

Análisis de Potencia en Productos de Cáñamo y Cannabis Utilizando un Enfoque Combinado de Dilución única LC-UV-MS / MS

Simon C. Roberts¹, Paul Winkler¹, Scott Krepich², Ty Garber³, KC Hyland¹, Christopher Borton¹
¹SCIEX, Redwood City, CA, USA, ²Phenomenex, Inc., Torrance, CA, USA, ³Phenova, Inc., Golden, CO, USA

Según los requisitos reglamentarios estatales individuales en los EE. UU., La potencia de los productos comerciales de cannabis debe informarse como el porcentaje de THC e imprimirse en las etiquetas de los productos de cannabis después de ser certificada por un centro de pruebas de cannabis con licencia. La metodología para obtener valores de potencia de cannabis puede variar según la técnica analítica y la instrumentación utilizada, lo que brinda opciones para que las instalaciones de prueba personalicen u optimicen sus flujos de trabajo.

Todos los instrumentos analíticos exhiben un rango dinámico de detección, y para cuantificar con exactitud la concentración de cualquier componente en una muestra, ese componente debe diluirse a una concentración dentro del rango dinámico del instrumento. El rango dinámico de un instrumento está controlado por varios factores, que incluyen el rendimiento del detector, la eficiencia cromatográfica y la eficiencia de ionización. A concentraciones muy altas de un compuesto, un detector puede no ser capaz de distinguir pequeños cambios de concentración



de una muestra a la siguiente y no mostrará una respuesta lineal en respuesta creciente del detector a la concentración de analito.

El enfoque más simple para el análisis de cannabinoides es la separación por LC con detección UV en el rango de longitud de onda de 200-230 nm. Debido a las limitaciones en el rango dinámico lineal de los detectores de matriz de UV y fotodiodos (PDA), puede ser difícil cuantificar con precisión un amplio rango de cannabinoides en una sola inyección usando un esquema de dilución única para todas las muestras. Las concentraciones de cannabinoides muy abundantes, como delta-9-THC y ácido tetrahidrocannabinólico A (THCA), el cannabis o cannabidiol (CBD) y ácido cannabidiólico (CBDA) en el cáñamo, pueden superar el 90 %. Sin embargo, otros cannabinoides solo pueden estar presentes en concentraciones inferiores al 0,5 %. Por lo tanto, con el análisis UV solo, puede ser necesario un protocolo de dilución múltiple para analizar un amplio panel de cannabinoides para garantizar que las concentraciones calculadas caigan dentro del rango dinámico lineal del detector UV.

La separación por LC con detección de MS / MS es otra técnica comúnmente utilizada para el análisis de potencia de cannabis. Es capaz de un rango dinámico más grande y una detección más específica porque la detección MS / MS mide la respuesta de fragmentos individuales de cada compuesto. Los espectrómetros de masas modernos están diseñados para ser lo suficientemente sensibles como para medir compuestos en el rango de fg / mL y pg / mL, sin embargo, algunos cannabinoides pueden estar presentes en concentraciones que exceden el 90 % del peso del producto. Lograr analizar concentraciones bajas para el análisis de MS / MS requiere diluir el extracto original varias veces para lograr

