

# **Die Bedeutung von Markersubstanzen für die Qualität und Entwicklung von Phytopharmaka**

**DPhG Jahrestagung  
Marburg, 4. Oktober 2006**

**Dr. Hartwig Sievers**

**PhytoLab GmbH & Co. KG, Vestenbergsgreuth**

# Gliederung

- Regulatorische Anforderungen
- Marker und Qualität
- Produktentwicklung:
  - Auswahl und Spezifikation des Wirkstoffs
  - systematische Markerauswahl
  - Arzneibuch-Monographien und Markerauswahl
  - Produktprofilierung und IP-Schutz
- Praxisbeispiele – Probleme und Lösungsansätze

# Regulatorische Anforderungen

## ICH Guidelines Q2A und Q2B zur Validierung:

NOTE FOR GUIDANCE ON VALIDATION OF ANALYTICAL METHODS:  
DEFINITIONS AND TERMINOLOGY (**CPMP/ICH/381/95**)

NOTE FOR GUIDANCE ON VALIDATION OF ANALYTICAL METHODS:  
METHODOLOGY (**CPMP/ICH/281/95**)

## ICH Guideline Q7A zu GMP:

NOTE FOR GUIDANCE ON GOOD MANUFACTURING PRACTICE  
FOR ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENTS (**CPMP/ICH/4106/00**,  
Glossary: Reference Standard)

# Regulatorische Anforderungen

NOTE FOR GUIDANCE ON QUALITY OF HERBAL MEDICINAL PRODUCTS / TRADITIONAL HERBAL MEDICINAL PRODUCTS  
(**CPMP/QWP/2819/00 Rev 1**)

GUIDELINE ON SPECIFICATIONS: TEST PROCEDURES AND ACCEPTANCE CRITERIA FOR HERBAL SUBSTANCES, HERBAL PREPARATIONS AND HERBAL MEDICINAL PRODUCTS / TRADITIONAL HERBAL MEDICINAL PRODUCTS  
(**CPMP/QWP/2820/00 Rev 1**)

COMPILATION OF GENERAL QUALITY QUESTIONS ADDRESSED BY THE HMPWP (**EMA/18123/00/Rev 5**)

# Regulatorische Anforderungen

NfG on Quality of Herbal Medicinal Products/ Traditional Herbal Medicinal Products (CPMP/QWP/2819/00 Rev 1)

## Herbal substance

“In the case of herbal substances with constituents of known therapeutic activity, assays of their content are required ...

...where constituents of known therapeutic activity are not known, **assays of marker substances** are required. The choice of markers should be justified.“

# Regulatorische Anforderungen

NfG on Quality of Herbal Medicinal Products/ Traditional Herbal Medicinal Products (CPMP/QWP/2819/00 Rev 1)

## **Herbal preparation**

“A quantitative assay of markers or of substances with known therapeutic activity is also required. The content should be indicated with the lowest possible tolerance (the narrowest possible tolerance with both upper and lower limits stated).

# Regulatorische Anforderungen

NfG on Quality of Herbal Medicinal Products/ Traditional Herbal Medicinal Products (CPMP/QWP/2819/00 Rev 1)

## Finished product

“The control tests on the finished product should allow the **qualitative and quantitative determination** of the composition of the active substance(s). A specification should be provided and this may include **the use of markers** where constituents with known therapeutic activity are unknown.

# Regulatorische Anforderungen

NfG on Quality of Herbal Medicinal Products/ Traditional Herbal Medicinal Products (CPMP/QWP/2819/00 Rev 1)

## Finished product

...If a herbal medicinal product contains a combination of several herbal substances or preparations of several herbal substances, and if it is not possible to perform a quantitative determination of each active substance, **the determination may be carried out jointly for several active substances**. The need for this procedure should be justified.

➤ **wichtig für Kombinationen**

# Regulatorische Anforderungen

Guideline on Specifications: ... (CPMP/QWP/2820/00 Rev 1)

## Herbal substances

“**Assay**: In the case of herbal substances with constituents of known therapeutic activity or with **active markers**, assays of their content are required with details of the analytical procedure. Where possible, a specific, stability-indicating procedure should be included...

# Regulatorische Anforderungen

Guideline on Specifications: ... (CPMP/QWP/2820/00 Rev 1)

## Herbal substances

### “Assay:

... In the case of herbal substances where the constituents responsible for the therapeutic activity are unknown assays of analytical markers or other justified determinations are required.

The appropriateness of the choice of markers should be justified.

**For example, reference to the assay of a marker in the relevant monograph of the European Pharmacopoeia is an appropriate justification.**

# Regulatorische Anforderungen

Guideline on Specifications: ... (CPMP/QWP/2820/00 Rev 1)

## Herbal preparations

### Assay:

... In the case of herbal preparations where constituents of known therapeutic activity or active markers are not known, assays of analytical markers or other justified determinations are required.

**The appropriateness of the choice of marker should be justified.**

# Regulatorische Anforderungen

Guideline on Specifications: ... (CPMP/QWP/2820/00 Rev 1)

## Herbal medicinal products

### Assay:

“In the case of products containing herbal substances and/or herbal preparations with constituents of known therapeutic activity, validated assays of the content of these constituents are required along with details of the analytical procedure(s). ... In the case of herbal medicinal products containing herbal substance(s) and/or herbal preparation(s) where the constituents responsible for the therapeutic activity are not known, **validated assays of marker substances or other justified determinations** are required.

# Regulatorische Anforderungen

Guideline on Specifications: ... (CPMP/QWP/2820/00 Rev 1)

## Herbal medicinal products

### Assay:

“In cases where a specific assay of each active substance of a herbal medicinal product is not possible other justified determinations are required (for example, in **multi-component traditional herbal medicinal products** for human use identical marker substances or minerals may be present in more than one herbal substance/preparation).”

# Regulatorische Anforderungen

## HMPs containing exclusively herbal substances (z.B. Tee)

For herbal medicinal products consisting of one herbal substance without any excipients, the assay can be included in the specification of the herbal substance, if justified.

In cases of multi-component herbal medicinal products **where an assay of each herbal substance is not possible, the applicant must justify how reproducibility of the finished product is guaranteed and tested.**”

# Regulatorische Anforderungen

## Marker im Arzneibuch

1. Drogenmonographien
2. Extraktmonographien
3. Monographie „Extrakte“
  - Standardisierte Extrakte
  - Quantifizierte Extrakte
  - Andere Extrakte

# Regulatorische Anforderungen

## Marker im Arzneibuch: Monographie „**Extrakte**“

„**Standardisierte Extrakte** werden innerhalb zulässiger Grenzen auf einen vorgegebenen Gehalt an bekannten wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffen eingestellt“

„**Quantifizierte Extrakte** werden auf einen definierten Bereich von Inhaltsstoffen eingestellt“

„**Andere Extrakte** werden im Wesentlichen durch ihr Herstellungsverfahren definiert“

## Regulatorische Anforderungen

Points to consider on the Biopharmaceutical Characterisation of Herbal Medicinal Products (EMA/HMPWP/344/03)

