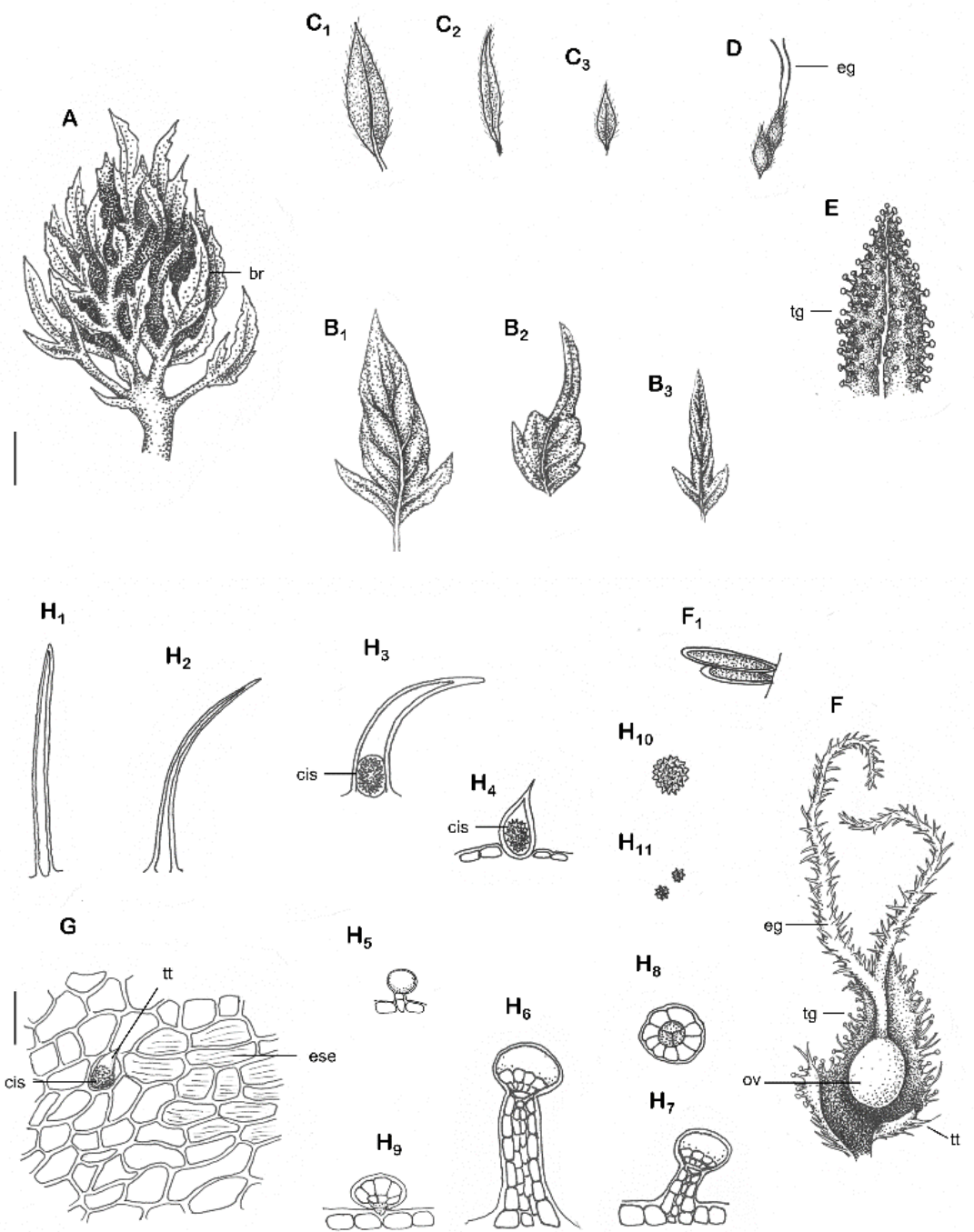
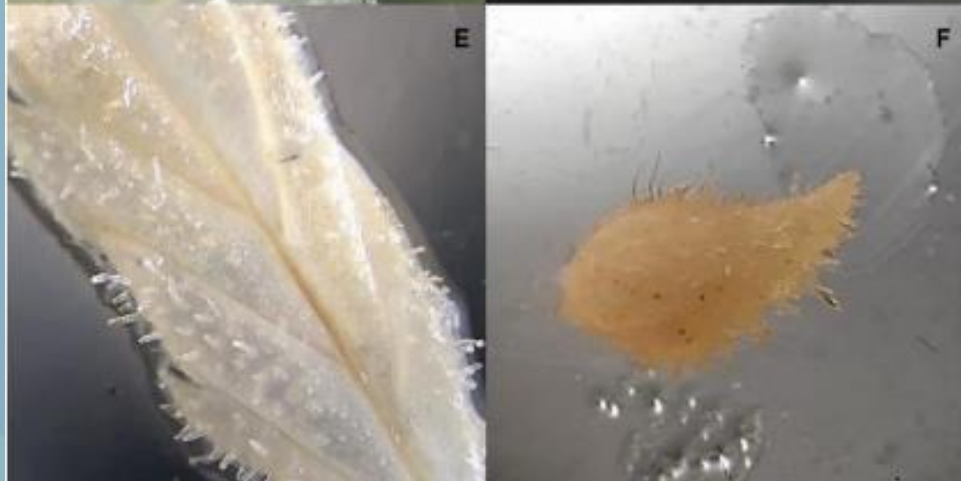
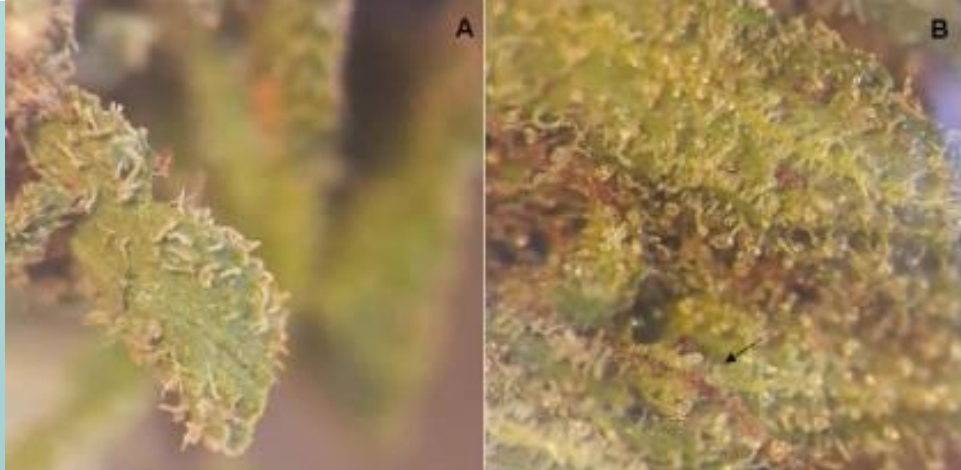
- Descrição das características diagnósticas das inflorescências da espécie
- Ilustração das principais estruturas observadas no material

