

CANNABIS,

Sumidades floridas

Definición - Consiste en las sumidades floridas femeninas desecadas, enteras o fragmentadas, obtenidas del pie femenino (o de plantas de semillas feminizadas) de *Cannabis sativa* L. (Cannabaceae), incluyendo sus subespecies, variedades y quimiotipos. Debe contener no menos de 90 por ciento y no más 110 por ciento del contenido declarado de cannabinoides, incluido Δ^9 -tetrahidrocannabinol o Δ^9 -THC (calculado como la suma de Δ^9 -THC y ácido tetrahidrocannabinólico o THCA) y canabidiol (CBD) (calculado como la suma de CBD y ácido cannabidiólico o CBDA) calculado respectivamente a partir del peso seco. El contenido de canabinol (CBN) no debe ser mayor a 2 % del contenido total de Δ^9 -THC.

Sustancias de referencia

Soluciones en metanol, metanol/etanol o acetonitrilo de los siguientes compuestos individuales o en mezcla: Cannabidiol SR-FA, Δ^9 -tetrahidrocannabinol SR-FA, ácido cannabidiólico SR-FA, ácido tetrahidrocannabinólico SR-FA, cannabinol SR-FA, Δ^8 -tetrahidrocannabinol SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos bien cerrados, almacenados en un sitio fresco y seco.

ENSAYOS

Identificación

A - *Características macroscópicas*. Flores pistiladas reunidas en una inflorescencia compacta (cima espiciforme), de aproximadamente 1–5 cm de largo, con brácteas ligeramente sobresalientes. Las inflorescencias pueden incluir hojas superiores completas o trozos reducidos de ellas, tallos, brácteas, bractéolas y pistilo. El tallo es estriado longitudinalmente y posee tricomas cortos y rígidos.

Las hojas superiores, cuando están presentes, varían de verde claro a verde oscuro, o son purpúreas, maculado-purpúreas o castañas, palmaticompuestas, con 3-5 (-7) folíolos subsésiles, angostamente elípticos, con ápice agudo a acuminado, base atenuada y margen aserrado. Las brácteas de la inflorescencia son de color verde a verde claro, simples hasta partidas, lanceoladas, de ápice acuminado y margen entero o aserrado,

estrigosas al tacto por la presencia de tricomas. Las bractéolas cubren el perigonio y el pistilo de cada flor femenina; son ovadas y miden 4–8 mm de largo, se encuentran de a pares en la axila de cada bráctea fusionándose en la base para formar una vaina cónica que envuelve completamente el ovario (salvo al estilo y estigmas exertos); están recubiertas por abundantes tricomas glandulares y tectores y son semejantes en color a las brácteas. Las flores pistiladas se ubican en la axila de cada bractéola sostenidas por un corto pedicelo. El ovario es súpero, con dos carpelos soldados que forman un único lóculo donde se ubica un solo óvulo; estilo corto con 2 ramas estigmáticas largas, filiformes, caducas, papilosas y muy exertas; el estilo y el estigma alcanzan hasta 1 cm de largo y su coloración varía con la madurez, de marrón claro a marrón.

La droga vegetal no debe contener flores estaminadas. Se describen estas flores, a los fines de su reconocimiento en caso que estén presentes. La flor estaminada es péndula, con corto pedicelo; el perigonio consta de 5 tépalos imbricados verde-amarillentos a blanquecinos, ovados a lanceolados, membranosos, raramente con tricomas glandulares; los estambres son cinco, con filamentos flácidos y anteras oblongas con dehiscencia longitudinal; puede haber un pistilo rudimentario y pequeño.

El color debe ser uniforme, desde verde claro brillante a verde oscuro, a veces con tonalidades purpúreas, hasta amarillo-dorado claro a marrón. Las partes de la inflorescencia con una alta densidad de tricomas glandulares y no glandulares tienden a ser blanquecinas, brillantes o cristalinas. El aroma es característico, dulce, aromático, rancio, agrio, frutado y pungente. El sabor es amargo, pungente. No debe mostrar coloración gris o negruzca, que son indicadores de infección por hongos.

