

Kurzbericht Validierung (V076-22-05)

Gehaltsbestimmung von Psilocybin in diversen getrockneten Pilzbestandteilen
sowie Extrakten mittels PSILO-QTest Schnelltest-Set

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--------------------------------------|---|
| Einführung | 2 |
| Zusammenfassung | 3 |
| Akzeptanzkriterien und Prüfparameter | 3 |
| Methoden | 4 |
| Ergebnisse | 5 |
| Bewertung | 7 |

Einführung

Der Wirkstoffgehalt von Psilocybin in organischen Materialien unterliegt großen natürlichen Schwankungen zwischen den inzwischen mehreren hundert Pilzarten, natürlichen Standortbedingungen sowie zwischen verschiedenen Entwicklungsstadien. Selbst zwischen den unterschiedlichen Pilzbestandteilen eines Fruchtkörpers können erhebliche Schwankungen festgestellt werden, und sogar unter standardisierten Laborbedingungen gezüchtete Pilze unterliegen großen Abweichungen in ihrem Wirkstoffgehalt.

Mit dem neuen PSILO-QTestverfahren kann innerhalb von 30 Minuten die Konzentration des Wirkstoffes Psilocybin analysiert werden, es ist damit der weltweit erste und einzige Schnelltest. Die Grundlage für die Funktionsweise liegt in einer durch uns entwickelten linearen colorimetrischen chemischen Reaktion von Psilocybin mit der Nachweisreagenz. Dies liefert die Grundlage für die ersten quantitativen-Tests (QTests) für unterschiedlichste Wirkstoffe. Mittels beiliegender Farbkarte können die Tests auch einfach mit dem Auge ausgewertet werden und korrekt ausgeführte Tests weisen dabei nachweislich nicht mehr als 10 % Abweichungen zu im Labor durchgeführten (U)HPLC-MS Messungen auf.

Es handelt sich um ein freiwillig validiertes und standardisiertes Testverfahren auf Grundlage der pharmazeutischen Methodenvalidierungsrichtlinie ICH Q2(R1), welche wir auf die QTests ausgeweitet haben. Jene Richtlinie beschreibt die Anforderung der Analyseverfahren für Wirkstoffe welche nachfolgend humanmedizinisch eingesetzt werden sollen, und garantiert eine sichere Dosierung dieser Wirkstoffe zum Beispiel in Apotheken.

Der PSILO-QTest wurde an der Friedrich-Schiller-Universität Jena am Institut für Pharmazie, Lehrstuhl für pharmazeutische Mikrobiologie, unter dem Förderkennzeichen 03EGSTH1189, unterstützt vom deutschen Bundesministerium für Wirtschaft und Klimaschutz sowie den Europäischen Sozialfonds, im Zuge des Drittmittelprojektes "Herstellung von quantitativen Testsystemen psychotroper Wirkstoffe" im Zeitraum von 2019 bis 2021 unter der Projektleitung von Herrn Dr. Felix Blei entwickelt. Die notwendige Erlaubnis für den Umgang und den Erwerb der Betäubungsmittel Psilocybin/Psilocin nach § 3 des deutschen Betäubungsmittelgesetzes wurde für die Friedrich-Schiller-Universität Jena unter der aktuellen BtM-Nummer 463 23 75 sowie vorherige für die Betriebsstätte der Pharmazeutische Mikrobiologie in Jena erteilt. Die für das Projekt benötigten Reinstoffe wurden von der LIPOMED GmbH sowie LGC Standards Ltd bezogen.

Zusammenfassung

Dieser Auszug aus der Validierung fasst die Ergebnisse des quantitativen Testverfahrens zur Konzentrationsbestimmung von Psilocybin in organischen Materialien oder Extrakten zusammen. Ziel der Validierung ist der Nachweis über die Eignung des PSILO-QTests als Schnelltest zur Konzentrationsbestimmung von Psilocybin in getrockneten Pilzbestandteilen oder Extrakten. Bei dem Testsystem handelt es sich um eine Extraktion mit einer anschließenden Bestimmung der Konzentration mittels Farbstest.

