

MC-Transaction on Biotechnology, 2011, Vol. 3, No. 1, e3

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

文獻回顧：

核黃素光化學研究綜述

簡宏霖、鄭建璋、陳良宇、梁致遠*

銘傳大學健康科技學院生物科技學系(中華民國 台灣 桃園)

中文摘要

核黃素對光敏感，經光照可產生各種不同型態的化合物。以核黃素的光化學性質，探討光照度和光質對核黃素光分解及產生活性氧的影響，發現核黃素具有可逆的氧化還原特性，經紫外光或可見光照射，可移轉電子，使鳥糞嘌呤殘基斷裂，導致核酸鏈結的結構發生改變。所以利用核黃素光化學方法，運用於血液的潔淨，將是一項簡單且安全的技術。

關鍵字：核黃素、光照、光化學

通訊作者：梁致遠[liang121@mail.mcu.edu.tw]

收稿：2011-6-30 接受：2011-7-5

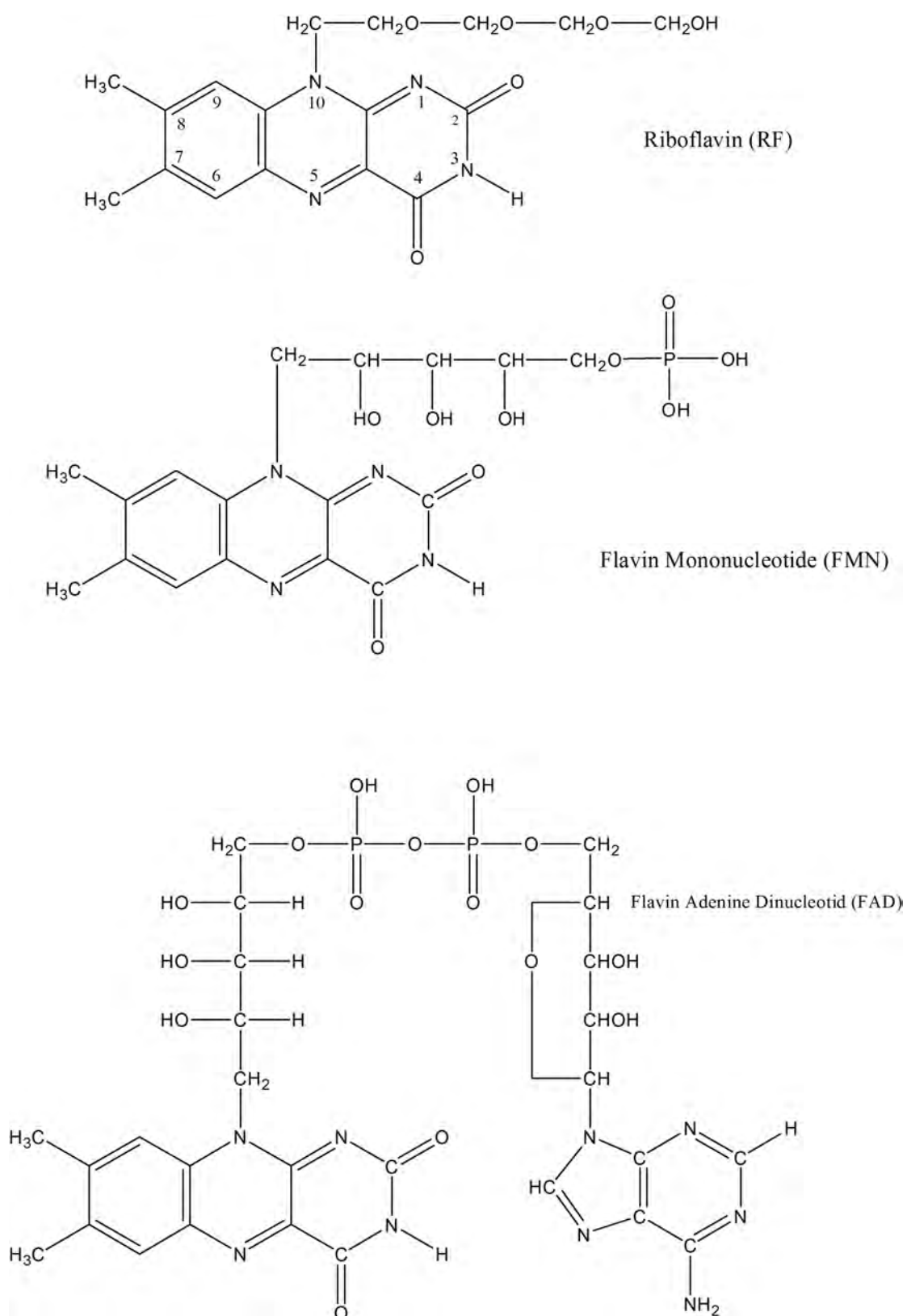
一、前言

核黃素是人類膳食所必須的維生素，對光敏感，易受光照破壞。本文以核黃素的光敏感特性，探討核黃素的光化學性質、光照度與光質對核黃素光分解產生的活性氧、及對硝基藍四氫唑的光還原法的影響。核黃素的異咯嗪環中的氮原子可反覆接受和放出氫，具有可逆的氧化還原特性，本文也將討論核黃素光化學技術應用於血小板之病毒和細菌的失活及使用於血液製品的可能性。

二、核黃素化學結構及性質

核黃素 (riboflavin; RF) 即維生素B₂，是水溶性B族維生素。核黃素於1932年從啤酒酵母 (Brewer's yeast) 中分離，被認為是一種黃色酵素且和細胞的呼吸作用有關。核黃素化學結構於1933至1935年被確定^[1]。核黃素作為酵素輔酶，功能廣泛，參與能量代謝，傳遞電子與氧化還原反應，支援細胞內的抗氧化系統，幫助