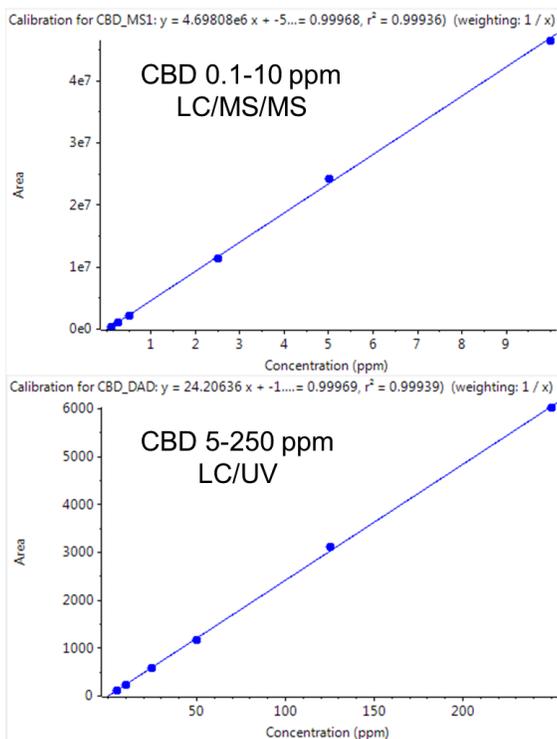


Figura 1: Curvas de calibración de CBD. (Arriba) Curva de calibración de CBD con detector MS (0.1-10 ppm en vial; corresponde a 0.05-5 % en muestras) mostrando un r^2 de 0.999. (Inferior) Curva de calibración de CBD usando PDA (5-250 ppm en vial; corresponde a 2.5-125 % en muestras) mostrando r^2 de 0.999.

diluciones finales de 1: 250,000 a 1: 2,250,000. Debido a la alta hidrofobicidad de los cannabinoides, puede producirse una unión no específica de los cannabinoides en las superficies de plástico o vidrio, disminuyendo la concentración aparente de cannabinoides en la muestra. Por lo tanto, realizar diluciones en serie múltiples de extractos de cannabis puede conducir a resultados inexactos.

En este estudio, se presenta un flujo de trabajo para analizar 11 cannabinoides en productos de cannabis y cáñamo con niveles variables de potencia usando LC-UV en conjunto con un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo. El espectrómetro de masas proporciona sensibilidad para los cannabinoides de baja abundancia y el detector HPLC-UV proporciona cuantificación de hasta 100 % de potencia de THC o CBD en peso.

Principales Ventajas de HPLC-UV en tándem con análisis de potencia MS / MS

- El panel de ensayo cubre 0.05 -100 % de potencia en peso, lo que permite realizar pruebas tanto para destilado de flores como puro sin ningún arrastre o cambio en el factor de dilución
- El software SCIEX OS proporciona marcas personalizadas para determinar si el PDA o la MS se utilizan automáticamente como detector para generar resultados cuantitativos precisos

Experimental

Preparación de la muestra: Flor, destilados y concentrados

1. Homogeneizar muestras de flores, procesar concentrados sin homogeneizar
2. Coloque 0.2 gramos de muestra en 10 mL de acetonitrilo
3. Agitar y sonicar durante 30 minutos.
4. Centrifugar durante 5 minutos a 300 x g.
5. Extráe el filtrado con un filtro de jeringa de nylon de 0.2 µm
6. Diluir extracto filtrado 1: 100 (v / v) con acetonitrilo
7. Inyectar 2 µL para análisis

La masa de la muestra extraída se puede modificar si es necesario. Por ejemplo, se pueden extraer 0,5 g de muestra en 25 mL de acetonitrilo. El contenido de agua no se determinó en este estudio. Por lo tanto, los resultados porcentuales representan el peso recibido de cada muestra. El análisis del contenido de humedad debe realizarse por separado para normalizar los resultados al contenido de agua de cada muestra. Se probaron seis cepas de cannabis y flores de cáñamo y se analizaron seis concentrados de diferentes variedades (Tabla 1).

Separación LC: Se inyectó un volumen de muestra de 2 µL usando un sistema ExionLC™ AD con un detector PDA (arreglo de diodos) acoplado a un QTRAP® Sistema 6500+. Se realizó la separación utilizando un columna de Phenomenex,

Tabla 1. Lista de muestras de cannabis y cáñamo probadas.

