

MC-Transaction on Biotechnology, 2016, Vol. 8, No. 1, e2

©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.

酸鹼值及氧氣對核黃素光反應的影響

陳良宇、陳淑玲、簡宏霖、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，經藍光照射後，激發核黃素產生超氧自由基，可破壞大腸桿菌質體 DNA，使大腸桿菌失活。本文以緩衝溶液 pH、藍光光照強度及氧氣濃度探討核黃素光化學反應產生超氧自由基的影響。結果表明，在同樣藍光強度照射的核黃素，超氧自由基隨著緩衝溶液的 pH 值增加而提高。在相同的溶液 pH，照射的藍光強度增加，核黃素光化學反應產生的超氧自由基增加。低溶氧的緩衝溶液，不影響核黃素光化學反應產生超氧自由基。

關鍵字：核黃素、光照強度、溶氧量

通訊作者：梁致遠[liang121@mail.mcu.edu.tw]

收稿：2016-3-4 修改：2016-4-10 接受：2016-4-12 線上發表：2016-4-15

前 言

核黃素 (riboflavin; RF) 即維生素 B₂，是水溶性 B 族維生素。核黃素功能廣泛，參與傳遞電子與氧化還原反應且作為酵素輔酶，參與能量代謝^[1]。

核黃素微溶於水(0.067–0.33 g L⁻¹)，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^[1]。核黃素以紫外光 C (波長小於 280 nm)^[2]、紫外光 B (280–320 nm)^[3]、紫外光 A (320–400 nm)^[4]及藍光^[5, 6]照射，吸收光子的能量，達激發的狀態。當核黃素受光激發，引起核黃素側鏈的核糖醇提供電子，引起異咯胍環的光還原反應，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，可移轉電子造成核酸的結構異常，進而影響微生物的功能，達到病原微生物失活^[1]。

核黃素受光激發產生氧化性自由基，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，是核黃素光敏化核苷酸的活性粒子^[1]。另一方面，核黃素以光激發，可轉成三重態激發態的核黃素，進而可產生超氧陰離子(superoxide anion)或單線態氧(singlet oxygen)^[7, 8]。產生的活性氧物種(ROS)能導致DNA降解、細胞膜過

氧化及內皮細胞的破壞[9]。吾人之前的研究，核黃素經藍光照射，產生活ROS，破壞大腸桿菌質體DNA，使大腸桿菌失活[5, 6]。

核黃素被光激發，利用核黃素在光照下產生 ROS，能將硝基藍四氮唑(NBT)還原為藍色的 formazan 化合物，在 560 nm 波長有最大吸收[10]。儘管已有對硝基藍四氮唑光照還原影響的因子研究，如光照度(Lux)及反應時間[11, 12]等的討論，但實際在操作上往往發生疑問，使用的光源是否合適？Cheng 等人指出使用 NBT 光照還原法，以螢光燈作為激發光源，因廠牌不同，放射光源波長不同，會導致核黃素產生超氧自由基的不確定性[13]。Cheng 等人指出最適合核黃素的可見光源，是以藍光作為激發的光源[13]。

本實驗的研究目的：(1)以藍光作為光源，不同的光照強度對核黃素產生超氧自由基的能力的影響？(2)不同的 pH 環境下，核黃素經光照反應對超氧自由基產生的影響(3)不同氧氣濃度環境下，核黃素經光照反應對超氧自由基產生的影響。因此本研究透過藍光照度、照光反應時間、氧氣濃度及緩衝溶液 pH 等因素，進一步研究硝基藍四氮唑光照還原反應發生的關聯性，以期評估核黃素在光照下產生超氧自由基的影響因子。

材料與方法

(一)材料

光源的選擇：以 580 公厘長度的藍色 LED 燈(VITALUX T8HO LED tube lights, Vita LED Technologies Co., Tainan, Taiwan)作為實驗的光源，藍光最大放射波長是 463 nm，半波寬度($W_{1/2}$) 23 nm。

光照暗箱：改造長、寬、高各為 104、75、55 公分的上蓋式塑膠箱，上蓋裝設藍色 LED 燈燈管，固定測定位置，以太陽能功率計(TM-207, Tenmars Electronics Co., Taipei, Taiwan)偵測光照強度(mW/cm^2)，箱內貼滿白色紙板，光照時，箱外鋪蓋黑布遮光。

