


aoxlab	Procedimiento de determinación de perfil de Cannabinoides. AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-184
		Revisión: 10
		Inicio de vigencia: 2025-04-06




Procedimiento de determinación de perfil de Cannabinoides.

AOXLAB S.A.S.

	Procedimiento de determinación de perfil de Cannabinoides. AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-184
		Revisión: 10
		Inicio de vigencia: 2025-04-06


DOCUMENTO CONTROLADO

PROC-TC-184 Procedimiento de determinación de perfil de Cannabinoides.


	Nombre	Puesto o función	Firma	Fecha
Elaboró:	María Carmen Domínguez	Líder adjunta		2025-04-05
Revisó:	Angela P. Patiño Pérez	Directora de Calidad		2025-04-06
Aprobó:	Jonatan Zárate Álvarez	Director Técnico		2025-04-06
Localización del documento:		Plataforma SGC		

Control de Cambios

Estado	Fecha de inicio de vigencia	Revisión	Descripción del cambio realizado	Realizó	Revisó	Aprobó
Obsoleto	2019/03/08	1	Ninguno (versión original).	MCDG	JCVG	YELP
Obsoleto	2020-06-25	2	Se realizan cambios en el procesamiento de la muestra y se adiciona al procedimiento límite de detección del método para material vegetal y extractos.	MCDG	DPP	YELP
Obsoleto	2020-08-27	3	Se rectifica el método de referencia para el ensayo	MCDG	DPP	YELP
Obsoleto	2020-11-27	4	Se adiciona al procedimiento estándar de aptitud del sistema.	MCDG	DPP	YELP
Obsoleto	2020-12-28	5	Se adiciona procedimiento de preparación de curvas de calibración a partir de estándares individuales de 1000mg/L, requisitos de aptitud y aseguramiento de calidad.	MCDG	DPP	YELP
Obsoleto	2022-12-12	6	Se cambia estilo según manual identidad.	MCDG	APPP	DPP
Obsoleto	2023-05-31	7	Se corrigen las referencias bibliográficas. Se actualiza el	MCDG	APPP	DPP


	Procedimiento de determinación de perfil de Cannabinoides. AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-184
		Revisión: 10
		Inicio de vigencia: 2025-04-06

			esquema de control de calidad analítico			
Obsoleto	2024-02-02	8	Se actualiza el cálculo de total THC, teniendo en cuenta los valores de THCA, d9THC y d8-THC. Se retira un punto del numeral 4.5.3. Se modifica la forma de preparación de algunos puntos de la curva de calibración en los numerales 4.5.1.3 y 4.5.1.4., se añade procedimiento para cosméticos y alimentos	MCDG	APPP	LSGF
Obsoleto	2024-05-16	9	Se mejora redacción de procedimiento. Se unifican procedimientos 1 y 2.	LSGF	APPP	LSGF
Vigente	2025-04-06	10	Se generaliza el volumen de la jeringa a usar, se retira de equipos usados la centrífuga y dispensador. Se añade pipetas aforadas. Se ajustan aspectos del aseguramiento de calidad.	AHM	MCD	JOZA


	Procedimiento de determinación de perfil de Cannabinoides. AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-184
		Revisión: 10
		Inicio de vigencia: 2025-04-06

ÍNDICE

1. OBJETIVO Y ALCANCE.....	6
1.1. Objetivo.....	6
1.2. Alcance.....	6
2. DEFINICIONES Y NOTACIONES.....	7
2.1. Definiciones.....	7
2.2. Notaciones.....	8
3. REFERENCIAS.....	9
4. DESARROLLO.....	10
4.1 Actividades previas.....	10
4.1.1 Inspección de la muestra.....	10
4.1.2 Estabilización.....	10
4.1.3 Verificación de equipos.....	10
4.1.4 Manejo de la muestra.....	11
4.1.5 Medidas de seguridad.....	11
4.2 Patrones y/o equipos de medición.....	12
4.3 Materiales y consumibles.....	12
4.4 Reactivos y/o soluciones.....	13
4.5 Instrucciones de ensayo.....	13
4.5.1 Procedimiento determinación de perfil de cannabinoides en material vegetal, extractos, aislados, cristales, cosméticos y alimentos.....	13
4.6 Resultados.....	19
4.6.1 Cuantificación.....	19
4.6.2 Contenido de CBD.....	19
4.6.3 Cannabinoides diferentes al CBD identificados.....	20
4.6.4 Otros Cannabinoides no identificados.....	20
4.6.5 CBD Total.....	20
4.6.6 THC Total.....	21
4.6.7 Cuantificación de compuestos en extractos y material vegetal.....	21
4.7 Aseguramiento de calidad.....	22
4.7.1 Cuantificación de componentes en material vegetal y extractos.....	22
4.7.2 Cuantificación de componentes en cristales.....	23

	Procedimiento de determinación de perfil de Cannabinoides. AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-184
		Revisión: 10
		Inicio de vigencia: 2025-04-06

5. RESPONSABILIDADES.....	23
6. DOCUMENTOS RELACIONADOS.....	25
7. ANEXOS.....	25

	Procedimiento de determinación de perfil de Cannabinoides. AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-184
		Revisión: 10
		Inicio de vigencia: 2025-04-06

OBJETIVO Y ALCANCE.

1.1. Objetivo.

Describir el procedimiento para realizar el ensayo de perfil de Cannabinoides.

1.2. Alcance.

Prueba o ensayo	Método de referencia	Técnica o Método
Determinación de los Cannabinoides: <ul style="list-style-type: none"> • Tetrahidrocannabivarin (THCV) • Δ8-Tetrahidrocannabinol (d8-THC) • Δ9-Tetrahidrocannabinol (d9-THC) • Δ9-Ácido tetrahidrocannabinolico (THCA) • Cannabidiol (CBD) • Ácido cannabidiolico • Cannabidivarin (CBDV) • Cannabinol (CBN) • Cannabigerol (CBG) • Ácido cannabigerolico (CBGA) • Cannabichromene (CBC) 	AOAC Official Method 2018.10 (2023) Cannabinoids in Cannabis sativa Dried Flowers and Oils 2020 Cannabis Analyzer for Potency, Shimadzu	Cromatografía Líquida De alta resolución (HPLC)


Este método se aplica a las siguientes matrices:

- Material vegetal de cannabis
- Extractos de cannabis
- Cristales de CBD
- Cosméticos
- Preparados magistrales
- Alimentos

El rango de calibración del método es de 0,5-100 mg/L.