B - *Características microscópicas*. En el material disociado se pueden observar varios tipos de tricomas tectores y glandulares. Los tricomas tectores son unicelulares, cónicos, silicificados, y emergen de la parte central de un anillo constituido por 15-20 células epidérmicas cubiertas por una cutícula estriada. Pueden ser tricomas cistolíticos anchos, con una concreción de carbonato de calcio (cistolito) en su parte basal ensanchada y se encuentran en tallos, hojas y brácteas, y tricomas no cistolíticos angostos que cubren primordialmente el envés de hojas, tallos, pecíolos, tépalos (flor estaminada) y en las bractéolas (flor pistilada). Los tricomas glandulares pueden ser: a) capitado-pediculados, con pie pluricelular, pluriseriado y

cabezuela globosa de 8-16 células dispuestas radialmente, rodeadas por una cutícula común; se disponen densamente en pecíolos, brácteas y principalmente en el envés de las bractéolas; son raros en flores estaminadas. Los pedículos pueden ser cortos o largos y a medida que envejecen, es común que la cabezuela resinosa pardo-rojiza se desprenda en una región de abscisión; b) bulbosos pequeños, con pie generalmente 1, 2 ó 4-celular y cabezuela 1, 2 o 4-celular. Se hallan en todas las partes aéreas, con mayor densidad en tallos y bractéolas y menor en brácteas.

En vista superficial, las células epidérmicas del haz de las hojas presentan paredes anticlinales casi rectas y poseen tricomas cistolíticos más abundantes en las nerviaciones y, en ocasiones, tricomas glandulares bulbosos, también dispuestos cerca de las venas. La epidermis del envés presenta células con paredes sinuosas, con cutícula más delgada y brevemente estriada; posee numerosas estomas anomocíticos, anisocíticos (a veces más escasos en la epidermis superior), o raramente microcíticos y tricomas tectores no cistolíticos abundantes, cónicos, curvados, de ápice agudo, generalmente adpresos y antrorsos; los numerosos tricomas glandulares bulbosos están hinchados o colapsados; los tricomas capitado-pediculados son poco frecuentes. Las hojas son dorsiventrales con un mesófilo con parénquima en empalizada unistrato y parénquima esponjoso laxo, 2-4 estratificado, con abundantes drusas de oxalato de calcio; nervio medio con 3-4 estratos de colénquima subepidérmico, haces vasculares colaterales; floema con conductos laticíferos con secreciones amarillentas. Brácteas con estructura semejante a las hojas. Bractéolas con mesófilo indiferenciado.

C - Características del polvo. Puede ser verde claro, opaco a oscuro, parduzco o, a veces, violáceo. Pueden observarse pequeños fragmentos de tallos, hojas superiores, brácteas y bractéolas con tricomas glandulares y no glandulares adheridos o desprendidos y fragmentos de estigmas naranjas a marrón rojizos.

D - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*), recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Emplear una mezcla recientemente preparada de hexano y dietil éter (40: 10).

Solución estándar A - Preparar una solución que contenga 0,5 mg por mL de CBD en metanol. Almacenar en un lugar fresco y oscuro.

Solución estándar B - Preparar una solución que contenga 0,5 mg por mL de THC en metanol. Almacenar en un lugar fresco y oscuro.

Solución muestra - Agitar 1 g de la muestra previamente molida con 10 mL de metanol durante 15 minutos a temperatura ambiente o mediante un baño de ultrasonido. Filtrar.

Revelador - Utilizar una solución del reactivo Fast Blue B (3,3'-dimetoxi dicloruro de bifenil-4-4'-bise-diazonio) 0,5 % p/v recientemente preparada de la siguiente manera: disolver 0,5 g de sal Fast Blue B en 100 mL de agua. Pulverizar con el reactivo seguido de una solución de NaOH 0,1 M para evitar que pierda el color.

Procedimiento - Aplicar por separado en bandas de 5 mm, 5 µL de la *Solución muestra*, 2 µL de la *Solución estándar A* y 2 µL de la *Solución estándar B*. Desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar que el solvente se evapore. A continuación, pulverizar la placa con el *Revelador* y observar a la luz visible. Las bandas correspondientes a CBD, THC y CBN deben separarse entre sí. El cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* puede presentar desde arriba hacia abajo, una banda marrón-anaranjada, otra roja-violácea y otra violácea que se corresponden en posición y color con las bandas correspondientes a CBD, THC, CBN, CBG y CBC. También se observan otras bandas más atenuadas (marrón-anaranjada, y rojo-violácea) correspondientes a CBDA, THCA y otros cannabinoides ácidos. En el esquema siguiente se muestra la secuencia de bandas presentes en el cromatograma obtenido con las soluciones de referencia y la solución muestra. Pueden estar presentes bandas adicionales correspondientes a otros cannabinoides.

Frente del solvente			
CBD	THC	CBD THC	Marrón-Anaranjado Rojo-Violáceo
		CBN	Púrpura
		CBG	Marrón-Anaranjado
		CBC	Violáceo
		Formas Ácidas	Zonas Rojo-violácea Marrón anaranjada
<i>Soluciones estándar</i>		<i>Solución muestra</i>	

Materia orgánica extraña (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

No debe contener más de 2%.