血球正常增生，維護皮膚健康，促進組織修復等[2]。



圖一、核黃素、FMN及FAD的化學結構

核黃素分子式為 $C_{17}H_{20}N_4O_6$ ，分子量為376.36，化學結構如圖一，在7號碳及8號碳位置各有一甲基，10號碳位置則接有核糖醇 (ribityl) 側鏈的衍生物。核黃素是橙黃色晶體，熔點為278至282°C，微溶水 ($0.067-0.33 \text{ g L}^{-1}$)，溶液呈現出強烈的黃綠色螢光，以核黃素接上一磷酸成為黃素單核苷酸 (riboflavin 5'-phosphate；FMN)，溶解度大增，超過核黃素溶解度的200倍。在生物體內核黃素主要以黃素單核苷酸 (flavin mononucleotide；FMN) 及黃素腺嘌呤雙核苷酸 (flavin adenine dinucleotide；FAD) (圖一)兩種輔酶的形式參與生物體的氧化還原過程，FMN 和 FAD為體內輔酵素 (coenzyme) 和輔因子 (cofactor)，與細胞呼吸、脂肪酸氧化、胺基酸及醣類分解有密不可分的關係。

核黃素缺乏症主要發生在唇舌口腔、眼睛、皮膚與生殖器官，含量豐富的核黃素食物則有內臟、草菇、綠葉蔬菜、乳製品、全穀類、堅果類及蛋等^[2]。核黃素在生物體儲存量不多，多餘的核黃素在尿液中排出，尿液呈鮮黃色。衛生署訂定的國人膳食營養素參考攝取量(Dietary Reference Intakes, DRIs)，19至64歲男性及女性的每日建議量分別為1.2及1.0毫克，但各年齡層仍有20~30%左右的人，維生素B₂攝取不足，可透過增加乳製品、全穀類食品改善維生素B₂不足^[3]。