Límite de detección:

- Material vegetal: sin dilución 0,05 mg/g o 0,005g/100g y con dilución 1mg/g o 0,1g/100g.
- Extractos: sin dilución 0,125 mg/g o 0,0125g/100g y con dilución 5mg/g o 0,5g/100g.

	Procedimiento de determinación de perfil de Cannabinoides. AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-184
		Revisión: 10
		Inicio de vigencia: 2025-04-06

2. DEFINICIONES Y NOTACIONES.

2.1. Definiciones.

Calibración [1].

Operación que, bajo condiciones especificadas, en un primer paso, establece una relación entre los valores de las magnitudes con su incertidumbre de medición provista por patrones de medición y las indicaciones correspondientes con incertidumbres de medición asociadas y, en segundo paso, usa esta información para establecer una relación para obtener un resultado de medición de una indicación.

Desviación Estándar Relativa (DSR%) [4].

Estimador del grado de dispersión de medidas repetidas. Se calcula como

$$DSR \% = \frac{D.S.}{\bar{x}} \times 100$$

Donde D. S. es la desviación estándar de las réplicas y \bar{x} es el promedio de estas

Error relativo porcentual (E. R. %) [4].

Estimador del sesgo de una medición. Se calcula como

$$b\% = E.R.\% = \frac{\bar{x} - x_{ref}}{x_{ref}} \times 100$$

Donde x_{ref} es el valor teórico o aceptado como verdadero y \bar{x} es el promedio de estas

Ensayo/prueba [2].


Determinación de una o más características de acuerdo con un procedimiento

Procedimiento [2].

Forma especificada para llevar a cabo una actividad o un proceso.

Cannabinoides

Los fitocannabinoides hacen referencia a una clase de compuestos caracterizados por 21 átomos de carbono que aparecen únicamente en la naturaleza en la especie Cannabis sativa L. Se han descubierto alrededor de 70 fitocannabinoides, incluidas sus formas ácidas y neutras, los análogos y otros productos de transformación. La planta sólo es capaz de sintetizar los fitocannabinoides directamente en sus formas ácidas no psicoactivas, y, por lo tanto, los principales fitocannabinoides presentes en el material vegetal fresco son Δ^9 -THCA, CBDA, CBGA y CBCA. Sin embargo, el grupo carboxilo no es

	Procedimiento de determinación de perfil de Cannabinoides. AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-184
		Revisión: 10
		Inicio de vigencia: 2025-04-06

muy estable y se pierde fácilmente en forma de CO₂ bajo la influencia del calor o de la luz, lo que provoca la transformación en las formas neutras activas [3].

Los fitocannabinoides ácidos se descarboxilan parcialmente en el proceso de secado y curado de los cogollos; posteriormente, en el material seco de la planta encontramos principalmente los fitocannabinoides ácidos, y algunas de sus formas activas neutras (Δ^9 -THC, CBD, CBG y CBC). Un largo proceso de secado de la materia vegetal generaría la reducción de los fitocannabinoides ácidos y el aumento de los neutros. Cuando la planta se consume fumada o cocinada, todos los fitocannabinoides ácidos se descarboxilan en sus formas neutras correspondientes debido a la acción del calor [3]

Las pruebas de control de calidad de los cannabinoides son esenciales para el etiquetado preciso de los productos de cannabis en los mercados tanto médico como recreativo. La potencia del cannabis normalmente se reserva para la cuantificación de los principales cannabinoides, principalmente THCA, THC, CBD y CBN.


2.2. Notaciones.

Para propósitos de este documento, se hacen las siguientes consideraciones:

“Laboratorio”: se refiere al laboratorio AOXLAB S.A.S.


“Servicios”: para referir a los servicios de ensayo que el Laboratorio ofrece.

“Ítem”: se refiere a los objetos o materiales bajo ensayo.

	Procedimiento de determinación de perfil de Cannabinoides. AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-184
		Revisión: 10
		Inicio de vigencia: 2025-04-06

3. REFERENCIAS.

- [1] Centro Español de Metrología Vocabulario Internacional de Metrología Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados. 3ª edición en español
- [2] International Organization for Standardization. (2023). Quality management systems - - Fundamentals and vocabulary (ISO Standard No 9000:2015).
- [3] Fundación Canna 2019, ¿Qué son los cannabinoides?, Recuperado de <https://www.fundacion-canna.es/cannabinoides>
- [4] PROC-TC-012 Procedimiento de validación o verificación de método analíticos
- [5] Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL (2023) 22nd Ed., AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, USA, Official Method 2018.10.

	Procedimiento de determinación de perfil de Cannabinoides. AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-184
		Revisión: 10
		Inicio de vigencia: 2025-04-06

4. DESARROLLO.

4.1 Actividades previas.

4.1.1 Inspección de la muestra.

Al recibirse la muestra en el Laboratorio, éste es inspeccionado a fin de asegurar que se garantizan las condiciones conforme lo indicado en el procedimiento PROC-TC-008 "Procedimiento de aseguramiento de integridad de los ítems bajo servicio".

Antes de iniciar el análisis, se debe verificar que la muestra se encuentra empacada y sellada herméticamente, y etiquetada con el sticker de identificación interna del laboratorio. Se debe contar con al menos 5 gramos de muestra para realizar este análisis.

En caso de que la muestra no presente alguna de estas condiciones, informar de inmediato al líder comercial a través del Líder de laboratorio.