Nombre	Tipo de Producto	Planta
<i>Blue Dream</i>	<i>Flor</i>	<i>Cannabis</i>
<i>Limon Kush</i>	<i>Flor</i>	<i>Cannabis</i>
<i>Milla de Cañamo alto</i>	<i>Flor</i>	<i>Cañamo</i>
<i>Cañamo Phenova</i>	<i>Flor</i>	<i>Cañamo</i>
<i>Cañamo prueba de potencia Phenova</i>	<i>Flor</i>	<i>Cañamo</i>
<i>FLO Sativa</i>	<i>Flor</i>	<i>Cannabis</i>
<i>Pegamento Gorilla</i>	<i>Aceite</i>	<i>Cannabis</i>
<i>M.H. Cañamo D</i>	<i>Destilado</i>	<i>Cañamo</i>
<i>Pastel de bodas</i>	<i>Cera</i>	<i>Cannabis</i>
<i>Paquimama</i>	<i>Cera</i>	<i>Cannabis</i>
<i>Fruta tropical</i>	<i>Aceite</i>	<i>Cannabis</i>
<i>CBD destilado</i>	<i>Distilado</i>	<i>Cañamo</i>

Luna Omega Polar C18 (150 • 4,6 mm, 3 µm) columna analítica. Las fases móviles de LC consistieron en 0.1 % de ácido fórmico en agua (A) y 0.1 % de ácido fórmico en 96 % de acetonitrilo y 4 % de agua (B) a una velocidad de flujo de 1 mL / min y una temperatura de columna de 25 °C.

Métodos de análisis: El análisis se realizó utilizando el sistema ExionLC con detector PDA UV integrado y LC-MS / MS operados en modos de polaridad positiva y negativa. El detector PDA se ajustó para recoger la absorbancia de un rango de longitud de onda de 210-230 nm. Se utilizaron las siguientes condiciones de fuente de MS: CUR = 40 psi, CAD = 11, IS = 5500 / -4500 V, TEM = 500 °C, y GS1 = 60 psi y GS2 = 60 psi. Las transiciones MRM se resumen en la Tabla 4.

Tabla 2: Condiciones de gradiente utilizadas para la separación LC. Se usó un flujo de 1 mL / min.

Tiempo (min)	B (%)
0	75
0.5	82
6	82
12	90
12.5	100
14	100
14.1	75
16	Fin

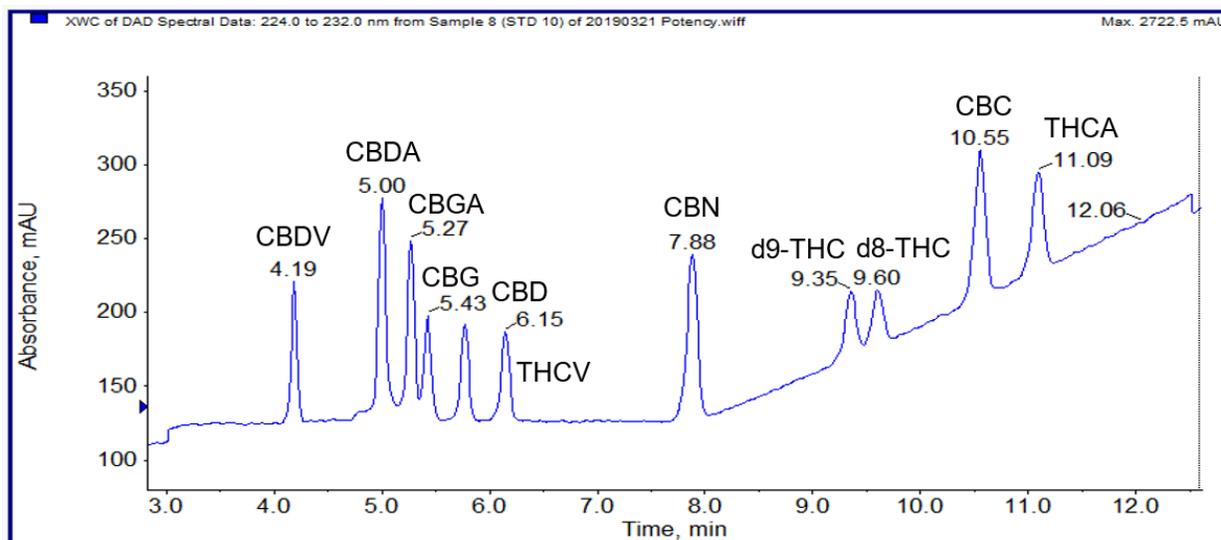


Figura 2: Perfil de elución de cannabinoides de un estándar de 10 ppm que muestra datos de trazas UV.

Procesamiento de datos: Los datos se procesaron con el software SCIEX OS-MQ 1.5. Para los 4 principales cannabinoides detectados comúnmente (THC, THCA, CBD, CBDA), se generó una curva de rango de calibración alta usando el detector PDA, y se generó una curva de rango de calibración baja usando MS / MS en el detector de MS. Para los cannabinoides remanentes, solo se analizó una curva MS porque las concentraciones de estos raramente exceden la concentración máxima de aproximadamente 4 % cuantificable por LC-MS / MS en este método. Una vez que se establecieron las curvas, se desarrollaron cálculos personalizados en el software de procesamiento SCIEX OS-MQ para convertir automáticamente las concentraciones calculadas al porcentaje en peso de la planta utilizando la masa extraída, el volumen extraído y el factor de dilución, que se ingresaron en Analyst® software cuando las muestras fueron enviadas para su análisis.

Resultados

Un sistema ExionLC con detector PDA integrado y un espectrómetro de masas SCIEX Triple Quad 6500+ se usaron juntos en una sola inyección con un esquema de dilución única para cuantificar 11 cannabinoides en cannabis y muestras de cáñamo que van desde 0.05 - 100 % de peso total. En el extremo inferior de este rango, había suficiente señal usando el sistema MS / MS para calibrar incluso más bajo que el límite utilizado en este estudio (aproximadamente 0.005 %). Esta sensibilidad adicional podría ser importante al analizar cannabinoides de baja abundancia o pequeñas masas de muestra con fines de investigación. El PDA detectó el extremo superior del rango de potencia para los abundantes cannabinoides a 2.5-100 % en peso sin saturación del detector en el punto más alto de la curva de calibración. En la Figura 1 se muestra un ejemplo de las dos curvas de calibraciones superpuestas de dos detectores diferentes.

Usando las características de marcado personalizadas en el software SCIEX OS-MQ, el software determinó automáticamente si se debía informar el valor calculado para el MS / MS o el PDA. SCIEX OSMQ también convirtió automáticamente los resultados a un porcentaje utilizando la masa de muestra extraída ingresada en el lote y los factores de dilución totales. Finalmente, el software calculó el porcentaje total de CBD y THC al agregar las formas ácida y neutra de cada uno (CBD + CBDA y THC + THCA) después de aplicar un factor de corrección molar 0.877x a los ácidos, debido al peso molecular adicional del ácido antes de la descarboxilación. Luego se utilizó una plantilla de informe personalizable para generar un informe como se muestra en la Figura 3.

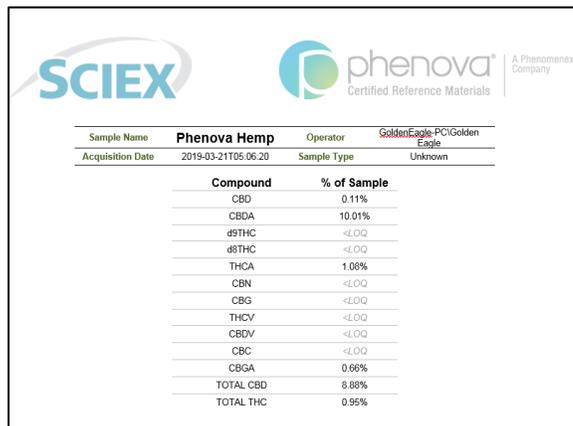
Además de un rango dinámico lineal sobresaliente, el método también exhibió una buena reproducibilidad, probablemente debido a la única dilución 1: 5,000 utilizada durante la preparación de la muestra junto con una inyección de 2 µL. Las verificaciones de calibración continua (CCV) se analizaron cada 10 muestras, y sus respuestas fueron consistentes en el transcurso del lote. La Tabla 3 muestra una buena reproducibilidad de THCA en un CCV MS / MS de 0.5 ppm y un CCV PDA de 25 ppm con RSD de 1.6 % y 2.0 %, respectivamente. Las concentraciones calculadas de los CCV estuvieron dentro del 25 % deseado de la concentración esperada durante el transcurso de la ejecución, que incluyó aproximadamente 60 inyecciones de flores de cannabis, flores de cáñamo y muestras de concentrado.