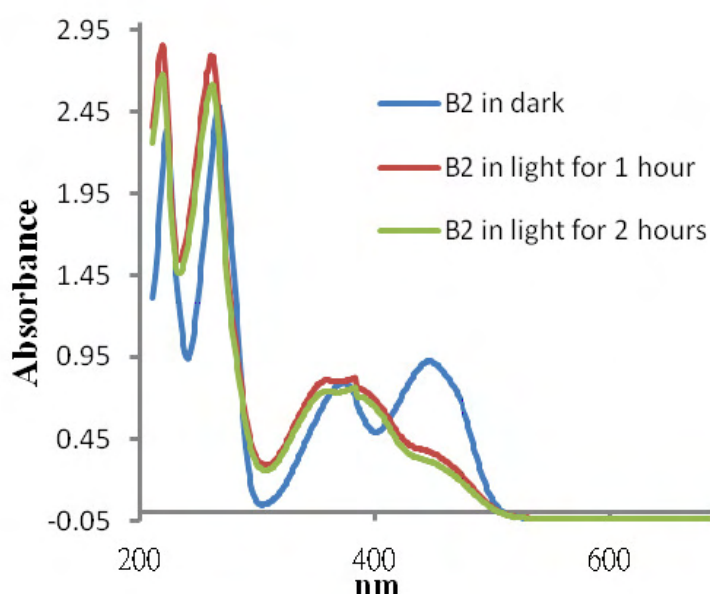
三、核黃素光化學性質

核黃素在100 mM的磷酸鉀緩衝溶液 (pH 7.8)，紫外光及可見光的吸收光譜如圖二，有四個吸收峰：220 nm、261 nm、376 nm及439 nm，其中220 nm及261 nm的吸收峰高而窄，376及439 nm的吸收峰低而寬，當核黃素曝曬於17,000 Lux的白晝一小時，其439 nm的吸收峰明顯消失(圖二)。核黃素水溶液易受光照破壞，因此液態乳品宜避開光線，裝在不透明的塑膠或紙製容器，不宜使用透明的玻璃瓶罐。

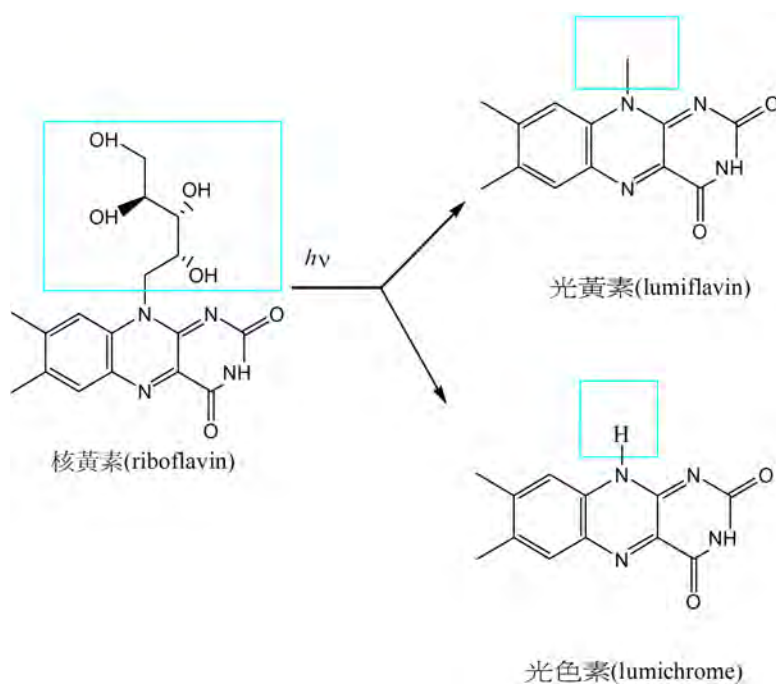
核黃素、FMN及FAD在紫外光及420 nm-560 nm的光源下，很容易降解^[4]，這些光源，會引起核黃素側鏈的核糖醇(ribityl side chain)提供電子，引起異咯肼環(isoalloxazine ring)的光還原反應 (photoreduction)^[5,6]，且在不同的酸鹼條件，降解的方式不同，在酸性或中性的條件，側鏈的核糖醇斷裂，形成光色素(lumichrome)，在鹼性條件經紫外光照射，側鏈的核糖醇分裂，形成光黃素(lumiflavin)^[7] (圖三)。

核黃素能接受失去的一對氫原子，其光化學反應非常複雜^[1]。核黃素經光激發可產生活性氧物種 (reactive oxygen species；ROS)，其中包括超氧陰離子(superoxide anions)及單態氧 (single oxygen)^[8, 9, 10, 11]。Choe 等^[12]指出核黃素為一種光敏劑

(photosensitizer)，以型式 I 及型式 II 的機制作為食品中的促氧化劑(pro-oxidant)，當核黃素經光激發成為核黃素三重態($^3\text{RF}^*$)，具有很強的氧化性，核黃素三重態接受其他食品化合物所提供的氫原子或電子被還原成核黃素自由基 (riboflavin radical) (型式 I)，或者核黃素三重態與三重態氧 (triplet oxygen) 反應後形成超氧陰離子及單態氧 (型式 II)。