Teor (CLAE-DAD)

- CBDA, THCA, CBD e Δ^9 -THC

Pureza

- CBN (impureza específica)
- Matérias estranhas
- Metais pesados
- Micotoxinas
- Pesticidas
- Cinzas
- Água
- Limites microbianos



Estrutura básica da monografia

Identificação

- Identificação botânica
- Perfil cromatográfico (CCD)
- Perfil cromatográfico (CLAE-DAD)

Teor (CLAE-DAD)

- CBDA, THCA, CBD e Δ^9 -THC

Pureza

- CBN (impureza específica)
- Matérias estranhas
- Metais pesados
- Micotoxinas
- Pesticidas
- Cinzas
- Água
- Limites microbianos

- Foco no monitoramento dos principais canabinoides
- Diferenciação entre quimiotipos
- Acompanhamento de alterações

Perfil cromatográfico - CCD

Triagem

Otimização da fase móvel - DoE

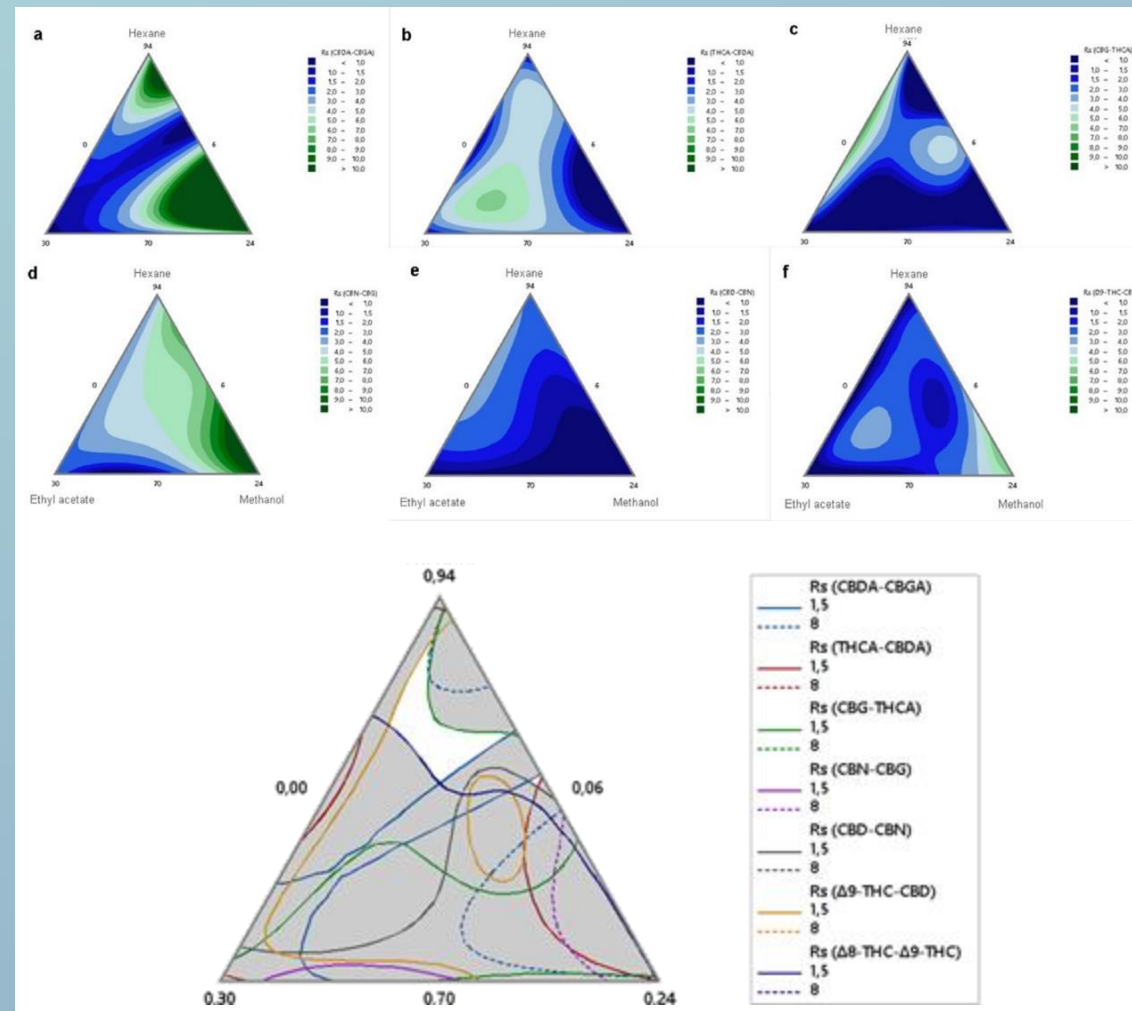
- *Mixture design*
- Gráficos de contorno
- *Derringer desirability function*