Akzeptanzkriterien und Prüfparameter

| Parameter | Beschreibung und Erwartungswerte | Akzeptanzkriterien |
|--|---|--|
| Eignungsprüfung der Methode der quantitativen Messung von Psilocybin (Linearität) | <p><u>Verdünnungsreihe mit Psilocybin Referenz: Stammlösung Psilocybin 1mg/ml (in Extraktionslösung)</u></p> <p>aufsteigende Konzentrationen von 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 µg PSB je Reaktionsansatz sorgen für ansteigende Farbtintensitäten, messbar im Spektralphotometer durch OD bei 590nm</p> | <p><u>Verdünnungsreihe mit Psilocybin Referenz: Stammlösung Psilocybin 1mg/ml (in Extraktionslösung) n=6</u></p> <p>Lineare Reaktion mit minimalen oder höheren Pearson-Korrelationskoeffizienten R von 0,95</p> |
| Richtigkeit der Methode | <p><u>Probe: <i>Psilocybe cubensis</i> Myzel</u> Alkaloidgehalt von 1% PSB</p> <p><u>Probe: <i>Psilocybe cubensis</i> Myzel</u> Alkaloidgehalt von 0,3 % PSB</p> <p><u>Probe: <i>Psilocybe cubensis</i> Fruchtkörper</u> Alkaloidgehalt von 1,6 % PSB</p> <p><u>Probe: <i>Psilocybe tampanensis</i> Pseudosclerotien</u> Alkaloidgehalt von 0,4 % PSB</p> | <p><u>Probe: <i>Psilocybe cubensis</i> Myzel (n=3)</u> Alkaloidwerte von 0,9 - 1,1 % PSB</p> <p><u>Probe: <i>Psilocybe cubensis</i> Myzel (n=3)</u> Alkaloidwerte von 0,27 - 0,33 % PSB</p> <p><u>Probe: <i>Psilocybe cubensis</i> Fruchtkörper (n=3)</u> Alkaloidwerte von 1,44 - 1,76 % PSB</p> <p><u>Probe: <i>Psilocybe tampanensis</i> Pseudosclerotien (n=3)</u> Alkaloidwerte von 0,36 - 0,44 % PSB</p> |
| Spezifität der Methode | <p><u>Reagenzienblank</u> Extraktionslösung in Nachweisreagenz wird inkubiert</p> | <p><u>Reagenzienblank (n=3)</u> Konzentration PSB: Kein PSB nachweisbar</p> |
| Präzision der Methode | <p><u>Wiederholpräzision</u> Vermessen der 8 Konzentrationen der Verdünnungsreihe im Plattenlesegerät 3-mal hintereinander, Ermittlung der Standardabweichung</p> <p><u>Interne Laborpräzision</u> Vermessen der 8 Konzentrationen der Verdünnungsreihe im Plattenlesegerät an 2 unterschiedlichen Tagen durch unterschiedliche Analyten</p> <p>Vermessen der gleichen Verdünnungsreihe an einem anderen Spektralphotometer</p> | <p><u>Wiederholpräzision</u> Keine signifikante Standardabweichung bei mindestens 3 Konzentrationen x 3 Replikaten</p> <p><u>Interne Laborpräzision</u> Keine signifikante Standardabweichung bei Vermessung durch zweiten Analyten</p> <p>Ebenso lineare Kurvenverlauf bei Messung an zweiten Spektralphotometer</p> |
| Nachweis und Bestimmungsgrenzen | <p><u>Bestimmungsgrenze LOQ durch visuelle Prüfung</u> Ansätze mit 0,02 mg - 0,04 mg - 0,08 mg - 0,16 mg PSB</p> | <p><u>Bestimmungsgrenze LOQ durch visuelle Prüfung (n=3)</u> Präzision und Richtigkeit gewährleistet bei niedrigstem Punkt der Farbauswertungsskala (2mg PSB/g Substanz)</p> |