Tabla 3: Reproducibilidad de estándares CCV analizados a lo largo del lote de 60 muestras.

Muestra	Concentración esperada de THCA (ppm)	Concentración calculada THCA (ppm)	Exactitud
MS QC1	0.5	0.538	108%
MS QC2	0.5	0.533	107%
MS QC3	0.5	0.555	111%
MS QC4	0.5	0.547	109%
MS QC5	0.5	0.532	106%
MS QC6	0.5	0.540	108%
Sumatoria MS QC		RSD=1.6%	
UV QC1	25	24.9	100%
UV QC2	25	23.8	95%
UV QC3	25	24.9	100%
UV QC4	25	24.7	99%
UV QC5	25	24.8	99%
UV QC6	25	25.3	101%
Sumatoria UV QC		RSD=2.0%	

Los concentrados también se cuantificaron utilizando el mismo flujo de trabajo, incluido el mismo factor de dilución, volumen de inyección y estándares de calibración. En la Figura 4, los resultados de CBD se muestran usando la curva PDA o la curva MS. Debido a que la concentración era más alta que el rango dinámico lineal de la EM, el resultado calculado de 30 % en peso de CBD es inexacto. Sin embargo, el detector PDA, que puede cuantificar con precisión hasta el 100 % en peso, mostró que la concentración de CBD en la cera fue del 70,2 %. Las reglas de marcado automático utilizadas en el software SCIEX OS-MQ informaron el valor de 70.2 % de CBD al informe e ignoraron el valor calculado incorrecto de 30.7 % MS/MS.

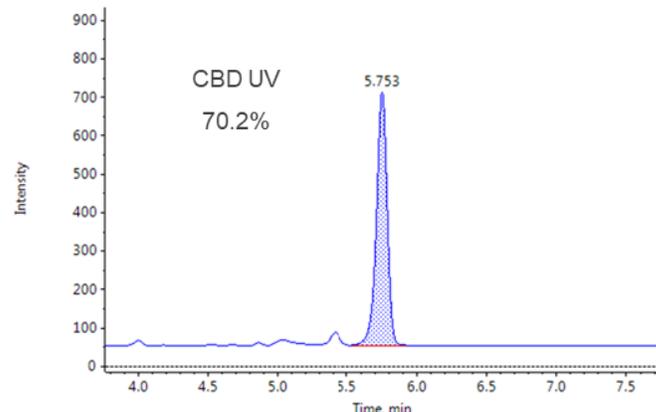
Los resultados de 4 muestras de flores de cannabis, 4 concentrados de cannabis, 3 muestras de flores de cáñamo y 1 concentrado de cáñamo se muestran en la Tabla 5. Los 11 cannabinoides se detectaron en al menos 1 muestra. Debido a que el contenido de humedad no se analizó para estas muestras, los valores representan el porcentaje de cada cannabinoide en la muestra completa y, por lo tanto, no fueron directamente comparables con los valores de etiqueta informados. Las 12 muestras se prepararon utilizando el protocolo descrito en la sección de preparación de muestras sin modificación basada en el tipo de muestra. La ventaja de este flujo de trabajo es esta capacidad de analizar con precisión este conjunto diverso de muestras sin cambiar la masa de la muestra extraída, el factor de dilución, el volumen de inyección o cualquier otro parámetro.