Validação do método

- Seletividade + degradação forçada
- Precisão
- Robustez – teste de Youden

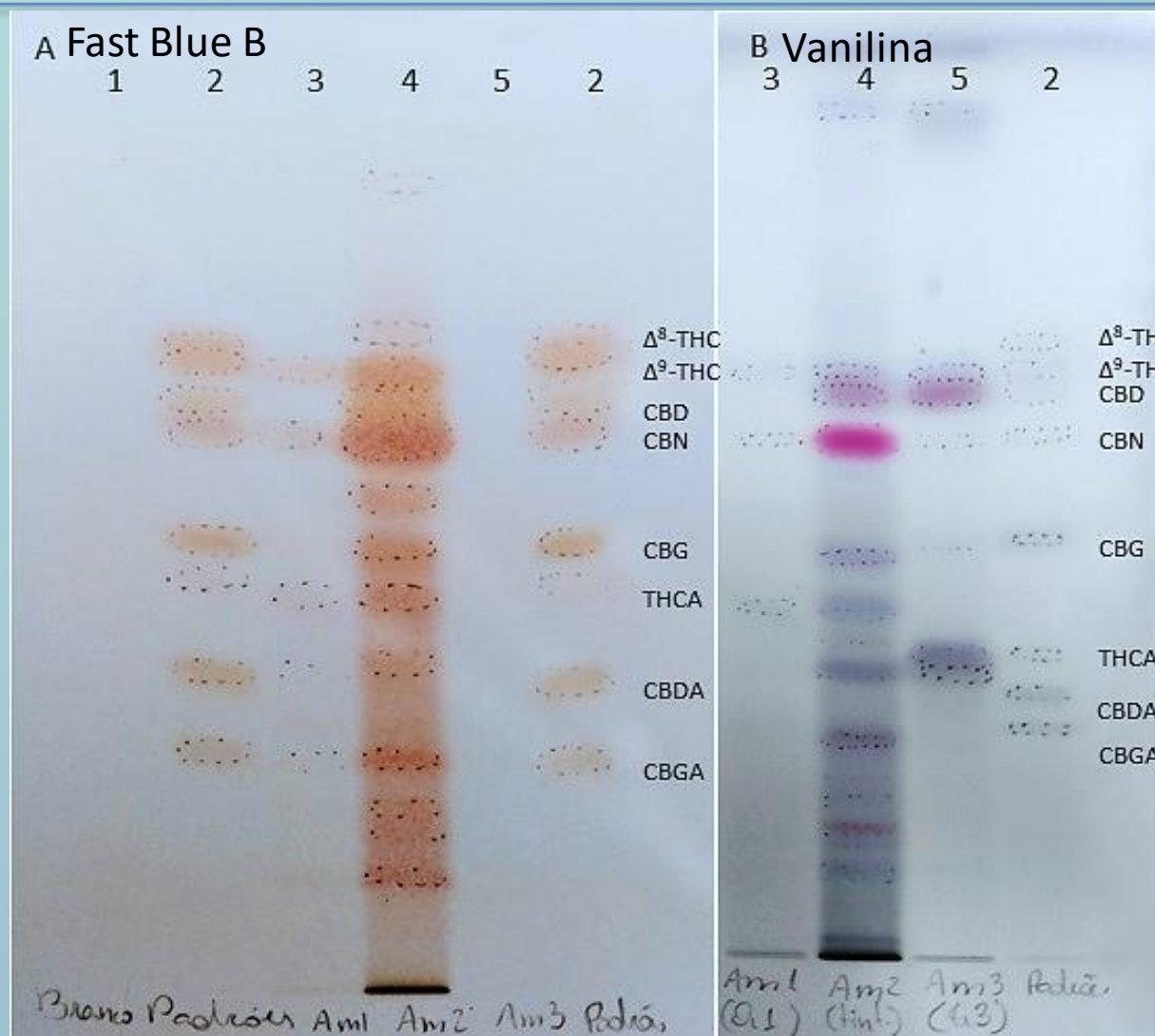
Método adequado ao propósito

- Identificação de canabinoides
- Diferenciação entre quimiotipos
- “indicativo de estabilidade”



Perfil cromatográfico - CCD

Hex: AcOEt:
MeOH: AcOH
(85:10:5:0,2)



1. Branco
 2. Solução padrão mista (8CBs);
 3. Solução amostra 1 (Q1)
 4. Solução amostra 2 (antiga)
 5. Solução amostra 3 (Q2);
- Registro fotográfico sob luz visível.