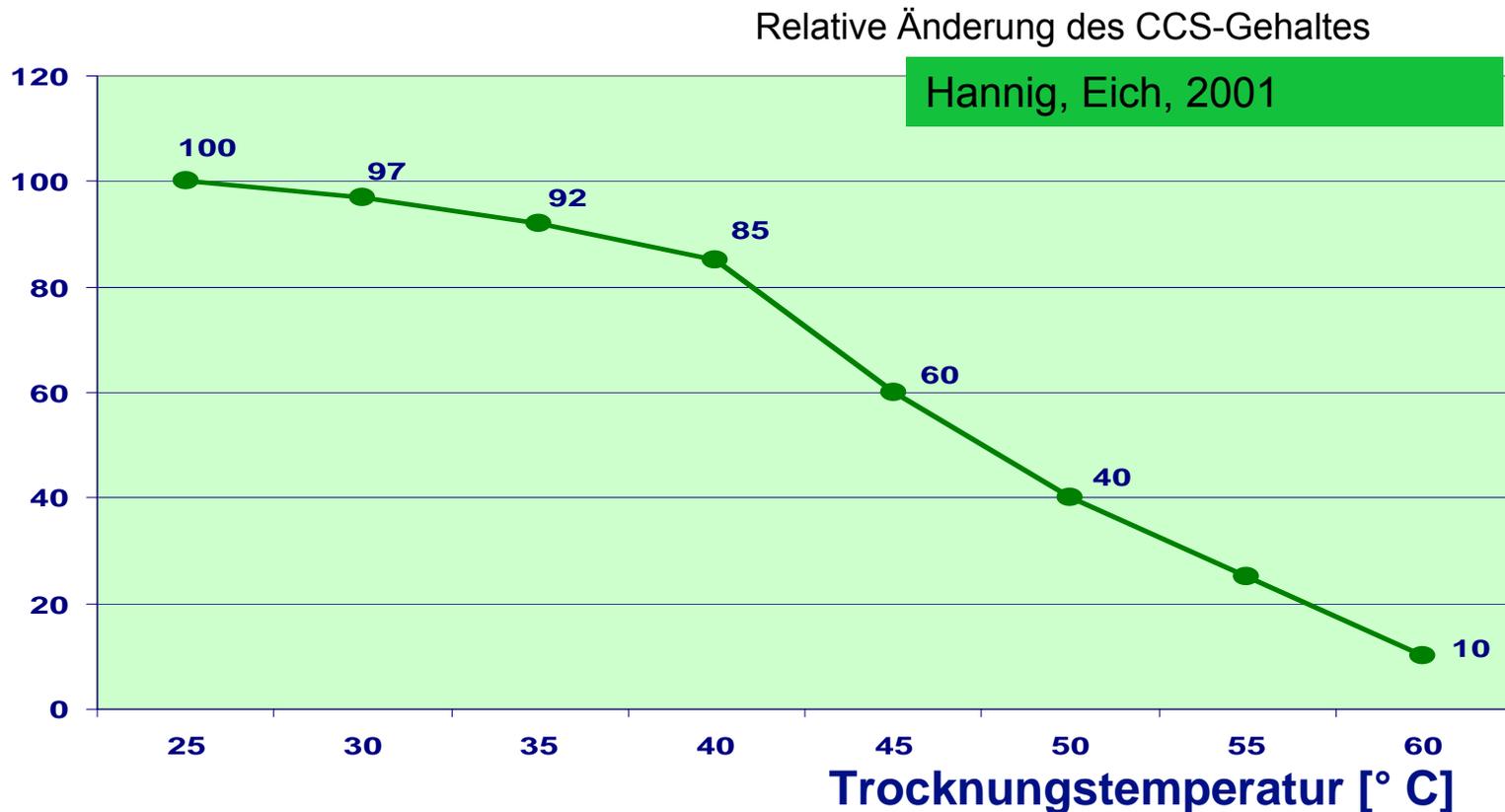
„Quantified extracts containing chemically defined constituent possessing relevant pharmacological properties (active markers) ... likely to contribute to the clinical efficacy; ... (e.g. extracts of Ginkgo, St. John`s Wort).

# Marker und Qualität

1. Marker als Indikatoren des Erntezeitpunkts/Vegetationszustands
2. Marker als Indikatoren für sachgerechte Trocknung
3. Marker als Indikatoren für Spezies
4. Marker als Indikatoren für Stabilität
5. Marker als Indikatoren für Wirksamkeit/Verträglichkeit
6. Marker als Indikatoren für korrekte Herstellung (chargenspezifische Kontrolle)

# Marker als Indikatoren für sachgerechte Trocknung

## Trocknungstemperatur und Gehalt an CCS-Derivaten in Artischocke



# Marker als Indikatoren für korrekte Species



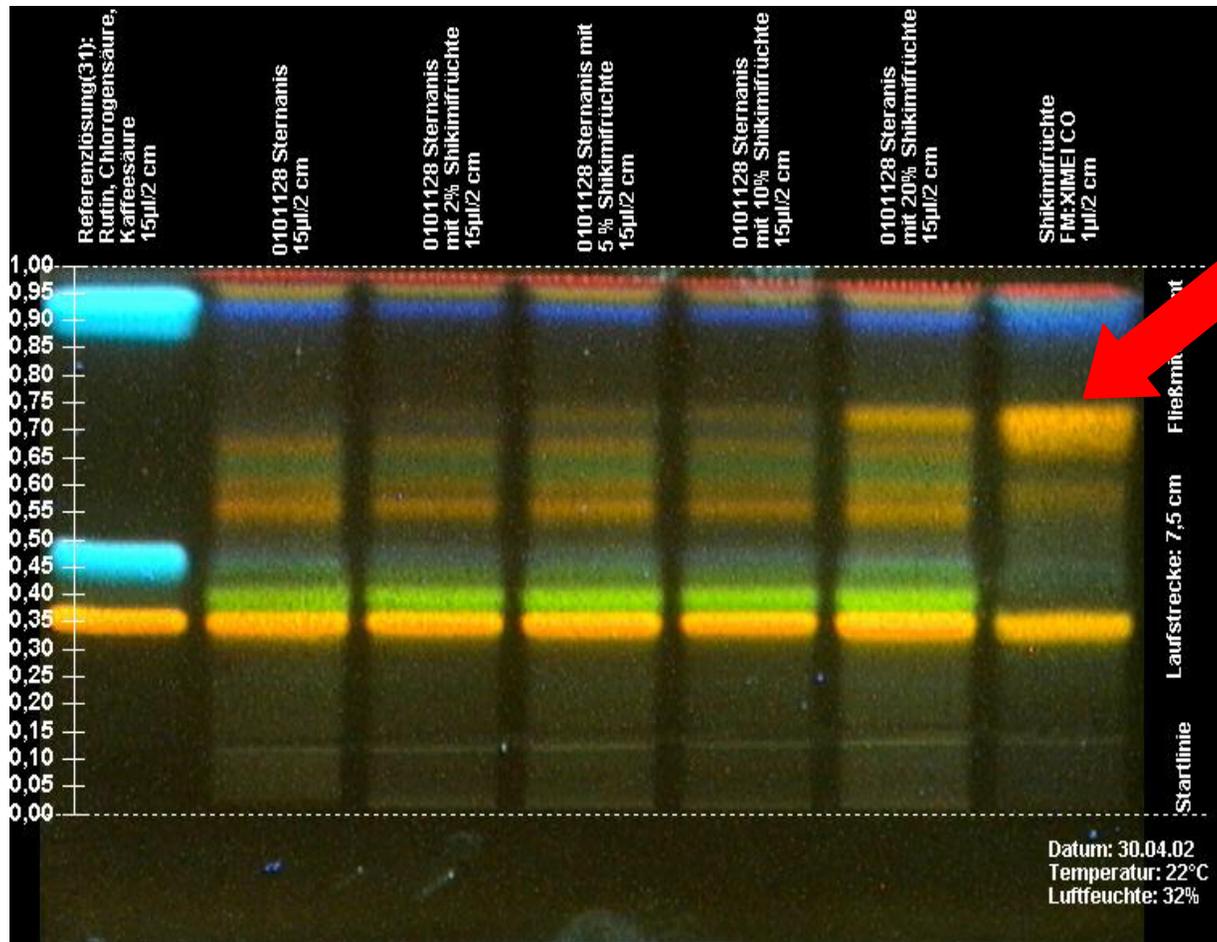
**Steranis**

(*Illicium verum* HOOK fil.)