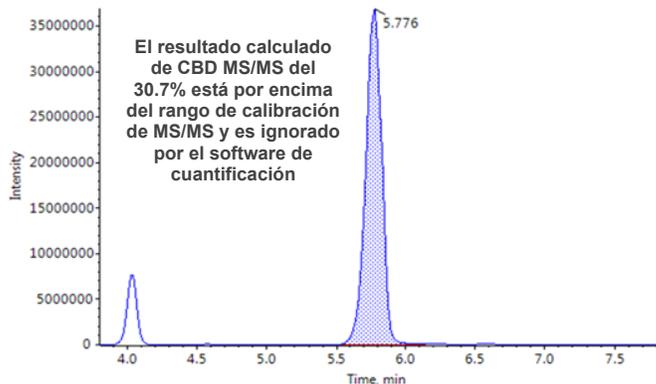
Sample Name	Phenova Hemp	Operator	GoldenEagle-PC/GoldenEagle
Acquisition Date	2019-03-21 10:06:20	Sample Type	Unknown
Compound	% of Sample		
CBD	0.11%		
CBDa	10.01%		
Δ9THC	<.00		
Δ8THC	<.00		
THCA	1.08%		
CBN	<.00		
CBG	<.00		
THCV	<.00		
CBDV	<.00		
CBC	<.00		
CBGA	0.66%		
TOTAL CBD	8.88%		
TOTAL THC	0.95%		

Figura 3: Plantilla de informe personalizado exportada de resultados que cuantifica la potencia de los cannabinoides en el cáñamo proporcionada por Phenova.

Mile High Hemp Distillate Wax - CBD_DAD (Unknown...\Data\20190321 Potency.wiff), (sample Index: 18)
Area: 3.483e3, Height: 6.578e2, RT: 5.75 min



Mile High Hemp Distillate Wax - CBD_MS1 (Unknown...\Data\20190321 Potency.wiff), (sample Index: 18)
Area: 2.956e8, Height: 3.685e7, RT: 5.78 min



Sample Name	Area	Component Name	Calculated Concentration	*LOQ	*ULOQ	*Percent
Mile High Hemp Distillate Wax	3.483e3	CBD_DAD	143.948	5.000	250.000	70.219
Mile High Hemp Distillate Wax	2.956e8	CBD_MS1	62.933	0.100	10.000	30.699

Figura 4: Resultados cuantitativos para CBD en cera de cáñamo. En esta muestra, SCIEX OS informó el valor UV (arriba) porque el valor MS / MS era demasiado alto para la curva de calibración MS/MS (abajo).

Conclusiones

Se presenta un método rápido y robusto para 11 cannabinoides que utiliza una combinación de LC con detectores UV y MS/MS en una sola prueba analítica para las pruebas de potencia de cannabis y cáñamo. El método separa el delta-9tetrahidrocannabinol psicoactivo (delta-9-THC) y su isómero delta-8tetrahidrocannabinol (delta-8-THC) en un gradiente de 16 minutos que proporciona niveles precisos de THC total para el etiquetado de potencia de los productos de cannabis.

Este enfoque de dos detectores cubre un amplio rango de cuantificación del contenido de cannabinoides individuales de 0.05-100% por peso del producto. Al utilizar simultáneamente los detectores UV y MS, se pueden detectar y cuantificar con precisión cannabinoides de mayor y menor cantidad en un solo análisis con la misma inyección de muestra y factor de dilución, lo que aumenta el rendimiento de la muestra de laboratorio. La viabilidad de utilizar un enfoque de detector dual para analizar 11 cannabinoides para la potencia reproducible con una dilución de muestra de 1: 5000 veces es posible con una desviación muy pequeña.

El método se probó en matrices de cáñamo y cannabis para flores y concentrados que cubren todo el rango de potencia. La preparación de la muestra ya no requiere una inyección múltiple o un método de muestra de dilución múltiple para monitorear los cannabinoides de baja y alta abundancia.

Tabla 4. Parámetros MRM.

