

Análisis de la lista canadiense de pesticidas de cannabis utilizando Técnicas de ESI y APCI

Robert Di Lorenzo¹, Diana Tran², Craig Butt², Paul Winkler², Scott Krepich³, Christopher Borton²
¹SCIEX, Canada; ²SCIEX, USA; ³Phenomenex, USA

La legalización federal del cannabis de uso adulto en Canadá confirma la necesidad de métodos robustos y reproducibles para el análisis del cannabis y productos derivados para la salud y la seguridad de los consumidores. Se ha demostrado la existencia de límites máximos de residuos (LMR) en los Estados Unidos, incluidos los impuestos por Oregon¹ y California². Estos estados monitorean 59 y 65 plaguicidas, respectivamente, a niveles de hasta 100 ppb en el producto. Los plaguicidas representan una amplia gama de clases y propiedades químicas.

En los Estados Unidos, los reglamentos sobre plaguicidas en los productos de cannabis se rigen por la legislación de cada estado, mientras que Health Canada regula a nivel federal. Health Canada ha propuesto actualmente regulaciones para 96 pesticidas, con niveles de tolerancia entre 10 y 500 veces más bajos que los regulados por California o Oregon, con muchos análisis regulados a 10 ppb en el producto. Solo Health Canada ha asignado MRLs individuales para la flor de cannabis seca, el aceite de cannabis, la flor y plantas frescas de Cannabis. Los productos alternativos de Cannabis, como los comestibles y los productos tópicos, todavía no han sido regulados. Aunque se han establecido pruebas para estos 96 pesticidas en las tres matrices, hasta marzo de 2019³. Health Canada sólo había definido el 64% de los MRLs. La legalización federal implica la unificación de las regulaciones en todo el país, sin embargo, estas listas incompletas requieren flexibilidad, rendimiento y



solidez del método a medida que las regulaciones continúan evolucionando.

Al igual que con las listas de California y Oregon, GC-MS ha analizado históricamente varios pesticidas de la lista canadiense; que requiere una preparación de muestra complicada, como la derivatización y de ejecución de muestra largos. Los compuestos en la lista de Health Canada, como los endosulfanos y el pentacloronitrobenzeno (quintoceno) no tienen grupos funcionales tradicionalmente ionizables por ionización por electroaspersión (ESI). La sensibilidad proporcionada por ESI se puede utilizar para alcanzar los límites estrictos de Health Canada para la mayoría de los pesticidas obligatorios, mientras que la ionización química a presión atmosférica (APCI) se puede utilizar para analizar aquellos compuestos que no son ionizables por ESI, o muestran una mejor sensibilidad por este mecanismo. APCI tiene las ventajas de ser más robusto frente a los efectos de matriz en comparación con ESI y particularmente en modo negativo, suele ser más selectivo. Esto conduce a un método de cannabis más robusto, clave para una muestra con el mayor potencial de variabilidad, supresión de iones e interferencia isobárica.

Ventajas clave del método ESI / APCI

- Aprovechando la sensibilidad de ESI y la flexibilidad de APCI para cumplir con los exigentes criterios de LOQ e ionizar compuestos tradicionalmente analizados por GC-MS.
- La desolvatación eficiente en la fuente IonDrive™ Turbo V permite una mejor ionización de analitos sensibles a la temperatura.
- La extracción con solvente y la dilución de muestras agilizan el flujo de trabajo, maximizan la eficiencia de extracción y minimizan los costos.

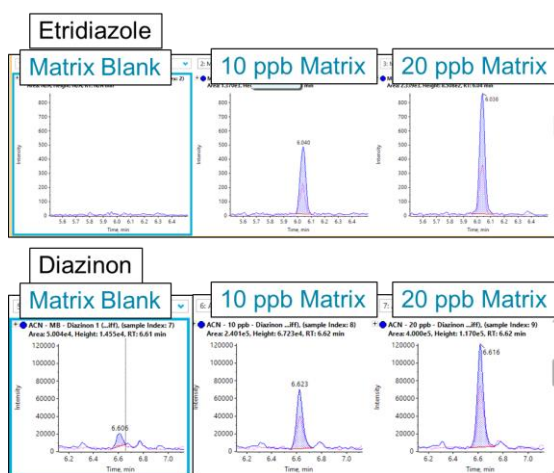


Figura 1. Datos de pico de matriz representativos para dos compuestos analizados tradicionalmente por cromatografía de gases. (Superior) Etridiazole y (inferior) Diazinon están regulados hasta 10 ppb en matrices de cannabis y pueden analizarse a estos niveles utilizando un sistema SCIEX QTRAP® 6500+ utilizando técnicas APCI y ESI, respectivamente.