藥品：核黃素(riboflavin)、L-甲硫胺酸(L-methionine)、硝基藍四氮唑(NBT)、磷酸氫一鉀及磷酸氫二鉀均為 Sigma 公司產品。

儀器：分光光度計(PerkinElmer Lambda 35 UV/Vis spectrometer)。

(二)方法

本實驗硝基藍四氮唑(NBT)光照還原反應法參考 Cheng et al [12,13]方法，配製 L-甲硫胺酸終濃度為 0.01 M，硝基藍四氮唑終濃度為 167 μ M，核黃素終濃度為 2.4 μ M 的反應溶液。以 3 mL 反應液，於藍色 LED 燈進行光照還原反應，核黃素產生的超氧自由基還原硝基藍四氮唑，進而產生光照後還原產物 formazan，以分

光光度計偵測，在 560 nm 波長有最大吸收。實驗為三重覆。

核黃素光照還原反應後產生超氧自由基的影響因素：

1. 緩衝溶液 pH 值的影響

調整緩衝溶液的 pH 為 5.8、6.8、7.8、8.8 及 9.8，偵測 NBT 光照還原反應吸光度。

2. 光照強度的影響

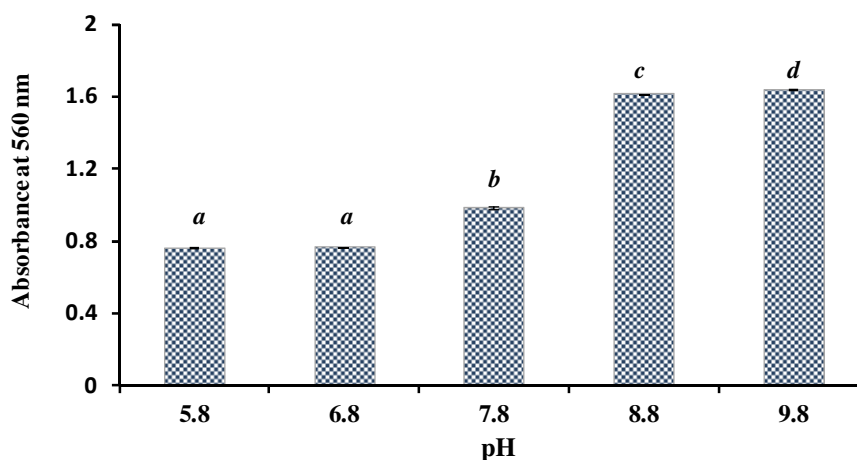
使用光照暗箱，控制光照強度為 0.5、1.0、1.5 及 2.0 mW/cm²，偵測 NBT 光照還原反應吸光度。

3. 溶液中氧氣濃度的影響

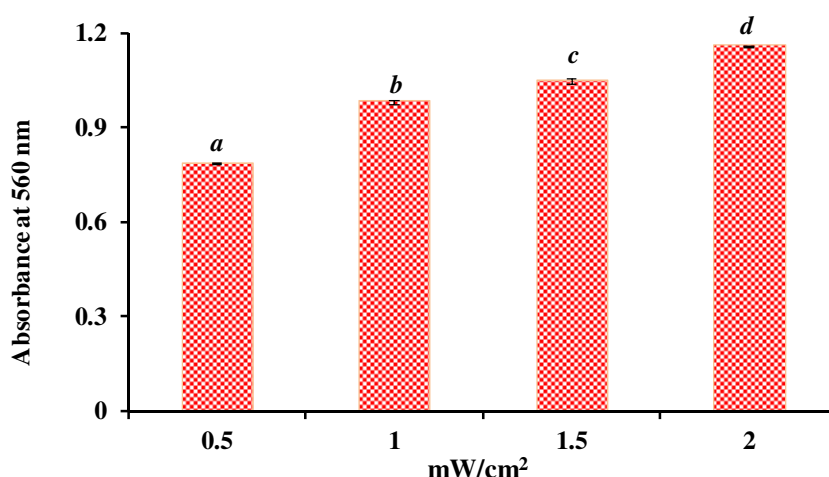
在黑暗中以氮氣灌入 3 mL 反應液藉以趕跑氧氣，反應液最終氧氣濃度以溶氧探測器(D200, CLEAN Instruments Co., Taipei, Taiwan)偵測為 0.22 mg/L，未經氮氣處理的反應液的氧氣濃度為 7.22 mg/L。偵測 NBT 光照還原反應吸光度。

