

| | |
|---|--|
| Produkt | : CannaFix-ID THC/CBD Schnelltest-Set The BC Green 17/1 OC |
| Hersteller | : Saxonia Diagnostics GmbH Praterschütz 5 01683 Nossen Deutschland |
| Methode | : Vorgehen nach Gebrauchsanweisung des CannaFix-ID THC/CBD Schnelltest-Sets |
| Analyt(en) | : Cannabinoide: Δ^9 -THC, CBD |
| Verwendete Matrix | : Cannabisblüte Ch-B: BC/CMD/OC/240902 |
| Ziel der Validierung | : Bestätigung der Eignung des CannaFix-ID THC/CBD Schnelltest-Sets für die Identifizierung von Cannabinoiden anhand der Cannabisblüte BC Green 17/1 OC |
| Verantwortliches Labor & Dokumentation | : Saxonia Diagnostics GmbH |

Vorbemerkung:

Dieser Validierungsplan beschreibt die Validierung einer Methode zur Identifizierung von Δ^9 -THC und Cannabidiol (CBD) in der Cannabisblüte BC Green 17/1 OC. Die Analysenmethode wird von der Saxonia Diagnostics GmbH validiert. Ziel der Validierung ist der Nachweis über die Eignung des CannaFix-ID THC/CBD Schnelltest-Sets zur Identifizierung von Δ^9 -THC und CBD in der Cannabisblüte BC Green 17/1 OC. Beim Testsystem handelt es sich um einen 2-stufigen Farbttest, welcher die strukturellen Unterschiede von Δ^9 -THC und CBD ausnutzt. In der ersten Stufe wird die Probe mit einem alkalischen Verdünner extrahiert. Bei Anwesenheit von CBD wird dieses durch eine violette Farbe des korrespondierenden CBD-Phenolat-Ions angezeigt. Das entsprechende THC-Phenolat-Ion zeigt im sichtbaren Bereich keine Absorption, so dass auf dieser Stufe CBD auch in Anwesenheit von Δ^9 -THC sicher identifiziert werden kann. In der zweiten Stufe wird ein Teil des Verdünner-Extrakt-Gemisches in eine Ampulle mit einem Farbreagenz überführt. Bei diesem Farbreagenz handelt es sich um ein Diazoniumsalz. Dieses Diazoniumsalz reagiert via Azo-Kupplung mit Δ^9 -THC und mit CBD. Die dabei gebildeten Kupplungsprodukte von Δ^9 -THC und CBD unterscheiden sich in der Farbe (siehe Abbildung 6).