Experimental

Preparación de la muestra: Se compraron mezclas de estándares analíticos de SPEX CertiPrep (Metuchen, NJ, EE. UU.) Y se adquirieron estándares individuales para la optimización de AccuStandard (New Haven, CT, EE. UU.). Las muestras de flores de cannabis secas se extrajeron en acetonitrilo de acuerdo con el siguiente protocolo.

1. Se pesó 1 gramo de flor seca homogeneizada en un tubo de centrifuga de plástico de 15 ml y se añadieron 5 mL de acetonitrilo.
2. La muestra se sometió a vórtice durante 30 segundos.
3. La muestra se sonicó durante 15 minutos.
4. El extracto de acetonitrilo se decantó para separar el vial
5. Los pasos 1 a 3 se repitieron en la misma muestra y los extractos se combinaron para producir una relación de extracto final de 1 gramo de flor homogeneizada a 10 mL de acetonitrilo.
6. Los extractos se prepararon para acondicionarse durante al menos 2 horas en un congelador a -20 °C o menos.
7. El sobrenadante se transfirió a otro vial y se acondiciono en frío nuevamente durante 2 horas.
8. Los extractos acondicionados en frío se centrifugaron a 4000 rpm y se pasaron por un filtro de jeringa de 0,2 µm
9. Una alícuota de 500 µL se diluyó 1:1 con metanol
10. Para el análisis, se usó un volumen de inyección de 1 µL para ESI y 4 µL para APCI.

Condiciones de HPLC: Los analitos se separaron en una columna LC Phenomenex Luna Omega Polar C18 de 3 µm (150 x 3 mm) utilizando un sistema SCIEX ExionLC™ AD con un mezclador de solvente de 20 µL. La separación se realizó a una velocidad de flujo de 420 µL/min con una temperatura de columna de 30 °C y una temperatura de almacenamiento de la muestra del inyector automático de 10 °C. Para el análisis de ESI, los disolventes de fase móvil fueron (A) agua + ácido fórmico al 0.1% + formiato de amonio 5 mM y (B) metanol + ácido fórmico al 0.1% + formiato de amonio 5 mM (B) con un programa de gradiente enumerado en la Tabla 1. Para En el análisis APCI, los disolventes de fase móvil fueron (A) agua y (B) metanol sin modificadores con un programa de gradiente enumerado en la Tabla 2 y un ejemplo de cromatografía en la Figura 2.

Condiciones de espectrometría de masas: Todos los compuestos se analizaron utilizando un sistema SCIEX QTRAP 6500+ con Algoritmo Pro MRM™ Programado. El tiempo de

exploración objetivo para los experimentos de polaridad positiva y negativa se optimizó para obtener al menos 12 exploraciones en cada pico. Los pesticidas analizados por ESI se adquirieron con las siguientes configuraciones de fuente: CUR = 50 psi, CAD = HIGH (12), ISV = +3500 / -4500 V, TEM = 350 °C, GS1 = 80 psi, GS2 = 60 psi. Los pesticidas analizados por APCI se adquirieron con los siguientes ajustes de fuente CUR = 50 psi, CAD = HIGH (12), NC = -3 µA, TEM = 400 °C, GS1 = 50 psi.

Tabla 1. Programa de gradiente LC para el panel ESI.

Tiempo (min)	A (%)	B (%)
0	100	0
0.75	100	0
1	75	25
5	20	80
16	0	100
18	0	100
18.01	100	0
20	100	0

Tabla 2. Programa de gradiente LC para el panel APCI.