**Shikimi**

(*Illicium anisatum* L.)

# Differenzierung von Illicium-Arten mittels HPTLC-Fingerprint



1. Reference substances  
Caffeic acid,  
Chlorogenic acid,  
Rutin

2. Chinese Star anise  
*I. verum*

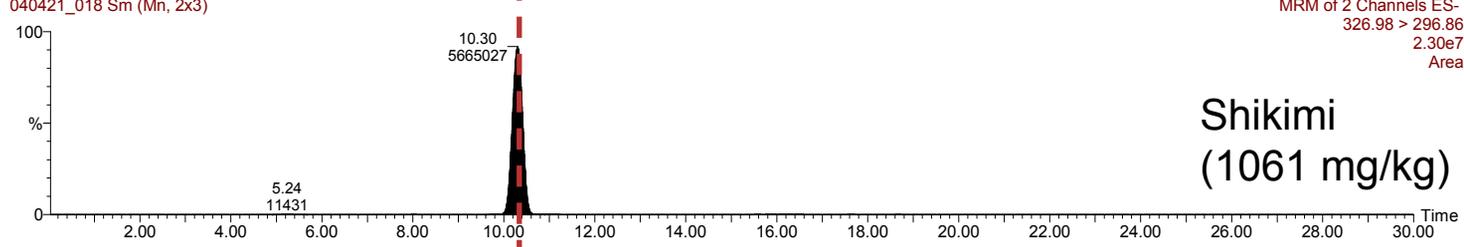
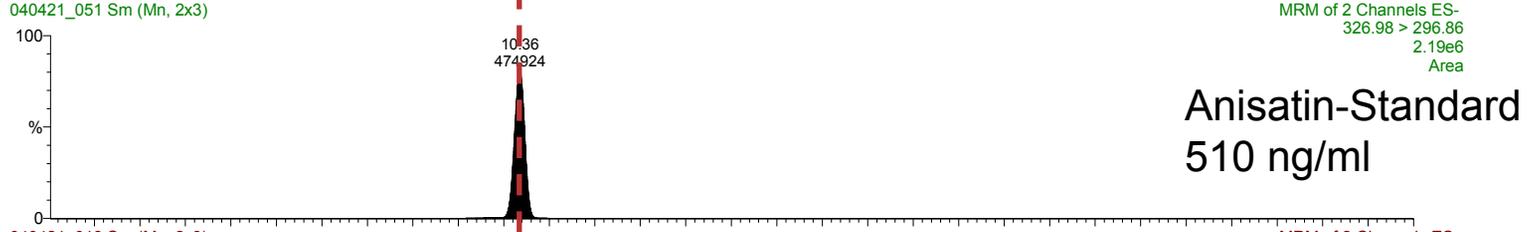
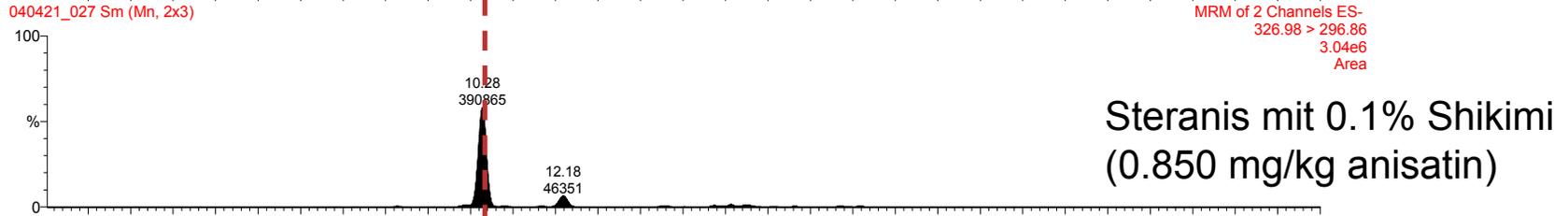
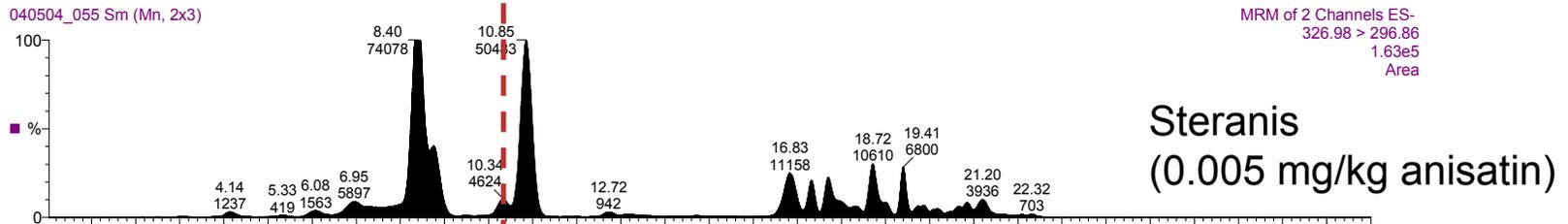
7. Japanese Star Anise  
Shikimi fruits  
*I. anisatum*