結 果

以 1.0 mW/cm² 藍光照射不同 pH 值的核黃素的反應液 20 分鐘，NBT 光照還原的吸光值如圖一。不同 pH 值對光照反應影響不一，一般而言，隨著緩衝液的 pH 值上升，NBT 光照還原的反應上升。反應液在酸性時，pH 5.8 及 6.8 的光照反應並無顯著差異，但隨著 pH 上升至鹼性，NBT 光照還原顯著上升。但在 pH 8.8 及 9.8 的條件下，NBT 光照還原雖有差異，但上升幅度不大。以 pH 7.8、8.8 及 9.8 的緩衝溶液條件，測試 NBT 光照還原的反應，分別是 pH 6.8 條件者的 1.3、1.8 及 2.1 倍。爾後的實驗，將以 pH 7.8 緩衝液作實驗的標的，藉以比較各種條件對 NBT 光照還原的影響。

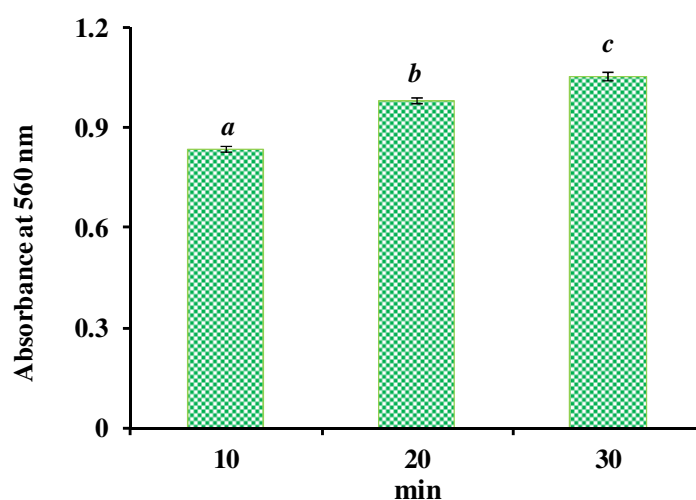


圖一、以 1.0 mW/cm² 藍光照射 20 分鐘，不同緩衝溶液 pH 對 NBT 光照還原的影響。資料呈現為平均值±標準偏差。實驗為三重覆。圖型線條上方不同字母表示群體間具顯著差異($p < 0.05$)。



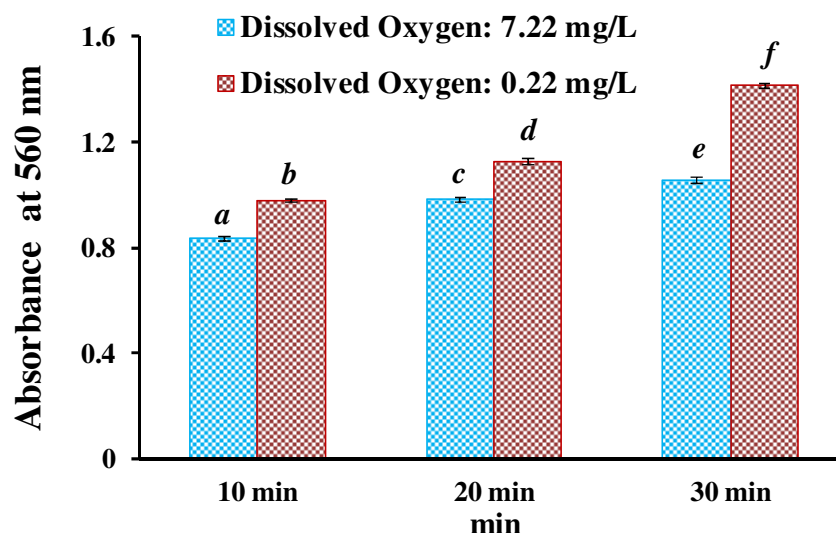
圖二、以 0.5、1.0、1.5 and 2.0 mW/cm² 藍光照射 20 分鐘，不同幅射強度對 NBT 光照還原的影響。資料呈現為平均值±標準偏差。實驗為三重覆。圖型線條上方不同字母表示群體間具顯著差異($p < 0.05$)。