Tiempo (min)	A (%)	B (%)
0	15	85
0.5	15	85
2	0	100
4	0	100
4.01	15	85
6	15	85

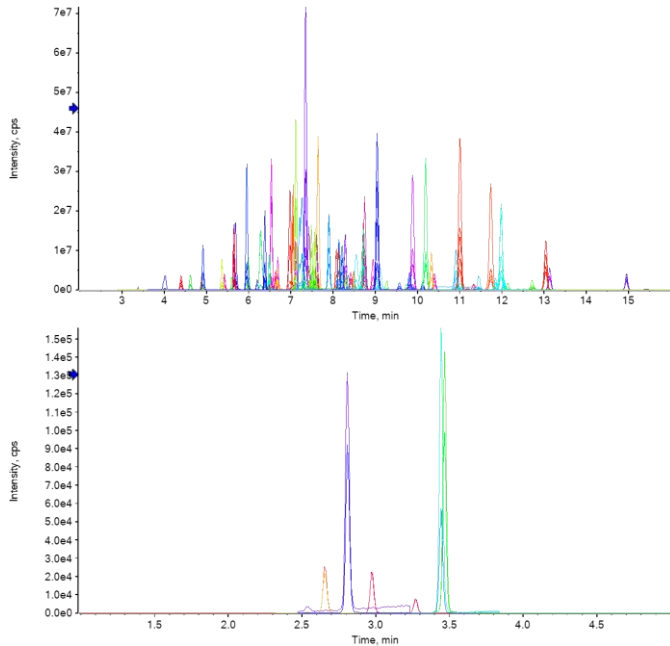


Figura 2. XIC de pesticidas. Ejemplo de cromatografía de panel ESI (superior) y panel APCI (inferior).

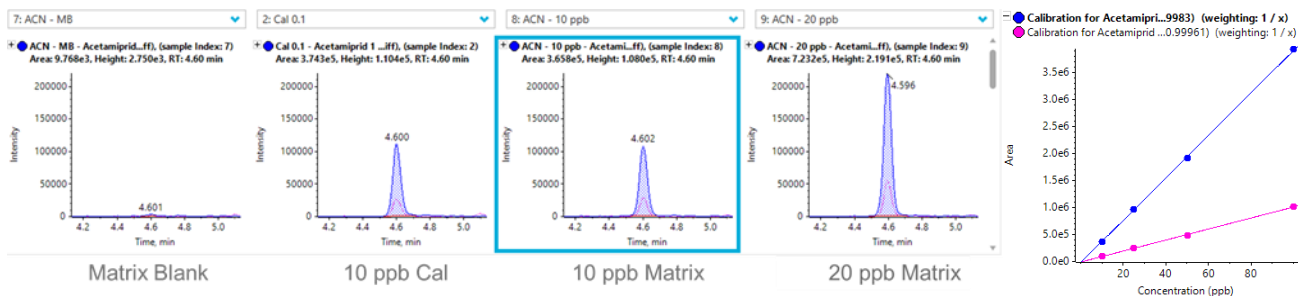
requisitos requieren un enfoque que utilice dos inyecciones; uno con ESI y otro con APCI.

Los MRLs establecidos por Health Canada exigen la sensibilidad que brinda ESI para la mayoría del panel de pesticidas, especialmente aquellos con requisitos de LOQ a 10 ppb. Los compuestos resaltados en la Figura 3 muestran una amplia señal de ruido y una excelente linealidad para los compuestos analizados tradicionalmente por LC-MS/MS. Con los análisis multiresiduos de paneles grandes, son los compuestos que muestran una pobre eficiencia de ionización los que ofrecen el mayor desafío. La Figura 4 resalta los compuestos que tradicionalmente se analizan utilizando técnicas de cromatografía de gases (GC), pero muestran un rendimiento cuantitativo que cumple, y en la mayoría de los casos supera, los requisitos establecidos por Health Canada utilizando ESI. Además, hay ciertos compuestos que simplemente no se ionizan bajo los mecanismos tradicionales de electrospray, como el quintoceno, el etridiazol y el endosulfán. Estos también son compuestos tradicionalmente analizados por GC. Por esta razón, es necesario emplear técnicas alternativas de ionización, como lo es APCI. Esto también permite que los compuestos que muestran una eficiencia de ionización mejorada por APCI sean analizados por su mecanismo más preferido. La Figura 5 destaca el rendimiento de la porción APCI de este método para cumplir con los requisitos de Health Canada. Juntos, Estos dos métodos tienen un tiempo de ejecución combinado inferior a 30 minutos y se utiliza el mismo extracto para ambos análisis. El