1 Akzeptanzkriterien und Prüfparameter

Tabelle 1: Zusammenfassung der Akzeptanzkriterien und Prüfparameter

| Parameter | Beschreibung und Erwartungswerte | Akzeptanzkriterien |
|--|--|--|
| Eignungsprüfung der Methode: Identität, Δ^9-THC / CBD | <p><u>Probe: Cannabisblüte BC Green 17/1 OC</u> Stufe 1: Keine violette Farbe → Identität CBD: negativ Stufe 2: Violette Farbe → Identität THC: positiv</p> <p><u>CBD-Referenzlösung: CBD 25 mg/ml (in MCT)</u> Stufe 1: Violette Farbe → Identität CBD: positiv Stufe 2: Orange → Identität THC: negativ</p> <p><u>THC-Referenzlösung: Δ^9-THC 25 mg/ml (in MCT)</u> Stufe 1: Keine Farbe → Identität CBD: negativ Stufe 2: Violett → Identität THC: positiv</p> <p><u>THC/CBD-Referenzlösung: (12,5 mg THC und 12,5 mg CBD in MCT-Öl)</u> Stufe 1: Violette Farbe → Identität CBD: positiv Stufe 2: Braun → Identität THC: positiv</p> | <p><u>Probe: Cannabisblüte BC Green 17/1 OC (n = 3)</u> Identität THC: positiv Identität CBD: negativ</p> <p><u>CBD-Referenzlösung (n = 1)</u> Identität THC: negativ Identität CBD: positiv</p> <p><u>THC-Referenzlösung (n = 1)</u> Identität THC: positiv Identität CBD: negativ</p> <p><u>THC/CBD-Referenzlösung (n = 1)</u> Identität THC: positiv Identität CBD: positiv</p> |
| Spezifität der Methode | <p><u>Reagenzien-Blank</u> Verdünner wird mit Farbreagenz gemischt und entwickelt → keine Farbreaktion.</p> <p><u>Spezifitätskontrolle I: Hanföl</u> Hanföl ohne CBD/THC wird mit Verdünner (Stufe 1) und Farbreagenz (Stufe 2) geprüft. → keine Farbreaktion</p> <p><u>Spezifitätskontrolle II (MCT)</u> MCT-Öl ohne CBD/THC wird mit Verdünner (Stufe 1) und Farbreagenz (Stufe 2) geprüft. → keine Farbreaktion</p> <p><u>Spezifitätskontrolle III (Kräuterteemischung)</u> Eine Kräuterteemischung ohne CBD/THC wird mit Verdünner (Stufe 1) und Farbreagenz (Stufe 2) geprüft. → keine Farbreaktion</p> | <p><u>Reagenzien-Blank (je n = 1)</u> Identität THC: negativ Identität CBD: negativ</p> <p><u>Hanföl (n = 1)</u> Identität THC: negativ Identität CBD: negativ</p> <p><u>MCT Öl (n = 1)</u> Identität THC: negativ Identität CBD: negativ</p> <p><u>Kräuterteemischung (n = 1)</u> Identität THC: negativ Identität CBD: negativ</p> |
| Robustheit | <p><u>Probe: Cannabisblüte BC Green 17/1 OC</u> Die Probenmenge ist zu variieren (Standard: 20 mg). Niedrigere Probenmenge (15 mg) Höhere Probenmenge (25 mg)</p> | <p><u>Probe: Cannabisblüte BC Green 17/1 OC (je n = 1)</u> Identität THC: positiv Identität CBD: negativ</p> |

2 Reagenzien, Materialien und Equipment

Tabelle 2: Verwendete Materialien und deren Ansatz

| Material | Ansatz |
|--|---|
| Probe (Cannabisblüte BC Green 17/1 OC) | 20 mg der Cannabisblüte werden eingesetzt. Mit dieser Probe wird überprüft, ob der Schnelltest in der Praxis mit Routineproben funktioniert (n = 3). |
| Reagenzien-Blank | Der reine Verdünner wird geprüft und ausgewertet. Keine Probenzugabe (n = 1). Anhand dieser Probe wird der Einfluss des Reagenzien-Blindwertes überprüft. |
| Spezifitätskontrolle I | 100 µl Hanföl werden geprüft und ausgewertet (n = 1). Anhand dieser Probe wird überprüft, ob weitere Inhaltsstoffe der Cannabispflanze das Testergebnis beeinflussen. |
| Spezifitätskontrolle II | 100 µl MCT-Öl werden geprüft und ausgewertet (n = 1). Anhand dieser Probe wird überprüft, ob die Matrix das Testergebnis beeinflusst. |
| Spezifitätskontrolle III | 20 mg Kräuterteemischung mit 31% Hopfenanteil werden geprüft und ausgewertet (n = 1). Anhand dieser Probe wird geprüft, ob andere sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe das Testergebnis beeinflussen. |
| THC-Referenz | 100 µl Dronabinollösung (25 mg/ml) werden für die Durchführung des Tests verwendet (n = 1). |
| CBD-Referenz | 25 mg eines reinen CBD-Isolats (kristallin) werden in 1 ml MTC-Öl gelöst (n = 1). Es werden 100 µl für die Durchführung des Tests verwendet. |
| THC/CBD-Referenz | THC-Referenz und CBD-Referenz werden im Verhältnis 1:1 gemischt, was einer THC- bzw. CBD-Konzentration in der fertigen Prüflösung von 12,5 mg/ml entspricht. Es werden 100 µl für die Durchführung des Tests verwendet (n = 1). |

