

亚麻籽中氰化物定性定量方法的研究

李高阳^{1,2}, 丁霄霖²

(1.湖南省农产品加工研究所, 湖南长沙 410125; 2.江南大学食品学院, 江苏无锡 214122)

摘要:建立测定亚麻籽中氰化物的定性定量方法。结果表明,改进的异烟酸-吡唑啉酮比色法能进行亚麻籽氰化物的测定,检测方法具有很强的线性相关性, $R^2 = 0.9986$, 加标回收率 93.08%~95.65%, 相对标准偏差 < 5%。本方法灵敏, 准确可靠, 重现性好, 测定的结果可靠。

关键词:亚麻籽, 生氰糖苷, 氰化物, 测定

Study on qualitative and quantitative methods of cyanide in flaxseed

LI Gao-yang^{1,2}, DING Xiao-lin²

(1. Institute of Hunan Agricultural Product Processing, Changsha 410125, China;

2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Objective to establish a qualitative and quantitative methods of cyanide in flaxseed. Results showed that modified isonicotinic acid-pyrazolone colorimetric method was possible to measure cyanide content of flaxseed, with very strong linear relevance ($R^2 = 0.9986$) and high returns-ratio of additive sample (93.08%~95.65%) as well as small relative standard deviation (less than 5%). The methods were sensitive, accurate, reliable, and suitable for the detection of cyanide.

Key words: flaxseed; cyanogenic glycoside; cyanide; measurement

中图分类号: TS207.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2008)06-0291-03

近二十年以来, 亚麻籽作为一种高蛋白油料作物, 因其营养价值成为人们关注的热点, 发现它含有必需脂肪酸(ω -3 脂肪酸和 ω -6 脂肪酸) 和雌性激素——木脂素, 而且发现它是目前含量最高的已知植物之一^[1,2]。但亚麻籽中以生氰糖苷为主的抗营养因子限制了亚麻粕的综合利用, 作为一种潜在的优质蛋白资源没有得到很好的应用, 基本上仅应用于动物饲料, 造成资源的浪费^[3,4]。生氰糖苷(cyanogenetic glycoside) 亦称氰苷、氰醇苷, 是一类 α -羟腈或称氰醇的糖苷, 广泛地分布在植物王国中, 这些化合物在植物的初步代谢中起着很重要的作用^[5,6]。在正常情况下植物中极少存在游离的氢氰酸, 但是在植物细胞遭受破坏时, 生氰糖苷在有关酶等的作用下产生氢氰酸^[6], 对于人、畜等具有剧烈的毒性。亚麻籽中已经鉴定的主要氰苷有亚麻氰苷(LN) 和新亚麻氰苷(NN)^[7], 分别为丙酮氰醇的 β -龙胆二糖和甲乙酮氰醇的 β -龙胆二糖, 通过薄层层析也检测到含量更少的亚麻苦苷和百脉根苷^[8]。在亚麻籽加工中生氰糖苷将转化为氢氰酸, 精确测定亚麻粕等产品中的氰化物含量, 将有利于亚麻籽开

发利用中产品的安全评价。目前, 我国食品卫生标准规定: 原粮中氰化物(以 HCN 计) 允许量 $\leq 5\text{mg/kg}$, 亚麻粕饲料中氰化物的允许含量为 5mg/kg ^[9]。氰化物含量测定方法中, 气相色谱法可以测定植物组织中的氰化物含量^[10], 但此方法需要特殊的色谱柱和检测器, 普遍推广受到限制。本研究根据亚麻籽的化学组成特点, 结合粮油氰化物测定中前处理方法和水质测定的异烟酸-吡唑啉酮比色法建立测定亚麻籽氰化物含量的方法。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

亚麻籽 宁亚 11 号, 购自宁夏银川福德生物食品工程有限公司; 亚麻粉 亚麻籽除杂后, 经粉碎机粉碎, 再经 20、40、60 目筛选除去大部分的亚麻壳后, 得 60 目亚麻粉; 氢氧化钠、酒石酸、试银灵(对二甲氨基亚苄基罗丹宁)、无水磷酸二氢钾、无水磷酸氢二钠、氯铵 T、异烟酸、吡唑啉酮、氢氧化钾、铬酸钾(K_2CrO_4) 指示剂等 均为分析纯; 双蒸水 实验室自制。

AB104-N 电子天平 托利多-梅特勒(上海)有限公司; UV-2102 PCS 型紫外可见分光光度计 尤尼柯(上海)仪器有限公司; 灵巧型中草药粉碎机 上海医用设备制造有限公司。