Estrategia cuantitativa de dos inyecciones

Los requisitos de prueba establecidos por Health Canada representan demandas analíticamente desafiantes para la detección y cuantificación de pesticidas en Cannabis. Estos

Acetamiprid – Health Canada LOQ = 50 ppb (*Cannabis fresco*), 100 ppb (*Cannabis seco*)



Bifenazate – Health Canada LOQ = En desarrollo (*Cannabis fresco*), 20 ppb (*Cannabis seco*)

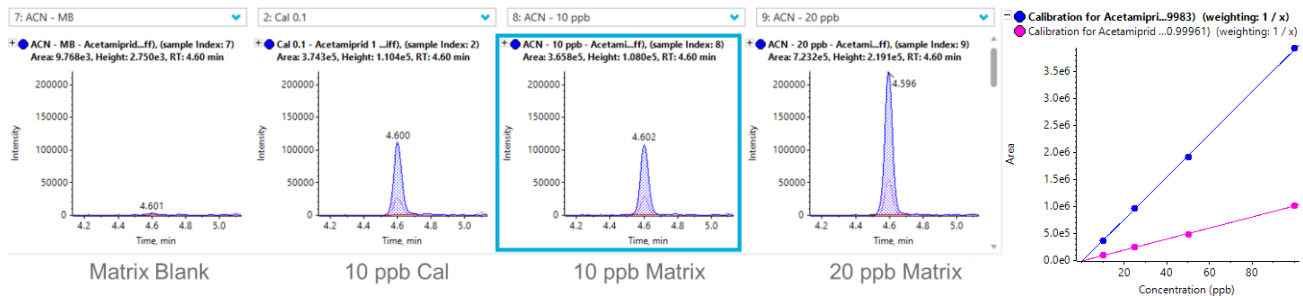
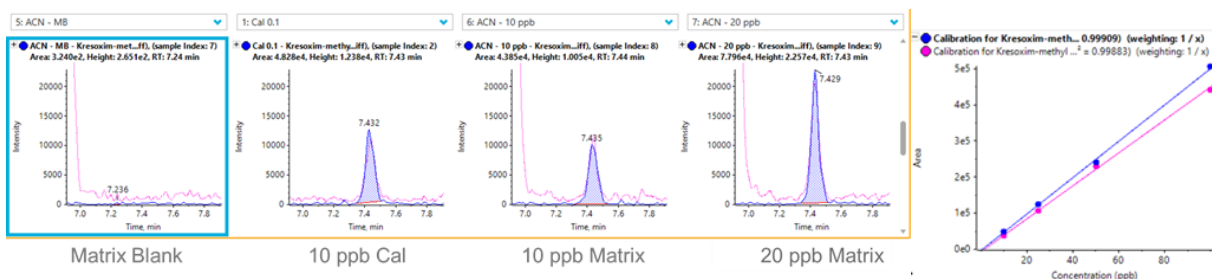
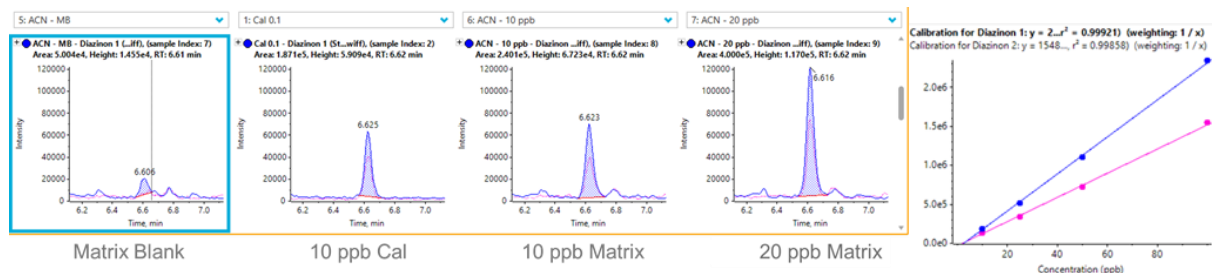