3 - 6. Blends of  
*I. verum* and  
*I. anisatum*

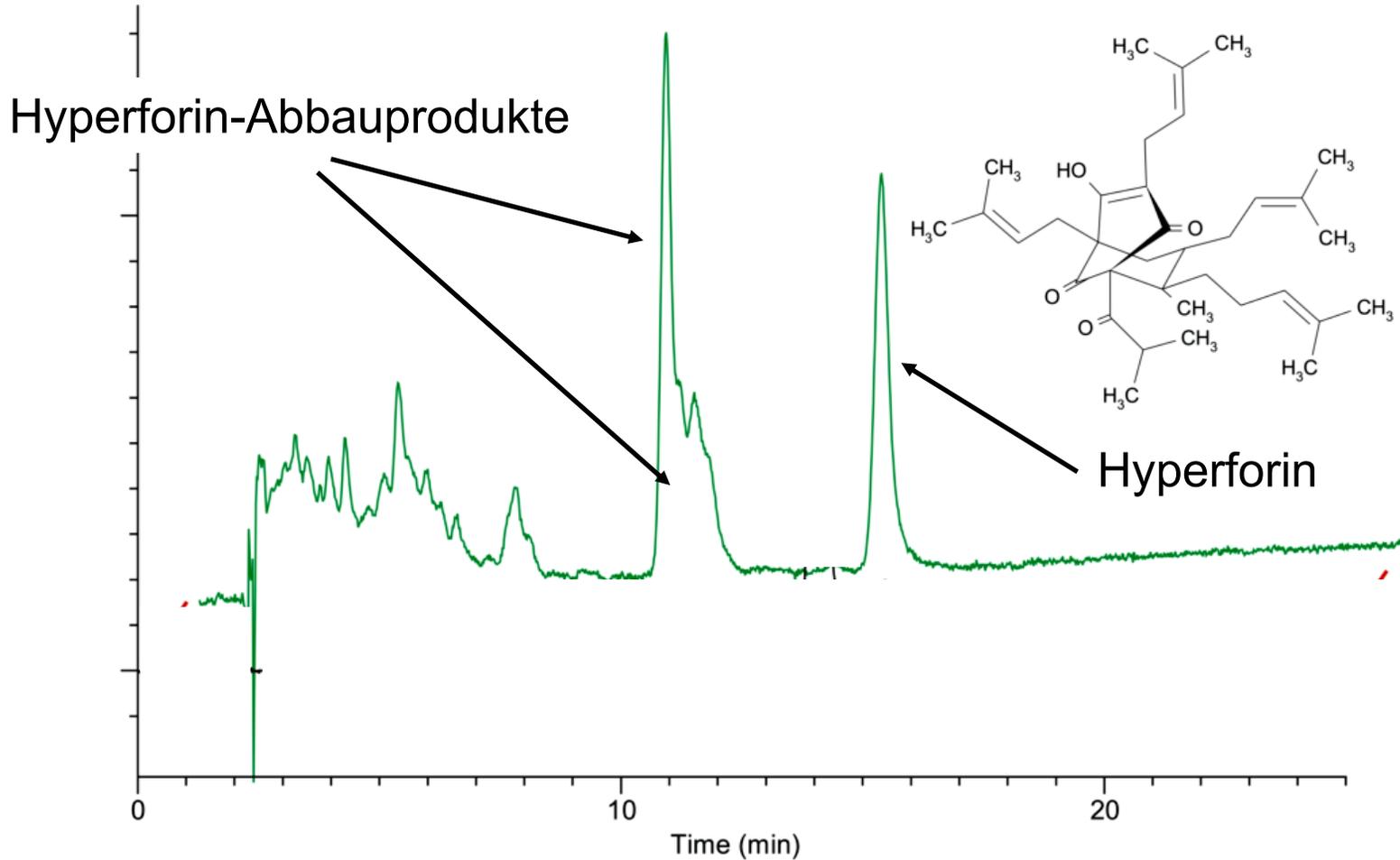
Limit of detection

5 % *I. anisatum*

# LC/MS Chromatogramme von 3 Sternanis-Mustern

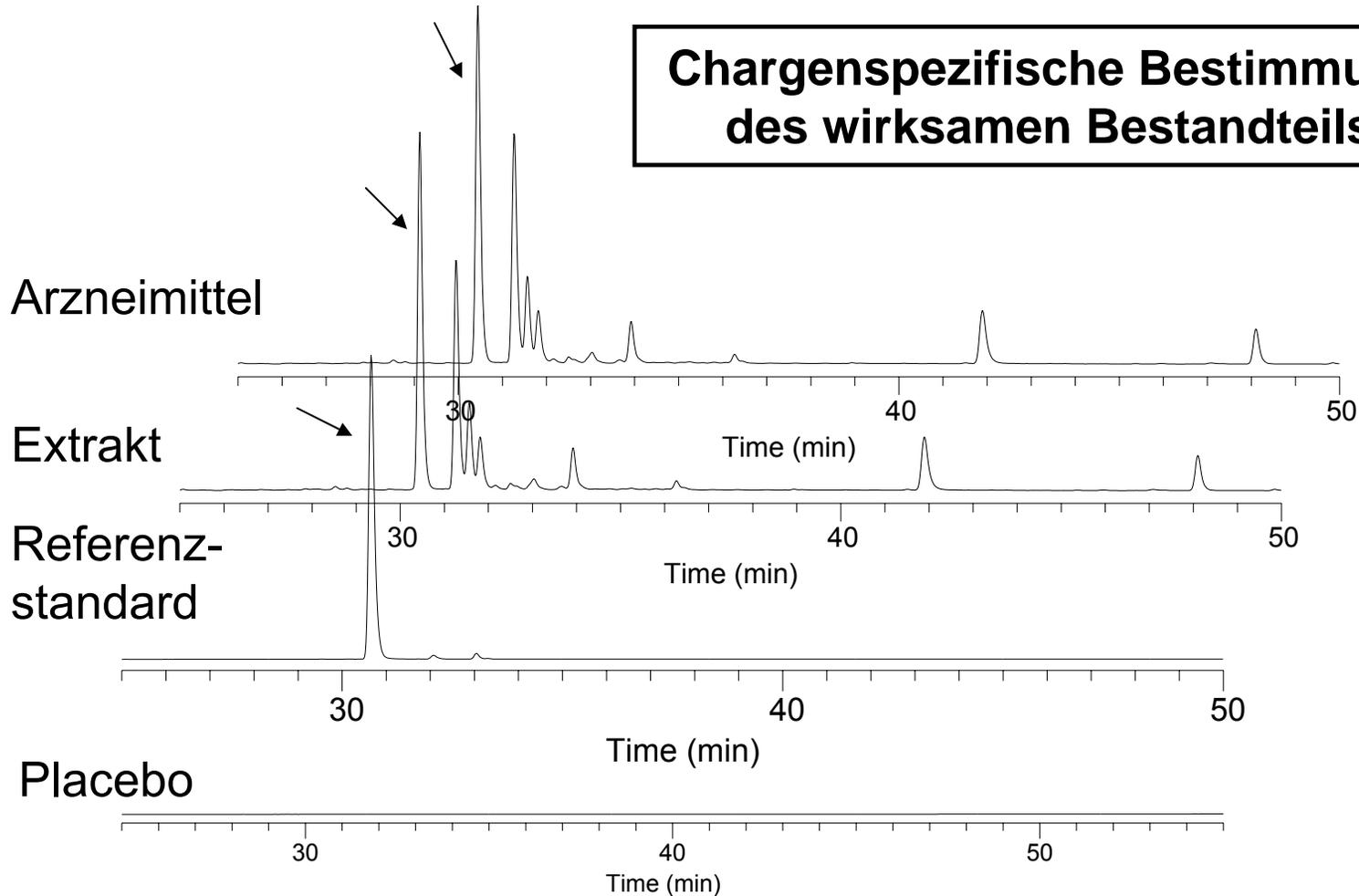


# Marker als Stabilitätsindikatoren



# Marker und Qualität

**Chargenspezifische Bestimmung  
des wirksamen Bestandteils**



# Marker und Qualität

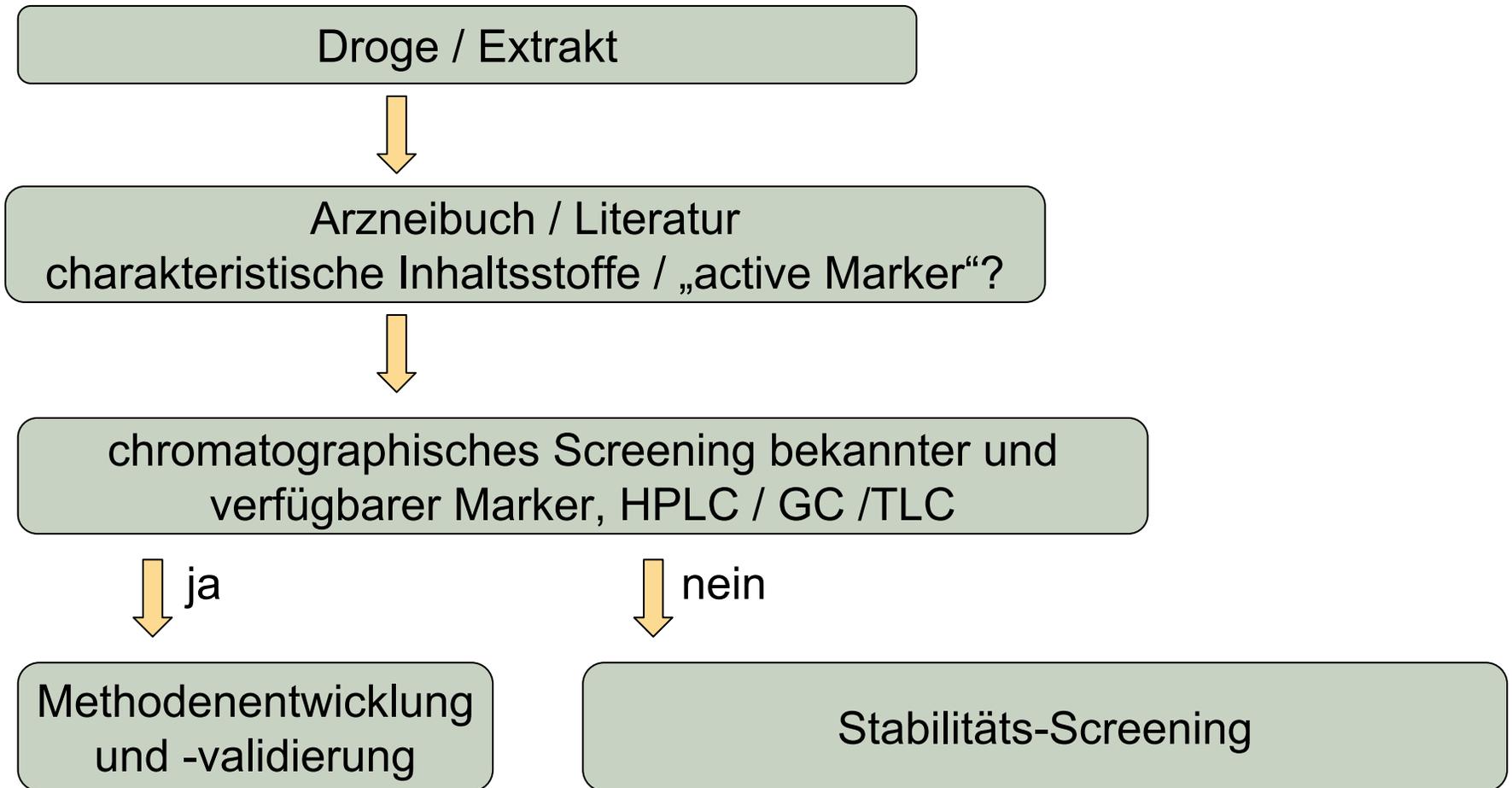
## Allgemeine Anforderungen an Marker

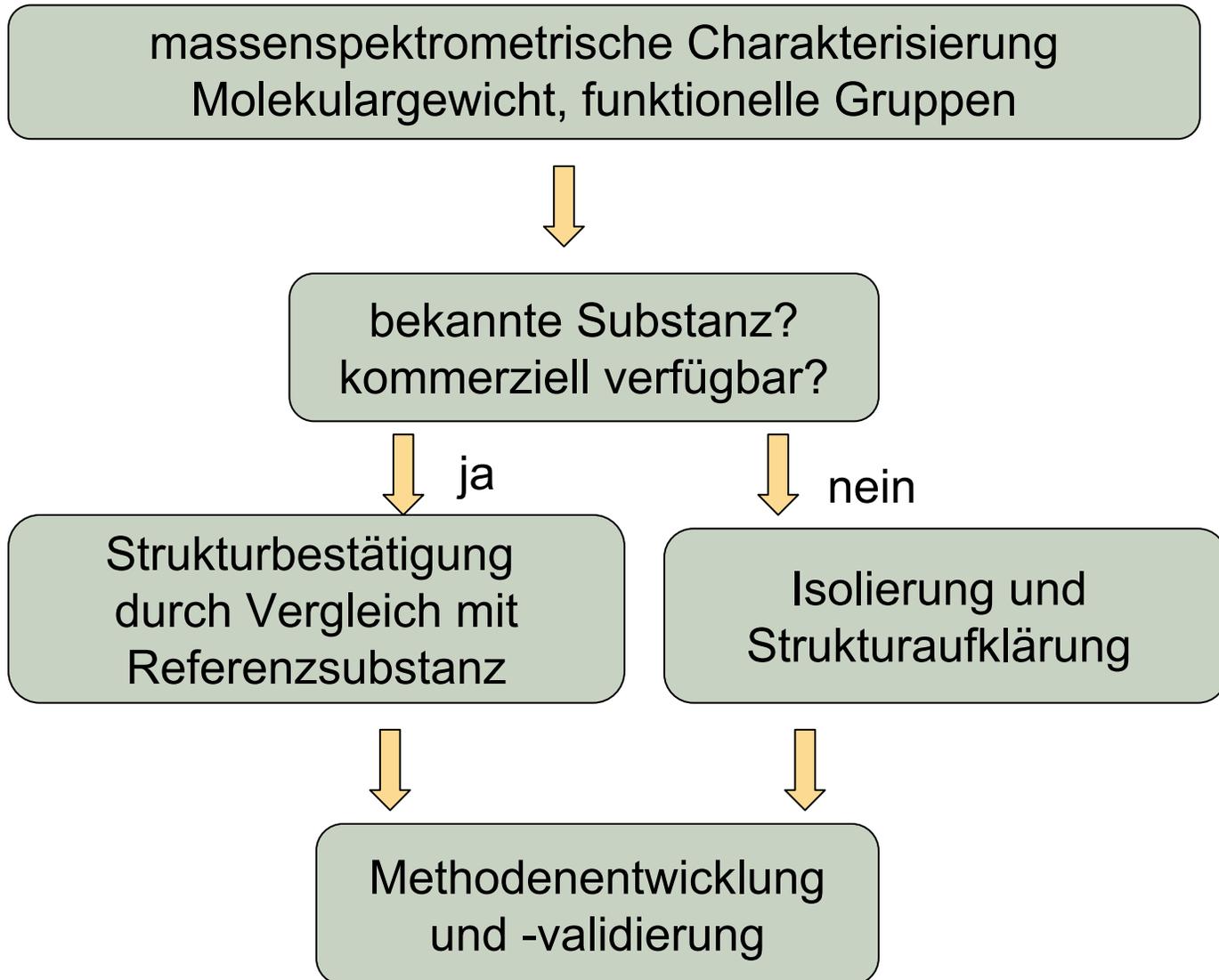
- charakteristisch für Droge oder die Zubereitung
- in ausreichender Konzentration enthalten
  - ➔ zuverlässig quantifizierbar
- mit üblichem Equipment spezifisch quantifizierbar (GC, HPLC)
  - ➔ Methode im Routinelabor problemlos durchführbar
- ausreichend stabil
- in weiteren wirksamen Bestandteilen nicht enthalten
- als Referenzstandard kommerziell verfügbar

## Produktentwicklung - Auswahlkriterien für Marker

- Arzneibuch, Literatur, analytisches Screening
- Stabilität
- Darreichungsform
- Analytik
  - Selektivität
  - Löslichkeit / Extrahierbarkeit
  - Stabilität
- Untersuchung mehrerer Wirkstoff-Chargen (→ Spanne)
- Validierung der Methode
- Wirksamkeitsbezug („Active Marker“)

# Produktentwicklung - Markerauswahl





# Spezifikationen für Marker in der Droge

- Empirische Basis
  - mindestens 6 Drogenchargen
    - Erntejahr
    - Herkunft
    - Trocknungsbedingungen
    - Stabilität
- Methodenentwicklung und Validierung
  - analytischer Marker: Mindestgehalt\*
  - active marker: Spanne
  - wirksame Substanz Spanne

\*aus analytischer Sicht Spanne sinnvoll (Validierung Linearitätsbereich)