1.2 定性

普鲁士蓝实验: 溶液 I : 10% FeSO_4 (用前配

收稿日期: 2007-09-18

作者简介: 李高阳(1971-), 男, 博士, 副研究员, 主要从事食品科学与工程技术研究。

基金项目: 国家“十五”重大科技攻关项目(2001BA535C)资助。

制);溶液Ⅱ:5% FeCl_3 溶液。取样品亚麻粉 0.5g 置试管中,加水湿润,立即用经 10% NaOH 溶液湿润的滤纸将管口用橡皮筋扎紧,于热水溶液上加热 10min 后,在滤纸上加溶液Ⅰ、稀盐酸和溶液Ⅱ各 1 滴,滤纸显蓝色为阳性。如检验为阳性反应,说明有氰化物存在。

1.3 定量

1.3.1 原理 在中性条件下,样品中的氰化物与氯胺 T 反应生成氯化氰,再与异烟酸作用,经水解后生成戊烯二醛,最后与吡唑啉酮缩合生成蓝色染料,其颜色与氰化物的含量成正比。

1.3.2 硝酸银溶液的标定 吸取 0.01mol/L 氯化钠标准溶液 10.00mL,于 150mL 锥形瓶中,加 50mL 水,同时另取一锥形瓶,加入 60mL 水作空白实验。

向溶液中加入 3~5 滴铬酸钾指示剂,在不断搅拌下,从滴定管加入待标定的硝酸银溶液,直至溶液由黄色变成浅砖红色为止,记下读数(V)。同样滴定空白溶液,读数(V_0)。

硝酸银浓度 C_1 (mol/L) 按式(1)计算:

$$C_1 = C \times 10 / (V - V_0) \quad \text{式(1)}$$

式中: C —氯化钠标准溶液浓度, mol/L; V —滴定氯化钠标准溶液时硝酸银溶液用量, mL; V_0 —滴定空白溶液时硝酸银溶液用量, mL。

1.3.3 氰化钾(KCN)标准溶液

1.3.3.1 氰化钾标准溶液的配制和标定 称取 0.25g 氰化钾溶解于 1% 氢氧化钠中,并稀释至 100mL,摇匀,棕色瓶中避光贮存。吸取 10.00mL 上述氰化钾贮备溶液于锥形瓶中,加入 50mL 水和 1mL 2% 氢氧化钠,加入 0.2mL 试银灵批示剂,用硝酸银标准溶液滴定,溶液由黄色刚变为橙红色为止,记录硝酸银标准溶液用量(V_1)。同时另取 10.00mL 实验用水代替氰化钾贮备液作空白实验,记录硝酸银标准溶液用量(V_0)。

氰化物含量(C_2 , mg/mL)以氰离子(CN^-)计,按式(2)计算:

$$C_2 = \frac{C(V_1 - V_0) \times 52.04}{10.00} \quad \text{式(2)}$$

式中: C —硝酸银标准溶液浓度, mol/L; V_1 —滴定氰化钾贮备溶液时硝酸银标准溶液用量, mL; V_0 —空白实验硝酸银标准溶液用量, mL; 52.04—相当于 1L 的 1mol/L 硝酸银标准溶液的氰离子(2CN^-)的质量, g; 10.00—氰化钾贮备液体积, mL。

1.3.3.2 氰化钾标准中间溶液 先按式(3)计算配制 500mL (1.00mL 含 10.0 μg 氰离子) 氰化钾标准中间溶液时,应吸取氰化钾贮备溶液的体积 V (mL):

$$V = \frac{10.00 \times 500}{T \times 1000} \quad \text{式(3)}$$

式中: $T \times 1000$ —1mL 氰化钾贮备溶液含氰离子质量, μg ; 10.00—1mL 氰化钾中间标准溶液含 10.0 μg 氰离子; 500—氰化钾标准中间溶液体积, mL。

准确吸取 V (mL) 氰化钾贮备溶液于 500mL 棕色瓶中,用氢氧化钠溶液稀释。

1.3.3.3 氰化钾标准使用溶液 临用前,吸取 10.00mL 氰化钾标准中间溶液于 100mL 棕色瓶中,

用氢氧化钠溶液稀释至标线,摇匀备用。

1.3.4 操作方法

1.3.4.1 氰化氢的释放和吸收 迅速称取 10.00g 亚麻籽粉样品,置于 500mL 蒸馏瓶中,加适量水使样品全部浸没。加 20mL 100g/L 乙酸锌溶液,加 1~2g 酒石酸,迅速连接好全部装置,冷凝管下端插入盛有 5mL 10g/L 氢氧化钠溶液的 100mL 容量瓶中的液面下,缓缓加热,通水蒸气进行蒸馏,收集蒸馏液近 100mL,取下容量瓶,加水至刻度,此碱性馏出物“ A ”待测定总氰化物用。