Figura 3: Datos de ejemplo de pesticidas analizados tradicionalmente por LC-MS/MS monitoreados con ESI. (Arriba) Datos de acetamiprid en solvente y en extracto seco de flor de cannabis. (Abajo) Datos de bifenazato en solvente y en extracto seco de flor de cannabis. En ambos casos, los LOQ superan los requisitos de Health Canada y, en el caso de Bifenazate, muestran éxito donde el LOQ todavía está en desarrollo.

Kresoxim Metilo - Health Canada LOQ = 10 ppb (Cannabis fresco), En desarrollo (Cannabis seco)



Diazinon - Health Canada LOQ = 10 ppb (Cannabis fresco), En desarrollo (Cannabis seco)



Sulfato de endosulfán - Health Canada LOQ = 500 ppb (cannabis fresco), en desarrollo (cannabis seco)

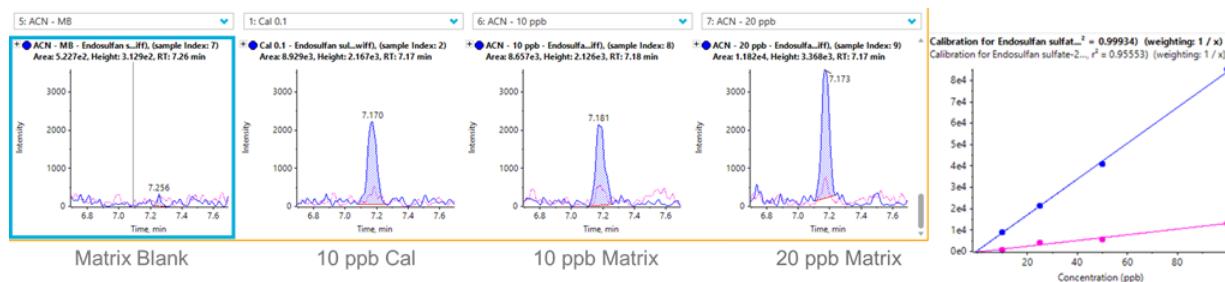


Figura 4: Ejemplo de datos de plaguicidas tradicionalmente analizados por GC-MS(/MS) monitoreados con ESI. (Arriba) Datos de Kresoxim Metilo, (medio) Diazinon, (inferior) Sulfato de Endosulfán en disolvente y en extracto seco de flor de cannabis. En todos los casos, el rendimiento cuantitativo se reduce a 10 ppb en los casos en que Health Canada todavía no ha elaborado una lista de los LOQ de cannabis secos.

cambio entre las sondas ESI y APCI lleva menos de un minuto, sin necesidad de cambios de software.

Impacto de la preparación de muestras

La extracción de solvente y el acondicionamiento en frío, fue utilizado para preparar todas las muestra para el análisis del panel de pesticidas a partir de un solo extracto. No se observó diferencia en el rendimiento entre el acetonitrilo y los extractos de acetonitrilo acidificado y mostró un rendimiento mejorado sobre el acetonitrilo con sales de QuEChERS, por lo que se eligió acetonitrilo puro como disolvente de extracción para este método. La preparación para el acondicionamiento en frío reduce la solubilidad de todos los componentes en el extracto, pero solo los componentes de mayor concentración (es decir, los componentes de la matriz) precipitarán de la solución, mientras que los pesticidas de objetivo a bajas concentraciones permanecen en solución para el análisis. Como no se pudo obtener cannabis fresco, solo se probaron matrices de cannabis secas. Se espera que las interferencias entre las dos matrices

sean similares, pero dado que el cannabis fresco es aproximadamente un 50% de agua, se anticipa que demuestre un carácter menos supresor. Para el aceite de cannabis, puede valer la pena emplear una técnica de eliminación de lípidos según lo recomendado por Health Canada⁴. Se puede esperar que los sorbentes de eliminación de lípidos, ya sea en forma de cartuchos de paso dSPE o SPE, en combinación con la preparación para el acondicionamiento en frío, eliminen la mayoría de la matriz hidrofóbica, pero aún pueden ocurrir pérdidas de compuestos, específicamente de daminozida.