# Spezifikationen für Marker in der Zubereitung

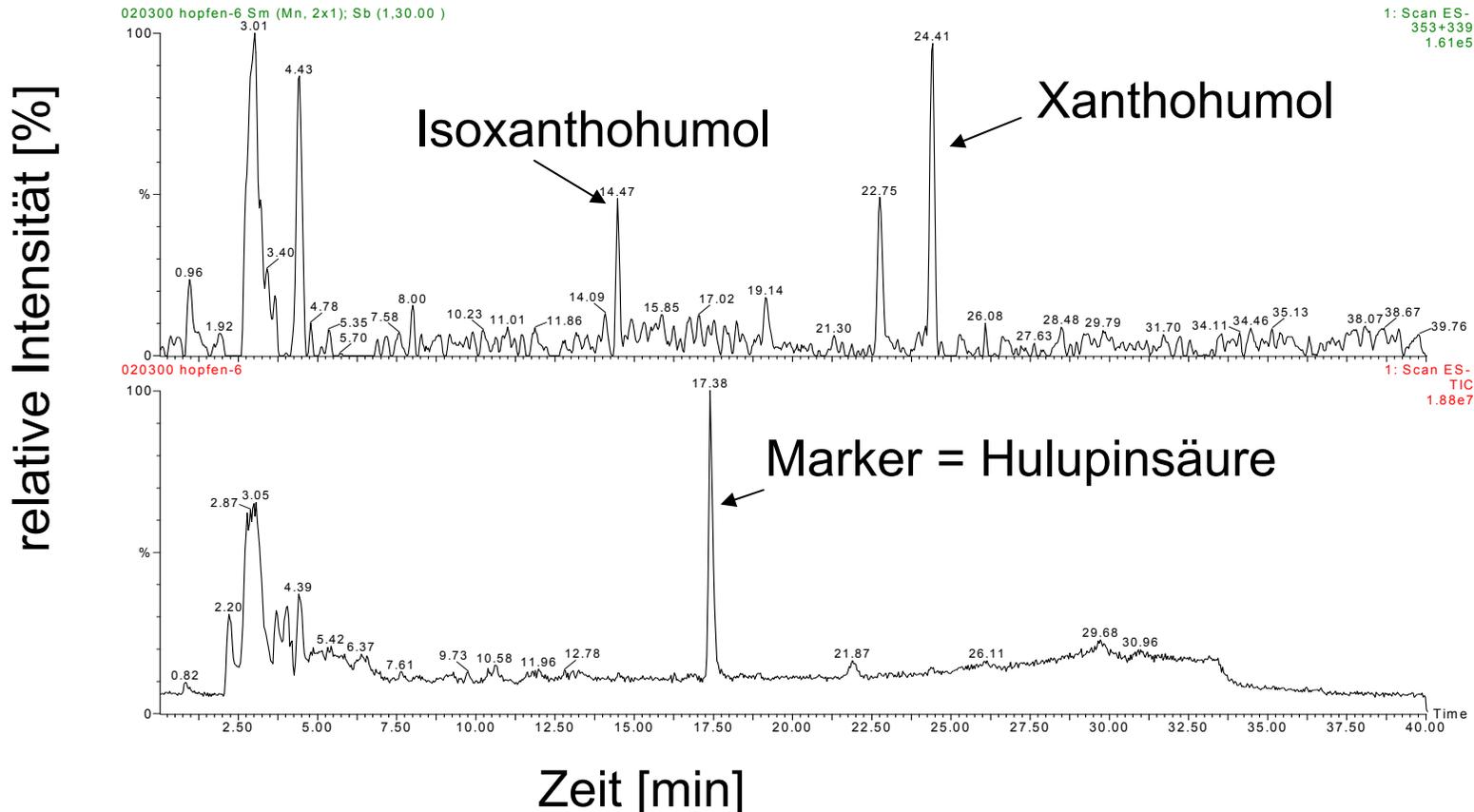
- Ausreichende empirische Basis
  - mindestens 6 Chargen
    - Drogenqualität
    - Herstellbedingungen
    - Übergangsrate in Extrakt
    - Stabilität
- Methodenentwicklung und Validierung
  - analytischer Marker: Mindestgehalt\* bei „anderen Extrakten“
  - active marker: Spanne
  - wirksame Substanz: Spanne
- \*aus analytischer Sicht Spanne sinnvoll (Validierung Linearitätsbereich)
- Festlegung von Spannen für „andere Extrakte“ wissenschaftlich wenig sinnvoll

## Suche nach einem alternativen Marker am Beispiel Hopfen

- wässriger Hopfenextrakt enthält kein Xanthohumol
- geeigneter Leitpeak Hulpupinsäure
- **aber**: nicht in allen Drogenchargen in ausreichender Menge enthalten

Lösung: Entwicklung einer DC Screeningmethode und Selektion geeigneter Drogenchargen für die Extrakterstellung

# Entwicklung einer HPLC Methode / Charakterisierung des Markers Hulupinsäure durch HPLC-MS/MS

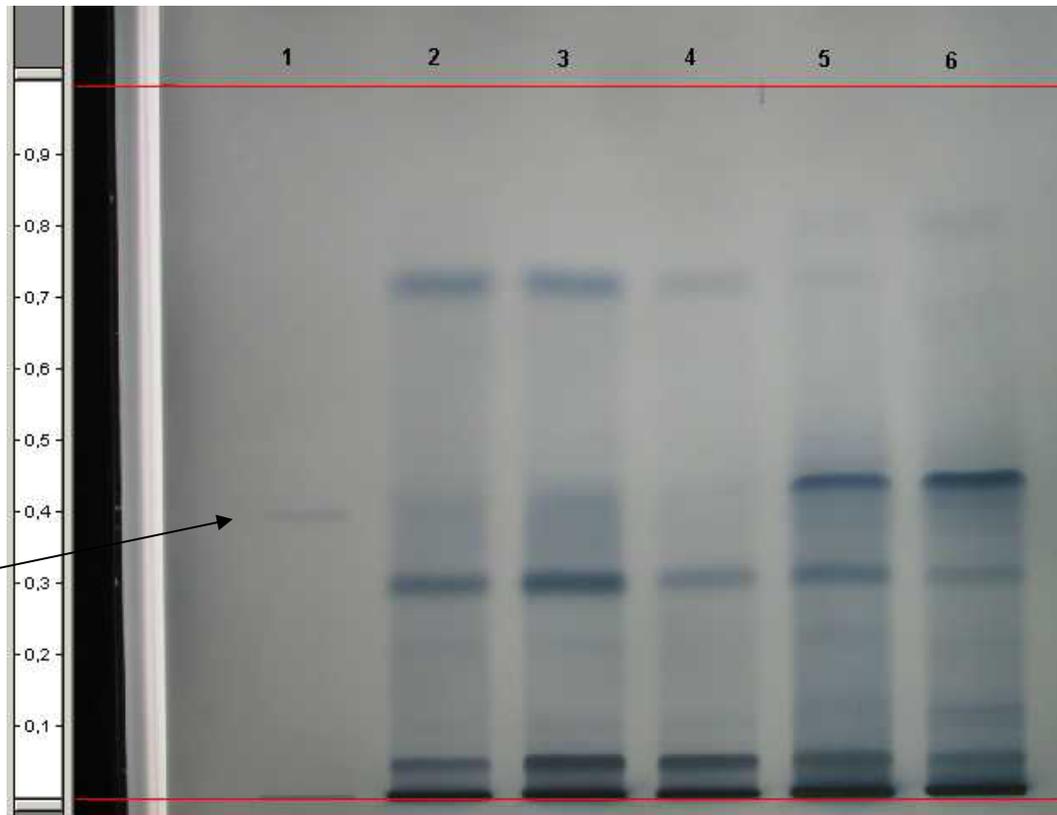


# DC Screening auf Vorkommen des Markers in der Droge (Hopfen)

Bahn 1:  
Referenzsubstanz  
Hulupinsäure

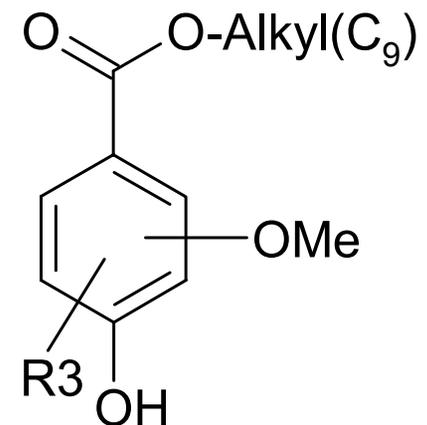
Bahn 2 bis 6:  
verschiedene  
Hopfenchargen