4.1.2 Estabilización.


Los ítems de ensayo, patrones y controles de calidad deben atemperarse con suficiente antelación de tal manera que se encuentren en equilibrio térmico con el ambiente en el cual se ejecutarán los ensayos.

La balanza analítica y los equipos electrónicos que realicen mediciones de alguna magnitud correspondiente a condiciones de influencia en la ejecución del ensayo deben ser encendidos antes de realizar las mediciones, a fin de lograr su operación óptima o estabilización térmica. El cromatógrafo líquido de alta resolución debe encenderse y ajustarse a los parámetros de medida, acondicionando el sistema al menos 30 minutos antes de iniciar la corrida cromatográfica.

4.1.3 Verificación de equipos.

Antes de iniciar el ensayo, debe verificarse que el estado de funcionamiento de los equipos sea adecuado. Esto puede llevarse a cabo revisando que cuenten con la etiqueta de mantenimiento vigente y que estos no tengan alguna etiqueta que lo identifique como "Fuera de servicio". Además, en el caso en el cual se lleve el control de uso, deben registrarse los últimos registros consignados en el formato FOR-TC-017, con el propósito de verificar que no se han registrado fallas en el funcionamiento. Si algún equipo es utilizado para la medición de alguna magnitud de influencia en el ensayo, este debe estar calibrado. Por tanto, se debe verificar la etiqueta de calibración adherida a este, y comprobar que se encuentre vigente.

Así mismo, debe verificarse que se haya realizado y registrado la verificación diaria de la balanza analítica en el formato FOR-TC-005.

	Procedimiento de determinación de perfil de Cannabinoides. AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-184
		Revisión: 10
		Inicio de vigencia: 2025-04-06

Además de lo anterior, debe verificarse la fecha de expiración de los patrones, materiales de referencia y controles de calidad empleados en el ensayo con el fin de evitar el uso de materiales vencidos.

4.1.4 Manejo de la muestra.

Para la identificación, manejo, transporte, almacenamiento y descarte de la muestra, se siguen las instrucciones dadas en el procedimiento PROC-TC-008 Procedimiento de aseguramiento de integridad de las muestras bajo servicio.

Al tomar de la porción de análisis, la muestra debe estar a temperatura ambiente y correctamente homogeneizada. Sí es líquida, mezclar hasta homogeneidad aparente mediante agitación magnética, y con la ayuda de un gotero o una pipeta tomar la cantidad necesaria de muestra, mientras se continúa con la agitación.

Sí la muestra es sólida, moler o triturar en su totalidad hasta homogeneidad aparente, y realizar un cuarteo atendiendo los siguientes pasos:


- Colocar la muestra previamente homogeneizada sobre una superficie lisa, limpia y seca, donde no existan corrientes de aire fuertes.
- Limpiar los instrumentos a utilizar (espátula o cuchara).
- Mezclar la muestra echando repetidas veces el material de los bordes hacia el centro.
- Juntar todo el material dándole forma circular con espesor uniforme.
- Dividir el material en cuatro sectores iguales.
- Eliminar los sectores opuestos quedando la masa del material reducida a la mitad.
- Mezclar los dos sectores restantes echando repetidas veces el material de los bordes hacia el centro.

NOTA: Las muestras para análisis de vitaminas se deben trabajar con protección actínica.

4.1.5 Medidas de seguridad.

Se deben seguir las siguientes medidas de seguridad antes y durante la realización del servicio: Verificar que el sticker de calibración y mantenimiento del equipo se encuentre vigente (ubicados en el módulo 1 del laboratorio) y no requiere alguna intervención. Verificar que todos los reactivos preparados en el laboratorio al momento de realizar el ensayo o los que se encontraban almacenados se encuentren identificados conforme al formato FOR-TC-024 "Formato para rotular reactivos elaborados en el laboratorio". En caso de que se encuentre alguna anomalía al respecto, avisar a la Dirección Técnica a través del Líder de Laboratorio.

Durante el análisis tener en cuenta que se debe seguir el procedimiento aquí descrito sin modificar ningún parámetro.

	Procedimiento de determinación de perfil de Cannabinoides. AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-184
		Revisión: 10
		Inicio de vigencia: 2025-04-06

Tener en cuenta las instrucciones dadas en el reglamento interno de trabajo PROC-GC-015 Reglamento Interno AOXLAB S.A.S, capítulo XIII.


4.2 Patrones y/o equipos de medición

Para realizar el ensayo se utilizan los siguientes equipos y componentes clave:

- Balanza analítica con resolución de 0.1 mg
- Vortex
- Cromatógrafo líquido de alta resolución con detector UV, capaz de separar las longitudes de onda de 220 nm
- Columna NexLeaf CBX for potency 2.7um, 150 x 4.6mm
- Purificador de agua
- Ultrasonido
- Transfer pipeta 200uL y 1mL
- Curva estándar a partir de mix 11 componentes de 250mg/L (ver numeral 4.5.1.1)
- Curva de calibración a partir de estándares individuales de 1000mg/L que se describen a continuación (ver numeral 4.5.1.2 y 4.5.1.3):
- Estándar Cannabidivarin (CBDV)
- Estándar ácido cannabidiólico (CBDA)
- Estándar ácido cannabigerólico (CBGA)
- Estándar cannabigerol (CBG)
- Estándar cannabidiol (CBD)
- Estándar Tetrahidrocannabivarin (THCV)
- Estándar Cannabinol (CBN)
- Estándar delta 9 tetrahidrocannabinol (d9-THC)
- Estándar delta 8 tetrahidrocannabinol (d8-THC)
- Estándar cannabichromene (CBC)
- Estándar ácido tetrahidrocannabinólico (THCA)
- Estándar individual de ácido cannabidiólico de 1000 ug/mL (Restek)
- Estándar individual de d8-THC de 1000ug/mL (Restek)
- Estándar mix 3 componentes: CBN, CBD y d9-THC de 1000ug/mL (Restek)
- Bomba de vacío

NOTA: La curva de calibración debe ser preparada según la forma del estándar que se tenga disponible de acuerdo como se indica en los numerales 4.5.1.1, 4.5.1.2 y 4.5.1.3. Las curvas número 2 y 3 son alternativas a la curva número 1. En las 3 curvas se manejan los mismos niveles de calibración.