Tabla 3. LOQ obligatorios de Health Canada para el cannabis fresco y seco. Todos los LOQ se pueden lograr con la excepción de Kinopreno.
En casos donde el LOQ está en desarrollo, los pesticidas respectivos se pueden detectar cuantitativamente.

	Health Canada LOQ				Health Canada LOQ				Health Canada LOQ		
	Fresco (µg/g)	Seco (µg/g)	Meet LOQ?		Fresco (µg/g)	Seco (µg/g)	Meet LOQ?		Fresco (µg/g)	Seco (µg/g)	Meet LOQ?
<i>Abamectin</i>	0.25	*	✓	<i>Dodemorph</i>	0.05	*	✓	<i>Naled</i>	*	*	✓
<i>Acephate</i>	*	0.02	✓	<i>Endosulfan-alpha</i>	0.1	*	✓	<i>Novaluron</i>	0.025	0.05	✓
<i>Acetamiprid</i>	0.05	0.1	✓	<i>Endosulfan-beta</i>	0.5	*	✓	<i>Oxamyl</i>	1.5	3	✓
<i>Acequinocyl</i>	*	*	✓	<i>Endosulfan sulfate</i>	0.5	*	✓	<i>Paclobutrazol</i>	0.01	0.02	✓
<i>Aldicarb</i>	0.5	1	✓	<i>Ethoprophos</i>	0.01	0.02	✓	<i>Permethrin</i>	0.5	*	✓
<i>Allethrin</i>	0.1	0.2	✓	<i>Etofenprox</i>	*	*	✓	<i>Phenothrin</i>	0.025	0.05	✓
<i>Azadirachtin</i>	0.5	1	✓	<i>Etoxazole</i>	0.01	0.02	✓	<i>Phosmet</i>	*	*	✓
<i>Azoxystrobin</i>	0.01	0.02	✓	<i>Etridiazol</i>	0.01	*	✓	<i>Piperonyl butoxide</i>	0.25	*	✓
<i>Benzovindiflupyr</i>	0.01	0.02	✓	<i>Fenoxycarb</i>	0.01	0.02	✓	<i>Pirimicarb</i>	0.01	0.02	✓
<i>Bifenazate</i>	*	0.02	✓	<i>Fenpyroximate</i>	*	0.02	✓	<i>Prallethrin</i>	*	*	✓
<i>Bifenthrin</i>	0.1	*	✓	<i>Fensulfothion</i>	0.01	0.02	✓	<i>Propiconazole</i>	0.01	*	✓
<i>Boscalid</i>	0.01	0.02	✓	<i>Fenthion</i>	0.01	*	✓	<i>Propoxur</i>	0.01	0.02	✓
<i>Buprofezin</i>	0.01	0.02	✓	<i>Fenvalerate</i>	*	*	✓	<i>Pyraclostrobin</i>	0.01	0.02	✓
<i>Carbaryl</i>	0.025	0.05	✓	<i>Fipronil</i>	0.01	0.06	✓	<i>Pyrethrins</i>	0.025	0.05	✓