Parte superior da placa			
Δ^9 -THC: zona de coloração violeta CBD: zona de coloração violeta CBN: zona de coloração rosada	zona de coloração violeta zona de coloração rosada	zona de coloração violeta zona de coloração violeta	zona de coloração violeta
THCA: zona de coloração violeta CBDA: zona de coloração violeta	zona de coloração violeta intensa	zona de coloração violeta intensa zona de coloração violeta intensa	zona de coloração violeta intensa
<i>Solução de referência</i>	<i>Solução amostra (quimiotipo I, THC-dominante)</i>	<i>Solução amostra (quimiotipo II, intermediário)</i>	<i>Solução amostra (quimiotipo III, CBD-dominante)</i>

DoE-assisted development and validation of a thin layer chromatography method for optimized separation of major cannabinoids in *Cannabis sativa* L. samples

Maíra Ribeiro de Souza^{a,b,c} , Renata Pereira Limberger^b, and Amélia Teresinha Henriques^a 

^aLaboratório de Farmacognosia e Controle da Qualidade de Fitoterápicos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil; ^bLaboratório de Análises e Pesquisas em Toxicologia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil; ^cAgência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Brasília, Brazil

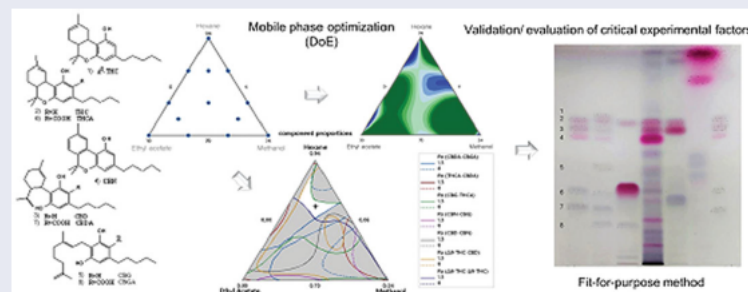
ABSTRACT

As interest in the medical use of cannabis and cannabinoids rises, the need to establish appropriate quality specifications for them also becomes evident. Consequently, various methods applied to the analyses of cannabinoids in *C. sativa* have been reported. Among the chromatographic techniques used for this purpose, TLC stands out as a suitable alternative for fingerprint assessment. Nevertheless, structural similarity between cannabinoids imposes some analytical challenges. In this context, DoE-assisted optimization may favor achieving an adequate resolution between those analytes. Accordingly, this study aimed at developing and validating a TLC method for cannabinoid profile monitoring in *C. sativa* inflorescences by employing a DoE-driven strategy. A mixture design was applied to estimate the ideal mobile phase composition. Data analyses focused on maximizing resolutions between eight major cannabinoids and improving band distribution throughout the chromatogram. The overall quality of the chromatographic profiles after method optimization was satisfactory. Method validation covered selectivity, precision, and ruggedness assessment. The Youden design was applied for simultaneous analysis of five experimental factors. The proposed method was shown to be fit-for-purpose, allowing chemotype differentiation, in addition to being stability-indicating. Moreover, the results can support the definition of control strategies to ensure consistent achievement of the intended method's performance.