Nombre	Q1 m/z	Q3 m/z	DP	CE
<i>CBG_1</i>	317	193	200	10
<i>CBG_2</i>	317	123	100	30
<i>THCV_1</i>	287.1	165	125	30
<i>THCV_2</i>	287.1	231.3	125	24
<i>CBDV_1</i>	287.1	165.3	150	32
<i>CBDV_2</i>	287.1	123.1	150	41
<i>CBC_1</i>	315	193	94	27
<i>CBC_2</i>	315	81.2	94	17
<i>THC_1</i>	315	193.1	150	25
<i>THC_2</i>	315	135	150	25
<i>CBN_1</i>	311.2	223	50	15
<i>CBN_2</i>	311.2	241	50	15
<i>CBD_1</i>	315	259	200	27
<i>CBD_2</i>	315	193	150	27
<i>CBGA_1</i>	359	191.1	-200	-45
<i>CBGA_2</i>	359	315.3	-200	-30
<i>CBDA_1</i>	357	245.3	-200	-39
<i>CBDA_2</i>	357	179.1	-200	-32
<i>THCA_1</i>	357	313.4	-100	-34
<i>THCA_1</i>	357	191.2	-100	-42

Tabla 5. Tabla resumen de las concentraciones de cannabinoides para todas las muestras analizadas en este estudio. * * Las concentraciones totales de CBD y THC suponen una descarboxilación del 100 % de CBDA y THCA a CBD y THC, respectivamente, sobre una base molar.

Nombre de muestra	CBD	CBDA	d9THC	d8THC	THCA	CBN	CBG	THCV	CBDV	CBC	CBGA	Total CBD*	Total THC*
<i>Flor de cannabis Blue Dream</i>	<LOQ	0.06%	0.14%	<LOQ	18.38%	<LOQ	0.07%	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.19%	0.05%	16.26%
<i>Flor de cannabis FLO</i>	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	12.67%	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.05%	0.18%	0%	11.11%
<i>Flor de cannabis Lemon Kush</i>	<LOQ	0.06%	0.83%	<LOQ	17.48%	<LOQ	0.12%	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.91%	0.05%	16.16%
<i>Flor de Cannabis Phenova</i>	3.37%	3.90%	<LOQ	<LOQ	2.31%	0.14%	0.15%	0.19%	<LOQ	0.27%	0.15%	6.79%	2.02%
<i>Pachamama Cera de azúcar</i>	0.38%	3.25%	9.25%	<LOQ	59.88%	<LOQ	0.39%	0.45%	<LOQ	0.21%	1.05%	3.23%	61.76%
<i>Pastel de Bodas Cera de azúcar</i>	<LOQ	0.22%	4.90%	<LOQ	69.83%	<LOQ	0.27%	<LOQ	<LOQ	0.11%	2.13%	0.19%	66.14%
<i>Evolabs Tropical Aceite CO2</i>	3.77%	<LOQ	72.45%	<LOQ	<LOQ	0.76%	1.78%	0.66%	<LOQ	1.18%	<LOQ	3.77%	72.45%
<i>Pegamento Gorilla CO2 Aceite</i>	0.16%	0.25%	41.08%	<LOQ	13.02%	1.02%	1.58%	0.37%	0.12%	1.14%	1.17%	0.38%	52.50%
<i>Flor de cáñamo Phenova 1</i>	0.12%	12.27%	<LOQ	<LOQ	1.15%	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.68%	10.9%	1.01%
<i>Flor de cáñamo Phenova 2</i>	4.13%	5.70%	<LOQ	<LOQ	0.58%	<LOQ	0.22%	<LOQ	<LOQ	0.25%	0.36%	9.12%	0.50%
<i>Flor de cáñamo Mile High</i>	1.62%	4.92%	0.07%	<LOQ	0.10%	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.11%	0.06%	5.93%	0.15%
<i>Destilado de cáñamo Mile High</i>	69.97%	<LOQ	3.76%	<LOQ	<LOQ	0.39%	3.53%	<LOQ	0.14%	4.45%	<LOQ	69.97%	3.76%

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. © 2018 AB SCIEX. SCIEX is part of AB SCIEX. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license. Mention of trade names or commercial products in this publication is solely for the purpose of providing specific information and does not imply recommendation or endorsement by the USDA.

Publication number: Related to RUO-MKT-02-9907-A