<i>Carbofuran</i>	0.01	0.02	✓	<i>Fonicamid</i>	0.025	0.05	✓	<i>Pyridaben</i>	0.025	0.05	✓
<i>Chlorantraniliprole</i>	*	*	✓	<i>Fludioxonil</i>	0.01	0.02	✓	<i>Quintozene</i>	0.01	*	✓
<i>Chlorphenapyr</i>	0.1	*	✓	<i>Fluopyram</i>	0.01	0.02	✓	<i>Resmethrin</i>	*	0.1	✓
<i>Chlorpyrifos</i>	0.01	*	✓	<i>Hexythiazox</i>	*	*	✓	<i>Spinetoram</i>	*	*	✓
<i>Clofentezine</i>	0.01	0.02	✓	<i>Imazalil</i>	*	*	✓	<i>Spinosad</i>	*	*	✓
<i>Clothianidin</i>	0.025	0.05	✓	<i>Imidacloprid</i>	0.01	0.02	✓	<i>Spirodiclofen</i>	*	*	✓
<i>Coumaphos</i>	0.01	0.02	✓	<i>Iprodione</i>	0.5	1	✓	<i>Spiromesifen</i>	*	3	✓
<i>Cyantranilipole</i>	0.01	*	✓	<i>Kinoprene</i>	0.05	*	✓	<i>Spirotetramat</i>	*	0.02	✓
<i>Cyfluthrin</i>	*	*	✓	<i>Kresoxim-methyl</i>	0.01	*	✓	<i>Spiroxamine</i>	*	*	✓
<i>Cypermethrin</i>	*	*	✓	<i>Malathion</i>	0.01	0.02	✓	<i>Tebuconazole</i>	*	*	✓
<i>Cyprodinil</i>	*	*	✓	<i>Metalaxyl</i>	0.01	0.02	✓	<i>Tebufenozide</i>	0.01	0.02	✓
<i>Daminozide</i>	*	*	✓	<i>Methiocarb</i>	0.01	0.02	✓	<i>Teflubenzuron</i>	0.025	0.05	✓
<i>Deltamethrin</i>	*	*	✓	<i>Methomyl</i>	*	0.05	✓	<i>Tetrachlorvinphos</i>	0.01	0.02	✓
<i>Diazinon</i>	0.01	*	✓	<i>Methoprene</i>	1	*	✓	<i>Tetramethrin</i>	0.05	0.1	✓
<i>Dichlorvos</i>	0.05	0.1	✓	<i>Methyl parathion</i>	*	*	✓	<i>Thiacloprid</i>	0.01	0.02	✓
<i>Dimethoate</i>	0.01	0.02	✓	<i>Mevinphos</i>	0.025	0.05	✓	<i>Thiamethoxam</i>	0.01	0.02	✓
<i>Dimethomorph</i>	*	*	✓	<i>MGK-264</i>	*	*	✓	<i>Thiophanate-methyl</i>	*	0.05	✓
<i>Dinotefuran</i>	0.05	0.1	✓	<i>Myclobutanil</i>	0.01	0.02	✓	<i>Trifloxystrobin</i>	0.01	0.02	✓

*- LOQ en desarrollo por Health Canada

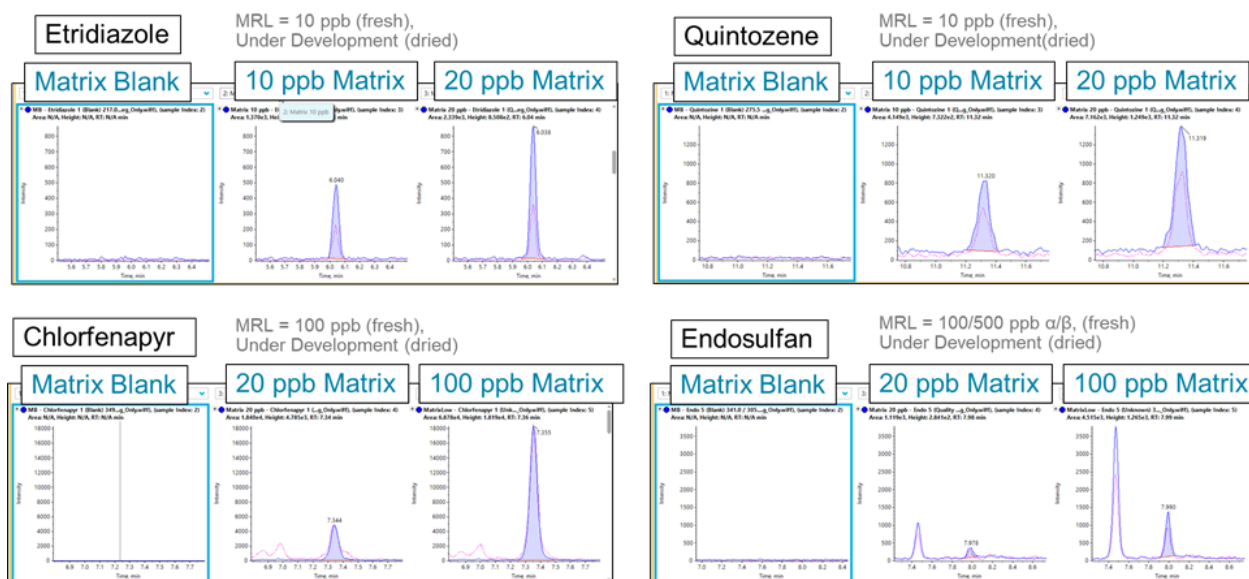


Figura 5: Ejemplo de datos de plaguicidas monitoreados con APCI. (En el sentido de las agujas del reloj desde la parte superior izquierda) Etridiazol, quintoceno, clorfenapir y endosulfán α/β en extracto seco de flor de cannabis. En todos los casos, los LOQs de Cannabis frescas se consiguen en la matriz de Cannabis seca, donde las LOQs de Cannabis secas todavía están en desarrollo por Health Canada.

Conclusiones

Todos los pesticidas regulados por Health Canada fueron ionizados, detectados y analizados cuantitativamente por LC-MS / MS, utilizando técnicas ESI o APCI. La flor de cannabis seca se usó como matriz representativa, y los picos de la matriz en los LOQ obligatorios mostraron que el rendimiento del método cumplía o superaba los requisitos de LOQ para todos menos uno de los 96 paneles objetivo. Para el kinopreno, el LOQ obligatorio en el cannabis fresco puede lograrse utilizando una inyección de mayor volumen, ya que el LOQ seco aún está en desarrollo, y el cannabis fresco representa una matriz menos desafiante.

Se puede utilizar un protocolo de extracción simplificado al aprovechar la sensibilidad y la solidez del sistema SCIEX QTRAP 6500+ con la fuente IonDrive Turbo V, para optimizar la preparación de muestras al reducir la necesidad de técnicas de limpieza complejas y costosas para mantener el rendimiento del instrumento, y analizar todo el pesticida panel juntos. Este flujo de trabajo también conserva la flexibilidad para agregar componentes adicionales, como las micotoxinas, para aumentar aún más la productividad en los laboratorios de pruebas. Este enfoque integral reduce la necesidad de técnicas de cromatografía de gases y el mantenimiento frecuente que requieren al analizar matrices sucias.

Referencias

1. Quantitation of Oregon List of Pesticides and Cannabinoids in Cannabis Matrices by LC-MS/MS. SCIEX Technical Note RUO-MKT-02-6729-B.
2. Achieving the California Pesticide Regulations in *Cannabis* Using Optimized APCI and ESI Techniques. SCIEX Technical Note RUO-MKT-02-8859-A.
3. Health Canada. Mandatory Cannabis Testing For Pesticide Active Ingredients – Lists and Limits. Published online November 8, 2018. <https://www.canada.ca/en/public-health/services/publications/drugs-health-products/cannabis-testing-pesticide-list-limits.html>
4. Moulins, J.R., et al., (2018) Multiresidue Method of Analysis of Pesticides in Medical *Cannabis*. *J AOAC Int*, **101(6)**:1948-1960.

The SCIEX clinical diagnostic portfolio is For In Vitro Diagnostic Use. Rx Only. Product(s) not available in all countries. For information on availability, please contact your local sales representative or refer to <https://sciex.com/diagnostics>. All other products are For Research Use Only. Not for use in Diagnostic Procedures.

Trademarks and/or registered trademarks mentioned herein, including associated logos, are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners in the United States and/or certain other countries. © 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-9602-A. AB SCIEX™ is being used under license.



Headquarters

500 Old Connecticut Path | Framingham, MA 01701 USA
Phone 508-383-7700
sciex.com

International Sales

For our office locations please call the division headquarters or refer to our website at sciex.com/offices