Tabelle 3: Verwendete Geräte und Reagenzien

| Geräte/Reagenzien | Hersteller / Lieferant |
|--------------------------------------|---|
| Skalierte Feindosierspritze | B. Braun |
| CannaFix-ID THC/CBD Schnelltest-Sets | Saxonia Diagnostics GmbH |
| MCT-Öl | Endima |
| Hanföl, kaltgepresst | Chiron |
| Kräutertee | Bad Heilbrunner: Anti-Stress-Tee (mit 31% Hopfenanteil) |
| Feinwaage | Sartorius |

Tabelle 4: Verwendete Reagenzien

| Referenzen | Hersteller / Lieferant | Charge | Gehalt | Verwendbar bis |
|-------------------------------------|------------------------|-----------------------|--------------|----------------|
| Dronabinollösung (Δ^9 -THC) | alpha cannabis | ACPSO30901 | 100 % (m/m) | 09/25 |
| Cannabidiol (CBD) | CannaFlos | 23N29251/003-10300024 | >98,0% (m/m) | 08/28 |

| | | |
|--|----------------------------|------------|
|  | Validierungsbericht | 19.12.2024 |
| Validierung des CannaFix-ID THC/CBD Schnelltest-Sets an der Cannabisblüte BC Green 17/1 OC | | |

Tabelle 5: Verwendete Proben

| Probenbeschreibung | Charge | Verwendbar bis |
|--------------------------------|------------------|----------------|
| Cannabisblüte BC Green 17/1 OC | BC/CMD/OC/240902 | 06/25 |

3 Methoden

Die Prüfungen werden bei Raumtemperatur (15-25°C) durchgeführt, d.h. Proben und Reagenzien haben Raumtemperatur.

Die Prüfungen sind nach dem in Abbildung 4 und 5 abgebildeten Schema durchzuführen (siehe Anhang).

Schritt 1: Probenvorbereitung

- Flasche mit Verdünner öffnen.
- Zugabe der entsprechenden Probemenge.

Schritt 2: Nachweis von CBD

- Flasche mit dem Verdünner verschließen, kurz schütteln und für ca. 5 Minuten ruhen lassen.
- Ergebnis anhand Farbskala beurteilen und mit einer Digitalkamera dokumentieren.

Schritt 3: Nachweis von THC

- Ampulle mit Reagenz öffnen.
- Zugabe von 10 Tropfen der Verdünnung (siehe Schritt 2).
- Zugabe der Entwicklerlösung.
- Mit Kappe verschließen und schütteln.
- Ergebnis anhand Farbskala beurteilen und mit einer Digitalkamera dokumentieren.

4 Eignungsprüfung Identität

Für die Eignungsprüfung der Identität des CannaFix-ID THC/CBD Schnelltest-Sets wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Ansätze verwendet. Die Durchführung und Auswertung des Tests erfolgte nach Abbildung 4 und 5.

Tabelle 6: Wirkstoffkonzentrationen für die Bestimmung der Identität

| Probe | BC Green 17/1 OC | CBD-Referenz | THC-Referenz | THC/CBD-Referenz |
|-------------------------|--|--|--|--|
| Anzahl (n) | 3 | 1 | 1 | 1 |
| Δ^9 -THC -Gehalt | 17 % | 0 mg/ml | 25 mg/ml | 12,5 mg/ml |
| CBD-Gehalt | < 1 % | 25 mg/ml | 0 mg/ml | 12,5 mg/ml |
| Probenvolumen | 20 mg | 100 μ l | 100 μ l | 100 μ l |
| Verdünner | 2 ml | 2 ml | 2 ml | 2 ml |
| Akzeptanz- kriterium | THC: positiv CBD: negativ | THC: negativ CBD: positiv | THC: positiv CBD: negativ | THC: positiv CBD: positiv |
| Ergebnis | THC: positiv CBD: negativ | THC: negativ CBD: positiv | THC: positiv CBD: negativ | THC: positiv CBD: positiv |



Abbildung 1: Foto nach Durchführung des CannaFix-ID THC/CBD Schnelltests an der Cannabisblüte BC Green 17/1 OC, CBD-Referenz, THC-Referenz und THC/CBD-Referenz.