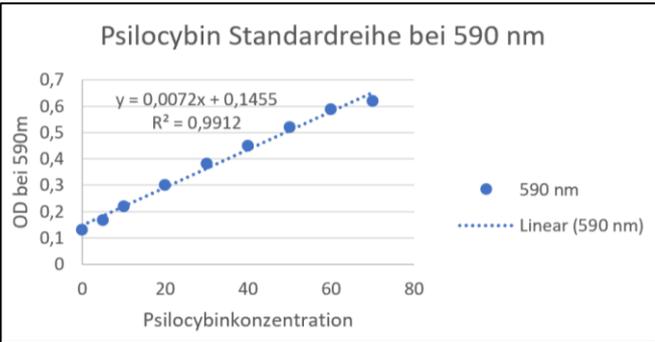
| | | |
|--|---|--|
| Arbeitsbereich des Testverfahrens | <u>Standardkurve</u> Die durchgeführten Experimente zur Linearität des Messverfahrens definieren den Arbeitsbereich, erwartungsgemäß liegt der Arbeitsbereich aufgrund der Farbauswertungsskala von 2 - 24 mg PSB je Gramm Substanzprobe | <u>Standardkurve</u> Für die Methode der Bestimmung der Gleichförmigkeit des Gehalts sollte der Arbeitsbereich normalerweise 70 % bis 130 % der Testkonzentration abdecken |
| Robustheit des Testverfahrens | <u>Variation der Inkubationszeit bei Färbung</u> <u>Nur grob zerkleinerte Substanzprobe</u> <u>Variation Extraktionszeit</u> | <u>Variation der Inkubationszeit bei Färbung</u> gleiche Färbung bei Verdopplung der Inkubationszeit <u>Nur grob zerkleinerte Substanzprobe</u> gleiche Färbung, wenn Probenmaterial lediglich mit Schere zerkleinert ist <u>Variation Extraktionszeit</u> gleiche Färbung bei verdoppelter Extraktionszeit |

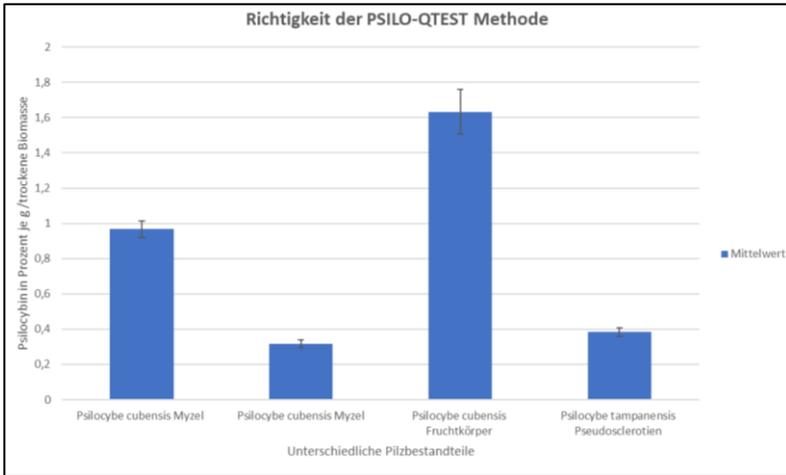
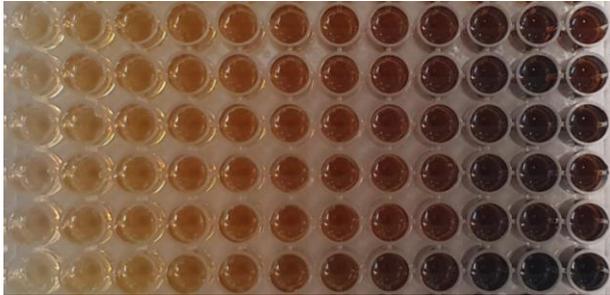
Methoden