Cenizas Totales (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

No debe contener más de 10 %, determinado sobre la droga en polvo (partículas de aproximadamente 5 mm, tamiz 5600).

Pérdida por secado (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

No debe contener más de 10% p/p.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación de aflatoxinas (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

Debe cumplir con los requisitos.

Límite de metales pesados <590>

Método 1. No debe contener más de 0,001 %.

Residuo de pesticidas (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico – Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector espectrofotométrico UV ajustado a 222 nm y una columna de 150 mm x 4,6 mm con una fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 2,7 µm de tamaño de partícula. La temperatura de la columna debe ser 40 °C. El caudal debe ser de aproximadamente 1,5 mL por minuto.

Solución A - Ácido fórmico al 0,1 %.

Solución B - Ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo.

Fase móvil – Emplear mezclas variables de *Solución A* y *Solución B*. Programar el cromatógrafo del siguiente modo:

Tiempo (min)	<i>Solución A</i> (%)	<i>Solución B</i> (%)	Etapas
0 a 3,5	26	74	Isocrática

3,5 a 6,5	26 →15	74—85	Gradiente lineal
6,5 a 7	15	85	Isocrática
7 a 7,01	15 →26	85 →74	Gradiente lineal
7,01 a 8,5	26	74	Isocrática

Preparación estándar - Preparar una solución que contenga 0,100 mg de Δ -9-tetrahidrocannabinol (Δ 9-THC), 0,100 mg de cannabidiol (CBD), 0,0125 mg de cannabinol (CBN), 0,025 mg de ácido tetrahidrocannabinólico (THCA), 0,025 mg de ácido cannabidiólico (CBDA) y 0,0125 mg de Δ 8-tetrahidrocannabinol (Δ 8-THC) por mL de metanol.

Preparación muestra - Pesar exactamente alrededor de 0,65 g de material molido y sonicar con 20 mL de metanol calidad HPLC durante 15 minutos. Transferir el sobrenadante a un matraz de 50 mL y repetir el procedimiento. Completar a volumen con metanol. Transferir 1,0 mL a un matraz de 10 mL y completar a volumen con metanol. Mezclar para homogeneizar la solución y filtrar.

Aptitud del sistema - Cromatografiar la *Solución estándar* según se indica en *Procedimiento*: el máximo de absorbancia del espectro UV en el vértice del pico para CBDA debe ser 222 ± 2 nm; la resolución *R* entre los picos correspondientes a Δ 9-THC y Δ 8-THC no debe ser menor a 1,0; el factor de asimetría *F* para el pico de Δ 9-THC no debe ser mayor a 2,0.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 5 μ L) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*. Identificar los picos en el cromatograma obtenido con la *Preparación muestra*, empleando los tiempos de retención de los picos correspondientes a cada cannabinoide en el cromatograma obtenido con la *Preparación estándar*. Los tiempos de retención relativos y los factores de conversión respecto al CBD se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 1

Analito	Tiempo de retención relativo	Factor de conversión
---------	------------------------------	----------------------

CBDVA	0,62	0,68
CBDV	0,68	0,94
CBDA	0,85	0,70
CBGA	0,89	0,69
CBG	0,94	0,99
CBD	1,00	1,00
THCV	1,06	1,03
THCVA	1,35	0,68
CBN	1,43	0,52
Δ 9-THC	1,77	1,03
Δ 8-THC	1,82	1,21
CBC	2,04	0,67
THCA	2,17	0,73

Calcular la cantidad en mg por g de cada cannabinoide en la porción de inflorescencia de cannabis analizada, por la fórmula siguiente:

$$(r_M / r_E) \times C_E \times (V/P) \times F$$

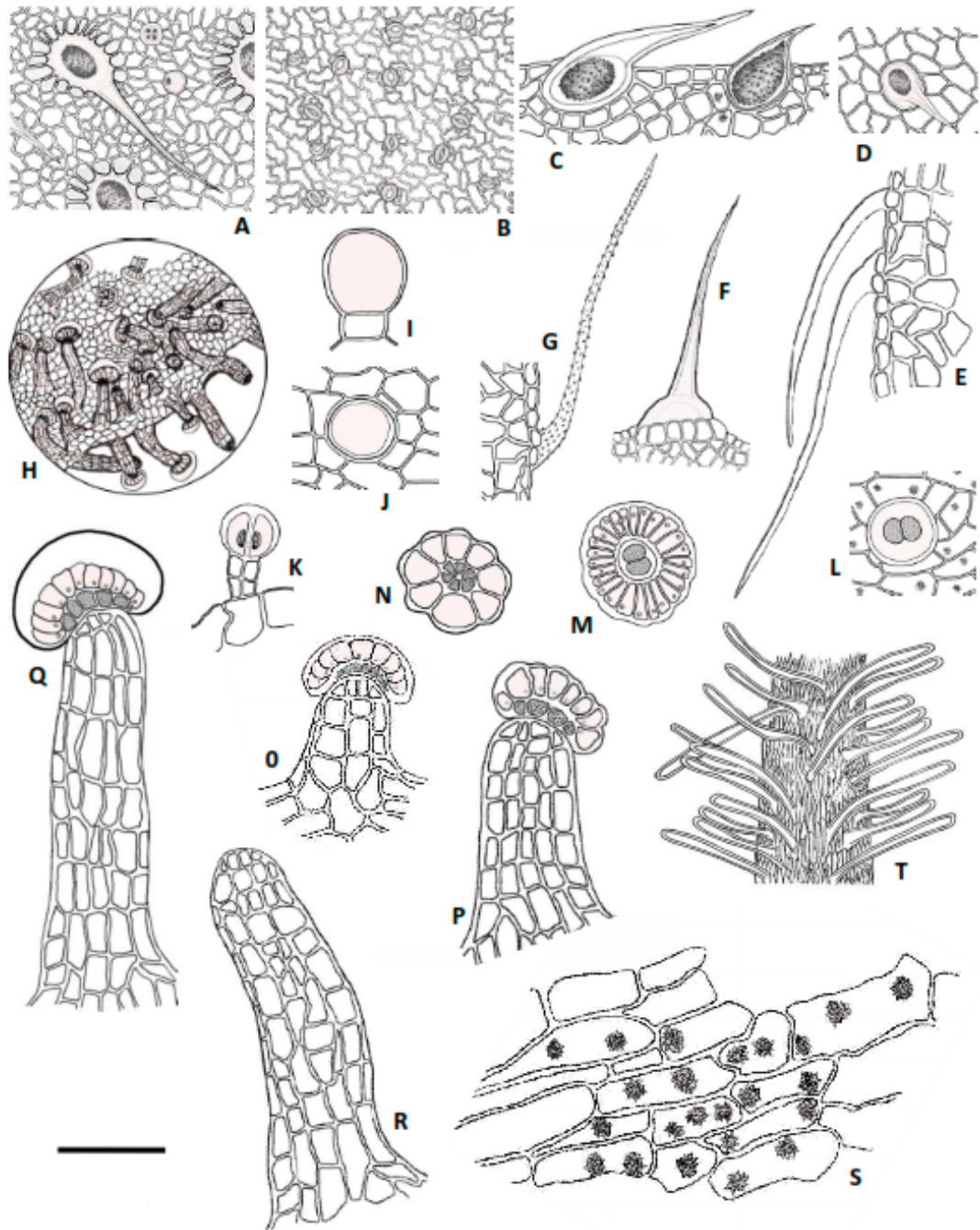
en la cual r_M es la respuesta máxima del cannabinoide de la *Preparación muestra*, r_E es la respuesta máxima de CBD en la *Preparación estándar*, C_E es la concentración en mg por mL de CBD en la *Preparación estándar*, V el el volumen en mL de la *Preparación muestra*, P es el peso en g de la inflorescencia de cannabis empleado para preparar la *Preparación de muestra* y F es el factor de conversión para el analito (*Tabla 1*).

Calcular la cantidad de THC total y CBD total, expresada en mg de cannabinoide por g de material vegetal, por las fórmulas siguientes:

$$\text{THC total} = \text{THCA} \times 0,877 + \Delta 9\text{-THC}$$

$$\text{CBD total} = \text{CBDA} \times 0,877 + \text{CBD}$$

en la cual THCA, Δ 9-THC, CBDA y CBD se expresan en mg por g de material vegetal



A, Epidermis superior con tricomas cistolíticos y bulbosos de cabezuela 1-celular y 4-celular.- B, Epidermis inferior con estomas anisocíticos.- C-D y F, Epidermis superior con tricomas cistolíticos cortos y largos.- E, Detalle de tricomas simples tectores no cistolíticos de paredes lisas.- G, Detalle de tricoma simple, tector no cistolítico con paredes rugosas.- H, Bractéola epidermis externa.- I-L, Tricomas bulbosos con cabezuelas 1-2-4 celular y pedículo 1-4 celular (vista lateral y superior).- M-N, Cabezuelas de tricomas glandulares capitado-pediculados 8-celular y multicelular.- O-Q, tricomas glandulares capitado-pediculados en diversos estadios.- R, pedículo del tricoma glandular sin cabezuela globosa.- S, Detalle de parénquima foliar con drusas.- T, Detalle de ramas estigmáticas.- La escala vale 250 μm para Ay B; 130 μm para C-G; 400 μm para H; 100 μm para I-R; 160 μm para S.