Die Cannabisblüte BC Green 17/1 OC wies in der ersten Stufe des Farbttest eine leicht grün-gelbliche Färbung auf. Dieser unterscheidet sich deutlich von den verwendeten Referenzen und stammt aus coextrahiertem Chlorophyll bzw. anderen Pflanzeninhaltsstoffen. In der zweiten Stufe des Farbttests, nach der Reaktion des Verdünner-Extraktes mit der Farbreagenz und dem Entwickler, ergab sich ein violetter Farbumschlag.

Die Farbumschläge aller weiteren untersuchten Substanzen entsprachen der in Tabelle 1 erwarteten Ergebnisse und der in Abbildung 5 dargestellten Farbskala. Somit erfüllte der Tests für die Cannabisblüte BC Green 17/1 OC und alle verwendeten Referenzen die Akzeptanzkriterien. Die Eignungsprüfung der Identität gilt als bestanden.

5 Spezifität

Für die Ermittlung der Spezifität des CannaFix-ID THC/CBD Schnelltest-Sets wurden folgende Proben (je n = 1) verwendet: Reagenzien-Blank, kaltgepresstes Hanföl (Spezifitätskontrolle I), MCT-Öl (Spezifitätskontrolle II) und Kräutertee mit Hopfenanteil (Spezifitätskontrolle III). Die genauen Spezifikationen sind Tabelle 2 und 7 zu entnehmen. Die Durchführung des Tests erfolgte nach Abb. 4 und 5.

Tabelle 7: Kontrollen für die Bestimmung der Spezifität

| Probe | Reagenzien-Blank | Spezifitätskontrolle I (Hanföl) | Spezifitätskontrolle II (MCT-Öl) | Spezifitätskontrolle III (Kräutertee) |
|-------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| Anzahl (n) | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Δ^9 -THC -Gehalt | 0 mg/ml | 0 mg/ml | 0 mg/ml | 0 mg/ml |
| CBD-Gehalt | 0 mg/ml | 0 mg/ml | 0 mg/ml | 0 mg/ml |
| Probenvolumen | - | 100 μ l | 100 μ l | 25 mg |
| Verdünner | 2 ml | 2 ml | 2 ml | 2 ml |
| Akzeptanzkriterium | THC: negativ CBD: negativ | THC: negativ CBD: negativ | THC: negativ CBD: negativ | THC: negativ CBD: negativ |
| Ergebnis | THC: negativ CBD: negativ | THC: negativ CBD: negativ | THC: negativ CBD: negativ | THC: negativ CBD: negativ |

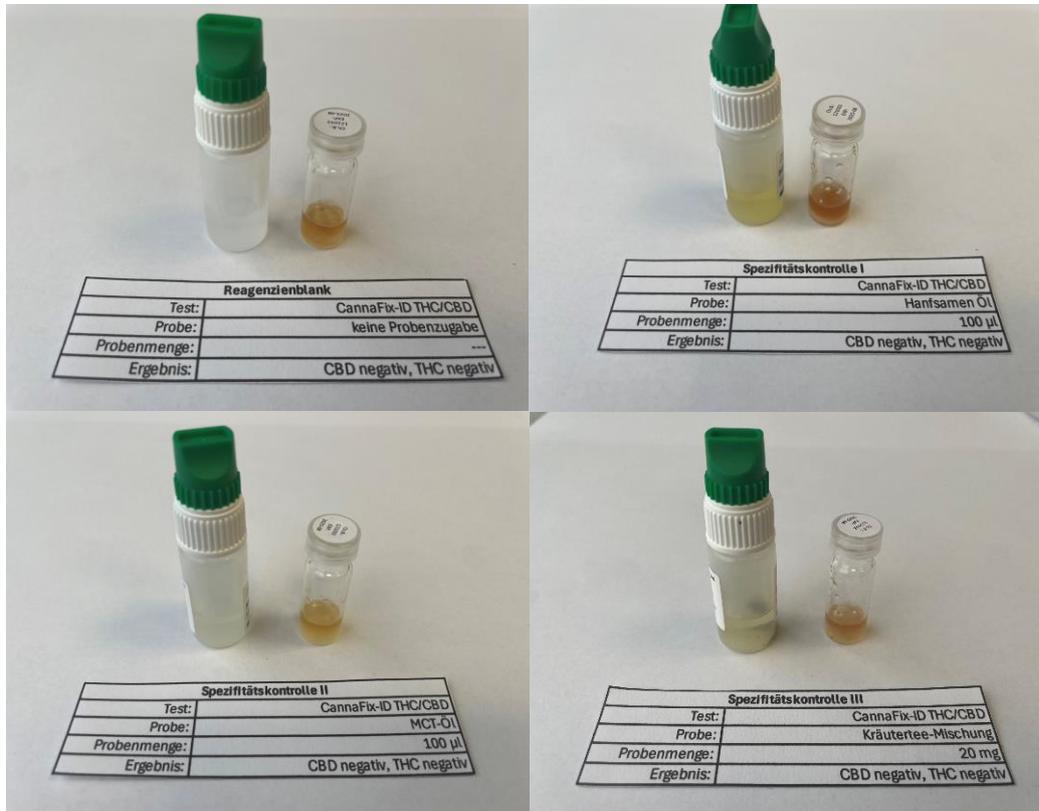


Abbildung 2: Fotos nach Durchführung des CannaFix-ID THC/CBD Schnelltest-Sets mit Reagenzien-Blank und Spezifitätskontrollen I – III.

Die Tests am Reagenzien-Blank, sowie den Spezifitätskontrollen I - III ergaben das erwartete Ergebnis (vgl. Abbildung 2 und 5). Im ersten Schritt ergab sich kein Farbumschlag. Lediglich das verwendete Hanföl bewirkte durch die intensive Eigenfärbung eine gelbliche Färbung des Verdünners, die sich jedoch eindeutig von den Referenzsubstanzen unterschied. Auch im zweiten Schritt ergab sich kein Farbumschlag. Alle Ergebnisse entsprachen somit der in Tabelle 1 dargestellten Erwartungshaltung und zeigten sich sowohl CBD-, als auch THC-negativ. Eine Kreuzreaktion mit sekundären Pflanzeninhaltsstoffen oder Matrixeffekte werden somit ausgeschlossen. Damit werden alle Akzeptanzkriterien erfüllt und die Spezifität des Tests ist gewährleistet.

6 Robustheit

Es ist denkbar, dass in Praxis das Probenvolumen bzw. Einwaage etwas variiert oder nicht exakt eingehalten wird. Die nachfolgenden Experimente wurden durchgeführt, um sicherzustellen, dass die Methode für diese Variation robust genug ist. Für die Ermittlung der Robustheit des CannaFix-ID THC/CBD Schnelltest-Sets wurde die Cannabisblüte BC Green 17/1 OC bei verschiedenen Einwaagen, wie in Tabelle 8 beschrieben, getestet (75 %, 100 %, 125%).

Tabelle 8: Probenmengen für die Bestimmung der Robustheit

| Probe | BC Green 17/1 OC | BC Green 17/1 OC | BC Green 17/1 OC |
|-------------------------|--------------------------------------|---|--------------------------------------|
| Anzahl (n) | 1 | Ergebnisse der Eignungsprüfung gelten hier ebenfalls. 20 mg | 1 |
| Δ^9 -THC -Gehalt | 17 % | | 17 % |
| CBD-Gehalt | < 1 % | | < 1 % |
| Probenvolumen | 15 mg | | 25 mg |
| Verdünner | 2 ml | | 2 ml |
| Anzahl | n = 1 | | n = 1 |
| Akzeptanzkriterium | THC: positiv CBD: negativ | THC: positiv CBD: negativ | THC: positiv CBD: negativ |
| Ergebnis | THC: positiv CBD: negativ | THC: positiv CBD: negativ | THC: positiv CBD: negativ |

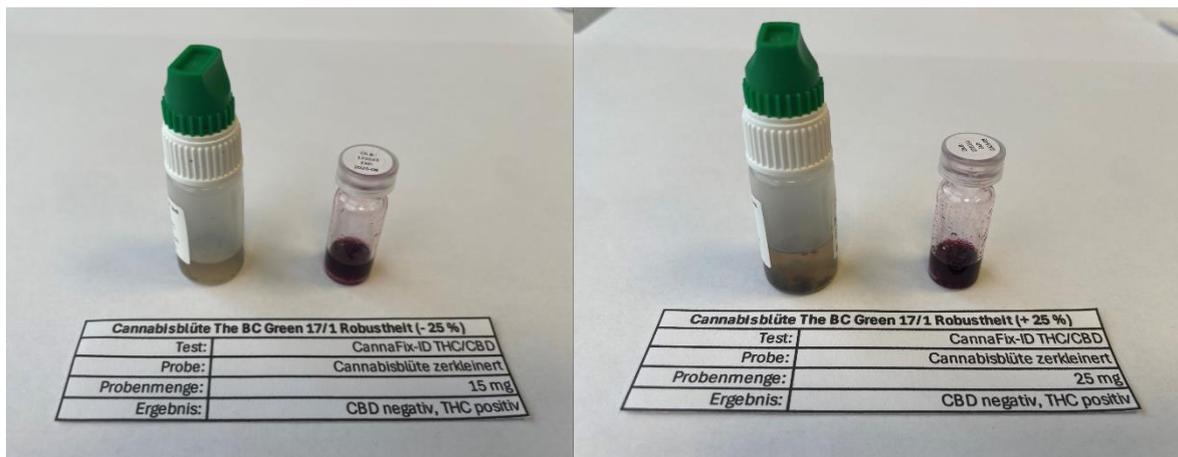


Abbildung 3: Fotos nach Durchführung des CannaFix-ID THC/CBD Schnelltest-Sets mit der Cannabisblüte BC Green 17/1 OC bei unterschiedlichen Einwaagen (Einwaage: 15 mg und 25 mg).

Die Cannabisblüte BC Green 17/1 OC wies bei abweichendem Probenvolumen eine leicht grün-gelbliche Färbung auf. Diese unterscheidet sich jedoch deutlich von den verwendeten Referenzen. In der zweiten Stufe des Farbtests, nach der Reaktion des Verdünner-Extraktes mit der Farbreagenz und dem Entwickler, ergab sich ein violetter Farbumschlag. Demnach erfüllte die Cannabisblüte BC Green 17/1 OC auch bei einem Probenvolumen von 15 mg und 25 mg die Akzeptanzkriterien. Die Robustheit des Tests ist sichergestellt.

7 Zusammenfassung und Bewertung

Das CannaFix-ID THC/CBD Schnelltest-Set wurde für die Bestimmung von THC und CBD in der Cannabisblüte BC Green 17/1 OC in vollem Umfang validiert. Die Validierungsparameter der Eignungsprüfung der Identität, Spezifität und Robustheit wurden alle erfüllt. Daher eignet sich das CannaFix-ID THC/CBD Schnelltest-Set zur alternativen Identitätsfeststellung in der Cannabisblüte BC Green 17/1 OC.

8 Historie

| Datum | Version | Bemerkungen | Signatur |
|------------|---------|---------------|----------|
| 19.12.2024 | 01 | Erste Version | SF |

Labor:

Saxonia Diagnostics GmbH

Praterschütz, 19.12.2024

Natalie Andrich

(Leitung der Qualitätssicherung)

Dr. Stefanie Fröhlich

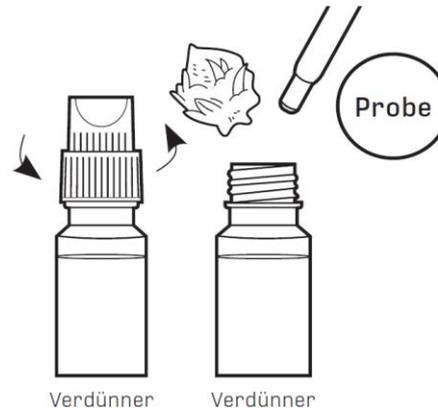
(Leitung Labor)

9 Anhang

So einfach geht's:

1 Probenzugabe

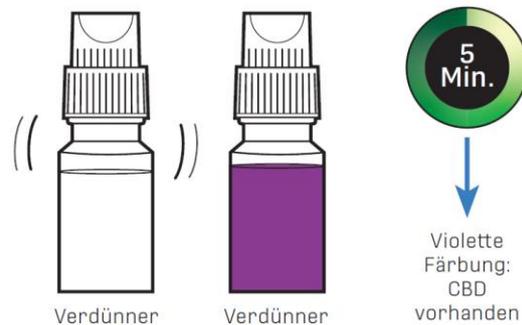
- Flasche mit Verdünner öffnen
- Zugabe der zu prüfenden Rezeptur:
Cannabisextrakt: 0,1 ml*
Cannabisblüte: 20 mg
Dronabinol: 5 mg
Cannabidiol: 5 mg



*Bei einer THC-Konzentration von > 50 mg/ml ist der Einsatz eines geringeren Probenvolumens oder eine Vorverdünnung des zu testenden Extrakts in MCT-Öl notwendig, so dass die zu identifizierende Substanz in einem Konzentrationsbereich von ca. 25-50 mg/ml vor Testdurchführung vorliegt.

2 Nachweis von CBD

- Flasche mit Verdünner verschließen, kräftig schütteln und für ca. 5 Minuten ruhen lassen
- Ergebnis mit Farbskala beurteilen



3 Nachweis von THC

- Phiolen mit Reagenz öffnen
- Zugabe von 10 Tropfen des Verdünners
- Zugabe von 5 Tropfen des Entwicklers
- Verschließen und schütteln
- Ergebnis mittels Farbskala beurteilen

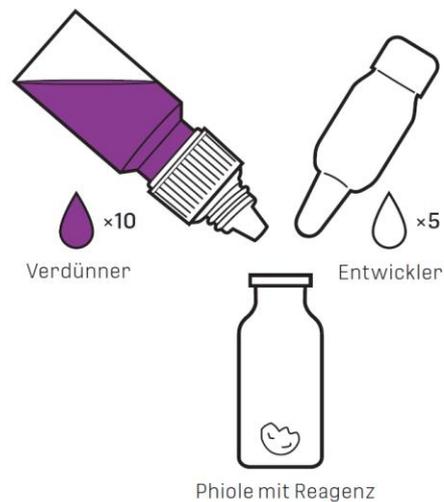


Abbildung 4: Handhabung des CannaFix-ID THC/CBD Schnelltest-Sets (Schritt 1 & 2, Verdünner)

Ergebnis ablesen

| | Verdüner  | Reagenz  |
|--------------|--|---|
| KEIN THC/CBD |  |  |
| THC |  |  |
| THC & CBD |  |  |
| CBD |  |  |

CBD/THC-Farbskala

Dieser 2-stufige Farbttest nutzt die strukturellen Unterschiede von CBD und Δ^9 -THC aus. In der ersten Stufe wird bei Anwesenheit von CBD eine violette Farbe angezeigt. Die in der zweiten Stufe gebildeten Farben sind Kupplungsprodukte und abhängig von Δ^9 -THC sowie CBD:

- THC-dominante Ausgangsstoffe verursachen einen dunkelvioletten Farbumschlag.
- Liegen sowohl THC als auch CBD vor, entsteht eine Mischfarbe, die je nach Mischungsverhältnis mehr in die eine oder andere Richtung ausschlägt.
- CBD-dominante Ausgangsstoffe sorgen für einen orangen Farbumschlag.

Grundsätzlich gilt: Die Intensität der Farben kann je nach Ausgangsprobe und THC/CBD-Gehalt stärker oder schwächer ausfallen. Bei sehr niedrigen Wirkstoffkonzentrationen von ≤ 1 mg/ml in Cannabisextrakten oder 1% in Cannabisblüten ist kein erkennbarer Farbumschlag zu erwarten.

Die Eigenfarbe des Cannabisextraktes bzw. co-extrahiertes Chlorophyll (bei Cannabisblüten) kann im ersten Schritt zu einer nicht wirkstoffbedingten, gelb/grünen Einfärbung des Verdünners führen. Bei der Anwesenheit von CBD entwickelt sich ein zusätzlicher violetter Farbton.

Abbildung 5: Farbskala der Stufe 1 und 2 des CannaFix-ID THC/CBD Schnelltest-Sets