KEYWORDS

Cannabinoids; *Cannabis sativa*; design of experiments; quality control; thin-layer chromatography

GRAPHICAL ABSTRACT



Estrutura básica da monografia

Identificação

- Identificação botânica
- Perfil cromatográfico (CCD)
- Perfil cromatográfico (CLAE-DAD)

Teor (CLAE-DAD)

- CBDA, THCA, CBD e Δ^9 -THC

Pureza

- CBN (impureza específica)
- Matérias estranhas
- Metais pesados
- Micotoxinas
- Pesticidas
- Cinzas
- Água
- Limites microbianos

- Abordagem baseada em AQbD
- CBD como padrão de referência (FRR)
- Validação completa – método indicativo de estabilidade

Determinação de canabinoides - HPLC-DAD

ATP; CMA; CMV

Análise de risco

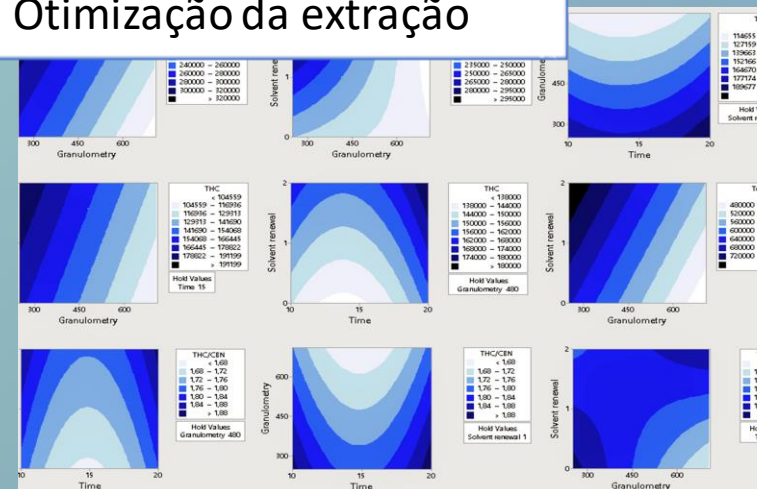
DoE

MODR Metodologia de superfície de resposta
Modelos polinomiais

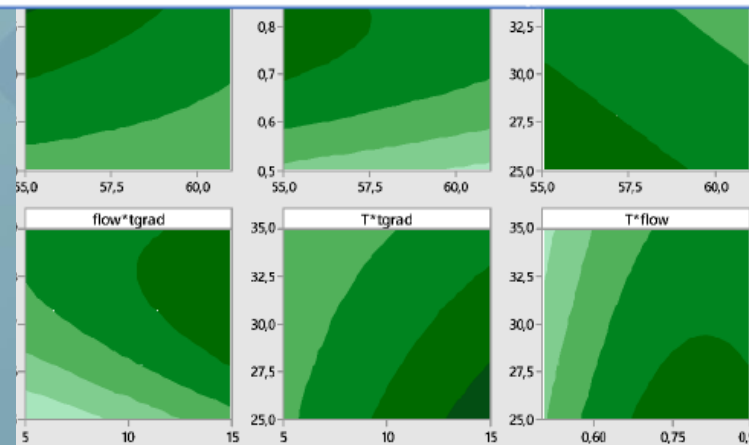
Validação

AQbD

Otimização da extração



Otimização da etapa cromatográfica



Determinação de canabinoides - HPLC-DAD

ATP; CMA; CMV

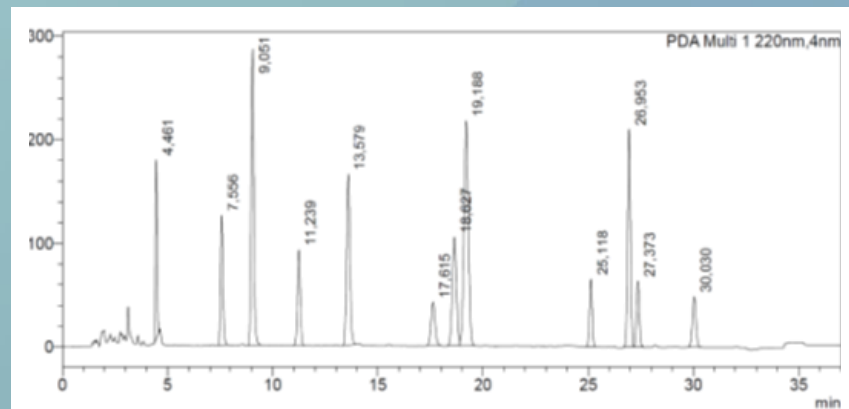
Análise de risco

DoE

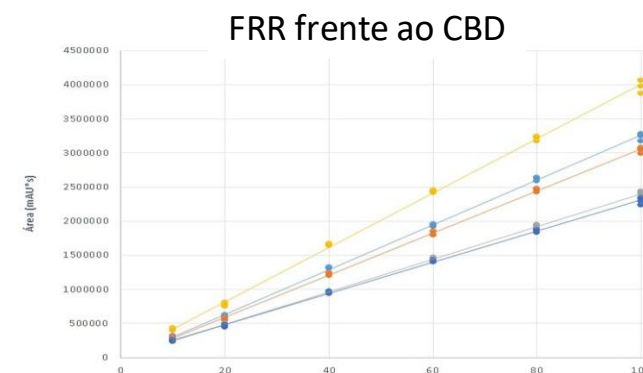
MODR

Validação

AQbD



Condição otimizada



Método validado

<i>Tempo (minutos)</i>	<i>Eluente (A) (%)</i>	<i>Eluente (B) (%)</i>	<i>Eluição</i>
0 - 15	44 → 39	56 → 61	gradiente linear
15 - 19	39	61	isocrática
19 - 23	39 → 25	61 → 75	gradiente linear
23 - 30	25	75	isocrática
30 - 31	25 → 44	75 → 56	gradiente linear
31 - 35	44	56	isocrática