4.3 Materiales y consumibles

	Procedimiento de determinación de perfil de Cannabinoides. AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-184
		Revisión: 10
		Inicio de vigencia: 2025-04-06

- Matraz volumétrico de 500mL y 1000mL
- Tubos de centrifuga de 50mL
- Tubos eppendorf de 2mL
- Filtros de 0,45um x 47mm de celulosa
- Filtros de 0,22um x 47mm de Nylon
- Microfiltros de jeringa de 0,22um
- Jeringas de 5mL y 3mL
- Viales transparentes de 2mL
- Pipetas volumétricas aforadas de 20 mL y 25 mL

4.4 Reactivos y/o soluciones

- Metanol grado HPLC
- Agua tipo I
- Acetonitrilo grado HPLC
- Ácido fosfórico al 85%
- **Fase Móvil A ácido fosfórico en agua 0,085% (Canal A HPLC)** En un balón volumétrico de 1000mL, agregar 500mL de agua, con ayuda de un transfer pipeta de 1mL, adicionar 1mL de ácido fosfórico 85%, agitar por rotación suave y aforar con agua. Filtrar con membrana de 0,45 um.
- **Fase móvil B ácido fosfórico en acetonitrilo 0,085% (canal B y canal RINSE HPLC)** En un balón volumétrico de 1000mL, agregar 500mL de acetonitrilo, adicionar 1mL de ácido fosfórico 85%, agitar muy bien y aforar con acetonitrilo. Filtrar con membrana de Nylon 0,22um. Transferir una pequeña porción a un frasco schott de 250mL (Canal RINSE) y la mayor cantidad a un frasco schott de 1000mL (canal B).


4.5 Instrucciones de ensayo.

4.5.1 Procedimiento determinación de perfil de cannabinoides en material vegetal, extractos, aislados, cristales, cosméticos y alimentos.

4.5.1.1 Estándar de trabajo

El patrón primario consiste en un mix de 11 cannabinoides a 250mg/L que contiene los compuestos que se listan a continuación:

- Tetrahidrocannabivarin (THCV)
- Δ8-Tetrahidrocannabinol (d8-THC)
- Δ9-Tetrahidrocannabinol (d9-THC)

	Procedimiento de determinación de perfil de Cannabinoides. AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-184
		Revisión: 10
		Inicio de vigencia: 2025-04-06

- Δ9-Ácido tetrahidrocannabinolico (THCA)
- Cannabidiol (CBD)
- Ácido cannabidiolico
- Cannabidivarin (CBDV)
- Cannabinol (CBN)
- Cannabigerol (CBG)
- Ácido cannabigerolico (CBGA)
- Cannabichromene (CBC)


NOTA: Este material de referencia debe ser certificado. El almacenamiento de los estándares se debe hacer según las condiciones establecidas por el proveedor en el empaque de este.

4.5.1.2 Curva de calibración 1 (once cannabinoides)

Tomar estándar madre mix de 11 cannabinoides a 250mg/L y preparar curva de calibración de 0,5mg/L a 100 mg/L, de la siguiente forma:

- **Estándar mix 11 cannabinoides a 100 mg/L:** Con una transfer pipeta de 1mL, transferir 400uL de estándar mix 11 cannabinoides a 250mg/L en un vial HPLC de 1,5mL, adicionar 600uL de metanol grado HPLC y agitar en vortex por 30 segundos.
- **Estándar mix 11 cannabinoides a 50 mg/L:** Con una transfer pipeta de 1mL, transferir 500uL de estándar mix 11 cannabinoides a 100mg/L en un vial HPLC, adicionar 500uL de metanol y agitar en vortex por 30 segundos.
- **Estándar mix 11 cannabinoides a 10.0 mg/L:** Con una transfer pipeta de 200uL, transferir 200uL de estándar mix 11 cannabinoides a 50mg/L en un vial HPLC, con una transfer pipeta de 1mL, adicionar 800uL de metanol y agitar en vortex por 30 segundos.
- **Estándar mix 11 cannabinoides a 5.0 mg/L:** Con una transfer pipeta de 1mL, transferir 500uL de estándar mix 11 cannabinoides a 10.0mg/L en un vial HPLC, adicionar 500uL de metanol y agitar en vortex por 30 segundos.
- **Estándar mix 11 cannabinoides a 1.0 mg/L:** Con una transfer pipeta de 200uL, transferir 200uL de estándar mix 11 cannabinoides a 5.0mg/L en un vial HPLC, adicionar 800uL de metanol y agitar en vortex por 30 segundos.
- **Estándar mix 11 cannabinoides a 0.5 mg/L:** Con una transfer pipeta de 1mL, transferir 500uL de estándar mix 11 cannabinoides a 1.0mg/L en un vial HPLC, adicionar 500uL de metanol y agitar en vortex por 30 segundos.

4.5.1.3 Curva de calibración 2 (cinco cannabinoides)

	Procedimiento de determinación de perfil de Cannabinoides. AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-184
		Revisión: 10
		Inicio de vigencia: 2025-04-06


Tomar estándar madre individual de los siguientes cannabinoides: ácido cannabínolico (CBDA), cannabidiol (CBD), ácido tetrahidrocannabinol (THCA), d9- Tetrahidrocannabinol (d9-THC) y Cannabinol (CBN) a concentraciones de 1000mg/L y preparar mix curva de calibración de 0,5mg/L a 100 mg/L de la siguiente forma:

- **Estándar mix 5 cannabinoides a 100mg/L:** Con una transfer pipeta de 200uL, transferir 100uL de cada estándar individual de cannabinoides de 1000mg/L (para un total de 500uL de adición) a un vial ámbar HPLC de 1,5 mL, adicionar 500uL de metanol HPLC y agitar con vortex por 30 segundos.
- **Estándar mix 5 cannabinoides a 50mg/L:** Con una transfer pipeta de 1000uL, transferir 500uL de la solución anterior "**Estándar mix 5 cannabinoides a 100mg/L**" en un vial ámbar HPLC de 1,5 mL, adicionar 500uL de metanol HPLC y agitar con vortex por 30 segundos.
- **Estándar mix 5 cannabinoides a 10mg/L:** Con una transfer pipeta de 200 uL, transferir 200 uL de la solución anterior "**Estándar mix 5 cannabinoides a 50mg/L**" en un vial ámbar HPLC de 1,5 mL, adicionar 800uL de metanol HPLC y agitar con vortex por 30 segundos.
- **Estándar mix 5 cannabinoides a 5mg/L:** Con una transfer pipeta de 1000uL, transferir 500uL del **estándar mix 5 cannabinoides a 10mg/L** a un vial ámbar HPLC de 1,5 mL, adicionar 500uL de metanol HPLC y agitar con vortex por 30 segundos.
- **Estándar mix 5 cannabinoides a 1mg/L:** Con una transfer pipeta de 200uL, transferir 200uL del **estándar mix 5 cannabinoides a 5mg/L** a un vial ámbar HPLC de 1,5 mL, adicionar 800uL de metanol HPLC y agitar con vortex por 30 segundos.
- **Estándar mix 5 cannabinoides a 0.5mg/L:** Con una transfer pipeta de 1000uL, transferir 500uL del **estándar mix 5 cannabinoides a 1mg/L** a un vial ámbar HPLC de 1,5 mL, adicionar 500uL de metanol HPLC y agitar con vortex por 30 segundos.

4.5.1.4 Curva de calibración 3 (seis cannabinoides)

Tomar estándar madre individual de los siguientes cannabinoides: Cannabidivarin (CBDV), ácido cannabigerólico (CBGA), cannabigerol (CBG), tetrahidrocannabivarin (THCV), d8- tetrahidrocannabinol (d8-THC) y Cannabichromene (CBC) a concentraciones de 1000mg/L y preparar mix curva de calibración de 0,5mg/L a 100 mg/L de la siguiente forma:

- **Estándar mix 6 cannabinoides a 100mg/L:** Con una transfer pipeta de 200uL, transferir 100uL de cada estándar individual de cannabinoides de 1000mg/L (para un total de 600uL de adición) a un vial ámbar HPLC de 1,5 mL, adicionar 400uL de metanol HPLC y agitar con vortex por 30 segundos.

	Procedimiento de determinación de perfil de Cannabinoides. AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-184
		Revisión: 10
		Inicio de vigencia: 2025-04-06

- **Estándar mix 6 cannabinoides a 50mg/L:** Con una transfer pipeta de 1000uL, transferir 500uL de la solución anterior “**Estándar mix 6 cannabinoides a 100mg/L**” a un vial ámbar HPLC de 1,5 mL, adicionar 500uL de metanol HPLC y agitar con vortex por 30 segundos.
- **Estándar mix 6 cannabinoides a 10mg/L:** Con una transfer pipeta de 200 uL, transferir 200 uL de la solución anterior “**Estándar mix 6 cannabinoides a 50mg/L**” en un vial ámbar HPLC de 1,5 mL, adicionar 800uL de metanol HPLC y agitar con vortex por 30 segundos.
- **Estándar mix 6 cannabinoides a 5mg/L:** Con una transfer pipeta de 1000uL, transferir 500uL del **estándar mix 5 cannabinoides a 10mg/L** a un vial ámbar HPLC de 1,5 mL, adicionar 500uL de metanol HPLC y agitar con vortex por 30 segundos.
- **Estándar mix 6 cannabinoides a 1mg/L:** Con una transfer pipeta de 200uL, transferir 200uL del **estándar mix 5 cannabinoides a 5mg/L** a un vial ámbar HPLC de 1,5 mL, adicionar 800uL de metanol HPLC y agitar con vortex por 30 segundos.
- **Estándar mix 6 cannabinoides a 0.5mg/L:** Con una transfer pipeta de 1000uL, transferir 500uL del **estándar mix 5 cannabinoides a 1mg/L** a un vial ámbar HPLC de 1,5 mL, adicionar 500uL de metanol HPLC y agitar con vortex por 30 segundos.

Inyectar 5uL de cada estándar en el cromatógrafo HPLC. Utilizar el software “Cannabis Analyzer for Potency” para realizar la calibración del equipo y posterior cuantificación de las muestras.

La calibración es realizada por el software empleando las áreas de los compuestos y graficándolas contra su concentración teórica La función de calibración para cada compuesto y debe ser lineal.


Como criterio de aceptación, el coeficiente de determinación (R^2) debe ser mayor o igual a 0.995. Además, al interpolar las áreas obtenidas para cada nivel de concentración en la respectiva función de calibración para cada compuesto, estos no deben diferir de su valor teórico en más de un 5%.

En caso de no cumplirse estos requisitos, debe repetirse la calibración.

- **Estándar aptitud del sistema:** En cada lote de muestras se debe inyectar por triplicado el estándar de 10mg/L en el cual la %RSD para las 3 inyecciones debe ser máximo de 2%.

4.5.1.5 Preparación de la muestra material vegetal

- De la muestra previamente homogenizada, pesar en una balanza analítica 200mg en un tubo falcon de 50mL.
- Con ayuda de un dispensador automático o pipeta volumétrica de 20mL, adicionar 20mL de metanol y agitar en vortex por 30 segundos.

	Procedimiento de determinación de perfil de Cannabinoides. AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-184
		Revisión: 10
		Inicio de vigencia: 2025-04-06

- Utilizando ultrasonido, sonicar por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Homogenizar nuevamente usando vortex por 30 segundos.
- Muestra diluida: preparar una dilución usando una transfer pipeta de 200uL, para transferir 50uL de la mezcla de la muestra a un tubo eppendorf y adicionar 950uL de metanol grado HPLC, usando un transfer pipeta de 1mL. Homogenizar usando vortex por 30 segundos (factor de dilución 20). Tomar una porción de la dilución, adaptar a una jeringa un microfiltro de 0,22um y filtrar a vial transparente de 2mL.
- Muestra concentrada: tomar una porción de la mezcla de la muestra, adaptar a una jeringa un microfiltro de 0,22um y filtrar a vial transparente de 2mL.