以 0.5、1.0、1.5 和 2.0 mW/cm² 不同光照強度的藍光照射核黃素，其能量分別為 0.6、1.2、1.8 及 2.1 J/cm²。不同光照強度的藍光照射反應液 20 分鐘，NBT 光照還原的反應如圖二，隨著光照強度的提高，NBT 光照還原顯著上升。以 1.2、1.8 及 2.1 J/cm² 條件，測試 NBT 光照還原的反應，分別是 0.6 J/cm² 條件者的 1.2、1.3 及 1.5 倍，顯示超氧自由基的形成隨著光光照強度的作用增加而提高。圖三是以 1.0 mW/cm² 藍光照射核黃素的反應液 10、20 及 30 分鐘，其能量分別為 0.6、1.2 及 1.8 J/cm²。隨著照光時間的拉長，NBT 光照還的吸光度原顯著上升。



圖三、以 1.0 mW/cm² 藍光照射 10、20 及 30 分鐘，不同光照時間對 NBT 光照還原的影響。資料呈現為平均值±標準偏差。實驗為三重覆。圖型線條上方不同字母表示群體間具顯著差異($p < 0.05$)。

以 1.0 mW/cm^2 藍光照射含氧量不同的核黃素的反應液 10、20 及 30 分鐘，NBT 光照還原的吸光值如圖四。隨著照光時間的拉長，NBT 光照還原顯著上升。但在低氧濃度，核黃素經光照反應後，其 NBT 光照還原的吸光值明顯高於未處理氧氣的控制組，表示核黃素溶液中的氧氣濃度並不會干擾其光照反應。



圖四、以 1.0 mW/cm^2 藍光照射 10、20 及 30 分鐘，不同氧氣濃度對 NBT 光照還原的影響。資料呈現為平均值±標準偏差。實驗為三重覆。圖型線條上方不同字母表示群體間具顯著差異($p < 0.05$)。

討 論

由圖一，不同 pH 值對光照反應影響不一，反應液在酸性時，pH 5.8 及 6.8 的光照反應並無顯著差異，但隨著 pH 升至鹼性，NBT 光照還原顯著上升，以 pH 8.8 及 9.8 的緩衝溶液的條件，NBT 光照還原反應最為強烈。鄭等^[12]指出以螢光燈在相同光照度，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^[14]以 13 W 的螢光燈照射，進行光還原反應，也有相同類似結果。核黃素在鹼性溶液中較不穩定，照光容易分解成光黃素及超氧自由基，而核黃素在酸性及中性溶液相對穩定，經光照產生的超氧自由基有限。

一般認為，核黃素照光後，被激發的核黃素經甲硫胺酸提供的電子還原成半醌，半醌提供電子給氧形成超氧自由基，核黃素經光照後產生超氧自由基，能將硝基藍四氫唑還原為藍色的甲臍 (formazan) 化合物^[15]。圖四結果表明，在低氧濃度，核黃素經光照反應後，其 NBT 光照還原的吸光值明顯高於未處理氧氣的控制組，即在低氧濃度下，核黃素生成的超氧自由基高於未處理者，表示在低氧濃度時，核黃素照射藍光即可形成超氧自由基，而氧氣並非限制因子。另一方面，核黃素以光激發，吸收光子的能量，可轉成態激發態的核黃素或造成核黃素氧化性自由

基，引起核黃素側鏈的核糖醇提供電子，引起異咯肼環的光還原反應，移轉電子，可能使NBT光照還原反應進行。

核黃素作為酵素輔酶，功能廣泛，在生物所須的維生素，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^[16]。核黃素光化學技術可對血漿及血液中的微生物或病毒失活作用，近年以核黃素經藍光色光照後，產生活性氧物種，破壞大腸桿菌質體 DNA，使大腸桿菌失活^[5, 6]，並發展核黃素光化學的方法，使多重抗藥性細菌失活。

利用核黃素的安全性及光化學產生的活性氧分子(ROS)，發展高級氧化程序，進入環境污染的領域，降解目標污染物，是可行的方式。目前高級氧化程序主要是結合氧化劑(如臭氧、過氧化氫)和金屬或半導體觸媒並搭配紫外光等程序產生ROS，以此氧化有機物。愈短波長的紫外光，其能量愈高，對細胞有較高的損傷，因此發展以核黃素為光敏劑，以可見光照射進而產生 ROS，可見光取代紫外光，可避免紫外光的危害，是一可行的方式。

參考文獻

- [1] 簡宏霖、鄭建璋、陳良宇、梁致遠：核黃素光化學研究綜述。生技學報，2011，v3e3。
- [2] Lu CY, Wang WF, Lin WZ, Han ZH, Yao SD, Lin NY: Generation and photosensitization properties of the oxidized radical of riboflavin: a laser flash photolysis study. *J Photochem Photobiol B* 1999, 52:111-116.
- [3] Tripathi AK, Dwivedi A, Pal MK, Rastogi N, Gupta P, Ali S, Prabhu MB, Kushwaha HN, Ray RS, Singh SK, Duggal S, Narayan B, Mishra DP: Attenuated neuroprotective effect of riboflavin under UV-B irradiation via miR-203/c-Jun signaling pathway *in vivo* and *in vitro*. *J Biomed Sci* 2014, 21:39-49.
- [4] Sato K, Taguchi H, Maeda T, Minami H, Asada Y, Watanabe Y, Yoshikawa K: The primary cytotoxicity in ultraviolet-a-irradiated riboflavin solution is derived from hydrogen peroxide. *J Invest Dermatol* 1995, 105:608-612.
- [5] Liang JY, Yuann JM, Cheng CW, Jian HL, Lin CC, Chen LY: Blue light induced free radicals from riboflavin on *E. coli* DNA damage. *J photochem photobiol B* 2013, 119:60-64.
- [6] Liang JY, Cheng CW, Yu CH, Chen LY: Investigations of blue light-induced reactive oxygen species from flavin mononucleotide on inactivation of *E. coli*. *J photochem photobiol B* 2015, 143:82-88.

- [7] Lin Y, Eitenmiller RR, Landen WO: Riboflavin in vitamin analysis for the health and food sciences. Second edition. CRC press; 2008.
- [8] Ottaway P B: Stability of vitamins in food. in The technology of vitamins in food, Chapman and Hall, London; 1993.
- [9] Brown RK, McBurney A, Lunec J, Kelly FJ: Oxidative damage to DNA in patients with cystic fibrosis. Free Radic Biol Med 1995, 18:801-806.
- [10] Donnelly JK, McLellan KM, Walker JL, Robinson DS: Superoxide dismutases in foods. A review. Food Chem 1989, 33:243-270.
- [11] Beyer WF Jr, Fridovich I: Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. Anal Biochem 1987, 161:559-66.
- [12] 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，2010，v2e2。
- [13] Cheng CW, Chen LY, Chou CW, Liang JY: Investigations of riboflavin photolysis via coloured light in the nitro blue tetrazolium assay for superoxide dismutase activity. J Photochem Photobiol B 2015, 148:262-267.
- [14] 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。
- [15] Piacham T, Isarankura Na Ayudhya C, Prachayasittikul V, Bulow L, Ye L: A polymer supported manganese catalyst useful as a superoxide dismutase mimic. Chem Comm 2003:1254-1255.
- [16] Klein HG: Pathogen inactivation technology: cleansing the blood supply. J Intern Med 2005, 257:224-237.

Effects of pH and Oxygen Content on Riboflavin Photolysis

Liang-yü Chen, Shu-Ling Chen, Hong-Lin Jian, and Ji-Yuan Liang*

Department of Biotechnology, Ming Chuan University, Gui-Shan 333, Taoyuan, Taiwan, R.O.C

Abstract

Riboflavin is sensitive to blue light for generating reactive oxygen species and able to inactivate *E. coli* by damaging nucleic acids with free radicals generated. This study was working on the effects of pH, blue light irradiance intensity and dissolved oxygen on photo-decomposition of riboflavin and production of reactive oxygen species, based on the photochemical property of riboflavin. At a fixed blue light irradiance intensity, the increasing rate of production of superoxide radicals from photo-decomposition of riboflavin was increased with the pH of buffer solution. At a fixed pH of buffer solution, the increasing rate of production of superoxide radicals from photo-decomposition of riboflavin was increased with the blue light irradiance intensity. The photo-decomposition of riboflavin and production of reactive oxygen species was not influence by dissolved oxygen in buffer solution.

Keywords: riboflavin, irradiance intensity, dissolved oxygen

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

Received 3-4-2016 / Revised 4-10-2016 / Accepted 4-12-2016 / Online published 4-15-2016

MC-Transaction on Biotechnology, 2016, Vol. 8, No. 1, e2

©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.