Sämtliche Messungen wurden bei Raumtemperatur (21 °C) durchgeführt, d.h. Proben und Reagenzien hatten eine ebenso entsprechende Raumtemperatur. Die Prüfungen sind gemäß der Schnelltest-Set beiliegenden Anleitung durchgeführt, entsprechende Abweichung in den Methoden gekennzeichnet.

| Probe | <u>Verdünnungsreihe mit Psilocybin</u> <u>Referenz:</u> <u>Stammlösung</u> <u>Psilocybin 1mg/ml</u> <u>(in Extraktionslösung)</u> | <u>unterschiedliche Pilzbestandteile mit unterschiedlichen PSB Konzentrationen</u> | <u>Reagenzienblank</u> | <u>Bestimmungsgrenze LOQ durch visuelle Prüfung</u> |
|---------------------------|---|---|----------------------------------|--|
| PSB Gehalt | 5 µg PSB 10 µg PSB 20 µg PSB 30 µg PSB 40 µg PSB 50 µg PSB 60 µg PSB 70 µg PSB | <i>Psilocybe cubensis</i> Myzel Alkaloidgehalt von 1% PSB <i>Psilocybe cubensis</i> Myzel Alkaloidgehalt von 0,3 % PSB <i>Psilocybe cubensis</i> Fruchtkörper Alkaloidgehalt von 1,6 % PSB <i>Psilocybe tampanensis</i> Pseudosclerotien Alkaloidgehalt von 0,4 % PSB | 0 mg/ml PSB in Extraktionslösung | 0,02 mg/g PSB in Extraktionslösung 0,04 mg/g PSB in Extraktionslösung 0,08 mg/g PSB in Extraktionslösung 0,16 mg/g PSB in Extraktionslösung |
| Probenmenge | 70 µl | 150 mg | 150 mg | 1 ml |
| Extraktionsvolumen | ad 70 µl | 4 ml | 4 ml | 1 ml |
| Nachweislösung | 330 µl | 3 ml | 3 ml | 3 ml |
| Anzahl | n = 6 | n = 3 | n = 1 | n = 1 |

