

Zur Bioverfügbarkeitsprüfung von Mikronährstoffen*)

K. Pietrzik und T. Remer

Institut für Ernährungswissenschaft, Abt. Pathophysiologie der
Ernährung des Menschen, Universität Bonn

Summary: Bioavailability studies of micronutrients (vitamins, minerals) from different food stuffs, as well as from pharmaceutical preparations are of great importance for the calculation of nutrient intake and/or the evaluation of the therapeutic value.

In practice, bioavailability studies are not generally performed on a standardized level. For this reason basic criterions are presented and discussed. Finally, the investigation of the bioavailability of folate is demonstrated by an example. The parameters investigated are: the maximal concentration (c_{\max}), the time to reach this maximum (t_{\max}), and especially the bioavailability ratio determined from the area under the curve (AUC) after administration of the folic acid containing test and reference preparation.

The results indicate that 5-formyl-tetrahydrofolic acid given in the tested form has nearly the same bioavailability (ratio: 1.02) as folic acid (pteroylmonoglutamic acid) in aqueous solution.

Zusammenfassung: Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit essentieller Mikronährstoffe (Vitamine, Mineralstoffe, Spurenelemente) aus Lebensmitteln wie auch aus Arzneimittelzubereitungen sind von entscheidender Bedeutung bei der Beurteilung des jeweiligen Beitrages zur Nährstoffversorgung bzw. zur Abschätzung eines möglichen Therapieerfolges.

Die Durchführung derartiger Prüfungen erfolgt in der Praxis nicht selten nach unterschiedlichen Kriterien. Deshalb werden zunächst die Grundsätze erläutert, die bei entsprechenden Prüfungen für eine valide Bewertung von Nähr- bzw. Wirkstoffgemischen oder Monopräparaten bedeutsam sind. Abschließend wird die Ermittlung der Bioverfügbarkeit von Folsäure an einem Beispiel demonstriert.

Zur Testung werden die postresorptiven Kurvenintegrale ermittelt, wobei die Daten auf das basale Ausgangsniveau bezogen werden. Zur Beurteilung der Bioverfügbarkeit findet neben dem maximalen Vitaminanstieg im Serum sowie der Zeit bis zum Konzentrationsmaximum insbesondere der Bioverfügbarkeitsquotient von Test- und Referenzzubereitung mit seinem 95%-VB Berücksichtigung.

Die Ergebnisse zeigen, daß die exemplarisch eingesetzte Testsubstanz, 5-Formyl-Tetrahydrofolsäure, eine sehr gute Bioverfügbarkeit aufweist und daß unter Anwendung der beschriebenen Rahmenbedingungen eine objektive Bewertung der Bioverfügbarkeit möglich ist.

Key words: bioavailability, folic acid, pharmaceutical preparation

Schlüsselwörter: Bioverfügbarkeit, Folsäure, Arzneimittelzubereitung

*) Herrn Prof. Dr. med. Karl Heinz Bässler zum 65. Geburtstag gewidmet

Einleitung

Zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, daß zwischen Arzneimitteln verschiedener Hersteller trotz vergleichbarer Wirkstoffgehalte beachtliche Unterschiede bei der Verfügbarkeit bestehen können. Derartige Unterschiede sind in der Regel auf die Art der galenischen Zubereitung zurückzuführen, können jedoch auch aus den individuellen physiologischen Gegebenheiten der beteiligten Versuchspersonen resultieren. Daneben sind die Rahmenbedingungen wie Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme, Nüchternzeitraum etc. von Bedeutung, und dies um so mehr, wenn es sich um die Prüfung essentieller Nährstoffe handelt. So ist z. B. durch die gewählten Kostformen, die über den Prüfungszeitraum erlaubt sind, eine Beeinflussung basaler Nährstoffblutspiegel möglich.

Der Begriff „Bioverfügbarkeit“ ist von einem Teilgebiet der Pharmazie, der Pharmakokinetik, übernommen worden. Im Rahmen von Arzneimittelprüfungen versteht man darunter den zeitlichen Ablauf und das Ausmaß der Nutzbarmachung einer dem Organismus angebotenen Wirkstoffmenge. Die Bioverfügbarkeit gibt z. B. in Prozent an, welcher Anteil der zu prüfenden Substanz in die systemische Zirkulation gelangt bzw. am Ort der Wirkung vorliegt (1). In der Regel ist die Ermittlung der Konzentration am Wirkort direkt nicht möglich, deshalb werden im allgemeinen Konzentrationen in Körperflüssigkeit (z. B. Blut, Harn) gemessen, woraus Geschwindigkeit und Ausmaß der Stoffabsorption als indirekte Zielgrößen abgeleitet werden können. Eine direkte Ermittlung der Bioverfügbarkeit und quantitative Erfassung der Inkorporation ist nur mit einem enormen apparativen Aufwand (z. B. Ganzkörperretentionsmessung) zu erreichen und wird dementsprechend nur in seltenen Fällen von Spezialinstituten durchgeführt.

