

Riboflavinphosphat-Natrium-Hydrat

Riboflavini natrii phosphas hydricum

Allgemeine Angaben

Riboflavin (Vitamin B₂) gehört zur Gruppe der wasserlöslichen Vitamine und wird bei Hypovitaminose eingesetzt.

Die Substanz (2) ist auch in der USP, JAP und BP beschrieben. Allgemeines zu Riboflavin (Vitamin B₂), siehe den Kommentar zu **Riboflavin** (Ph. Eur.).

CAS-Nr.: 130–40–5

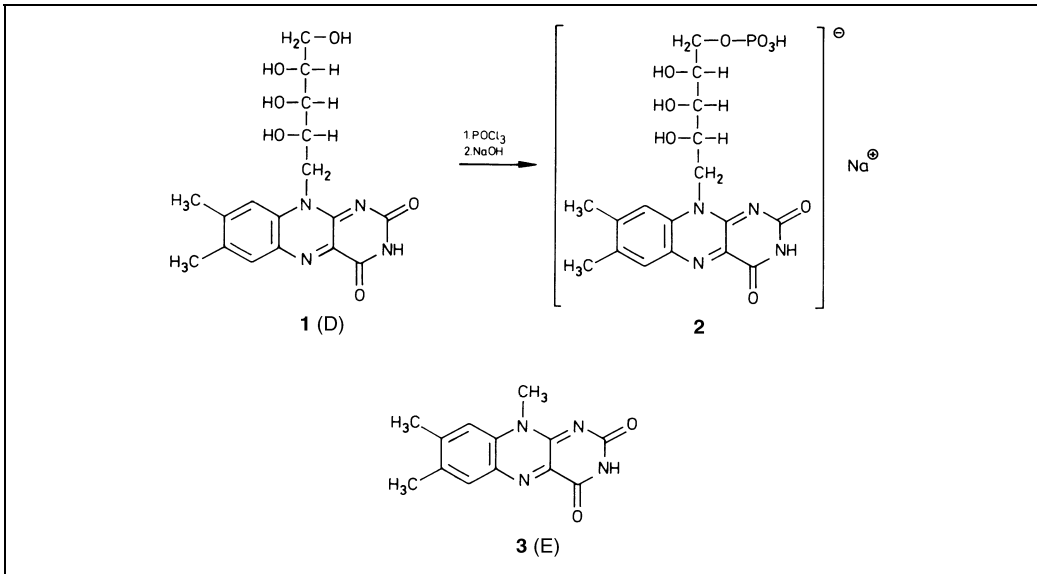
Drug Bank-Nr.: DBSALT000877 (Riboflavin-5'-monophosphat-Natrium-Dihydrat)
DBSALT001766 (Riboflavin-5'-monophosphat-Natrium, wasserfrei)

PubChem-ID: 23666409

In der Ph. Eur. 11.2 werden sowohl die 3'-, 4'- und 5'-Monophosphate als auch die 3',4'-, 3',5'- und 4',5'-Diphosphate berücksichtigt, die eine variable Menge Wasser beinhalten können. Die Hauptkomponente ist Riboflavin-5'-hydrogensulfat-Natrium. Die Ph. Eur., BP und USP schreiben vor, dass der Gehalt an getrocknetem Riboflavin 73,0 bis 79,0% betragen muss. Die JAP fordert einen Gehalt von < 92%, bezogen auf die wasserfreie Base.

Darstellung: Riboflavin (1, Verunreinigung D; zu dessen Synthese oder Gewinnung aus Mikroorganismen siehe den Kommentar zu **Riboflavin**, Ph. Eur.) wird mit Phosphoroxotrichlorid oder mit anderen Phosphorylierungsmitteln umgesetzt. Durch Neutralisation mit Natronlauge erhält man Riboflavinphosphat-Natrium (2).

Die in mehreren Patenten beschriebenen Verfahren unterscheiden sich hinsichtlich der Reaktionsbedingungen und durch Variation des Phosphorylie-



R

rungsmittels. Bei der Phosphorylierung mittels Phosphoroxytrichlorid in Diethylenglycolmonomethylether wird die Substanz mit 92 % Ausbeute erhalten¹⁾. Mit Tetrachlorpyrophosphorsäure in Gegenwart von Acetonitril, Phenol, Estern oder Nitroverbindungen erzielt man eine Phosphorylierung mit 90 % Ausbeute²⁾. Die Ausbeute beträgt

87 %, wenn mit partiell hydrolysiertem Phosphoroxytrichlorid phosphoryliert wird³⁾. Das erhaltene Rohprodukt wird chromatographisch gereinigt. Trotzdem enthalten die üblichen Handelsmuster in merklichen Mengen nicht umgesetztes Riboflavin und unterschiedliche Mono- und Diphosphate. Sehr reines Riboflavinphosphat-Natrium mit we-

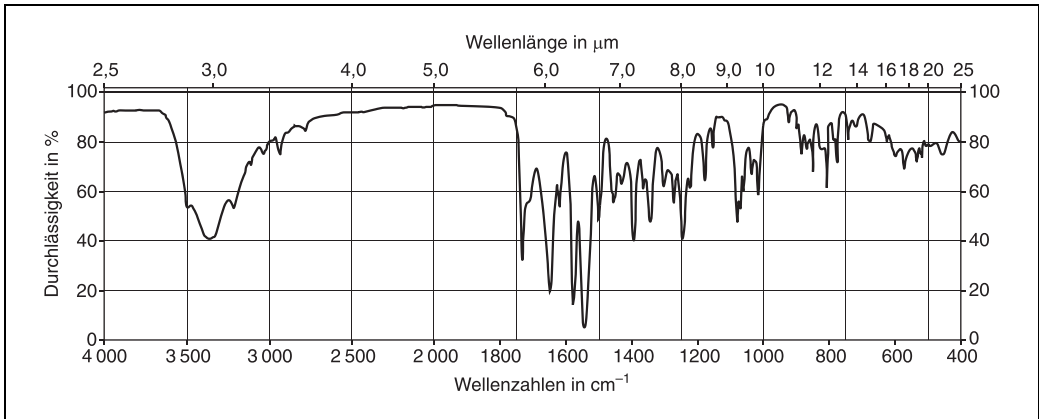


Abb. 1: IR-Spektrum von Riboflavin (KBr-Pressling; Spectral Database for Organic compounds)

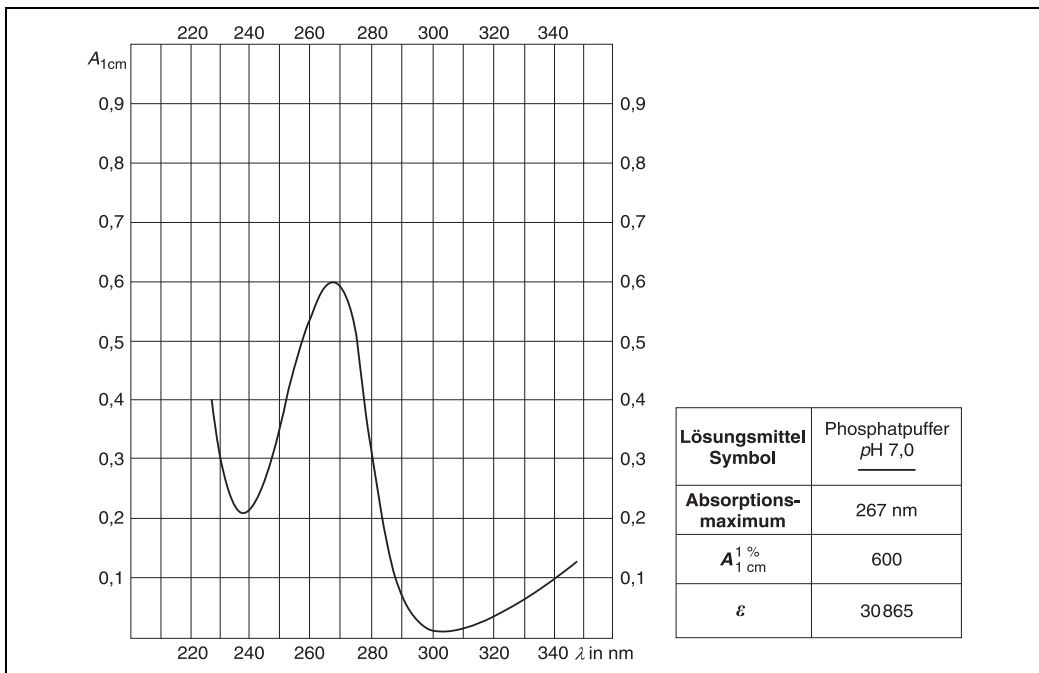


Abb. 2: UV-Spektrum von Riboflavinphosphat-Natrium-Dihydrat ($c = 1 \text{ mg}/100 \text{ ml}$)

niger als 1% Fremdstoffen wurde nach Affinitätschromatographie gewonnen⁴).

Stabilität/Lagerung: Zur Stabilität und Unverträglichkeiten siehe den Kommentar zu **Riboflavin** (Ph. Eur.).

Einheitlich empfehlen alle Arzneibücher eine Lagerung in dicht geschlossenen Gefäßen und vor Licht geschützt. Unter diesen Bedingungen ist die Substanz selbst bei höheren Temperaturen haltbar.

Synonyme: Flavinmononucleotid (FMN), Vitamin-B₂-Phosphat

Arzneibuchnamen: Riboflavin-5'-phosphate Sodium (USP), Riboflavin Sodium Phosphate (JAP, BP)

Eigenschaften

Die Substanz (2) ist ein gelbes oder orangegelbes, mikrokristallines Pulver von nur schwach wahrnehmbarem Geruch und bitterem Geschmack. Der entscheidende Unterschied zu **Riboflavin** (Ph. Eur.) besteht in der Wasserlöslichkeit. Während Riboflavin (1, D) sich in Wasser nur sehr schwer löst, ist 2 gut löslich, wobei die Löslichkeit pH-abhängig ist. In 1 ml Wasser lösen sich bei pH 6,9: 112 mg, bei pH 5,6: 68 mg und bei pH 3,8: 43 mg⁵).

Prüfung auf Identität

Die früher geforderten Identitätsprüfungen mittels UV-Spektroskopie und HPLC wurden im Nachtrag 11.2 durch die ausreichend spezifische IR-Spektroskopie ersetzt.

A. Vgl. Abb. 1.

B. Abbau der organischen Substanz mittels Salpetersäure und Glühen; die im Glührückstand enthaltenen Natrium-Ionen lassen sich im schwach Basischen als Natriumhexahydroxantimonat(V) fällen (siehe in 2.3.1, Ph. Eur., die Identitätsreaktion a auf Natrium und den zugehörigen Kommentar).

C. Die im Glührückstand von Identitätsprüfung B enthaltenen Phosphat-Ionen lassen sich als gelbes Ammoniummolybdophosphat nachweisen (siehe in 2.3.1, Ph. Eur., die Identitäts-

reaktion b auf Phosphat (Orthophosphat) und den zugehörigen Kommentar).

Die Identitätsprüfungen B und C erlauben die Unterscheidung zu Riboflavin (1, D).

Die USP lässt die Identität ebenfalls mittels Salpetersäure und Glühen sowie anschließender Prüfung auf Natrium und Phosphat (also entsprechend der Ph.-Eur.-Prüfungen B und C) prüfen.

Andere Identitätsprüfungen: Das 2. AB/DDR wies Natrium durch Flammenfärbung und Phosphat nach Glühen mit Natriumcarbonat/Kaliumnitrat nach.

Die JAP und BP lassen ein UV-Spektrum in Phosphat-Puffer aufnehmen (vgl. Abb. 2) und fordern ein Maximum bei 266 nm mit einer spezifischen Absorption $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ zwischen 580 und 640.

Die UV-Absorptionsspektren von Riboflavinphosphat-Natrium und Riboflavin (1, D) sind sehr ähnlich. Unterschiede bestehen nur in der spezifischen Absorption, wodurch eine Unterscheidung möglich wird; siehe auch den Kommentar zu **Riboflavin** (Ph. Eur.).

Die JAP und BP vergleichen den Hauptpeak des Chromatogramms der Reinheitsprüfung auf verwandte Substanzen mit dem Hauptpeak des Chromatogramms von Riboflavinphosphat-Natrium CRS.

Die JAP und BP lassen die Substanz in alkalischer Lösung mit UV-Licht bestrahlen. Dabei entsteht das gelbgrün fluoreszierende Lumiflavin (3, Verunreinigung E), welches sich nach Ansäuern mit Dichlormethan extrahieren lässt (siehe den Kommentar zu **Riboflavin**, Ph. Eur.).

Die USP überprüft die Farbe und Fluoreszenz einer 0,1%igen wässrigen Lösung. Unter Durchlichtung soll die Lösung blass grünlich gelb erscheinen, unter langweiliger UV-Belichtung eine intensiv gelblich grüne Färbung aufweisen, die unter Zusatz von Mineralsäuren oder Laugen verschwindet. Die Färbung beruht auf einer Oxidation des Isoalloxacins.

Prüfung auf Reinheit

pH-Wert: Der pH-Wert von Lösungen der Handelsprodukte schwankt, da sie geringe Mengen des Dinatriumsalzes enthalten. Reinstes Riboflavin-

R

phosphat-Natrium hat einen pH-Wert von 4,5 (Lit.⁵⁾). Die USP, JAP und das 2. AB/DDR limitieren den pH-Wert einer 1%igen Lösung ebenfalls auf 5,0 bis 6,5.

Spezifische Drehung: Die spezifische Drehung der Substanz ist stark vom pH-Wert abhängig. Alkalische Lösungen sind links drehend, saure rechts drehend. Bedingt durch den Phosphatanteil der Substanz ist die spezifische Drehung geringer als die von Riboflavin (1, D); diese beträgt im salzsauren Milieu +56,5 bis +59,5 (USP).

Verunreinigung E: Das toxische, für die Extraktion von Lumiflavin (3, E) früher übliche Chloroform ist durch Dichlormethan ersetzt. Dichlormethan enthält kein Ethanol als Stabilisator, weshalb die Verwendung eines speziell gereinigten Lösungsmittels nicht erforderlich ist (siehe den Kommentar zu **Riboflavin**, Ph. Eur.). Die USP und JAP schreiben die Verwendung von ethanolfreiem Chloroform vor.

Verwandte Substanzen: Mit der aus der USP übernommenen RP-HPLC-Prüfung ist eine gute Abtrennung der Hauptkomponente Riboflavin-5'-phosphat-Natrium Hydrat von den 3'- und 4'-Monophosphat- sowie den Diphosphatderivaten, den spezifizierten Verunreinigungen D bis H sowie unspezifizierten Verunreinigungen möglich. Durch die Aufnahme der Diphosphat-Hydrate in die Liste an Komponenten entfallen diese als früher aufgelistete Verunreinigungen A bis C. Im Gegensatz zur fluorimetrischen Detektion in der USP erfolgt nach der Ph. Eur. die Detektion mittels der einfacheren und allgemein üblichen UV-Absorptionsmessung bei 266 nm.

Die Trennung ist sehr robust, sodass mit allen gängigen C₁₈-Säulen die geforderte Auflösung von 1,5 zwischen den Peaks von Riboflavin-4'-monophosphat und Riboflavin-5'-monophosphat erzielt wird. Riboflavin (1, D) weist bei den meisten Säulen eine relative Retentionszeit von etwa 2 auf, sodass der Riboflavin-Peak häufig erst nach der zweifachen Retentionszeit des Riboflavin-5'-monophosphat-Peaks (etwa 1) erscheint. Da immer nicht umgesetztes Riboflavin in der Substanz enthalten ist, muss das Chromatogramm bis zum Erscheinen des Riboflavin-Peaks aufgezeichnet werden. Zur Identifikation der Peaks werden die Spektren von Riboflavin

CRS (Verunreinigung D) sowie Riboflavinphosphat-Natrium zur Peak-Identifikation CRS (enthält die Verunreinigungen F, G, und H) herangezogen. Die Ph. Eur. fordert max. 6,0% Riboflavin (Verunreinigung D), max. 0,7% für Verunreinigung F sowie max. 0,6 und 0,4% für die Verunreinigungen G bzw. H. Der Anteil an unspezifizierten Verunreinigungen wird auf 0,2% pro Verunreinigung begrenzt; maximal dürfen 8,0% Verunreinigungen enthalten sein bei einem Grenzwert von 0,05%, berechnet aus einer 2000fachen Verdünnung der Probelösung.

Die in der Monographie **Substanzen zur pharmazeutischen Verwendung** (Ph. Eur., unter „Monographiegruppen, Allgemeine Monographien“) in Tab. 2034-1 angegebenen Grenzwerte für Verunreinigungen gelten für Riboflavinphosphat-Natrium demnach nicht¹⁰⁾.

Zusammensetzung: Die Zusammensetzung der Probe wird mittels HPLC (siehe die Reinheitsprüfung „Verwandte Substanzen“) bestimmt. Zur Identifikation der Peaks werden das Chromatogramm von Riboflavinphosphat-Natrium CRS sowie das aus der Reinheitsprüfung „Verwandte Substanzen“ erhaltene Chromatogramm herangezogen. Die Ph. Eur. fordert mindestens 65,0% der Hauptkomponente Riboflavin-5'-phosphat-Natrium-Hydrat. Die 3'- und 4'-Natriumhydrogenmonophosphate werden auf 7,0 bzw. 12,0% limitiert; das früher als Verunreinigung A aufgeführte Riboflavin(3',4'-diphosphat) wird auf 1,0% begrenzt, die früher als Verunreinigungen B und C aufgeführten -3',5'- und 4',5'-diphosphate werden auf je 3,5%.

Anorganisches Phosphat: Als Syntheserückstand (siehe unter „Darstellung“) enthält die Substanz merkliche Mengen an Phosphat. Die Bestimmung erfolgt durch photometrische Messung von Molybdänblau. Die drastischen Bedingungen der Vorschrift zur allgemeinen Phosphat-Grenzprüfung nach 2.4.11 der Ph. Eur. (siehe den zugehörigen Kommentar) werden hier nicht angewandt, da sonst aus der Substanz selbst Phosphat abgespalten würde. Die Reduktion der Phosphormolybdänsäure erfolgt hier stattdessen mit Eisen(II)-sulfat (siehe dazu Lit.⁹⁾). Die Ph. Eur. begrenzt den Anteil an anorganischem Phosphat auf 1,0%, berechnet aus der Absorption bei 700 nm gegen eine Referenzlösung.

Trocknungsverlust: Die Ph. Eur. schreibt Trocknen im Vakuumtrockenschrank bei 105 °C für 5 h vor. Die von den Arzneibüchern geforderten Grenzwerte sind in Abhängigkeit vom angegebenen Verfahren unterschiedlich. Die USP akzeptiert maximal 7,5%, während die JAP bei Bestimmung mittels Karl-Fischer-Titration 10,0% zulässt. Der theoretische Wert beträgt 7,0%.

Gehaltsbestimmung

Wie bei **Riboflavin** (Ph. Eur.) wird auch hier der Gehalt durch Messung der Absorption im Maximum bei 444 nm bestimmt. Unterschiede zu Riboflavin bestehen in der Art der Bereitung des Natriumacetatpuffers. Mit dieser Prüfung wird der Riboflavingehalt einschließlich des freien Riboflavins erfasst. Es wird die gleiche spezifische Absorption $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 328$ verwendet, sodass der Natrium- und Phosphatanteil keine Berücksichtigung finden.

Andere Bestimmungsmethoden: Die JAP misst die Absorption bei 444 nm gegen eine Riboflavinphosphat-Natrium-Standardsubstanz mit und ohne Zusatz von Natriumdithionit. Das 2. AB/DDR bestimmt nach Oxidation mit Kaliumperanganat ebenfalls bei 444 nm. Die USP schreibt eine Gehaltsbestimmung durch Messung der Fluoreszenzintensität bei 530 nm und einer Anregung von 440 nm gegen eine Riboflavin-Standardsubstanz vor. Zur Bestimmung in Arzneifertigpräparaten und Multivitaminpräparaten haben sich besonders fluorimetrische⁶⁾ und HPLC-Verfahren^{7, 8)} bewährt.

Metabolisierung

Siehe Abb. 3 und 4. Riboflavin (**1, D**) ist Teil der Coenzyme FMN (Flavinmononucleotid) und FAD (Flavin-Adenin-Dinucleotid), welches eine prosthetische Gruppe verschiedener wasserstoffübertragender Flavoproteine darstellt¹¹⁾. Vor der aktiven Aufnahme in den proximalen Darmab-

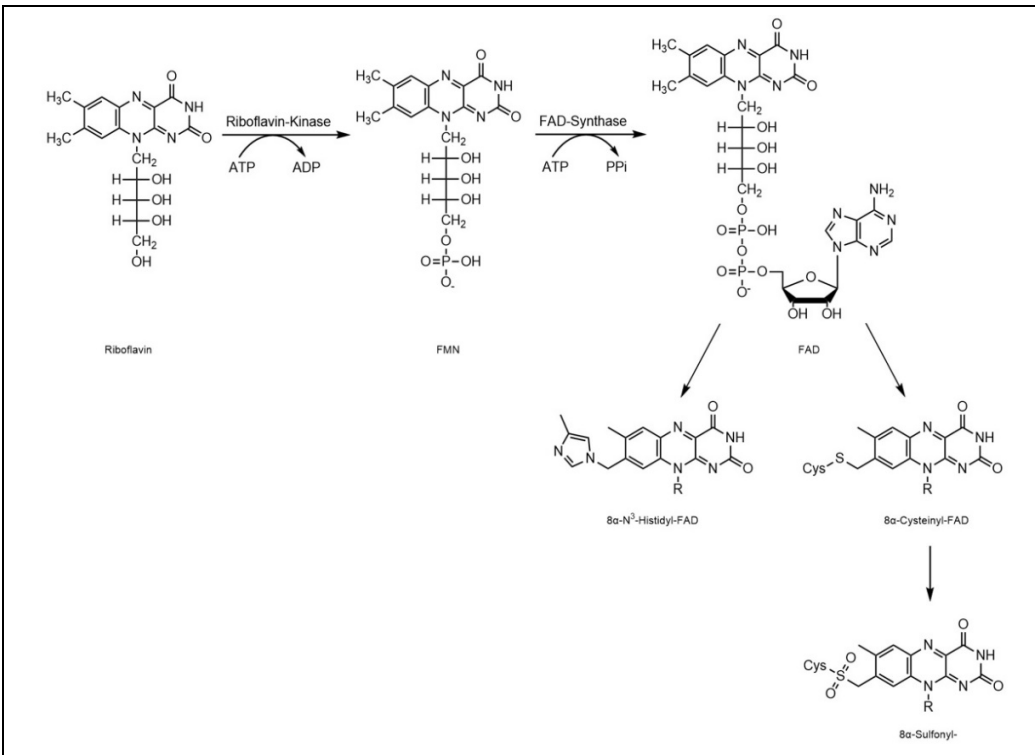


Abb. 3: Umwandlung von Riboflavin in seine Derivate

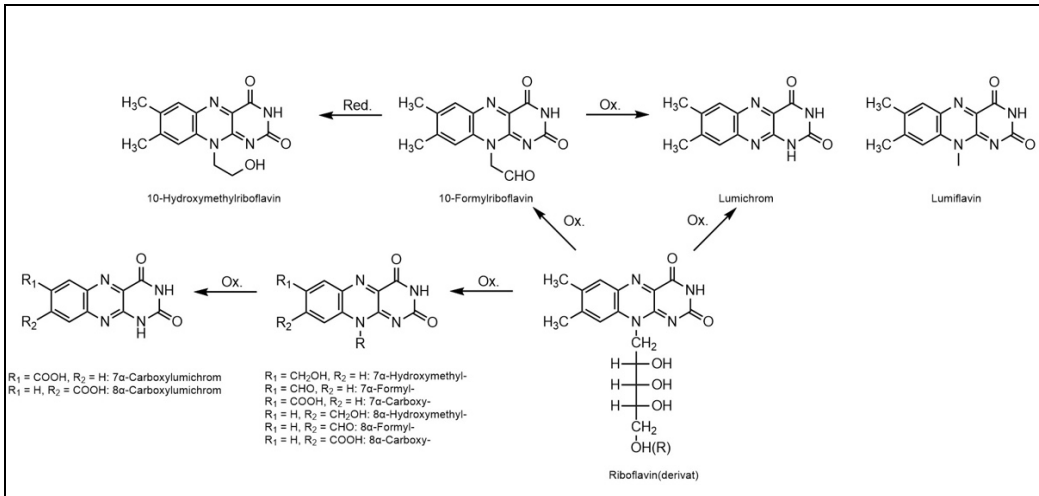


Abb. 4: Metaboliten von Riboflavin

schnitten wird phosphoryliertes Riboflavin enzymatisch gespalten¹². Nach der Aufnahme wird Riboflavin im Zytosol¹³ durch Riboflavin-Kinase in FMN überführt, welches anschließend durch FAD-Synthase (Cofaktor $\text{Mg}^{2\oplus}$) zu FAD umgewandelt wird¹¹⁻¹⁴. Bei einem Wechsel des Cofaktors $\text{Mg}^{2\oplus}$ zu $\text{Co}^{2\oplus}$ dient das Enzym als FAD-Hydrolase, es befindet sich im Zytosol, in den Mitochondrien und im Zellkern^{14, 15}. FMN und FAD können nichtkovalent oder kovalent an Apo-Flavoenzyme gebunden werden. Apo-Flavoenzyme sind instabil und daher nicht in großen Mengen vorhanden, können aber dennoch als Indikatoren für einen Riboflavinmangel herangezogen werden, da sie eng mit der Proteinqualitätskontrolle verbunden sind¹⁶. Die kovalente Bindung der Coenzyme an Apo-Flavoenzyme erfolgt vermutlich während oder

nach der Translation unter Autokatalyse, z.B. $8\alpha\text{-N}^3\text{-Histidyl-FAD}$ an Succinat-Dehydrogenase oder $8\alpha\text{-Cysteinyl-FAD}$ an mitochondriale Monoaminoxidase^{17, 18}. Die Ausscheidung erfolgt hauptsächlich renal¹⁹. Es werden freies Riboflavin, Spaltprodukte von Flavinylpolypeptiden aus somatischen Zellen²⁰ sowie $7\alpha\text{-}$, $8\alpha\text{-Hydroxyriboflavin}$ ^{21, 22} und $8\alpha\text{-Sulfonylriboflavin}$ ²¹ ausgeschieden. Bakterien des Magen-Darm-Trakts spalten die Ribityl-Seitenkette zu 10-Formylmethylriboflavin, das entweder zu 10-Hydroxymethylriboflavin^{12, 19} reduziert oder zu Lumichrom und Lumiflavin oxidiert werden kann^{23, 24}. Durch photochemische Reaktionen auf der Haut bilden sich Lumiflavin- und Lumichromderivate²¹.

E. Kallert/Schi

Pharmakologische Eigenschaften

Physiologie: Wasserlösliches Riboflavin (Vitamin B₂) ist ein essenzieller Wirkstoff für den Menschen. Es ist in Form von Riboflavin-5'-monophosphat (FMN, Flavinmononucleotid) oder Flavinadeninucleotid (FAD; besteht aus FMN und Adenosinmonophosphat) Coenzym oder prosthetische Gruppe einer großen Zahl von Oxidoreduktasen, die wegen der gelben Farbe des oxidierten Coenzym als Flavoproteine oder Flavoenzyme

bezeichnet werden. Diese sind für die Wasserstoffübertragung in der mitochondrialen Atmungskette, die Dehydrierung von Fettsäuren und die oxidative Desaminierung von Aminosäuren unentbehrlich. Ferner bestehen biochemische Verknüpfungen mit anderen Vitaminen der B-Gruppe und Vitamin A. So werden die Vitamine Folsäure und Pyridoxin unter Mitwirkung von FAD und FMN in ihre Coenzymformen überführt. Der tägliche Bedarf liegt für gesunde Erwachsene bei 1,2 bis 1,4 mg Riboflavin. In der Schwangerschaft ist eine Steigerung von etwa 0,3 mg/Tag und in der Stillzeit von

0,8 mg/Tag erforderlich. Ein Mehrbedarf kann zudem bei länger dauernder Anwendung von Arzneimitteln, bei Erkrankungen oder Stoffwechselstörungen sowie bei Alkoholmissbrauch bestehen.

Ein spezifischer Riboflavinmangel ist beim Menschen selten und nur bei einer extrem Riboflavin-armen Ernährung sowie unter experimentellen Bedingungen zu beobachten. Klinische Symptome treten erst nach Wochen auf. Ein Riboflavinmangel ist aber häufig mit einer Unterversorgung weiterer Vitamine des B-Komplexes verbunden. Mangelzustände geben sich in Form von Mundwinkelrhagaden, Atrophie der Zungenschleimhaut, Rötung und Schuppenbildung der Haut, v.a. in den Augenwinkeln und Nasolabialfalten, sowie brüchigen Fingernägeln zu erkennen. Wegen der zentralen Rolle von Riboflavin im oxidativen Stoffwechsel sind mitunter auch schwere Schäden an verschiedenen anderen Geweben möglich (Blut, Haut, Nervengewebe).

Pharmakokinetik: Riboflavin kommt in der Nahrung als freies Riboflavin und als proteingebundenes FAD und FMN vor. Es wird vornehmlich in den proximalen Darmabschnitten durch einen aktiven Prozess resorbiert. Phosphorylierte Bindungen werden zuvor durch Pankreasenzyme gespalten. Im Blut liegt der größte Teil von Riboflavin als FAD oder FMN und nur 0,5 bis 2 % als freies Riboflavin vor. Die höchsten Konzentrationen an Riboflavin finden sich in der Leber, den Nieren und im Herzen. Die Reservekapazität für Riboflavin beträgt 2 bis 6 Wochen. Die terminale Eliminationshalbwertszeit liegt bei 14 Stunden. Riboflavin

wird hauptsächlich über die Nieren ausgeschieden. Ausscheidungsprodukte sind vor allem unverändertes Riboflavin neben Hydroxyflavinen und bei hohen Dosen auch Hydroxyethylflavin.

Indikationen: Prophylaxe und Therapie von klinischen Riboflavin-Mangelzuständen verschiedener Ursachen, die über die Nahrungszufuhr nicht behoben werden können; diese können bei schwerer Fehlernährung, gestörter Riboflavinresorption infolge chronischer Entzündungen der Dünndarmschleimhaut (Enteritiden) und im Zusammenhang eines erhöhten Riboflavinbedarfs (z.B. in der Schwangerschaft und Stillzeit) auftreten. Weiterhin ist eine Substitution mit Riboflavin nach einer Phototherapie der Neugeborenen-Hyperbilirubinämie angezeigt, da Riboflavin durch die Blaulichtbestrahlung zerstört wird. Zudem kann eine Substitution nach chronischer Einnahme bestimmter Arzneimittel wie tricyclischer Antidepressiva oder hormoneller Kontrazeptiva erforderlich sein. Eine weitere Risikogruppe für einen Riboflavinmangel sind vor allem mangelernährte Alkoholiker.

Dosierung:

Prophylaktisch: täglich 1 bis 2 mg peroral

Therapeutisch: täglich 5 bis 25 mg

Zu exakten Dosierungen bei parenteraler Anwendung liegt kein Erkenntnismaterial vor.

Nebenwirkungen, Interaktionen und Intoxikationen sind nicht bekannt.

M. Neubeck/Mu

Literatur

1) Yamasa Shoyu Co LID, Jap. Pat. 7525596, (1973); C. A. 83, 79551 (1975). 2) Takeda Chem. Ind., Fr. Pat. 150374, (1974). 3) Toa Nutritional Chem., Ind. Japan Kokai 7354099 (1971); C. A. 79, 146560 (1973). 4) W. Friedrich, *Handbuch der Vitamine*, S. 263, Urban und Schwarzenberg, München 1987. 5) Merck Index. 6) R. Strohecker, M. Hennig, in: *Vitaminbestimmungen*, S. 102, Verlag Chemie, Weinheim 1963. 7) R.L. Kirchmeyer, R.P. Upton, J. Pharm. Sci. 67, 1444 (1978). 8) M.C. Walker, B.E. Carpenter, E.L. Cooper, J. Pharm. Sci. 70, 99 (1981). 9) U. S. Rai, T. S. B. Narasaraju, Can. J. Chem. 65, 1313 (1987) 10) Pharmeuropa 18, 340-343 (2006). 11) G. Litwack, *Human Biochemistry*, Chap. 20: *Vitamins and nutrition*, pp. 645-680, Elsevier, London 2018. 12) J. Zempleni J. et al., Am. J. Clin. Nutr. 63, 54-66 (1996). 13) M. Barile et al., Eur. J.

Biochem. 267, 4888-4900 (2000). 14) T. A. Giancaspero et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 465, 443-449 (2015). 15) T.A. Giancaspero et al., J. Biol. Chem. 288, 29069-29080 (2013). 16) A. Martinez-Limon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 113, 12156-12161 (2016). 17) H. H. Hamm, K. Decker, Eur. J. Biochem. 104, 391-395 (1980). 18) P. Sharma P et al., Curr. Opin. Struct. Biol. 59, 38-46 (2019). 19) mibe GmbH Arzneimittel, Fachinformation Vitamin B₂ 10 mg Jenapharm®. 20) C. P. Chia et al., J. Nutr. 108, 373-381 (1978). 21) J. L. Chastain, D. B. McCormick, Am. J. Clin. Nutr. 46, 830-834 (1987). 22) Ohkawa, H. et al., J. Biol. Chem. 258, 5623-5628 (1983). 23) E. C. Owen, D. W. West, in: D. B. McCormick, L. D. Wright, *Vitamins and Coenzymes, Methods in Enzymology*, Vol. 11B, pp. 574-579, Acad. Press, New York 1971. 24) D. W. West, E. C. Owen, Br. J. Nutr. 29, 33-41 (1973).

R