Hulupinsäure



## Anforderungen an die Charakterisierung von Markern

- „...chemically defined...“
- Probleme z. B. bei Kombinationspräparaten, Finden eines Markers, der nicht von den anderen wirksamen Bestandteilen gestört wird
- mit entsprechender Begründung kann massenspektrometrische Charakterisierung (z. B. Alkylresorcinolderivat) ausreichen
- UV/VIS-Spektrum: Maximum bei 256 nm



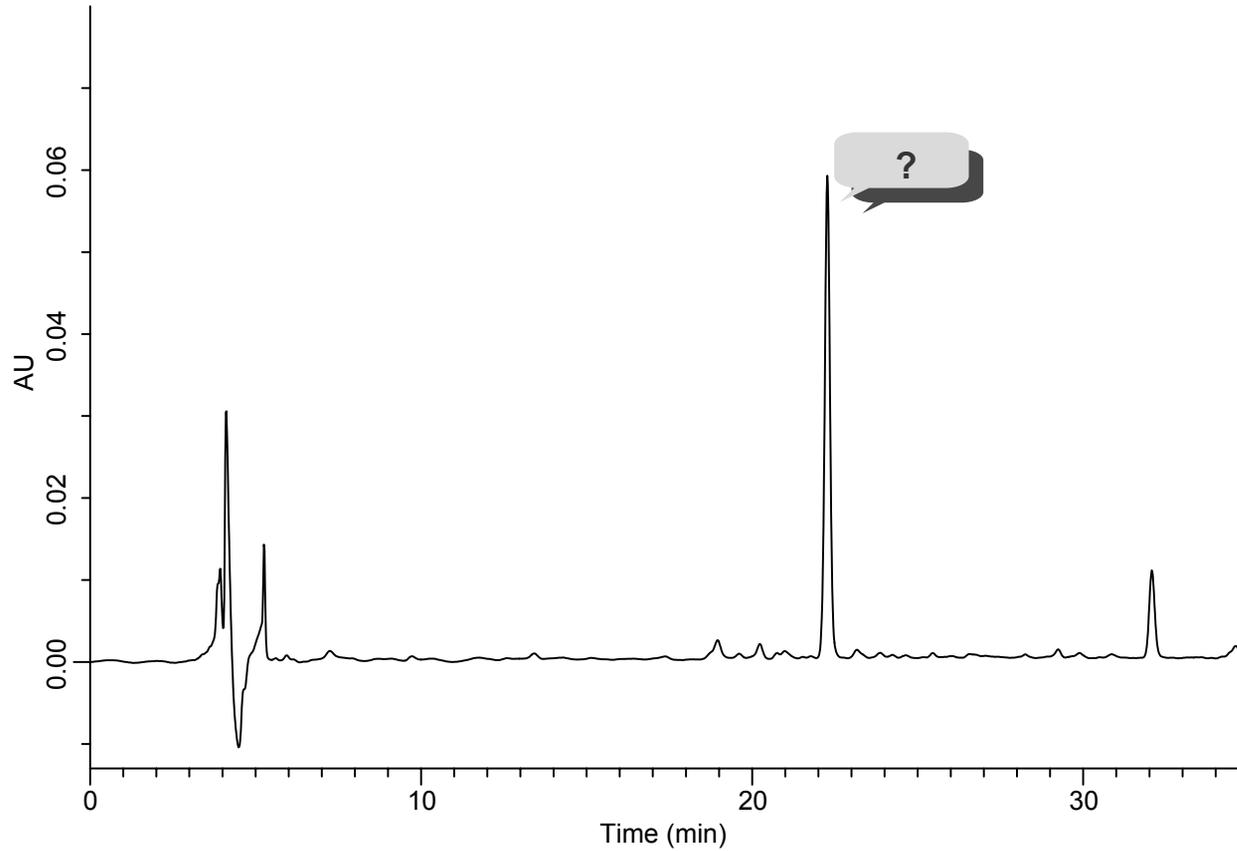
## Anforderungen an die Charakterisierung von Markern

**Muss jeder Marker isoliert und vollständig strukturell aufgeklärt werden?**

- Grundsätzlich müssen Leitsubstanzen charakterisiert werden,... Wenn eine Substanz allerdings z.B. mit LC-MS/MS ausreichend identifiziert und charakterisiert ist ... kann sie als Leitsubstanz genutzt werden.
- Auch die Bestimmung mit Hilfe eines externen, nicht mit der eigentlichen LS identischen Markers ist zulässig, es muss aber immer gegen die Leitsubstanz gemessen werden.

[www.bfarm.de/de/DasBfArM/publ/berichte/BfArM-Q1.pdf](http://www.bfarm.de/de/DasBfArM/publ/berichte/BfArM-Q1.pdf), 3.1.2.

# Leitpeak in Hauhechelwurzel



# Leitpeak in Hauhechelwurzel

PL-Untersuchungs-Nr.:  
Untersucht auf: Identität

Spektrum von: Hauhechelwurzel  
Vial: 2  
Instrument: QUATTROULTIMA

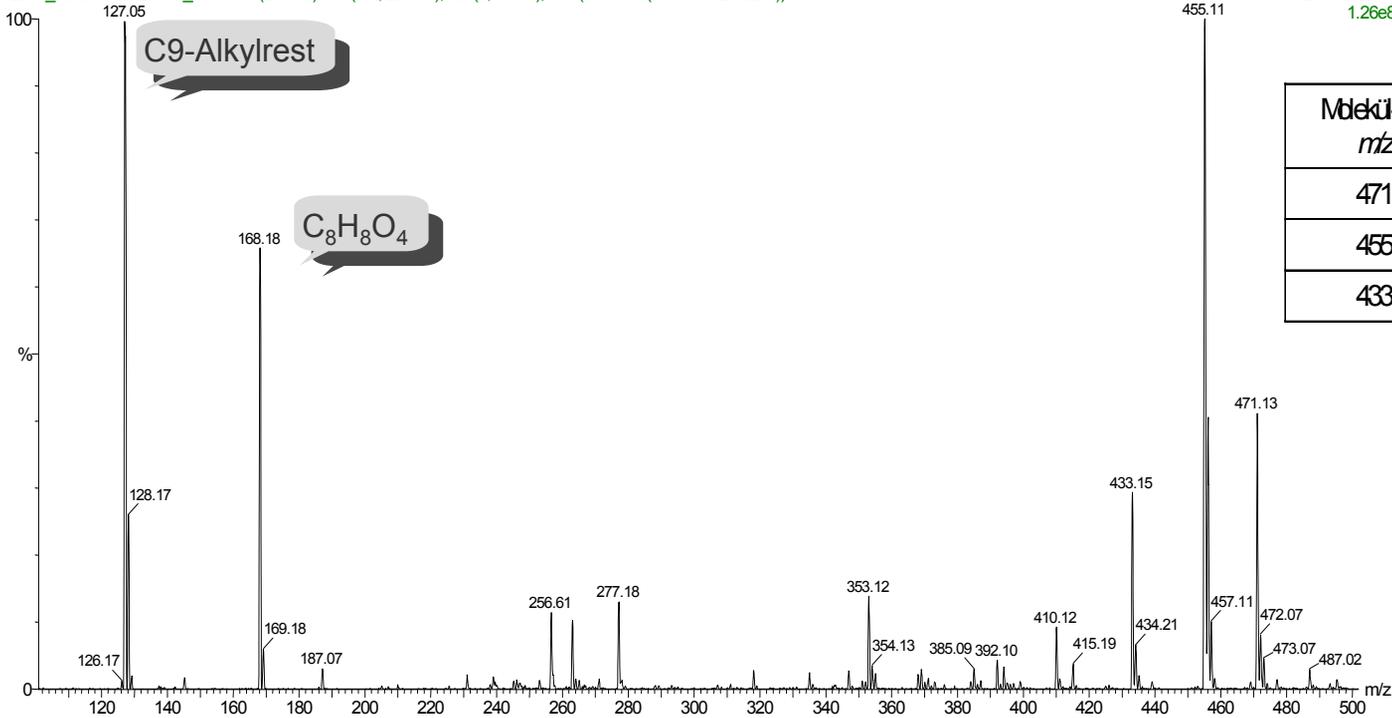
Date acquired: 15-Oct-2002  
Time acquired: 20:02:05  
Datum: \_\_\_\_\_