Ergebnisse

| Probenname | Ergebnis | Validierungsergebnis | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|---|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------|-------|---------------------------------|-----------------------|-------|--|-----------------------|-----|---|-----------------------|-------|-------------------------------------|
| <p><u>Verdünnungsreihe mit Psilocybin</u> <u>Referenz:</u> <u>Stammlösung</u> <u>Psilocybin 1mg/ml</u> <u>(in</u> <u>Extraktionslösung)</u></p> | <p>Die Vermessung mit Spektralphotometer zeigte eine ausgesprochen lineare chemische Reaktion mit Pearson-Korrelationskoeffizienten R von 0,99. Dies liegt sehr nah an einem perfekten Ergebnis und ist absolut im Bereich der Akzeptanzkriterien der Validierung.</p> <p>Standardreihe mit PSB Standard:</p>  <p>Standardkurve mit Ausgleichsgerade zur Ermittlung des Korrelationskoeffizienten:</p>  | <p>Validierung bestanden</p> | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p><u>unterschiedliche Pilzbestandteile</u> <u>mit</u> <u>unterschiedlichen PSB</u> <u>Konzentrationen</u></p> | <p>Für die vier unterschiedlichen Pilzproben welche vorher mittels Referenzsubstanz an der HPLC auf ihren Psilocybingehalt vermessen wurden, erfolgte parallel durch 3 unterschiedliche Wissenschaftler (Analyten) eine optische Auswertung mittels beiliegender Farbkarte entsprechend der Anleitung.</p> <table border="1" data-bbox="443 1339 1168 1780"> <thead> <tr> <th>Substanzprobe</th> <th>Ergebnis mittels HPLC Standardkurve</th> <th>Abweichung in Prozent zur HPLC</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>Psilocybe cubensis</i> Myzel</td> <td>Mittelwert: 1 % PSB</td> <td>3,3 %</td> </tr> <tr> <td><i>Psilocybe cubensis</i> Myzel</td> <td>Mittelwert: 0,3 % PSB</td> <td>5,3 %</td> </tr> <tr> <td><i>Psilocybe cubensis</i> Fruchtkörper</td> <td>Mittelwert: 1,6 % PSB</td> <td>2 %</td> </tr> <tr> <td><i>Psilocybe tampanensis</i> Pseudosclerotien</td> <td>Mittelwert: 0,4 % PSB</td> <td>4,2 %</td> </tr> </tbody> </table> | Substanzprobe | Ergebnis mittels HPLC Standardkurve | Abweichung in Prozent zur HPLC | <i>Psilocybe cubensis</i> Myzel | Mittelwert: 1 % PSB | 3,3 % | <i>Psilocybe cubensis</i> Myzel | Mittelwert: 0,3 % PSB | 5,3 % | <i>Psilocybe cubensis</i> Fruchtkörper | Mittelwert: 1,6 % PSB | 2 % | <i>Psilocybe tampanensis</i> Pseudosclerotien | Mittelwert: 0,4 % PSB | 4,2 % | <p>Validierung bestanden</p> |
| Substanzprobe | Ergebnis mittels HPLC Standardkurve | Abweichung in Prozent zur HPLC | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Psilocybe cubensis</i> Myzel | Mittelwert: 1 % PSB | 3,3 % | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Psilocybe cubensis</i> Myzel | Mittelwert: 0,3 % PSB | 5,3 % | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Psilocybe cubensis</i> Fruchtkörper | Mittelwert: 1,6 % PSB | 2 % | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Psilocybe tampanensis</i> Pseudosclerotien | Mittelwert: 0,4 % PSB | 4,2 % | | | | | | | | | | | | | | | |

| | | |
|-------------------------------------|---|-------------------------------------|
| | <p>An der HPLC sowie mit dem Auge vermessene Substanzproben (von links nach rechts): <i>Psilocybe cubensis</i> Myzel mit 1 % PSB, <i>Psilocybe cubensis</i> Myzel mit 0,3 % PSB, <i>Psilocybe cubensis</i> Fruchtkörper mit 1,6 % PSB, <i>Psilocybe tampanensis</i> Pseudosclerotien ("Trüffel") mit 0,4 % PSB</p>   | |
| <p><u>Präzision der Methode</u></p> | <p>In der Wiederholpräzision sowie der internen Laborpräzision wurden selbst bei der Anfertigung von Sextuplikaten keine relevanten oder statistisch signifikanten Abweichungen festgestellt, und selbst bei einer Einzelmessung mittels Küvetten konnte ein linearer Kurvenverlauf identisch zur Standardkurve nachgewiesen werden</p>  | <p>Validierung bestanden</p> |
| <p><u>Reagenzienblank</u></p> | <p>Ergebnis: Kein Psilocybin detektierbar, weder optisch mit dem Auge noch durch Vermessen am Spektralphotometer</p> | <p>Validierung bestanden</p> |