4.5.1.6 Preparación de la muestra extractos

- Homogenización: Para muestras de extractos muy viscosos y sólidos calentar la muestra en baño maría a 60°C por 30 minutos, dejar reposar y pesar.
- Si así se requiere, de la muestra previamente homogenizada pesar en una balanza analítica 100mg en un tubo falcon de 50mL.
- Usando un dispensador automático o pipeta volumétrica de 25mL, adicionar 25mL de metanol y agitar en vortex por 30 segundos o hasta completa homogenización.
- Muestra diluida: preparar una dilución usando una transfer pipeta de 200uL, para transferir 25uL de la mezcla de la muestra a un tubo eppendorf y adicionar 975uL de metanol grado HPLC, usando un transfer pipeta de 1mL. Homogenizar en vortex por 30 segundos (Factor de dilución: 40). Tomar una porción de la dilución, adaptar a una jeringa un microfiltro de 0,22um y filtrar a vial transparente de 2mL.
- Muestra concentrada: tomar una porción de la mezcla de la muestra, adaptar a una jeringa un microfiltro de 0,22um y filtrar a vial transparente de 2mL.

4.5.1.7 Preparación de muestras de aislado o cristales de CBD

- Triturar una porción de la muestra y homogenizar, pesar 100 mg de Cristales de CBD y llevar a un balón a forado de 25mL.
- Muestra concentrada: adicionar la diluyente fase B hasta $\frac{3}{4}$ partes del volumen y someter a ultrasonido por 5 minutos a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo, llevar a volumen con el mismo diluyente y homogenizar. Filtrar por membrana de nylon de 0,22 μ m y transferir a un vial de 2mL.
- Muestra diluida: tomar un volumen de 100uL de la muestra concentrada y transferir a un balón aforado de 5mL, completar volumen con el diluyente fase B.

4.5.1.8 Preparación de muestras cosméticos

	Procedimiento de determinación de perfil de Cannabinoides. AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-184
		Revisión: 10
		Inicio de vigencia: 2025-04-06

- De la muestra previamente homogenizada, pesar 500 mg en un tubo falcon de 50mL.
- Con ayuda de un dispensador automático o pipeta volumétrica de 20mL, adicionar 20mL de metanol y agitar en vortex por 30 segundos.
- Utilizando ultrasonido, sonicar por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Homogenizar nuevamente usando vortex por 30 segundos.
- Muestra diluida: preparar una dilución usando una transfer pipeta de 200uL, para transferir 50uL de la mezcla de la muestra a un tubo eppendorf y adicionar 950uL de metanol grado HPLC, usando un transfer pipeta de 1mL. Homogenizar usando vortex por 30 segundos (factor de dilución 20). Tomar una porción de la dilución, adaptar a una jeringa un microfiltro de 0,22um y filtrar a vial transparente de 2mL.
- Muestra concentrada: tomar una porción de la mezcla de la muestra, adaptar a una jeringa un microfiltro de 0,22um y filtrar a vial transparente de 2mL.

4.5.1.9 Preparación de muestras alimentos

- De la muestra previamente homogenizada, pesar aproximadamente 1 g en un tubo falcon de 50mL.
- Con ayuda de un dispensador automático o pipeta volumétrica de 20mL, adicionar 20mL de metanol y agitar en vortex por 30 segundos.
- Utilizando ultrasonido, sonicar por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Homogenizar nuevamente usando vortex por 30 segundos.
- Muestra diluida: preparar una dilución usando una transfer pipeta de 200uL, para transferir 50uL de la mezcla de la muestra a un tubo eppendorf y adicionar 950uL de metanol grado HPLC, usando un transfer pipeta de 1mL. Homogenizar usando vortex por 30 segundos (factor de dilución 20). Tomar una porción de la dilución, adaptar a una jeringa un microfiltro de 0,22um y filtrar a vial transparente de 2mL.
- Muestra concentrada: tomar una porción de la mezcla de la muestra, adaptar a una jeringa un microfiltro de 0,22um y filtrar a vial transparente de 2mL.

4.5.1.10 Proceso de lectura


- Inyectar 5uL de las muestras preparadas en el cromatógrafo, para cuantificar los cannabinoides.
- Cuantificar los compuestos utilizando el software el "Cannabis Analyzer for Potency"

Condiciones Cromatográficas

Método: High SensitivityPDA

Modo: HPLC

Detector: UV 220 nm

	Procedimiento de determinación de perfil de Cannabinoides. AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-184
		Revisión: 10
		Inicio de vigencia: 2025-04-06

Columna: Nexleaf CBX for potency 2.7um, 150 x 4.6mm

Fase móvil A: ácido fosfórico en agua 0,085% (Canal A HPLC)

Fase móvil B: ácido fosfórico en acetonitrilo 0,085% (canal B y canal RINSE HPLC)

Flujo: 1,6 mL/min

Gradiente:

Tiempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
3:00	30	70
7:00	15	85
7:01	5	95
8:00	5	95
8:01	30	70
10:00	-	stop

Temperatura columna: 35 °C

Volumen de inyección: 5 uL

4.6 Resultados

Los datos de peso, volumen de extracción, diluciones, lotes de reactivos y soluciones preparadas son registrados en el formato FOR-TC- 149 "Formato para el registro de datos primarios para el ensayo de Perfil de cannabinoides"

Los resultados se calculan de la siguiente manera:

4.6.1 Cuantificación


El software Lab Solutions calcula la muestra en concentraciones de g/100g al ingresar el peso (mg), volumen de extracción (mL) y factor de dilución. Los resultados obtenidos son ingresados en el cuadro de mando SOFT-TC-046 "Cuadro de mando para el ensayo de perfil de cannabinoides", en la ruta L:\LABORATORIO\REGISTROS\REGISTROS RT\Cuadros de Mando.