Die Kriterien, die zur Beurteilung der Bioverfügbarkeit herangezogen werden, sind nicht nur bei Arzneimittelprüfungen anwendbar, sondern prinzipiell auch auf die Bewertung der biologischen Verfügbarkeit von Lebensmittelinhaltsstoffen bzw. Nährstoffen übertragbar, die gemäß ihrem Verwendungszweck auch Bestandteile von Arzneimitteln sein können. Somit stellen Bioverfügbarkeitsuntersuchungen ein aktuelles Arbeitsfeld der angewandten Ernährungswissenschaft dar.

Kriterien zur Ermittlung der Bioverfügbarkeit

Zur Bewertung der Bioverfügbarkeit einer zu prüfenden Substanz werden deren postresorptiv gemessene Blut- oder Harnkonzentrationen (incl. der wirksamen Metaboliten nach dem first pass effect) herangezogen, und zusätzlich die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC area under curve) als aussagestärkstes Kriterium bestimmt. Die durch die „Absorptionskurve“ umschlossene Fläche läßt Rückschlüsse auf den Umfang der Bioverfügbarkeit zu, da für die meisten Wirkstoffe unabhängig von der Applikationsform zwischen der im Versuchsverlauf ins Blut übergetretenen Dosis und der postabsorptiven Blutspiegelkurve Proportionalität besteht. Die Fläche unter der Kurve kann man nach der Trapezformel aus den Flächeninhalten der Trapeze berechnen, die sich zwischen den einzelnen Konzentrationszeitpunkten konstruieren lassen (2). Die

Bestimmung des gesamten postresorptiven Kurvenintegrals nach einmaliger Verabreichung einer Prüfsubstanz ist in der Praxis nicht immer möglich, so daß eine Flächenextrapolation vom letzten Meßzeitpunkt (t_{last}) bis unendlich (t_{∞}) erforderlich werden kann. Die durch Meßpunkte belegte Fläche (AUC (t_0 – t_{last})) sollte jedoch mindestens 80 % der gesamten AUC (t_0 – t_{∞}) betragen.

Vorgenannte Messungen werden in der Regel im Blut (Serum/Plasma) durchgeführt. Diese Vorgehensweise ist jedoch dann nicht mehr möglich, wenn der Körper für die zu testende Substanz über ausgeprägte Homöostasemechanismen verfügt und dementsprechend Invasion und Evasion ähnlich stark ausgeprägt sind. Unter diesen Bedingungen ist ein Konzentrationsanstieg im Blut kaum noch meßbar. Die Elimination kann dann z.B. über die mit dem Urin ausgeschiedenen Mengen erfaßt werden. Hierdurch ist ebenfalls ein indirekter Nachweis der Bioverfügbarkeit möglich, da die absorbierte bzw. inkorporierte Menge z.B. eines wasserlöslichen glomerulär filtrierbaren Wirkstoffs bzw. Metaboliten mit dessen

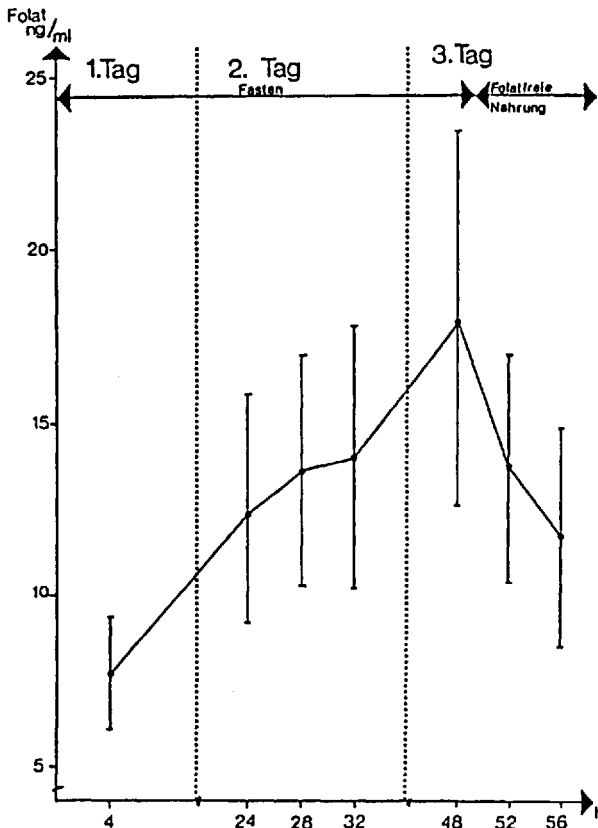


Abb. 1. Verlauf der Serumfolatkonzentration während einer zweitägigen Fastenperiode und anschließender folatfreier Nahrungsaufnahme ($x \pm s$ von 4 männl. und 4 weibl. VPn).

renaler Exkretion korreliert. Die Fläche unter der renalen Ausscheidungskurve (AUC) wird ebenso, wie zuvor beschrieben, durch die Ermittlung der Konzentrations-Zeit-Kurve mit der Trapezformel berechnet, wobei gleichzeitig die in einer definierten Zeit eliminierte Gesamtmenge der Prüfsubstanz Rückschlüsse auf den noch im System verbliebenen Anteil zuläßt. Aus den pro Zeitintervall renal ausgeschiedenen Mengen kann ebenfalls auf die Geschwindigkeit der Absorption geschlossen werden.

Weiterhin wird zur Bewertung der Bioverfügbarkeit das Ausmaß des maximalen Wirkstoffkonzentrationsanstiegs (c_{\max}) und die Zeitdauer bis zum Erreichen des Konzentrationsmaximums (t_{\max}) erfaßt, wobei die Angabe von t_{\max} nur dann eine Aussagekraft besitzt, wenn das Konzentrationsmaximum deutlich ausgeprägt ist. Bei flachem postresorptivem Kurvenverlauf kann durchaus die Angabe der Plateauzeit sinnvoller sein. Darunter versteht man die Zeitspanne, innerhalb der sich die Konzentration der zu prüfenden Substanz im Blut um nicht mehr als eine bestimmte Differenz von der maximal gemessenen Konzentration verändert.

Bei der Bestimmung der Bioverfügbarkeit unterscheidet man die „absolute Verfügbarkeit“ und die „relative Verfügbarkeit“. Bei der Ermittlung der absoluten Bioverfügbarkeit einer Prüfsubstanz wird neben der oralen Applikation zu einem anderen Zeitpunkt eine intravenöse Injektion der zu untersuchenden Substanz bei den gleichen Probanden vorgenommen. Aus dem Quotienten von $AUC_{p.o.}$ und $AUC_{i.v.}$ multipliziert mit 100 erhält man die absolute Bioverfügbarkeit.

$$\text{Absolute Bioverfügbarkeit in \%} = \frac{AUC_{p.o.}}{AUC_{i.v.}} \times 100$$

Zur Erfassung der relativen Bioverfügbarkeit werden Prüfpräparate und eine Standardvergleichssubstanz mit jeweils identischen Wirkstoffgehalten in ausreichend zeitlichem Abstand denselben Versuchspersonen über den gleichen Applikationsweg, z. B. peroral, verabreicht. Aus dem Bioverfügbarkeitsquotienten (AUC_1/AUC_2) multipliziert mit 100 ergibt sich die relative Bioverfügbarkeit in %.

$$\text{Relative Bioverfügbarkeit in \%} = \frac{AUC_1}{AUC_2} \times 100$$

AUC_1 : Fläche unter der Kurve der Prüfsubstanz

AUC_2 : Fläche unter der Kurve der Standardvergleichssubstanz

Vergleichende Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit werden meist mit einer begrenzten Zahl von Teilnehmern ($n = 6-20$) durchgeführt, wobei die Anzahl der Probanden vom gewählten Versuchsplan, der verabreichten Dosis, dem zu erwartenden Konzentrationsverlauf etc. mitbestimmt wird. Aufgrund der interindividuellen Unterschiede bezüglich Invasion, Evasion, Metabolismus und Elimination werden derartige Prüfungen im Cross-over-Design vorgenommen, wobei die Zuordnung der Versuchspersonen zu den einzelnen Prüfphasen in randomisierter Reihenfolge erfolgt. Die Intervalle zwischen den einzelnen Testabschnitten sind so zu wählen, daß eine ausreichende Auswaschphase zur Verfügung steht, um eine weitestgehende Wirkstoffelimination zu erreichen bzw. um zu gewährleisten, daß das Ausgangsniveau (bei der Prüfung essentieller Nährstoffe)

wieder erreicht wird. Dies ist mindestens nach fünf Eliminationshalbwertszeiten der Fall (3, 4, 5).

Besonderheiten bei der Prüfung von Mikronährstoffen

Die Vergleichbarkeit der bei Bioverfügbarkeitsuntersuchungen gewonnenen Daten setzt voraus, daß die Interaktionen des Körpers mit dem Wirkstoff, also die Stoffabsorption, -verteilung, -metabolisierung und/oder -ausscheidung unter der Voraussetzung standardisierter Versuchsbedingungen weitgehend identisch sind (6). Bei den meisten Arzneimitteln ist dies der Fall. Anders verhält es sich dagegen bei der Applikation körpereigener Stoffe wie z.B. bei der Untersuchung essentieller Nährstoffe. Hier wird der Umfang und die Geschwindigkeit der Stoffverteilung und -ausscheidung wesentlich vom Füllungszustand des Körperspeichers mitbestimmt: Bei leeren oder wenig gefüllten Depots wird der Nährstoff aufgrund des Defizits schneller aus dem Blut zu den Orten des Verbrauchs transportiert, und nur eine geringe Menge wird ausgeschieden. Die beschleunigte Elimination aus dem Plasma ist gekennzeichnet durch eine hohe totale Clearance pro Zeiteinheit. Bei gefüllten Körperspeichern verhält es sich dagegen umgekehrt. Die Substanz gelangt nur langsam zu den peripheren Verbrauchsorten und wird vorwiegend über Niere und/oder Galle ausgeschieden. In diesem Fall ist die totale Plasmaclearance insgesamt deutlich niedriger als bei geringen Vorräten.

Eine darüber hinausgehende Erniedrigung der Plasmaclearance bei gefüllten Speichern läßt sich beispielsweise für das Vitamin Folsäure auch dann beobachten, wenn ein Belastungstest unter Fastenbedingungen durchgeführt wird. So konnten wir zeigen, daß eine unzureichende Energieaufnahme nicht nur einen signifikanten Anstieg des Serumfolates zur Folge hat (vgl. Abb. 1), sondern auch zu einer deutlich verminderten totalen Clearance in der Zirkulation führt (7, 8).

Wie Abbildung 2 zeigt, fällt die Folatserumkurve nach einer oralen Folatbelastung mit 1 mg Pteroylmonoglutaminsäure (PGA) – als Zeichen einer erniedrigten Plasmaclearance – unter Fastenbedingungen deutlich langsamer ab als unter den Bedingungen einer adäquaten kalorischen Substitution. Die Ermittlung der Flächen unter den Folatserumkurven nach einer Folatbelastung würde somit zu einer Überbewertung des post-resorptiven Kurvenintegrals führen.

Da Folat hauptsächlich über die Galle ausgeschieden wird, und die Gallensekretion unter anhaltender Nahrungskarenz drastisch reduziert wird, ist davon auszugehen, daß die Beeinträchtigung dieses Eliminationsweges für die verringerte Eliminationsgeschwindigkeit von Folat verantwortlich ist. Zwar ist ein eindeutiger Nachweis für den kausalen Zusammenhang zwischen Gallensekretion und veränderlicher Folatkinetik noch nicht erbracht, jedoch spricht insbesondere der in Abbildung 1 dargestellte signifikante Abfall der überhöhten „Fastenfolatplasmaspiegel“ kurze Zeit nach Wiederaufnahme der Nahrungszufuhr für eine solche Beziehung. Inwieweit von diesem Phänomen auch andere Mikronährstoffe betroffen sind, bedarf noch einer weiteren Klärung. Die hier skizzierten Zusammenhänge unterstreichen nochmals die besondere Bedeutung, die exakt standardisierten Versuchsbedingungen bei Bioverfügbar-

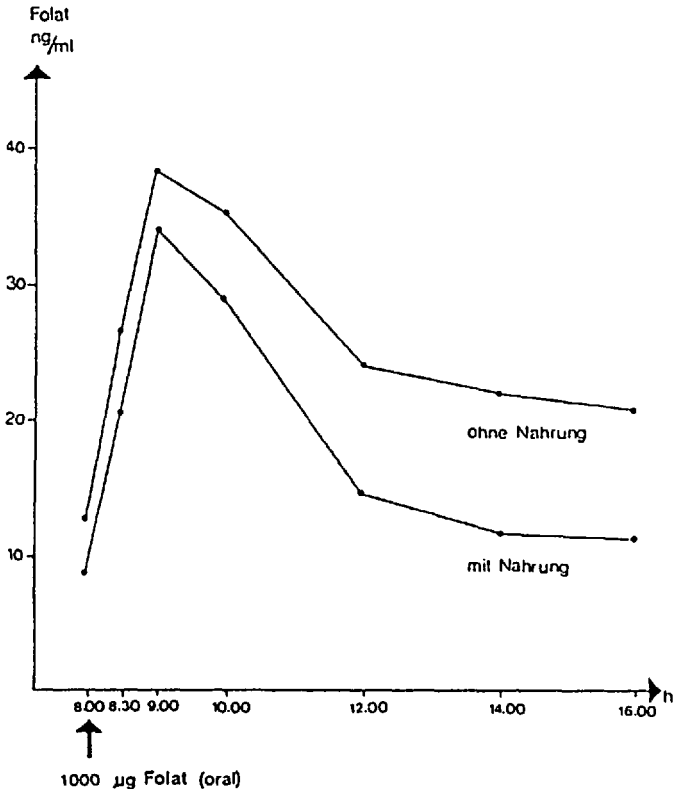


Abb. 2. Folatplasmaspiegel nach Gabe von 1 mg Folat unter Fasten- und Normalbedingungen (\bar{x} von $n = 8$ Probanden).

keitsuntersuchungen beizumessen ist. Wie bereits oben erwähnt, stellt bei der Prüfung essentieller Nährstoffe auch der Füllungszustand endogener Speicher eine wichtige Determinante kinetischer Meßgrößen dar und kann somit ebenfalls für variierende Ergebnisse verantwortlich sein. Neben einer schnelleren Invasion in entleerte Speicher muß zumindest für einige Nährstoffe (z.B. Fe) auch mit einer quantitativ gesteigerten Absorption bei Vorliegen eines prälatenten Mangels gerechnet werden.