用实验用水代替样品,按上述步骤操作,得到空白实验馏出物“ B ”,待测定总氰化物用。

1.3.4.2 测定 a.取 8 支具塞比色管,分别加入氰化钾标准使用溶液 0、0.20、0.50、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00mL,分别加 0.1% (m/v) 氢氧化钠溶液至 10mL; b.向各试管中加入 5mL 磷酸盐缓冲溶液 pH7.0,混匀,迅速加入 0.2mL 1% (m/v) 氯胺 T 溶液,立即盖塞子,混匀,放置 3~5min; c.向各管中加入 5mL 异烟酸-吡唑啉酮溶液,混匀,加水稀释至标线,摇匀,在 25~35 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴中放置 40min; 用分光光度计在 638nm 波长下,用 10mm 比色皿,以试剂空白作参比,测定吸光度,并绘制校准曲线; d.分别吸取 10.00mL 馏出液“ A ”和 10.00mL 空白实验馏出液“ B ”于具塞比色管中,按 b~d 进行操作。

1.3.5 结果计算 总氰化物含量 C_3 (mg/Kg) 以氰离子(CN^-)计,按式(4)计算:

$$C_3 = \frac{(m_a - m_b)}{V} \times \frac{V_1}{V_2} \quad \text{式(4)}$$

式中: m_a —从校准曲线上查出试份(A 液)的氰化物含量, μg ; m_b —从校准曲线上查出试份(B 液)的氰化物含量, μg ; V —样品的体积, mL; V_1 —试样(馏出物“ A ”)的体积, mL; V_2 —试份(比色时,所取馏出物“ A ”)的体积, mL。

2 氰化物定量测定方法的验证

精确称取一定量的氰化钾标准使用溶液,溶解定容后稀释成一系列不同已知浓度的溶液,按 b~d 进行操作,测定吸光度,绘制标准曲线见图 1。由图 1 可知, $y = 3.2051x + 0.0065$ (y 为吸光度, x 为氰离子浓度), $R^2 = 0.9986$,说明方程具有很好的线性相关性。

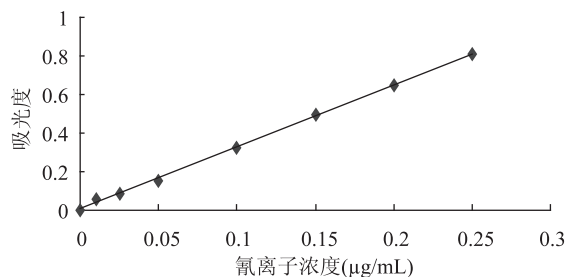


图 1 氰离子浓度标准曲线图

分别做 0.02、0.05、0.10、0.20mg/L 4 种浓度的 KCN 加标回收实验,每种浓度平行测定 6 次,结果见表 1。

由表 1 中加标回收实验的精密度和精确度分析 (下转第 296 页)

表2 花生油中脞菌酯的添加回收平行分析结果

序号	检测结果(mg/kg)	序号	检测结果(mg/kg)	序号	检测结果(mg/kg)	序号	检测结果(mg/kg)
1	0.2731	6	0.2558	11	0.2667	16	0.2409
2	0.2618	7	0.2877	12	0.2685	17	0.2832
3	0.2698	8	0.2617	13	0.2727	18	0.2467
4	0.2486	9	0.2729	14	0.2440	19	0.2675
5	0.2700	10	0.2545	15	0.2658	20	0.2526

对和第17对平行样落在上警告限附近,说明有失控倾向,但是仍处在上控制限之下。结果证明该分析过程处于控制状态,分析结果有效。

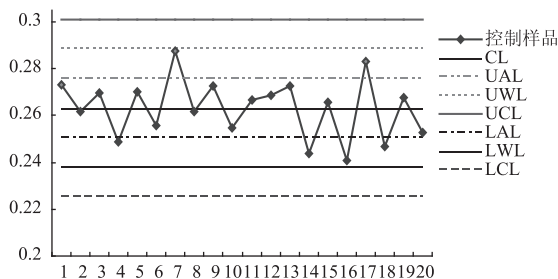


图4 脞菌酯在花生油中添加回收的精密度质控图

3.4 精密度

3.4.1 允许差 大于0.2mg/kg时两次平行测定的相对偏差不大于5%;小于0.2mg/kg时两次平行测定的相对偏差不大于10%。

3.4.2 重复性 在同一实验室,由同一操作者使用相同的设备,按相同的测试方法,在短时间内,对同一被测对象,相互独立进行测试获得的两次独立测试结果的绝对差值,超过重复性限r值的情况不大于5%。

(上接第292页)

可知,测定方法对高低4种不同浓度的标样,加标回收率在93.08%~95.65%之间,相对标准偏差<5%。因此,改进的异烟酸-吡啶啉酮比色法在测定亚麻籽中的氰化物含量时,系统误差对实验结果造成的影响很小,这种方法测定的结果是可靠的。

表1 精密度和精确度分析

序号	标样浓度(mg/L)			
	0.02	0.05	0.1	0.2
1	0.0182	0.0487	0.0948	0.1946
2	0.0195	0.0492	0.0962	0.1897
3	0.0179	0.0479	0.0957	0.1935
4	0.0176	0.0486	0.0925	0.1862
5	0.0193	0.0476	0.0941	0.1871
6	0.0192	0.0482	0.0959	0.1948
平均回收浓度	0.01862	0.04737	0.09453	0.1913
平均回收率(%)	93.08	94.8	94.53	95.65
相对标准偏差RSD(%)	3.85	2.32	3.24	2.26

3 结论

在亚麻籽产品的氰化物测定中,改进的异烟酸-吡啶啉酮比色法能测定氰化物的含量,进一步可推出亚麻籽中生氰糖苷的大致含量。

检测方法具有很强的线性相关性, $R^2 = 0.9986$,加标回收率在93.08%~95.65%之间,相对标准偏差<5%。本方法灵敏,重现性好,结果准确可靠。

3.4.3 再现性 在不同的实验室,由不同的操作者使用不同的设备,按相同的测试方法,对同一被测对象相互独立的进行测试获得两次独立的测试结果的绝对差值,超过再现性限R的情况不大于5%。

参考文献:

- [1] The Compilation of Residue Limits Standards for Pesticides and Veterinary Drugs in Foodstuffs in Major Trading Countries and Regions[M]. Beijing:China Standards Press,2004.
- [2] 何艺兵. 农药残留分析方法和残留限量应用[J]. 农业质量标准,2003.
- [3] 汪汉成,祁之秋,王建新,等. 脞菌酯对9种植物病原真菌室内活性测定[J]. 农药,2006,45(11):780~781.
- [4] 张荣华,李倩,朱志良,等. 脞菌酯合成工艺[J]. 农药,2007,46(1):29~30.
- [5] European commission. Commission Working Document-Does Not Necessarily Represent the View of the Commission Services, Trifloxystrobin,SANCO/4339/2000-Final[M]. 7 April 2003.
- [6] 岳永德. 农药残留分析[M]. 北京. 中国农业出版社,2004.

参考文献:

- [1] 李高阳,丁霄霖. 双液相技术对亚麻蛋白的氨基酸组成及其疏水性的影响[J]. 食品工业科技,2006,27(1):57~60.
- [2] 李高阳,丁霄霖. 亚麻籽油中脂肪酸组成的GC-MS分析[J]. 食品与机械,2005,21(5):30~32.
- [3] Madhusudha K J. Detoxification of commercial Linseed meal use in Broiler Ration[J]. Poultry Sci,1986,65:164~171.
- [4] Madhusudha K T. Effect of detoxification treatment on the physicochemical properties of Linseed proteins[J]. J Agric Food Chem,1985,33:1219~1222.
- [5] Niedzwiedz S I. Cyanogenic glucosides in linum usitatissimum[J]. Phytochemistry,1998,49(1):59~63.
- [6] 高锦明,廖蓉芬,高黎明,等. 植物化学[M]. 科学出版社,2003.
- [7] Wanasudara P K, Amarowicz J P D, Kara R, et al. Removal of cyanogenic lgcosides of flaxseed meal [J]. Food Chemistry, 1993,48: 263~266.
- [8] Varga T K, Diosady L L. Simultaneous extraction of oil and antinutritional compounds [J]. Journal of American Oil Chemistry's Society,1994,71(6):603~607.
- [9] 李高阳,丁霄霖. 用正己烷-乙醇-水三元双液相从亚麻籽提油脱氰苷[J]. 农业工程学报,2006,22(12):205~210.
- [10] 梁五生,潘娟. 应用分光光度法测定植物组织中的氰化物含量[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版),2004,30(2):226~228.