4.6.2 Contenido de CBD

Para calcular el porcentaje de CBD presente en la muestra se realiza con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ CBD (B. H.)} = \frac{Cstd}{Astd} \times \frac{Amta \times 25 \text{ mL}}{Wmta} \times \frac{5000 \text{ uL}}{100 \text{ uL}} \times \frac{1 \text{ mg}}{1000 \text{ ug}} \times 100\%$$

Donde:

	Procedimiento de determinación de perfil de Cannabinoides. AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-184
		Revisión: 10
		Inicio de vigencia: 2025-04-06

Amta: Área promedio de la solución muestra (d50)

Astd: Área promedio del estándar para cuantificar CBD. Ecuación línea recta $Y=mx+b$ luego de obtener R^2 aproximadamente 1.

Cstd: Concentración de la solución estándar ($\mu\text{g/mL}$)

Ecuación línea recta $Y=mx+b$ luego de obtener R^2 aproximadamente 1.

Wmta= Peso utilizado de la muestra (mg)

4.6.3 Cannabinoides diferentes al CBD identificados

Para calcular el porcentaje de $\Delta 9$ – THC, $\Delta 8$ – THC CBN y CBDA presente en la muestra se realiza con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Analito}(B. H.) = \frac{Cstd}{Astd} \times \frac{Amta \times 25 \text{ mL}}{Wmta} \times \frac{1 \text{ mg}}{1000 \text{ ug}} \times 100\%$$

Donde:

Amt: Área promedio de la solución muestra d1 para cada analito identificado

Astd: Área promedio de cada analito en la solución estándar de otros cannabinoides

Cstd: Concentración de la solución estándar correspondiente a cada analito($\mu\text{g/mL}$)
Ecuación línea recta $Y=mx+b$ luego de obtener R^2 aproximadamente 1.

Wmta= Peso utilizado de la muestra (mg)

Para realizar el cálculo en base seca (B.S) se realiza corrección teniendo en cuenta la humedad de la muestra.

4.6.4 Otros Cannabinoides no identificados

Para calcular el porcentaje de cualquier otro cannabinoide no identificado con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ otro cannabinoide}(B. H.) = \frac{ri}{rs} \times 100\%$$


Donde:

ri: Respuesta de cualquier pico individual en la solución muestra (d1)

rs: Suma de todas las respuestas presentes en la solución muestra (d1)

Para realizar el cálculo en base seca (B.S) se realiza corrección teniendo en cuenta la humedad de la muestra.

4.6.5 CBD Total

	Procedimiento de determinación de perfil de Cannabinoides. AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-184
		Revisión: 10
		Inicio de vigencia: 2025-04-06

Para calcular CBD total se utiliza la siguiente ecuación:

$$Total\ CBD = [CBDA \times 0.877] + [CBD]$$

El resultado corresponde a la totalidad de CBD en la muestra teniendo en cuenta CBDA y CBD. El factor de 0,877 sale de la relación entre el peso molecular de CBD/CBDA.

4.6.6 THC Total

Para calcular THC total se utiliza la siguiente ecuación:

$$Total\ THC = [THCA \times 0.877] + [d9 - THC] + [d8 - THC]$$

El THC total en la muestra se tiene en cuenta el contenido de THCA, d9-THC y d8-THC en la muestra.

El resultado corresponde a la totalidad de THC en la muestra teniendo en cuenta THC y THCA. El factor de 0,877 sale de la relación entre el peso molecular de 9-THC/THCA.:

NOTA: Este reporte se debe calcular de manera manual desde el cuadro de mando SOFT-TC-046 cuadro de mando para el ensayo de perfil de cannabinoides, ya que el software LabSolution del equipo HPLC entrega el cálculo de total THC sólo teniendo en cuenta el valor de THCA y d9-THC.

4.6.7 Cuantificación de compuestos en extractos y material vegetal

Realizar la calibración del sistema cromatográfico, empleando los estándares y siguiendo el procedimiento descrito en [4.5.1.2]. Se analizan por duplicado las muestras preparadas descritas en el punto [4.5.1.5] y [4.5.1.6]


El software Lab Solutions calcula la concentración de la muestra en mg/mg, con base en los datos de peso de la muestra(mg), volumen de extracción (mL) y factor de dilución. El reporte de resultados se genera a través del software por medio de las plantillas establecidas en la ruta: DOCUMENTOS/HPLC/HPLC0207/REPORTES/REPORTES CANNABIS.

El resultado tanto para material vegetal y extractos debe ser reportado en mg/g de la siguiente forma:

$$Concentración\ muestra \left(\frac{mg}{mg} \right) * 100 * potencia\ estándar$$

Conversión de unidades

$$concentración\ estándar \left(\frac{mg}{L} \right) * \frac{Vol\ muestra\ (L)}{W\ muestra\ (mg)} * F.D = \frac{mg}{mg}$$

	Procedimiento de determinación de perfil de Cannabinoides. AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-184
		Revisión: 10
		Inicio de vigencia: 2025-04-06

Corrección por humedad:

Se hace automática en el cuadro de mando SOFT-TC-046 "Cuadro de mando para el ensayo de perfil de cannabinoides" de la siguiente forma:

$$\text{Resultado en base seca mg/g o g/100g} = \left(\text{Resultado} \frac{\text{mg}}{\text{g}} \text{ o } \frac{\text{g}}{100\text{g}} \text{ base húmeda} \right) * \frac{100\text{g}}{100\text{g} - \% \text{humedad}}$$

NOTA: En la concentración de la muestra (arrojada por el software) ya está incluido el peso (mg), volumen de extracción (mL), factor de dilución (dilution factor) y Dil. factor.

Vol muestra (L): en el software Labsolutions se debe consignar este volumen en mL en la casilla del batch (Extraction vol.), pero la conversión a L (litros) se da cuando en la casilla del batch (Dil factor) se consigan el valor de este parámetro dividido 1000.