圖二、核黃素及其受光激發後的吸收光譜



圖三、核黃素經光分解後的主要分解產物，鹼性條件生成光黃素中性或酸性條件生成光色素

四、核黃素與超氧歧化酶

活性氧物種主要包括超氧自由基 (superoxide radical)、羥基自由基及有機過氧化物自由基等。超氧自由基是氧化與還原反應的中間產物，許多酵素催化反應可產生超氧自由基，例如，黃嘌呤氧化酶 (xanthine oxidase, XO) 可催化黃嘌呤 (xanthine) 或核黃素的氧化皆可產生超氧自由基。超氧自由基具毒性，能形成羥基自由基及過氧化氫化合物 (hydroperoxide)，造成細胞受損、發炎、動脈粥狀硬化及老化^[13, 14]。

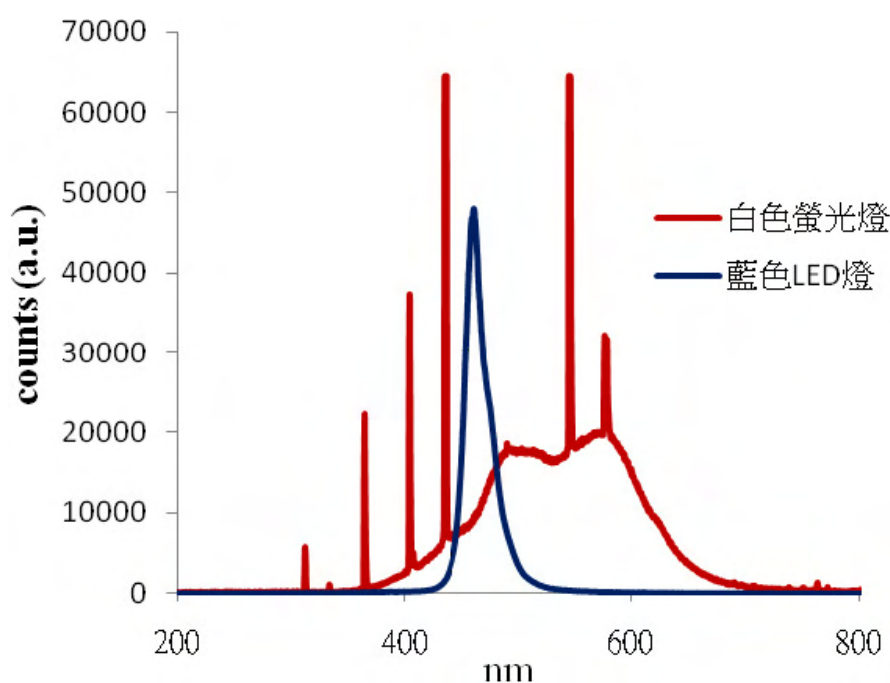
超氧歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 為廣泛存在於活體細胞中的酵素之一，能催化超氧自由基轉為 H_2O_2 及 O_2 ，進而清除細胞所產生的超氧自由基。硝基藍四氮唑光照還原反應是測定超氧歧化酶活性常見的方法之一。Beauchamp 與 Fridovich^[15] 利用核黃素在光照下產生超氧自由基，以硝基藍四氮唑的光還原間接測定超氧歧化酶，核黃素在光照下產生活性氧物種，能將硝基藍四氮唑還原為藍色的甲臍 (formazan) 化合物，當超氧歧化酶存在時，競爭超氧自由基，甲臍化合物減少，以分光光度計測定硝基藍四氮唑還原產物，可以間接反映超氧歧化酶的活性^[16]。

影響硝基藍四氮唑光照還原反應法的因子有溫度、硝基藍四氮唑濃度、過氧化酶的干擾^[17, 18]、光照度 (Lux) 及反應時間^[19]等，鄭等^[20]指出在相同光照度，以核黃素在 pH 7.8 條件下的光照還原反應後吸光值平均增加速率較 pH 7.0 者為高，黃等^[13]以 13 W 的螢光燈照射，進行硝基藍四氮唑的光還原反應，也有相同類似結果，在 pH 7.8，吸光值平均增加速率較其它 pH 值增加非常明顯。鄭等^[20]表示核黃素在鹼性溶液中較不穩定，光照容易分解成光黃素及超氧自由基，核黃素在中性溶液相對穩定，經光照產生的超氧自由基有限。

五、光照度與光質對核黃素的光分解影響

核黃素在照光的情形下，非常不穩定，鄭等^[20]以 2,000 至 6,000 Lux 的光照度條件，隨著光照度的增加，生成物吸光值平均增加速率增加，提高光照度，增加核黃素的光反應，進行電子轉移，產生的超氧自由基，有足夠的硝基藍四氮唑反應時，生成的甲臍增加，反應後生成物吸光值增高。朱等^[21]以不同光照度 (4,000、5,000 及 6,000 Lux) 比較硝基藍四氮唑清除超氧自由基的活性，在起始反應時樣品濃度最高，超氧自由基清除率也較高。以不同瓦數螢光燈為光源，在不同的距離，產生不同的光照度，不同的照度會影響核黃素產生超氧自由基的能力。

光質 (light quality) 泛指光的顏色，白色螢光燈的發射光譜如圖四，發射出紫外光及可見光，每一種廠牌的螢光燈其發射的光譜可能不一致。相對的，圖四中的藍色 LED 燈，發射出的可見光較單純，是單一波長的光源。Joe 等^[22]指出核黃素對藍光的量子效率最高，很容易通過活性氧引起器官甚至細胞的損失。Ohara 等^[23]以藍光作用核黃素研究，藉此抑制 B₁₆ 黑色素瘤細胞，指出不同波長的光源對核黃素的光反應有不同的表現。核黃素是一光敏劑，可被紫外線和可見光激發，吸收光譜主要有四個吸收峰，分別在紫外光及可見光範圍的藍光，藍光對核黃素的激發有一定的影響。以螢光燈作為硝基藍四氫唑光照還原法的光源，螢光燈發射出的光源，其波長複雜，能激發核黃素的光源在紫外光區及藍光，不同的光質會影響核黃素的激發，也影響硝基藍四氫唑的光還原反應。



圖四、白色螢光燈與藍色 LED 燈的發射光譜

六、核黃素光化學與微生物的失活

輸血的安全性一直倍受重視，血液及其製品的病毒的失活 (inactive)，即是杜絕和減少輸血液傳播疾病的方法。核黃素光化學方法應用在血液製品病原微生物的失活研究，主要是將核黃素光化學技術應用於血小板中病毒和細菌的失活^[24]。

在核黃素異咯胍環的第1和第10位置上的氮原子可反覆接受和放出氫，具有可逆的氧化還原特性。核黃素的核糖醇結構使其可以鍵結到核酸上，在紫外光或可見光的照射，吸收光子的能量，通過異咯胍環上的第1及10位置上的氮原子的可逆

性氧化還原反應，移轉電子，使核酸鏈上的鳥糞嘌呤殘基斷裂，導致病原體核酸鏈結的結構發生改變，阻止病原體核酸的複製、轉錄和翻譯，使病原體喪失複製活性，進而達到病原微生物失活的效果^[25]。

核黃素氧化性自由基是另外一種核黃素重要反應的活性粒子，陸等^[26]指出核黃素氧化性自由基可能是光敏化反應的重要活性中間體，核黃素氧化自由基與激發三重態一樣可能是核黃素光敏化核苷酸的活性粒子。

Ruane等^[27]以核黃素光化學法對血小板中的病毒和細菌的失活研究，使用50 $\mu\text{mol/L}$ 核黃素，經265-370 nm波長紫外光 (6.2 J/mL) 照射8-10分鐘，該項技術可將血液中的HIV病毒降低(4-6) \log_{10} ，西尼羅病毒降低約5 \log_{10} ，非脂包膜病毒的豬細小病毒降低5 \log_{10} 以上，大腸桿菌和金黃色葡萄球菌降低4 \log_{10} 或更多。Cui等^[28]使用400-500 nm的可見光激發核黃素光化學方法，可有效抑制淋巴細胞的增殖活性和細胞因子分泌活性，阻止淋巴細胞進入細胞增殖週期，可能是預防輸血相關的移植物對抗宿主疾病 (Graft Versus Host Disease ; TA-GVHD) 的一種有效可行的方法。

核黃素是人類膳食所必須的一種維生素，為人體不可缺少的物質，生成的FMN及FAD也是人體中重要的輔酶，使用核黃素光化學技術於血液中的病原微生物的失活作用，除了對血液成分無明顯不良影響外，且滿足安全、低毒的要求。

七、研究與展望

核黃素對光敏感，受光產生活性氧或經光激發成三重態或核黃素自由基。核黃素在光照下產生活性氧，以硝基藍四氮唑的光還原法間接測定活性氧的移除效率，是一種常見偵測超氧歧化酶活性的方法。然而，一般以螢光燈作為光源，螢光燈複雜的放射光譜，其光照度、光通量及光質，難被正確定量，因此，以螢光燈作為激發核黃素的光源，核黃素產生的活性氧難被正確量化，造成實驗設計上的不確定性偏高，以LED燈作為光源，放射出光的波長固定，光質容易確認，是一種乾淨的光源，將LED燈應用在核黃素的光化學反應，硝基藍四氮唑的光還原法將能更準確的測定超氧歧化酶活性。

核黃素是人類所必須的維生素，是FMN及FAD的前驅物，為人體重要的輔酶，核黃素及其光化學產物對人體幾乎沒有毒性，核黃素被美國FDA訂定為安全的普通化合物^[29]。利用核黃素的光化學技術可對血漿、血小板、紅血球中的細菌、

病毒等微生物的失活作用，並大量降低病原微生物致病含量，且對各種血液成分主要結構和功能影響很小，目前核黃素光化學技術的研究大都在實驗室階段，採用的紫外光對血液成分有一定影響^[24]，利用可見光作為光源，可避免因採用紫外光所產生的影響，以LED燈作為光源，放射出固定波長的光，光質容易掌握，將LED燈應用在核黃素的光化學反應，進一步的提供好的選擇。

八、結論

以核黃素對光敏感的特性，作光質、光照度的討論，及應用於血液潔淨的探討。不同的光照度會影響核黃素產生活性氧的能力，核黃素對紫外光及藍光敏感，不同的光質會影響核黃素的激發。利用核黃素的光化學激發，應用於血液中病原微生物的失活，對血液成分及功能影響很小，將是一項具有應用前景及發展的技術。

參考文獻

- [1] Lin Y, Eitenmiller RR, Landen WO: Riboflavin in Vitamin analysis for the health and food sciences, Second edition. CRC press; 2008.
- [2] 蕭寧馨：食品營養概論，第二版。時新出版社，台北市。2009。
- [3] 行政院衛生署：2005-2008國民營養健康狀況變遷調查。行政院衛生署，台北市。2009。
- [4] Ottaway P B: Stability of vitamins in food. in The technology of vitamins in food, Chapman and Hall, London; 1993.
- [5] Russell LF, Vandersilice JT: A comprehensive review of vitamin B₂ analytical methodology. J Micronutri Anal 1990, 8: 257-310.
- [6] Cairns WL, Metzler DE: Photochemical degradation of flavins. VI. A new photoproduct and its use in studying the photolytic mechanism. J Am Chem Soc 1971, 93: 2772-2777.
- [7] Woodcock EA, Warthensens JJ, Labuza TP: Riboflavin photochemical degradation in pasta measured by high performance liquid chromatography. J Food Sci 1982, 47: 545-549.
- [8] Kumari MVR, Yoneda T, Hiramatsu M: Scavenging activity of β -catechin on

reactive oxygen species generated by photosensitization of riboflavin. *Biochem Mol Biol Int* 1996, 38: 1163-1170.

[9] Grzelak A, Rychlik B, Bartosz G: Light-dependent generation of reactive oxygen species in cell culture media. *Free Rad Biol Med* 2001, 30: 1418-1425.

[10] Min DB, Boff JM: Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods. *Comp Rev Food Sci Food Safety* 2002, 1: 58-72.

[11] Mahns A, Melchheier I, Suschek CV, Sies H, Klotz LO: Irradiation of cells with ultraviolet-A (320–400 nm) in the presence of cell culture medium elicits biological effects due to extracellular generation of hydrogen peroxide. *Free Rad Res* 2003, 37: 391-397.

[12] Choe E, Huang R, Min D: Chemical reactions and stability of riboflavin in foods. *J Food Sci* 2005, 70: R28-R36.

[13] 黃政弘、陳惠婷、涂瑞澤：三種 SOD 活性測定法之比較。大葉學報 1999，8：101-109。

[14] Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM, Harman D: Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 1987, 107:526-545.

[15] Beauchamp C, Fridovich I: Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 1971, 44: 276-287.

[16] Donnelly JK, McLellan KM, Walker JL, Robinson DS：Superoxide dismutases in foods. A review. *Food Chem* 1989, 33: 243-270.

[17] 邵從本、羅廣華、王愛國、郭俊彥：幾種檢測超氧化物歧化酶活性反應的比較。植物生理通訊 1983，5：46-49。

[18] Constantine NG, Stanley KR: Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol* 1977, 59: 309-314.

[19] Beyer WF Jr, Fridovich I: Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Anal Biochem* 1987, 161:559-66.

- [20] 鄭建瑋、簡宏霖、梁致遠：光照度對硝基藍四氮唑光照反應的影響。生技學報(MC-TB)，2010，v2e2。
- [21] 朱靖博、韓少華、王妍妍、王宏豔：氮藍四唑光照法評價丹參水溶性成分清除超氧陰離子($O_2^{\cdot -}$)活性。大連工業大學學報 2009，28：251-254。
- [22] Jou MJ, Jou SB, Chen HM, Lin CH, Peng T: Critical role of mitochondrial reactive oxygen species formation in visible laser irradiation-induced apoptosis in rat brain astrocytes (RBA-1). J Bio Sci 2002, 9: 507-516.
- [23] Ohara M, Fujikura T, Fujiwara H: Augmentation of the inhibitory effect of blue light on the growth of B₁₆ melanoma cells by riboflavin. Int J Oncol 2003, 22:1291-295.
- [24] 崔振玲、黃宇聞、錢開誠：核黃素光化學技術在血液病原微生物滅活中的應用研究進展。中國輸血雜誌 2007，20：78-80。
- [25] Corbin F: Pathogen inactivation of blood components: Current status and introduction of an approach using riboflavin as a photosensitizer. Int J Hematol 2002, 76 (suppl 2): 253-257.
- [26] 陸長元、韓鎮輝、王文鋒、林維真、張達文、姚思德、林念芸：鳥嘌呤核苷酸與核黃素氧化性自由基之間的電子轉移研究。輻射研究與輻射工藝學報 2000，18：268-271。
- [27] Ruane PH, Edrich R, Gampp D, Kell SD, Leonard RL, Goodrich RP: Photochemical inactivation of selected viruses and bacteria in platelet concentrates using riboflavin and light. Transfusion 2004, 44: 877-885.
- [28] Cui Z, Huang Y, Mo Q, Wang X, Qian K: Inactivation of lymphocytes in blood products using riboflavin photochemical treatment with visible light. Photochem Photobiol 2008, 84: 1195-1200.
- [29] Klein HG: Pathogen inactivation technology: cleansing the blood supply[J]. J Intern Med 2005, 257: 224 – 237.

Mini Review:

The Photochemistry of Riboflavin

Hong-Lin Jian, Chien-Wei Cheng, Liang-Yu Chen, Ji-Yuan Liang*

Department Biotechnology, School of Health Technology, Ming-Chuan University,
(Taoyuan, Taiwan, R.O.C.)

Abstract

Riboflavin is sensitive to light. Various compounds may be derived from riboflavin after illumination. This study was working on the effects of luminance and light quality to photo-decomposition of riboflavin and production of reactive oxygen specie, based on the photochemical properties of riboflavin. Due to its reversible redox property, some electrons of riboflavin might be transferred after illumination by ultraviolet or visible lights. The guano purine residue on riboflavin is broken and which results in an altered structure of nucleic acid linkage. Riboflavin photochemistry can be a simple and safe blood cleaning technology.

Keyword: riboflavin, illumination, photochemistry

Corresponding author: Ji-Yuan Liang [liang121@mail.mcu.edu.tw]

Received 30 June 2011/Accepted 5 July 2011

MC-Transaction on Biotechnology, 2011, Vol. 3, No. 1, e3

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.