So konnte z. B. in einer von uns durchgeführten Testung zur Verfügbarkeit von Eisen-II-sulfat aus einer handelsüblichen Arzneimittelszubereitung gezeigt werden, daß das Ausmaß der Stoffabsorption ganz wesentlich von den vorhandenen Speichern beeinflusst wird. Die an der Prüfung beteiligten Versuchspersonen waren gesund und zeigten bei der Eingangsuntersuchung zur Ermittlung des Eisenstatus keinen auffälligen Befund. Hämoglobin und Hämatokrit waren ebenso im Normalbereich wie die Erythrozytenzahl und der Serumeisenspiegel. Berücksichtigt man jedoch die Eisenspeicher (Ferritin), so läßt sich eindeutig zeigen, daß Versuchspersonen mit niedrigen Ferritinplasmaspiegeln das Eisen wesentlich besser absorbieren als solche, deren Speicher weitestgehend entleert sind (Tab. 1).

Tab. 1. Ausmaß der Eisenabsorption in Abhängigkeit vom Füllzustand der Speicher (Ferritin).

Probanden-Nr.	Geschlecht	Ferritin ng/ml	AUC $\mu\text{g/dl} \times \text{h}$
1	weibl.	21,5	1278,50
2	männl.	34,0	900,20
3	männl.	172,0	-151,20
4	weibl.	34,0	20,95
5	männl.	174,0	-201,70
6	männl.	57,0	935,30
7	männl.	72,0	-231,70
8	weibl.	12,0	1536,40

Um zuverlässige Testergebnisse zu erzielen, sollten Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von körpereigenen Stoffen folglich nur dann vorgenommen werden, wenn sichergestellt ist, daß die Probanden an allen Untersuchungsterminen über ausreichend gefüllte Körperspeicher verfügen. Die individuelle Stoffresorption, -verteilung und -ausscheidung läuft somit immer unter vergleichbaren kinetischen Bedingungen ab. Erreicht wird dies entweder durch die Gabe hoher Wirkstoffdosen vor Versuchsbeginn zur Auffüllung der Depots oder durch eine gezielte Auswahl gut bis sehr gut versorgter Versuchspersonen.

Eine weitere Voraussetzung zum Erhalt zuverlässiger Bioverfügbarkeitsdaten bei der Prüfung essentieller Nährstoffe ist die Erfassung des physiologischen Tagesprofils. Durch die Überprüfung des diurnalen Konzentrationsverlaufs kann man mögliche endogen bedingte Schwankungen der Tageskonzentrationen erkennen. Sofern diese deutlich ausgeprägt sind, müssen sie bei der Auswertung der postresorptiven Flächenintegrale berücksichtigt werden. Hierzu erfolgt eine Korrektur der individuellen Plasmakonzentrationen nach Testnährstoffbelastung um die jeweiligen Basiswerte (z. B. nach Placebogabe). Insofern unterscheiden sich Prüfungen essentieller Nährstoffe von Bioverfügbarkeitsprüfungen von Arzneimittelzubereitungen mit körperfremden Stoffen, da in letzteren immer auf die Nulllinie Bezug genommen wird. Wie wir am Beispiel der Folsäure zeigen konnten, läßt sich zumindest für bestimmte essentielle Nährstoffe durch Standardisierung der Versuchsbedingungen ein weitgehend gleichmäßiges Tagesprofil ohne ausgeprägte Schwankungen erreichen, wobei die Plasmaspiegel im Bereich des Ausgangswertes (0-Termin) verbleiben. Unter diesen Bedingungen kann auf die Korrektur der postresorptiven Plasmakonzentrationen um die Basiswerte verzichtet werden. In diesem Fall wird der Plasmaspiegel zum Zeitpunkt t_0 (vor Substanzapplikation) als Nulllinie definiert.

Unter Berücksichtigung der zuvor skizzierten Rahmenbedingungen wird am Beispiel der Folsäure die Ermittlung der Bioverfügbarkeit aus Vitaminzubereitungen vorgestellt.

Versuchsanstellung und Methoden

Zwölf gesunde männliche und weibliche Probanden im Alter von 21 bis 30 Jahren nahmen nach Durchführung einer Voruntersuchung einschließ-

lich klinisch-chemischer Labortests an der Studie teil. Dabei wurden Probanden ausgewählt, deren Serum- und Erythrozytenfolatwerte deutlich oberhalb der Grenzwerte einer defizitären Folatversorgung (Serumfolat: $>4,5$ ng/ml, Erythrozytenfolat: >250 ng/ml, lagen und daher einen guten Folatstatus signalisierten (9, 10).

Im randomisierten Cross-over-Design wurde jeweils eine Einzeldosis mit 1 mg Folsäure verschiedener Zubereitungen per os verabreicht. Ein Monopräparat, das als Wirkstoff 1 mg 5-Formyl-Tetrahydrofolsäure enthält, wurde mit einer 1 mg Folsäure enthaltenden wäßrigen Lösung (Standardbezugssubstanz: Pteroylmonoglutamat (PGA)) verglichen, um die relative Bioverfügbarkeit des Monopräparates zu bestimmen. In die Prüfung wurde ein Placebo miteinbezogen, um die Konstanz des Basisprofils unter den gewählten Versuchsbedingungen zu demonstrieren. Zusätzlich wurde ein folsäurehaltiges Handelspräparat getestet, das neben 1 mg Folsäure (PGA) weitere Vitamine und Eisen enthält. Direkt vor der Einnahme der Präparate sowie $\frac{1}{2}$, 1, 2, 4, 6, 8 und 10 Stunden danach wurden Blutproben aus der Armvene entnommen und das Plasma bis zum Zeitpunkt der Analytik bei -20°C tiefgefroren. Zwischen den Applikationen lag eine Auswaschphase von einer Woche, um eine weitestgehende Elimination der gegebenen Dosis und eine Normalisierung der Blutspiegelkonzentration sicherzustellen. Die Probanden wurden für den jeweiligen Testtag um 8.00 Uhr zur Untersuchung bestellt und blieben bis zum Abschluß der letzten Blutentnahme (18.00 Uhr) unter ständiger Aufsicht.

Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Folat ohne Korrektur der postresorptiven Serumspiegel um die individuellen Basisprofile erfordern standardisierte Rahmenbedingungen hinsichtlich der Energiezufuhr, die in Vorversuchen erarbeitet wurden und an anderer Stelle bereits ausführlicher besprochen worden sind (11). Dabei wird ca. ein Drittel der Energie durch ein kommerziell erhältliches folatfreies Eiweißpräparat geliefert, welches neben einem hohen Eiweißanteil einen Zusatz der Vitamine A, B₁, B₂, B₆, C, D und E sowie Eisen und Calcium enthält. Von allen Versuchspersonen wurden 100 g (396 kcal) dieser Diätahrung einheitlich über den Tag verteilt in zweistündigen Abständen aufgenommen.

Die restlichen zwei Drittel der Energie – zur Sicherstellung einer ausreichenden Gallensekretion und damit einer konstanten Folat-Elimination – mußten von den Versuchspersonen in Form von 100–150 g Schokolade (2 µg Folat je 100 g), ebenfalls gleichmäßig über den Tag verteilt, verzehrt werden.

Die Analytik der Folsäure erfolgt radiochemisch (RIA, Testsatz: Diagnostic Products) nach dem Prinzip der kompetitiven Proteinbindungsmethode mit ^{125}J als Markierungsisotop. ^{125}J -Folsäure konkurriert mit dem freigesetzten Plasmafolat um die Bindung an (zuge-setztem) β -Lactoglobulin, dem spezifischen Folsäurebindungsprotein aus Kuhmilch. Die nach Abtrennung der freien (ungebundenen) Folsäure gemessene Radioaktivität ist umgekehrt proportional dem Folatgehalt der Probe (12). Die Bestimmung erfolgte in einem Gamma-Scintillationscounter (LKB, Riagamma). Der Meßbereich für Folsäure liegt zwischen 0,5 und 24 ng/ml. Plasmaproben mit höheren Konzentrationen wurden durch Zugabe von Nullstandard so weit verdünnt, daß eine in den Meßbereich fallende

Tab. 2. Fläche unter der Konzentrationszeitkurve ($AUC = \text{ng/ml} \times \text{h}$) nach Gabe von 1 mg Folicin in unterschiedlichen Zubereitungen sowie nach Gabe von Placebo.

Versuchsperson	AUC [$\text{ng/ml} \times \text{h}$]		Quotient	AUC [$\text{ng/ml} \times \text{h}$]	
	Bezugssubstanz Folsäure (PGA) wäßrige Lösung	Testpräparat 5-Formyl-THF		Placebo	Kombinationspräparat Folsäure (PGA)
1	96,4	94,5	0,98	38,4	18,4
2	64,3	50,0	0,78	-1,7	-1,1
3	50,2	58,3	1,16	7,3	-10,1
4	109,5	120,5	1,10	1,7	-28,0
5	107,0	119,1	1,11	-20,3	37,2
6	74,1	77,2	1,04	-10,5	1,3
7	80,1	69,2	0,87	8,2	2,5
8	79,6	70,8	0,89	9,6	6,5
9	86,6	147,2	1,70	-28,4	-76,8
10	65,2	71,0	1,09	18,1	-14,1
11	80,7	58,4	0,72	-3,6	8,3
12	76,7	51,9	0,68	-22,3	6,5
\bar{x}	80,90	82,40	1,02	-0,30	-4,10

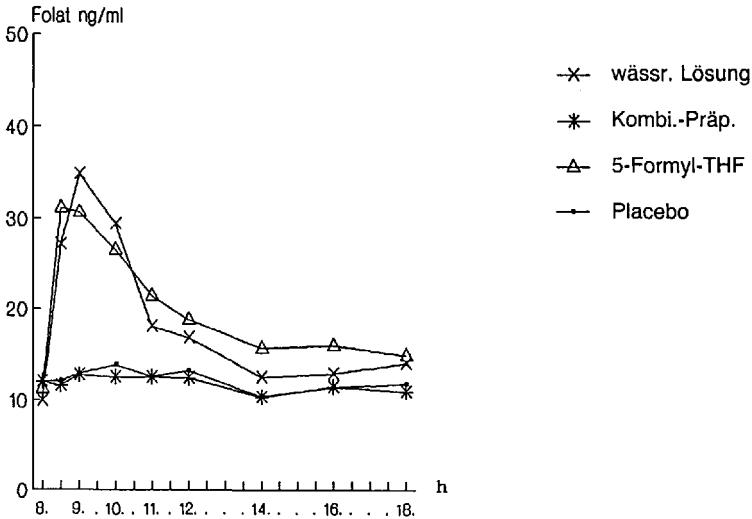


Abb. 3. Postresorptive Plasmafolatkonzentrationen nach Folacinapplikation in unterschiedlichen Formulierungen bzw. nach Placebogabe.

Konzentration vorlag. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

Die verabreichten Prüfpräparate wie das Placebo wurden von den beteiligten Versuchspersonen ausnahmslos sehr gut vertragen. Nach Placebogabe wurde das Basis-Folsäure-Profil über den Prüfungszeitraum untersucht. Da es sich im Streubereich des Ausgangswertes bewegte, wurden die Berechnungen der postresorptiv ermittelten Flächenintegrale auf den jeweiligen Nüchternwert (8.00 Uhr) bezogen.

Während der Absorption erfolgt bereits in der Mukosazelle eine weitestgehende Metabolisierung sowohl von Folsäure als auch von 5-Formyl-Tetrahydrofolsäure zu 5-Methyl-Tetrahydrofolsäure, der wesentlichen Form in der Zirkulation, so daß eine Aussage zur Bioäquivalenz der als Testsubstanz verabreichten 5-Formyl-Tetrahydrofolsäure ebenfalls möglich ist. Nach der Leberpassage liegen weitere stoffwechselwirksame Metaboliten vor (first pass effect), die bei der analytischen Bestimmung durch Wahl einer geeigneten Probenaufarbeitung in ihrer Gesamtheit erfaßt werden können.

Die Auswertung des postresorptiven Kurvenintegrals nach Gabe von 1 mg Folsäure in wäßriger Lösung ergibt eine AUC von $80,9 \pm 18,2$ ng/ml \times h (vgl. Tab. 2). Der maximale Serumanstieg erreicht ein Ausmaß von $C_{\max} = 28,29 \pm 8,83$ ng/ml, 1,0 h (t_{\max}) nach der Applikation.

Nach oraler Applikation von 1 mg 5-Formyl-Tetrahydrofolsäure wird das postresorptive Flächenintegral mit $AUC = 82,40 \pm 31,20$ ng/ml \times h ermittelt, wobei der maximale Serumanstieg $C_{\max} = 23,20$ ng/ml $\pm 7,5$ ng/ml beträgt. Dieses Maximum wird nach 0,79 h erreicht (t_{\max}).

Die Mittelwerte der postresorptiven Kurvenverläufe der geprüften Folsäureformulierungen sind in Abbildung 3 dargestellt, wobei ebenfalls das Basisprofil nach Placebogabe angegeben wird. Eine genauere Bewertung der relativen Bioverfügbarkeit läßt sich für das Formyl-THF-haltige Testpräparat vornehmen, indem der Bioverfügbarkeitsquotient aus den Flächen nach THF-Gabe bezogen auf die Fläche nach wäßriger Lösung gebildet wird. Multipliziert man den erhaltenen Mittelwert mit 100, ergibt sich eine relative Bioverfügbarkeit der Formyl-THF von 102, d.h., die geprüfte Substanz weist eine sehr gute Verfügbarkeit in bezug auf die Referenzlösung auf.

Nach varianzanalytischer Auswertung der individuellen AUCs von THF und Folsäure in wäßriger Lösung ergab sich mit einem MQR (mittlere Quadratsumme der Rest-Streuung) von 277 ein 95%-Vertrauensbereich (95%-VB) von 0,83 bis 1,21 für den gefundenen Bioverfügbarkeitsquotienten. Die bei der Ermittlung dieses 95%-VB zugrundeliegende mathematische Vorgehensweise ist der Arbeit von Steinijans und Diletti (13) zu entnehmen. Gemäß dieser Autoren ist ein 95%-VB von 0,8–1,2 für den Bioverfügbarkeitsquotienten für biologisch äquivalente Präparate tolerierbar.

Prinzipiell entsprechen die Freisetzungs- und Absorptionsraten aus pharmazeutischen Zubereitungen nicht der Verfügbarkeit von Wirkstoffen aus wäßrigen Lösungen. Generell muß angenommen werden, daß nach Verabreichung von Trinklösungen mehr absorbiert wird als nach Gabe von festen pharmazeutischen Formulierungen. Diesem Umstand wird insofern Rechnung getragen, als man üblicherweise davon ausgeht, daß pharmazeutische Zubereitungen, die mindestens 70 % der Verfügbarkeit nach Gabe der Vergleichssubstanz in wäßriger Lösung aufweisen, im allgemeinen als sehr gut bioverfügbar zu bewerten sind. Somit ist die hier geprüfte 5-Formyl-THF-haltige Zubereitung im Vergleich zur wäßrigen Lösung außergewöhnlich gut verfügbar.

Eine Vielzahl unterschiedlich dosierter folathaltiger Mono- und Kombinationspräparate befinden sich im Handel. Mehrere dieser Präparate wurden unter anderem auch von uns in den vergangenen Jahren getestet und weisen in der Regel eine gute Verfügbarkeit auf (14, 15).

Der Einsatz derartiger Präparate hat in mehrfacher Hinsicht seine Berechtigung. Einerseits ist unter den Bedingungen einseitiger Nahrungswahl und bei ungünstigen Zubereitungsbedingungen, die mit erhöhten Nährstoffverlusten verbunden sind, die prophylaktische Anwendung von Vitaminpräparaten sinnvoll. Andererseits ist unter den Bedingungen eines erhöhten Bedarfs (z.B. Schwangerschaft) eine bedarfsgerechte Versorgung nicht immer gewährleistet, so daß die prophylaktische Einnahme von Vitaminpräparaten auch hier ihre Berechtigung hat. Liegt bereits ein Nährstoffmangel vor, wird der therapeutische Einsatz mit höherer Dosierung erforderlich, um den bestehenden Mangel zu beheben. Der Therapieerfolg ist dabei im wesentlichen abhängig von der Verfügbarkeit des eingesetzten Mittels. Entsprechendes gilt auch für den prophylaktischen Einsatz von Vitaminpräparaten. Um so erstaunlicher war es, daß bei dem hier zusätzlich in die Testung miteinbezogenen Kombinationspräparat praktisch keine Verfügbarkeit der Folsäure zu erkennen war. Die Auswer-

tung des postresorptiven Kurvenverlaufs erbrachte nahezu deckungsgleiche Ergebnisse zur Placebogabe (s. Tab. 2 und Abb. 3).

Welche Bedeutung derartigen Verfügbarkeitsprüfungen zukommt, wird unter anderem darin deutlich, daß vereinzelt doch Präparate im Handel sind, deren Zusammensetzung scheinbar optimal ist, deren tatsächliche Potenz, bestimmte Nährstoffe für den Organismus bereitzustellen, nach objektiver Bewertung jedoch gering ist. Folglich ist es sehr zu begrüßen, daß entsprechende Daten zunehmend erhoben werden und damit weiteres Erkenntnismaterial für eine zuverlässigere Bewertung der verschiedenen Präparate zur Verfügung steht.

Literatur

1. Food and Drug Administration (1973) USA
2. Dost FH (1968) Grundlagen der Pharmakokinetik. 2. Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
3. Notes for Guidance of the EEC, III/573/79-EN, Investigations on Bioavailability
4. Notes for Guidance of the EEC, III/603/81-EN, Pharmacokinetic Studies in Man
5. APV-Richtlinie in „Generika“ (1979) Deutscher Ärzteverlag Köln (1988). Biometrics 35:273–280
6. Lückner PW, Nestler T (1985) Zur therapeutischen Verwertbarkeit von Magnesiumzubereitungen. Magnesium-Bulletin 7:62–65
7. Hages M, Mirgel C, Pietrzik K (1988) Vitamin B₁₂ und Folsäurekinetik unter Nahrungskarenz. EU 35:157
8. Pietrzik K: unveröffentlichte Ergebnisse (zur Publikation vorbereitet)
9. Pietrzik K, Urban G, Hötzel D (1978) Biochemische und hämatologische Maßstäbe zur Beurteilung des Folatstatus beim Menschen. 1. Mitteilung: Beziehungen zwischen Serumfolat und neutrophilen Granulozyten. Intern Z Vit Ern 48:391–396
10. Pietrzik K, Urban G, Hötzel D (1978) Biochemische und hämatologische Maßstäbe zur Beurteilung des Folatstatus beim Menschen. 1. Mitteilung: Beziehungen zwischen Serumfolat und neutrophilen Granulozyten. Intern Z Vit Ern 48:391–396
11. Hages M, Pietrzik K (1987) Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit der Folsäure aus unterschiedlichen Dosierungen. EU 34, 9:298–302
12. Waxman S, Schreiber C, Herbert V (1971) Radioisotopic assay for measurement of serum folate status. Blood 38:219–228
13. Steinijans VW, Diletti E (1983) Statistical analysis of bioavailability studies: parametric and nonparametric confidence intervals. Eur J Clin Pharmacol 24:127–136
14. Pietrzik K, Hötzel D (1980) Untersuchungen zur oralen Eisen-Folsäure-Substitution. Internat J Vit Nutr Res 50:141–149
15. Pietrzik K, Hages M, Mirgel C, König J (1988) Bewertung der Folsäureresorption aus einem eisenhaltigen Kombinationspräparat. medwelt 39:1112–1117

Eingegangen 24. Februar 1989

Für die Verfasser:

Prof. Dr. K. Pietrzik, Endenicher Allee 11–13, 5300 Bonn 1