| | | |
|---|---|------------------------------|
| <u>Bestimmungsgrenze LOQ durch visuelle Prüfung</u> | <p>Zur Analyse der quantitativen Bestimmungsgrenze wurden Proben mit sehr geringen Wirkstoffgehalten vermessen. Angefangen (von links nach rechts): 0,02 %, 0,04 %, 0,08 %, 0,16 % sowie 0,2 % Psilocybin. Selbst in der geringsten Konzentration war im Vergleich mit dem Reagenzienblank bereits mit dem Auge eine Verfärbung erkennbar (auf dem Foto nicht abgebildet). Durch die Vermessung des Referenzstandards wissen wir, dass das Messverfahren in diesen Bereichen bereits lineare Ergebnisse liefert. Also selbst deutlich unter dem angegebenen Messbereich liefert der PSILO-QTest bereits valide Ergebnisse:</p>  | Validierung bestanden |
| Arbeitsbereich des Testverfahrens | <p>Durch Vermessen der Standardreihe mit dem Spektralphotometer konnte der lineare Bereich des Messverfahrens genau charakterisiert werden, dieser liegt weit über dem Arbeitsbereich des Messverfahrens. Auch beim optischen Vergleich zeigten sich die Probanden in der Lage Proben im gesamten Arbeitsbereich präzise zu analysieren (0,2 % - 2,4%). In diesem Bereich liegen auch die natürlich vorkommenden Wirkstoffwerte der Psilocybin enthaltenen Pilze. Nur wenige Züchtungen weisen deutlich höhere Werte auf. Hier konnten aber durch Halbierung der Biomasse und anschließende Hochrechnung wieder valide Ergebnisse erhalten werden.</p> | Validierung bestanden |
| Robustheit des Testverfahrens | <p>Die Variation der Inkubationszeit im Wasserbad wurde verdoppelt, es zeigte sich im Vergleich keine signifikanten Unterschiede in der Färbung.</p> <p>Nur grob zerkleinerte Substanzproben ließen sich sogar wesentlich schneller mit dem beiliegenden Sterifilter aufziehen, und zeigten die gleiche Farbintensität wie die gleiche aber sehr fein gemahlene Biomasse.</p> <p>Eine Verdopplung der Extraktionszeit zeigte ebenso keinerlei signifikante Änderungen in der angezeigten Wirkstoffkonzentration</p> | Validierung bestanden |

Bewertung

Der geprüfte PSILO-QTest von miraculix ist zur Quantifizierung von Psilocybin in diversen Pilzbestandteilen sicher geeignet. Die Experimente haben den linearen Zusammenhang der optischen Dichte in Abhängigkeit von der vorliegenden Psilocybinkonzentration im gesamten Messbereich gezeigt. Die Ergebnisse sind direkt proportional zur vorliegenden Konzentration in der Probe und entsprechen daher den notwendigen Validierungsrichtlinien. Es zeigten sich maximal 5 % Abweichungen bei der Psilocybinkonzentration der mit dem Auge auszuwertenden Proben im Vergleich zu dem mit der HPLC vermessenen reellen Werten, was deutlich unter den angegebenen 10 % Abweichungen liegt. Die Analysen wurden an unterschiedlichen Tagen und durch unterschiedliche Analyten durchgeführt, und erwiesen sich in diesen Experimenten als absolut präzise. Es handelt sich um ein durchaus robustes Testverfahren, welches selbst bei Verlängerung der Inkubations- oder Extraktionszeiten oder bei nur grob zerkleinerter Biomasse absolut verlässliche Messergebnisse liefert. Auffallend sind auch die sehr geringen Nachweisgrenzen, bereits ab 200 ng Wirkstoffgehalt zeigte sich eine signifikant detektierbare Verfärbung der Nachweisreagenz. Der Arbeitsbereich des Testverfahrens liegt aufgrund der beiliegenden Farbkarte zur Auswertung zwischen 0,2 % - 2,4 %, damit deckt der Arbeitsbereich den Großteil der natürlich vorkommenden Wirkstoffwerte ab und die Validierung bestätigt eine sichere Quantifizierung in diesem Arbeitsbereich.

Das PSILO-QTestverfahren hat sich in der Validierung als einfach in der Handhabung und Durchführung sowie schnell und sicher in der Auswertung gezeigt. Es wurden alle Akzeptanzkriterien des Validierungsplanes eingehalten. Das Verfahren ist für die Konzentrationsbestimmung von Psilocybin in unterschiedlichen Pilzmaterialien sicher geeignet.