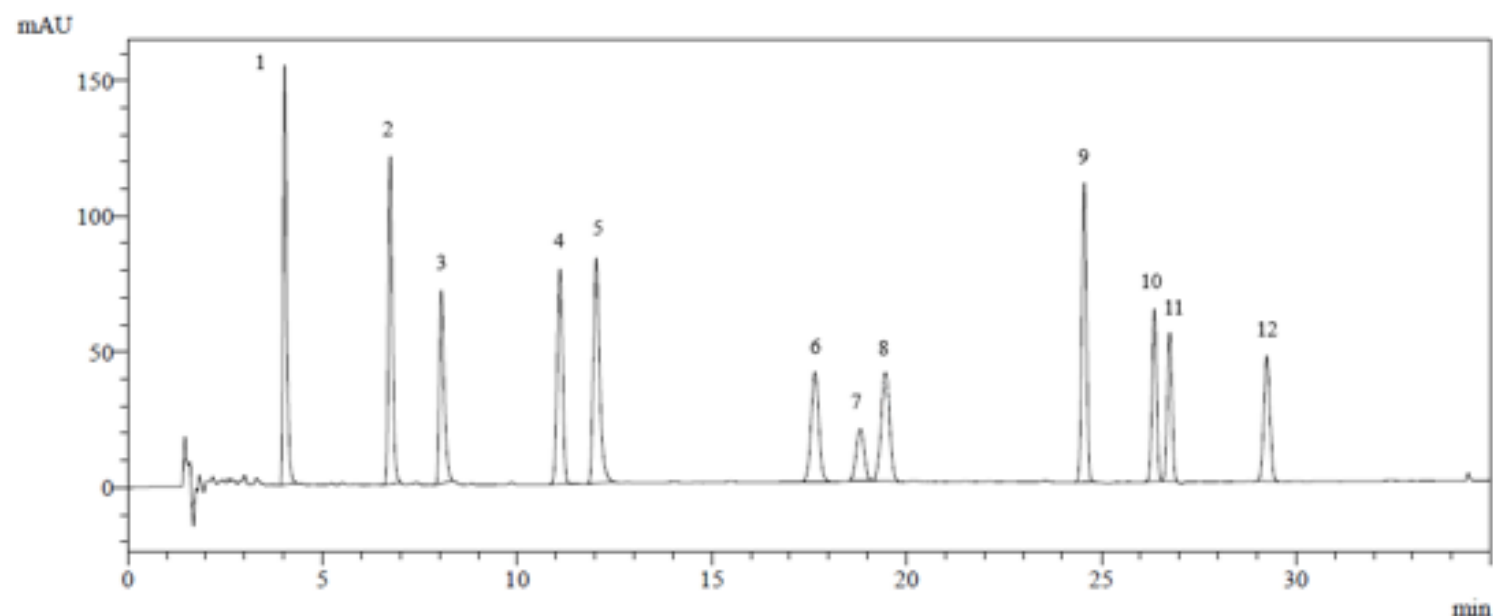


Figura 1: Cromatograma ilustrativo obtido por cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada a detector de arranjos de diodos indicando a distribuição dos sinais analíticos correspondentes aos principais canabinoides passíveis de serem encontrados em *Cannabis sativa* L. 1- ácido canabidivarínico; 2- ácido canabidiólico; 3- ácido canabigerólico; 4- canabidivarina; 5- ácido tetraidrocanabinólico; 6- tetraidrocanabivarina; 7- canabidiol; 8- canabigerol; 9- canabinol; 10- Δ^9 -tetraidrocanabinol; 11- Δ^8 -tetraidrocanabinol; 12- canabicromeno.

Determinação de canabinoides - HPLC-DAD

Desenvolvimento orientado por AQbD

- Entendimento do comportamento cromatográfico dos analitos de interesse
- Obtenção da **performance desejada do método de forma consistente**
- **Facilidade de adaptações futuras**

Validação (RDC 166)

- Método adequado à finalidade pretendida
- Indicativo de estabilidade
- **Obtenção de perfis cromatográficos consistentes**
- **Possibilidade de uso de um único padrão (CBD)**

Possíveis contribuições futuras

- **Determinação de outros canabinoides (minoritários)**
- **Aplicação a outros tipos de amostras**

RESEARCH ARTICLE

DoE-assisted development and validation of a stability-indicating HPLC-DAD method for simultaneous determination of five cannabinoids in *Cannabis sativa* L. based on analytical quality by design (AQbD) concept

Maíra Ribeiro de Souza^{1,2,3}  | Mariana Koetz² | Renata Pereira Limberger¹  |
Amélia Teresinha Henriques² 

¹Laboratório de Análises e Pesquisas em Toxicologia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

²Laboratório de Farmacognosia e Controle da Qualidade de Fitoterápicos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

³Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Brasília, DF, Brazil

Correspondence

Maíra Ribeiro de Souza, Laboratório de Análises e Pesquisas em Toxicologia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre 90610-000, RS, Brazil.
Email: maira.ribeiro@ufrgs.br

Abstract

Introduction: Medical uses of *Cannabis sativa* L. have gained interest in recent decades, which highlights the need for defining appropriate quality specifications for Cannabis-based products. However, the complexity of plant matrices and structural similarity between cannabinoids make analytical development a challenging task. Thus, the application of analytical quality by design (AQbD)-driven approaches can favour the development of fit-for-purpose methods.

Objectives: To develop a high-performance liquid chromatography diode array detector (HPLC-DAD) method for simultaneous quantification of cannabidiol, Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabidiolic acid, tetrahydrocannabinolic acid, and cannabinol in *C. sativa* by applying an AQbD-driven approach.

Materials and Methods: Critical method attributes (CMA) were established following the analytical quality by design (AQbD) approach. The method was developed and validated according to ICH Q10 guidelines.

Agradecimentos

Prof^a. Amélia Teresinha Henriques; Prof^a. Renata Pereira Limberger
Prof^a Lilian Auler Mentz



Contato

Anvisa

SIA Trecho 5 - Área especial 57 - Lote 200 -

CEP: 71205-050 - Brasília - DF

www.gov.br/anvisa

Central de Atendimento: 0800-642-9782



FARMACOPEIA
BRASILEIRA