Valor Dil factor para material vegetal

$$\text{Dil. factor} = \frac{\text{Extraction vol} * F.D \text{ (dilution factor)}}{1000} = \frac{20 * 20}{1000} = 0,4$$

Valor Dil factor para extractos


$$\text{Dil. factor} = \frac{\text{Extraction vol} * F.D \text{ (dilution factor)}}{1000} = \frac{25 * 40}{1000} = 1$$

4.7 Aseguramiento de calidad

- Realizar la preparación de la muestra a analizar por duplicado por matriz.
- Además de los controles de calidad detallados en los numerales siguientes, debe ensayarse semanalmente un material de referencia. Los resultados obtenidos, deben caer dentro del intervalo aceptable establecido para dicho material, en el respectivo certificado. Así mismo, debe participarse una vez al año en ensayos de aptitud y obtenerse resultados satisfactorios, de acuerdo con el criterio de evaluación establecido por el proveedor.

4.7.1 Cuantificación de componentes en material vegetal y extractos

Por cada lote de análisis, debe ensayarse un estándar de aptitud del sistema por triplicado. La desviación relativa entre estos dos resultados no debe superar el 5% y el porcentaje de recuperación debe estar entre 90% y 110%.

	Procedimiento de determinación de perfil de Cannabinoides. AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-184
		Revisión: 10
		Inicio de vigencia: 2025-04-06

Además, debe analizarse un blanco de método. El resultado de cada uno de estos blanco no debe ser superior a 0.25 mg/L para cada uno de los compuestos objeto de este ensayo.

La precisión entre resultados de, duplicados deben ser menor al 10% para valores superiores al 0.1%. Así mismo, los resultados de ensayos sobre material de referencia certificado deben encontrarse dentro de los límites de aceptación establecidos por el fabricante. Estos datos son registrados en el cuadro de mando SOFT-TC-046 Cuadro de mando para el ensayo de perfil de cannabinoides, el cual grafica las correspondientes cartas control, las cuales deben ser analizadas, de acuerdo con PROC -TC – 077(Procedimiento de Elaboración de gráficos de control).

Las calificaciones del desempeño obtenidas en participaciones en ensayos de aptitud deben ser satisfactorias.

4.7.2 Cuantificación de componentes en cristales

Por cada lote de análisis, debe analizarse un duplicado de muestra. Los resultados en % B. H. obtenidos no deben tener una %RSD superior al 10% para CBD y demás cannabinoides.

Los criterios de aceptación para los resultados de estándares, duplicados, material de referencia y participaciones en ensayos de aptitud son detallados en el numeral 4.7.1


5. RESPONSABILIDADES.

Director técnico.

- Asegurar la aplicación del presente documento y tomar decisiones en casos especiales no contemplados.
- Revisar y aprobar los informes técnicos una vez han sido revisados por el Líder de Laboratorio.
- Asesorar y orientar los analistas en la resolución de dudas e inconvenientes surgidos durante el desarrollo de los ensayos.
- Realizar o revisar las investigaciones pertinentes a los trabajos no conformes derivados de la ejecución del método y autorizar las indicaciones a seguir.
- Establecer los casos en los cuales se realiza la retención de muestras.

Director de Calidad.

- Asegurar la aplicación del presente documento y tomar decisiones en casos especiales no contemplados.
- Realizar y registrar las investigaciones pertinentes a los trabajos no conformes derivados de la ejecución del método.

	Procedimiento de determinación de perfil de Cannabinoides. AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-184
		Revisión: 10
		Inicio de vigencia: 2025-04-06


- Revisar los resultados obtenidos del aseguramiento de calidad del método.
- Archivar los registros técnicos relacionados con los ensayos.

Líder de Laboratorio.

- Asegurar la aplicación del presente documento por el personal subordinado o supervisado.
- Revisar los resultados ingresados por el analista, haciendo seguimiento de la trazabilidad del análisis (Cuadros de mando, formato de solicitud de servicio y salvaguardia de muestras, formatos de datos primarios) antes de enviar el informe final al director técnico.
- Realizar la revisión de resultados teniendo en cuenta la normativa vigente si esta aplica.
- Informar al director técnico las desviaciones que se den durante el desarrollo del método.
- Reportar y registrar los trabajos no conformes derivados del análisis al líder de calidad y al director técnico.
- Informar los casos en los que se deben de retener las muestras.
- Supervisar el cumplimiento de las actividades de aseguramiento de calidad.

Analista.

- Seguir todas las instrucciones establecidas en este procedimiento y en el reglamento del laboratorio
- Ingresar y entregar todos los resultados en los tiempos pactados.
- Entregar formatos de datos primarios completamente diligenciados al líder del laboratorio.
- Realizar revisión de datos primarios y cálculos realizados en los cuadros de mandos, informar al líder del laboratorio en caso de observar alguna desviación en los resultados obtenidos teniendo en cuenta las cartas control.
- Registrar los resultados de los ensayos de control de calidad y hacer el análisis de tendencias de estos.
- Realizar la revisión de resultados teniendo en cuenta la normativa vigente si esta aplica.
- Informar al líder de laboratorio las desviaciones que se den durante el desarrollo del método.

	Procedimiento de determinación de perfil de Cannabinoides. AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-184
		Revisión: 10
		Inicio de vigencia: 2025-04-06

- Reportar y registrar los trabajos no conformes derivados del análisis al líder del laboratorio.
- Informar cualquier incidente que suceda durante la realización del método.
- Revisar que los equipos usados en el desarrollo del método tengan mantenimiento, calibración y/o verificación vigente, de acuerdo con el programa de mantenimiento y calibración.

6. DOCUMENTOS RELACIONADOS

SOFT-TC-046 "Cuadro de mando para el ensayo de perfil de cannabinoides"

FOR-TC- 149 "Formato para el registro de datos primarios para el ensayo de Perfil de cannabinoides"

7. ANEXOS

No aplica