User: IL

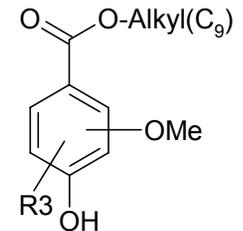
Sign of user: \_\_\_\_\_

P2789\_Hauhechel021015\_003 308 (21.471) Sm (SG, 2x0.60); Sb (1,40.00); Cm (304:311-(319:394+251:294))

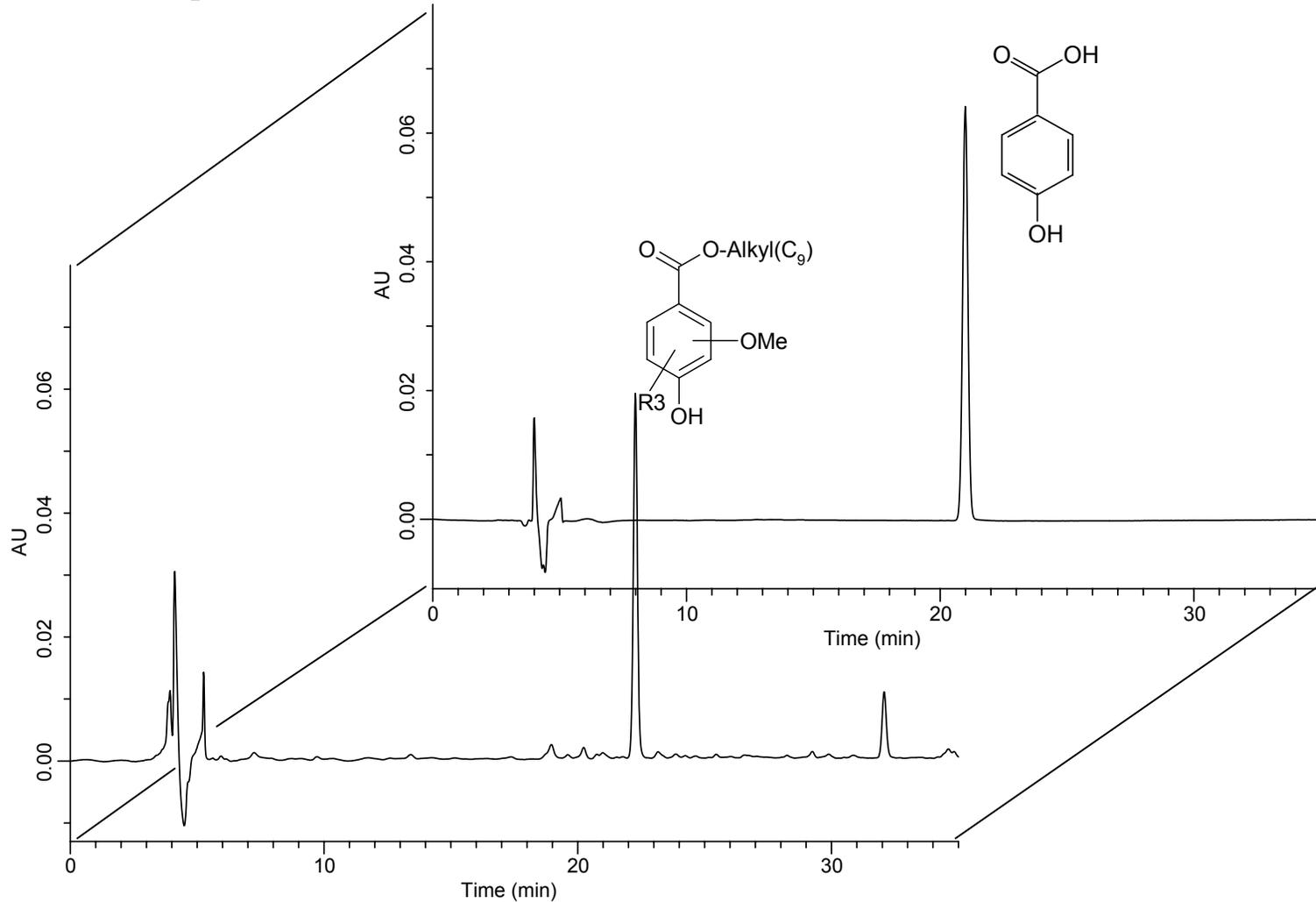
2: Scan ES+  
1.26e8



Molekül-Ion <i>m/z</i>	Interpretation
471	[M+K] <sup>+</sup>
455	[M+Na] <sup>+</sup>
433	[M+H] <sup>+</sup>



# Leitpeak in Hauhechelwurzel



## Marker und Produktentwicklung

### Instrument zum Schutz vor Nachahmung und / oder zur Stützung von Produktaussagen?

- Kenntnis über Marker – analytisch und / oder „active“ – stellt wertvolles Know how dar
- Anbausteuerung, Sortenentwicklung
- „Beherrschbarkeit“ des Arzneimittels
- In Verbindung mit pharmakologischen und klinischen Daten Basis für Alleinstellung („active marker“)

## Probleme

- Häufig sehr niedrige Konzentration spezifischer Marker
  - angemessene Schwankungsbreite!
- Gleiche Marker in mehreren Wirkstoffen bei Kombinationen
  - Summenbestimmung
- Marker nicht mit vertretbarem Aufwand charakterisierbar
  - Peak „X“ – Lösung
- Geringe Homogenität bei Produkten mit geschnittenen oder pulverisierten Pflanzenteilen
  - Spanne von  $\pm 10\%$  erscheint hier generell angemessen

## Gleiche Marker in mehreren Wirkstoffen bei Kombinationen

Bestimmung von Fenchel, Anis und Kümmel in Teemischung

**Fenchel**: Fenchon (Marker), **Anethol** (muss an der eingesetzten Droge quantitativ bestimmt werden)

**Anis**: **Anethol** (abzüglich des Gehaltes von Anethol in Fenchel bei Freigabe, Gehalt an Anethol bei Stabilitätsprüfung)

**Kümmel**: Carvon

## Probleme

**Sind Marker in Drogenmonographien des Arzneibuchs automatisch verpflichtend für entsprechende Extrakte?**

### **Active Markers???**

- Passiflora                      Flavonoide
- Thymian                        Thymol
- Baldrian                        Valerensäuren
- ...

**The appropriateness of the choice of marker should be justified.**

## Fazit

Marker sind nicht nur Werkzeug der Analytik, sondern können auch ein strategisches sein!

Mit der Wahl des Markers steht und fällt das Arzneimittel

Daher müssen die Weichen am **Anfang** richtig gestellt werden.



**Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit**