

**WYKORZYSTANIE CHROMATOGRAFII JONOWEJ (IC-PAD)
W ANALITYCE JONÓW CYJANKOWYCH OBECNYCH
W PESTKACH POLSKICH JABŁEK I MORELI**

Ewa Jaszczak, Żaneta Polkowska

*Katedra Chemii Analitycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska,
80-952 Gdańsk-Wrzeszcz, ul. Narutowicza 11/12*

Adres e-mail do korespondencji: zanpolko@pg.edu.pl

STRESZCZENIE

Jony cyjankowe zawarte w próbkach pestkach jabłek pochodzą z rozpadu glikozydów cyjanogennych. Główne rośliny jadalne, w których występują glikozydy cyjanogenne to migdały, sorgo, maniok, owoce pestkowe i pędy bambusa. Cyjanoglikozydy występują często w częściach roślin niespożywanych przez człowieka np. pestkach moreli. Jednakże, ze względu na domniemane właściwości antynowotworowe pestki moreli są dostępne w sklepach ze zdrową żywnością. W literaturze naukowej już od wielu lat występują informacje na temat glikozydów cyjanogennych w próbkach produktów spożywczych lecz brakuje danych na temat polskich owoców i warzyw. W prezentowanej pracy omówiono naturalne źródło cyjanków oraz ich biologiczne oddziaływanie. Przedstawiono wyniki oznaczeń jonów cyjankowych w wybranych, dostępnych w sklepach i targach pestkach jabłek i moreli, z zastosowaniem chromatografii jonowej z detekcją pulsacyjną amperometryczną (IC-PAD). Wyniki badań potwierdziły obecność jonów cyjankowych w próbkach pestek. Zawartość cyjanków w pestkach jabłek jest znacznie mniejsza w porównaniu do pestek moreli. Największą zawartością cyjanków charakteryzowały się pestki jabłek Champion (0,097 mg/kg) a najmniejszą pestki jabłek Antonówka, Starting i Gloster (0,002 mg/kg).

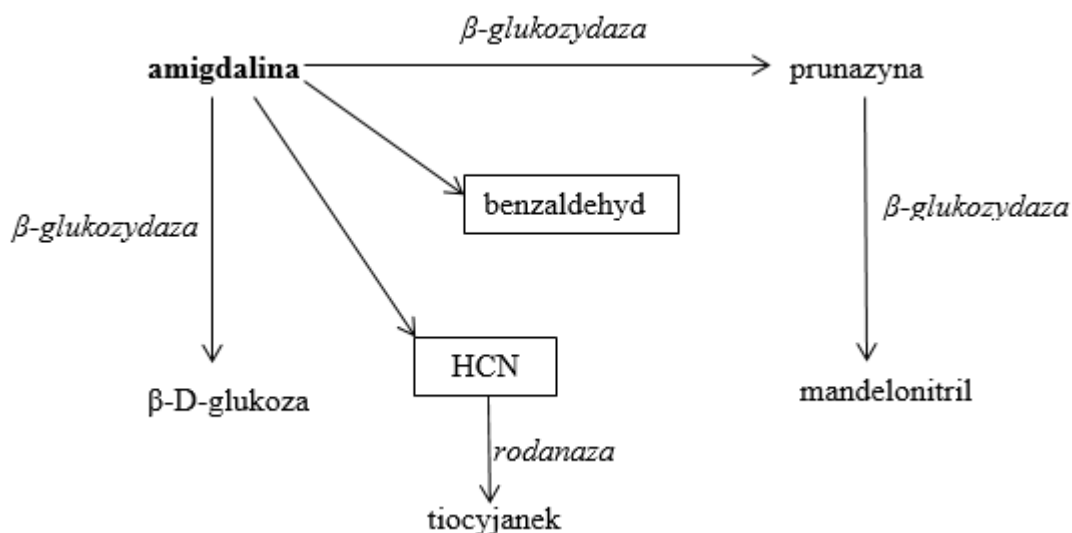
1. Wprowadzenie

Jony cyjankowe występują naturalnie w różnych roślinach w postaci glikozydów cyjanogennych. Rośliny głównie należące do rodzin *Rosaceae*, *Poaceae*, *Euphorbiaceae*, *Lineaceae* i *Scrophulariaceae* są naturalnym źródłem glikozydów cyjanogennych, które są przechowywane w wakuolach komórek roślinnych. W roślinach służą jako istotna ochrona chemiczna przed roślinożercami. Charakterystyczną cechą tych związków jest uwalnianie podczas rozpadu hydrolitycznego trującego cyjanowodoru (Siegień, 2007). Najbardziej znane to prunazyna, amigdalina i limaryna. Amigdalina jest glikozydem cyjanogennym występującym w ponad 1200 roślinach, zwłaszcza w nasionach powszechnie dostępnych owoców, takich jak morele, śliwki (Tabela 1). W pestkach polskich jabłek znajduje się ok. 1,95% amigdaliny. Oprócz naturalnych form, którymi są nasiona wewnątrz pestek, amigdalina dostępna jest również w postaci suplementów (kapsulek).

Tabela 1. Zawartość cyjanków w częściach roślin spożywanych przez człowieka (Haque and Bradbury, 2002)(Simeonova and Fishbein, 2004)

Roślina		Glikozyd cyjanogenenny	Stężenie CN ⁻ (mg HCN/kg)
Morela (<i>Prunus armeniaca</i>)	Pestka	Amigdalina	89-2170
Bambus (<i>Bambusa arundinacea</i>)	Młode pędy	Taxiphyllin	100-8000
Gorzkie migdały (<i>Prunus dulcis</i>)	Pestka	Amigdalina	4700
Maniok (<i>Manihot esculenta</i>)	Korzeń	Limaryna	15-1000
Wiśnia (<i>Prunus spp.</i>)	Pestka	Amigdalina	4,6
Len (<i>Linum usitatissimum</i>)	Ziarno	Limaryna	360-390
Taro (<i>Alocasia macrorrhizos</i>)	Liście	Triglochinin	29-32
Nektarynka	Pestka	Amigdalina	196-209
Brzoskwinia (<i>Prunus persica</i>)	Pestka	Amigdalina	710-720
Śliwka (<i>Prunus spp.</i>)	Pestka	Amigdalina	696-674
Sorgo (<i>Sorghum vulgare</i>)	Liście	Dhurrin	750-790

Uwalnianie cyjanowodoru jest możliwe tylko wtedy, gdy nastąpi zmacerowanie tkanki rośliny cyjanogennej. Pod wpływem enzymu β -glikozydazy rozkładane są na poszczególne podjednostki, z których są zbudowane, dodatkowo uwalniając cząsteczkę cyjanowodoru, który należy do jednej z najsilniejszych substancji toksycznej (Rys.1) (Siegień Irena 2007).



Rysunek 1. Rozkład glikozydu cyjanogennego na przykładzie amigdaliny.

Mechanizm toksycznego oddziaływania cyjanków na organizm człowieka polega na ich łączeniu z trójwartościowym żelazem oksydazy cytochromowej, która jest kluczowym enzymem łańcucha oddechowego. Połączenie to skutkuje blokowaniem oddychania wewnątrz komórkowego i wzrostem syntezy kwasu mlekowego. Jony cyjankowe powodują również bezpośrednie uszkodzenie układu nerwowego na drodze peroksydacji lipidów (Jaszczak et al., 2017). Organizmy żywe na ogół posiadają zdolność do detoksykacji cyjanowodoru poprzez przekształcenie cząsteczki cyjanowodoru do mniej toksycznych związków chemicznych. Znaczna część (80%) cyjanków podlega detoksyfikacji w wątrobie. Odpowiada za to enzym siarkotransferazytiosiarczanowej, obecny w mitochondriach wątroby. Siarka, która jest niezbędna do tej reakcji, pobierana jest ze związków biologicznych np. tiosiarczanów. W wyniku tej reakcji powstają jony rodankowe około 200 razy mniej toksyczne od cyjanków, które są wydalane wraz z płynami ustrojowymi (Simeonova and Fishbein, 2004).

Nadmierne ilości spożywanego pestek wraz z owocami mogą oddziaływać na organizm negatywnie, wywołując szereg niepożądanych reakcji alergicznych typu: biegunki, wymioty, bóle brzucha. Toksyczna reakcja wynikająca z doustnego spożycia amigdaliny jest cechą indywidualną i zależy od wielu czynników (Tabela 2).

Tabela 2. Informacje na temat zatruc cyjankiem w wyniku spożycia amigdaliny.

Pacjent	Dawka	Skutki	Źródło
4-letnie dziecko	12 tabletek 500mg	Biegunka przyspieszony oddech, stężenie cyjanków we krwi; 163 $\mu\text{g/l}$	(Sauer et al. 2015)
Dorosły mężczyzna	12g	Zawroty głowy, śmierć po 24 godz.	
Dorośla kobieta	9g	Wymioty, zawroty głowy, stężenie cyjanków we krwi 143 $\mu\text{g/l}$	(Cigolini et al. 2011)

Zalecane jest spożywanie owoców wraz z pestkami, jednak nie należy przekraczać dawki większej niż jedno nasiono moreli lub brzoskwini przypadającej na 5 kg masy ciała. Uważa się, że spożycie w krótkim czasie pięćdziesięciu gorzkich migdałów może stanowić dawkę śmiertelną dla dorosłego człowieka, a dawka 5-10 migdałów może okazać się trującą dla dziecka. Dawka śmiertelna dla człowieka dorosłego to 1,5 mg cyjanowodoru przypadająca na 1kg masy ciała (Blaheta et al., 2016).

Coraz większe zainteresowanie wzbudzają również preparaty z amigdalina, które traktowane są jako niekonwencjonalny lek na raka. Jednak, przy stosowaniu leczenia amigdalina istnieje niebezpieczeństwo zatrucia cyjanowodorem, w przypadku źle dobranej dawki. Według doniesień literaturowych, odnotowane są przypadki zatrucia cyjankami w wyniku spożycia zbyt dużej ilości pestek zawierających amigdalina, lecz nie ma doniesień na temat wyleczonych osób, które stosowały ten preparat. Dopóki nie zostaną przeprowadzone badania oznaczania markerów nowotworowych podczas tej terapii, odpowiedź na pytanie czy amigdalina jest lekarstwem na raka, nie będzie jednoznaczna (Blaheta et al, 2016).

Celem prowadzonych badań było określenie stężenia cyjanków wolnych występujących w pestkach jabłek dostępnych na Polskim rynku. Do badań próbek pestek jabłek zastosowano technikę chromatografii jonowej z pulsacyjną detekcją amperometryczną. Wyniki przeprowadzonych analiz dostarczyły informacji o stężeniach jonów cyjankowych obecnych w pestkach a tym samym istnieje potencjalna możliwość oszacowania narażenia na jony cyjankowe w wyniku spożywania pestek jabłek.

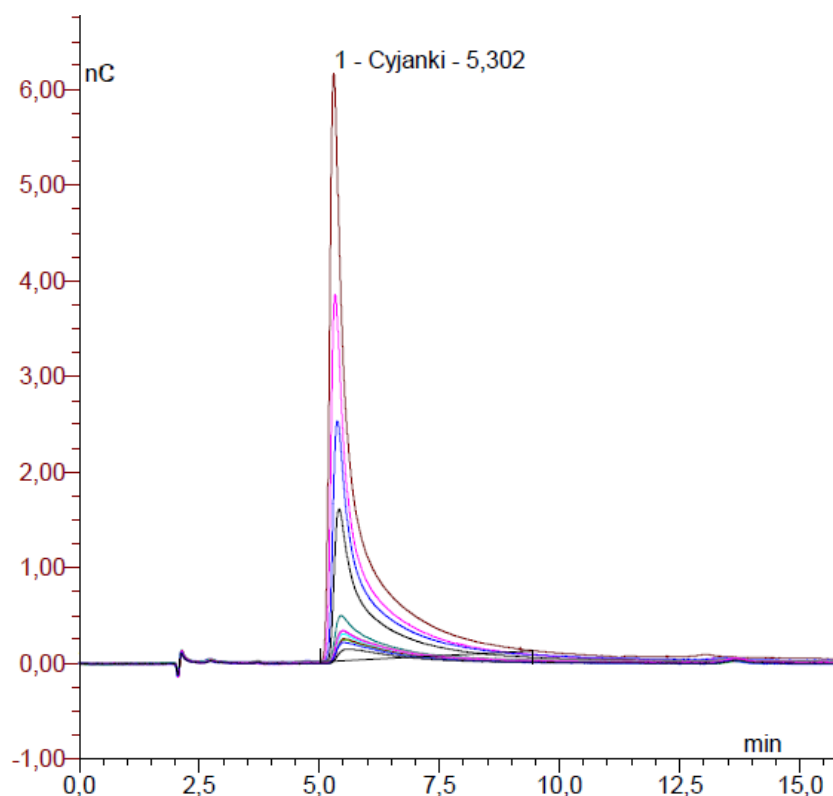
2. Materiały i metody

2.1. Aparatura i odczynniki

Badania przeprowadzono z wykorzystaniem chromatografu jonowego ICS 3000 firmy Dionex, wyposażonego w pompę gradientową, automatyczny podajnik próbek, detektor pulsacyjno amperometryczny PAD (srebrna elektroda robocza; Ag/AgCl elektroda odniesienia). Zastosowano kolumnę anionowymienną Dionex IonPac AS15 (2x250mm), która była zabezpieczona przez przedkolumną Dionex IonPac AG15 (2x250mm). Jako eluent zastosowano 63mM NaOH. Roztwory kalibracyjne przygotowano przez odpowiednie rozcieńczenie woda dejonizowaną roztworu wzorcowego NaCN (firmy Sigma-Aldrich) o stężeniu 1000mg/L. W badaniach stosowano wodę dejonizowaną otrzymaną w systemie oczyszczania wody Milipore Gradient A10 (18,2 Ω cm przy 25°C). W etapie przygotowania próbek do analizy korzystano również z aparatury do przyspieszonej ekstrakcji za pomocą rozpuszczalnika ASE 350 firmy Dionex. Uzyskane dane zostały opracowane za pomocą oprogramowania Chromeleon (wersja 6.8).

2.2. Etap kalibracji chromatografu

Kalibrację chromatografu przeprowadzono z wykorzystaniem roztworów wzorcowych zawierających różne stężenia jonów cyjankowych w zakresie 0,5-100 μ g/L. Na Rysunku 2. Przedstawiono zarejestrowane chromatogramy dla badanych roztworów kalibracyjnych. Równanie opisujące krzywe wzorcowe dla jonów cyjankowych miało postać $y=0,042x-0,243$ ($R^2=0,993$). Granica wykrywalności zastosowanej metody wynosiła 5.8 μ g/L.



Rysunek 2. Chromatogramy roztworów kalibracyjnych cyjanków (zakres 0,5-100 μ g/L).

2.3. Przygotowanie próbek do analizy

Owoce zostały zakupione w sklepach i targach w Gdańsku. Próbki pestek (22 rodzajów jabłek) i moreli (2 rodzaje) zostały przygotowane do analizy przy użyciu przyspieszonej ekstrakcji za pomocą rozpuszczalnika (ASE). Ze względu na aspekty środowiskowe, rozpuszczalnikiem była woda dejonizowana. W celu przeprowadzenia ekstrakcji próbek stałych, po wcześniejszym mechanicznym ich rozdrobieniu przy użyciu młynka oraz zważeniu na wadze analitycznej, próbki zostały przeniesione do naczyń ekstrakcyjnych wykonanych ze nierdzewnej stali. Zastosowanie ziemi okrzemkowej, jako wypełniacza w naczyniu ekstrakcyjnym, pozwoliło na ochronę próbki przed zniszczeniem pod wpływem wysokiego ciśnienia. W pierwszym etapie ekstrakcji próbka została ogrzana do 100 °C. Możliwości techniczne aparatury pozwalają na zastosowanie podwyższonego ciśnienia do 1000psi. Całkowity czas trwania procesu przygotowania dla jednej próbki wynosił 15min.

3. Wyniki i dyskusja

W celu porównania zawartości jonów cyjanków w różnego rodzaju próbkach pestek, wykonano również analizę próbek pestek moreli (Rysunek 3). Wyniki przeprowadzonych badań na próbkach pestek jabłek i moreli wyraźnie wskazują na obecność jonów cyjankowych. Największa zawartość cyjanków obecna jest w próbkach pestek z moreli gorzkiej, jednak uwarunkowane jest to również od regionu pochodzenia pestek. Większą zawartością cyjanków charakteryzują się pestki moreli pochodzące z Syrii niż z Turcji (Tabela 3). Morele najlepiej uprawiać na glebach o pH lekko kwaśnym lub zbliżonym do obojętnego. Do uprawy moreli najlepiej nadają się tereny charakteryzujące się ciepłym klimatem, chronione od zimnych prądów powietrznych.

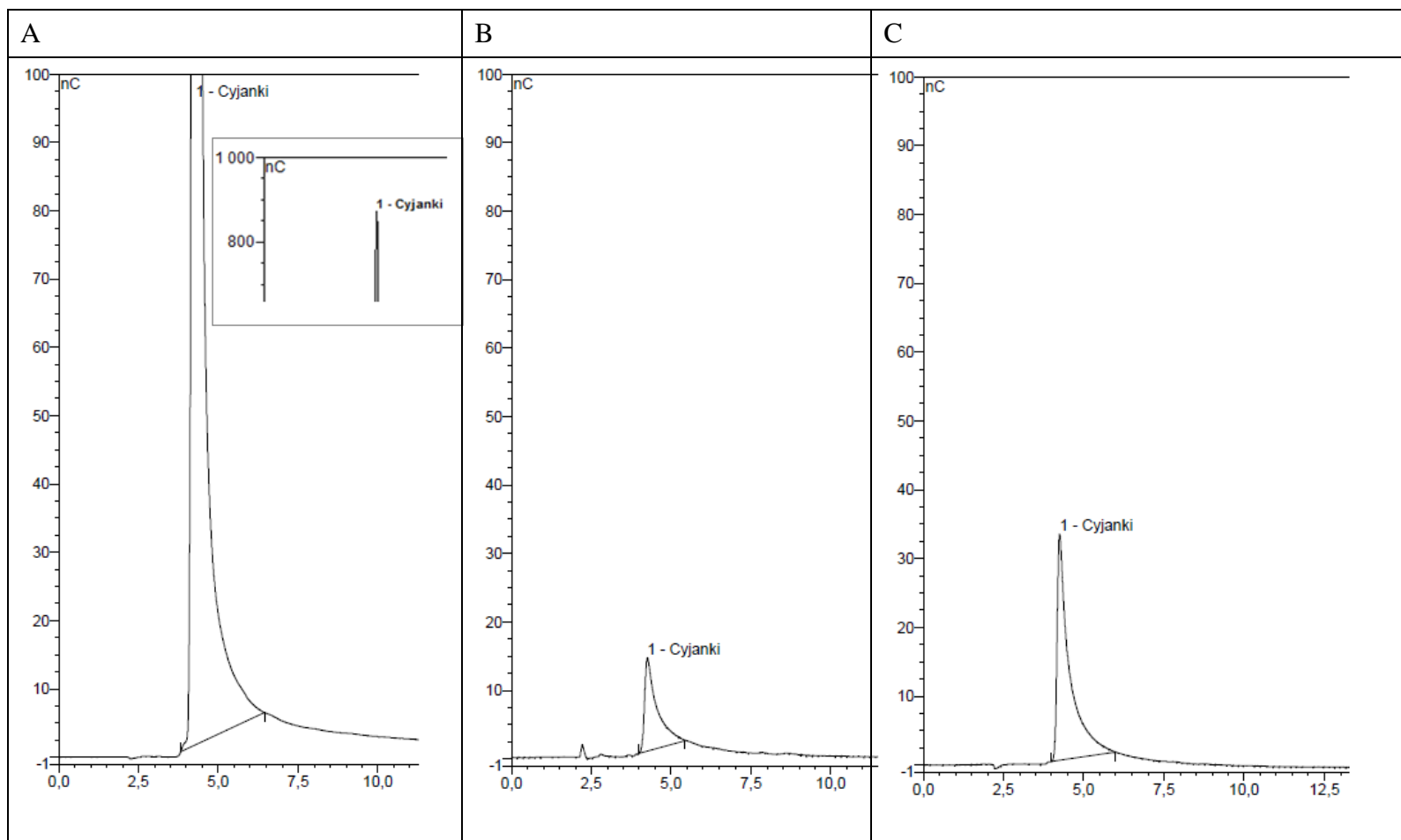
Tabela 3 Stężenie jonów cyjankowych w badanych próbkach pestek jabłek i moreli.

Owoc	Informacje (pochodzenie, miejsce zakupu, kolor miąższu)	Waga 1 pestki [g]	Stężenie [mg/kg]
Morela gorzka	Syria; sklep ze zdrową żywnością	0,0308	1,056
Morela gorzka	Turcja; sklep ze zdrowa żywnością	0,0459	0,259
Grany Smith	Francja; market; biały miąższ	0,0415	0,007
Dekosta	Targ; żółty miąższ	0,0475	0,042
Elstar		0,0522	0,013
Prims		0,0559	0,004
Mutus		0,0394	0,019
Eliza		0,0403	0,016
Starting		0,0257	0,002
Lobo		Targ; biały miąższ	0,0525
Reneta	0,0601		0,019
Alwa	0,0718		0,013
Gala	0,0423		0,042
Rubin	0,0417		0,007
Fiesta	0,0311		0,035
Boskoop	0,0307		0,016
Antonówka	0,0461		0,001
Empajer	0,0295		0,006
Ligol	0,039		0,008
Kosta pomarańczowa	0,042		0,002
Gloster	Supermarket; żółty miąższ	0,024	0,002
Golden		0,042	0,002
Champion	Supermarket; biały miąższ	0,0585	0,097

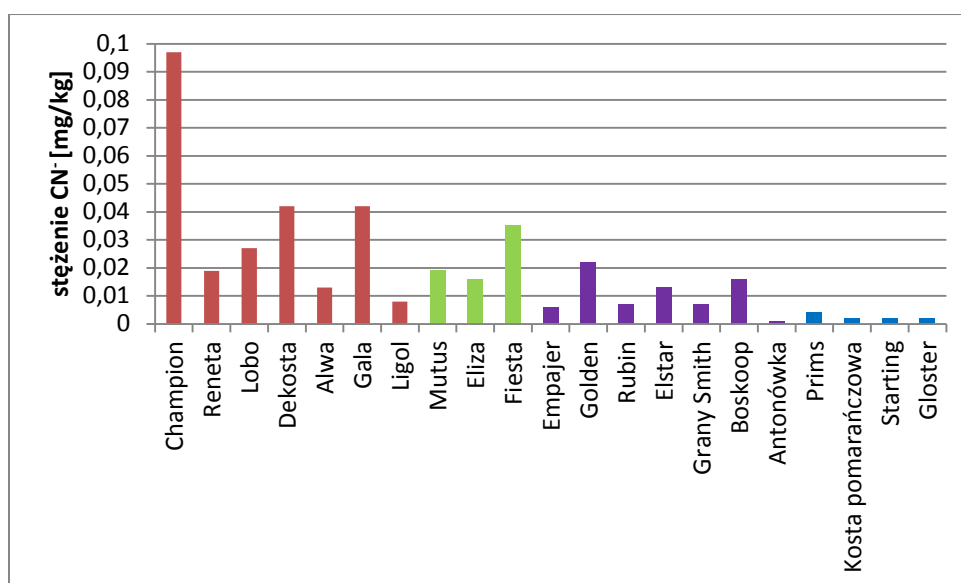
Próbki pestek pobranych z jabłek charakteryzowały się mniejszą zawartością cyjanków niż pestki moreli. Z uzyskanych danych można zauważyć, że stężenie jonów

cyjankowych jest większe w wypadku próbek pestek jabłek o intensywniejszym kolorze miąższu. W przypadku próbek pestek jabłek, stężenie jonów cyjankowych zależało w dużym stopniu od terenu uprawy, gleby i uwarunkowań klimatycznych (Rysunek 4). Analizując odmiany jabłek, od których pobrano pestki do analizy chromatograficznej określono cztery typy gleb, na których najczęściej uprawia się w Polsce jabłonie. Rodzaje wyszczególnionych gleb to: gleba żyzna – czarnoziemy, gleba z podłożem gliniastym, gleba wilgotna o pH 6,2-6,7 oraz gleba piaszczysta. Większość roślin najlepiej rośnie na glebie o odczynie lekko kwaśnym tzn o pH 6,2-6,7. W glebie o takim pH rozwijają się pożyteczne mikroorganizmy, a składniki mineralne są łatwo dostępne dla korzeni roślin. W glebie zbyt kwaśnej giną pożyteczne bakterie i rozwijają się grzyby pleśniowe, a wiele minerałów tworzy nierozpuszczalne w wodzie związki chemiczne.

Na podstawie informacji zamieszczonych na wykresie (Rysunek 4) można zauważyć, iż stężenie jonów cyjankowych zawartych w pestkach jabłek jest największe w przypadku odmian uprawianych na glebach żyznych - czarnoziemach, najmniejsze natomiast w przypadku jabłoni uprawianych na glebach bogatych w podłoże gliniaste. Największa zawartość jonów cyjankowych jest na glebach żyznych - czarnoziemach, charakteryzujących się bogactwem dwuwartościowych jonów takich jak: krzem, potas i magnez, najmniejsze natomiast w przypadku tych próbek uprawianych na glebach bogatych w przeważającej części w glinę.



Rysunek 3. Przykładowe chromatogramy zarejestrowane dla próbek a) pestki moreli (1,056 mg CN/kg) b) pestki jabłka Starting (0,002 mg CN/L) c) pestki jabłka Champion (0,097 mg CN/kg)



● gleba żyzna - czarnoziemy ● gleba wilgotna o pH 6,2-6,7 ● piaszczysta gleba ● glina

Rysunek 4 Stężenie jonów cyjanekowych w zależności o gatunku jabłoni, z uwzględnieniem preferowanej gleby pod ich uprawę.

Ostra toksyczność wywołana przez wybrane glikozydy cyjanogenne jest bezpośrednio związana z uwolnieniem i detoksykacją HCN. Dawka śmiertelna (LD50) dla człowieka jest zróżnicowana. Różnice te wynikają z wielu indywidualnych czynników takich jak: masa ciała, stan zdrowia osoby narażonej na zatrucie. Średnie doustne dawki śmiertelne różnych glikozydów cyjanogennych (limaryna, purazyne, amygdalina) mieszczą się w zakresie od 450 do 880 mg/kg masy ciała. Odnotowane przypadki zatruc cyjankami były spowodowane spożyciem zbyt dużej ilości źle przetworzonej żywności. Jednak stosowane obecnie metody przygotowania żywności minimalizują to ryzyko (Tunçel et al., 1995). Według opinii wydanej przez ekspertów WHO, maksymalne tolerowane dzienne spożycie jonu cyjanekowego wynosi 20 µg/kg masy ciała (JECFA 2011). Na tej podstawie można oszacować, że osoba dorosła nie powinna spożywać więcej niż 2 pestki gorzkich moreli w ciągu jednego dnia. Natomiast pestek jabłek nie powinno się spożywać więcej niż znajduje się ich w jednym owocu.

4. Podsumowanie

Przeprowadzone badania potwierdziły obecność jonów cyjankowych w próbkach pestek Polskich jabłek. Stężenie jonów cyjankowych w badanych próbkach roślinnych uwarunkowane jest sezonowością, klimatem, a także regionem z jakiego dany owoc pochodzi. Zawartość cyjanków w pestkach jabłek jest znacznie mniejsza w porównaniu do pestek moreli. Stężenia cyjanków w pestkach moreli zawierają się w przedziale od 259 do 1056 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Natomiast największe zawartości cyjanków (w zakresie 2-97 $\mu\text{g}/\text{kg}$) w przypadku pestek jabłek oznaczono dla jabłoni, które były uprawiane na glebach żyznych.

Specjaliści z Światowej Organizacji Zdrowia odradzają spożywanie większej dawki cyjanków niż 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ mc, gdyż większa dawka może spowodować poważne zagrożenie dla zdrowia.

5. Literatura

Blaheta, R. A., Nelson K, Haferkamp A., and Juengel E. (2016). "Amygdalin, Quackery or Cure?" *Phytomedicine* 23(4):367–76.

Cigolini D (2011). "Hydroxocobalamin Treatment of Acute Cyanide Poisoning from Apricot Kernels." *Emergency Medicine Journal* 28(9):804 LP-805.

Jaszczak E, Polkowska Ż, Narkowicz S, Namieśnik J. (2017). "Cyanides in the Environment—analysis—problems and Challenges." *Environmental Science and Pollution Research* 24(19):15929–48.

JECFA, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. (2011). "Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants." *WHO Technical Report Series* (966):55–70.

Haque R. M., Bradbury J.H. (2002). "Total Cyanide Determination of Plants and Foods Using the Picrate and Acid Hydrolysis Methods." *Food Chemistry* 77(1):107–14.

Sauer H (2015). "Severe Cyanide Poisoning from an Alternative Medicine Treatment with Amygdalin and Apricot Kernels in a 4-Year-Old Child." *Wiener Medizinische Wochenschrift* 165(9–10):185–88.

Siegień I. (2007). "Cyjanogeneza U Roslin I Jej Efektywność W Ochronie Roślin Przed

Atakiem Roślinożerców I Patogenów.” *Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych* 2:155–66.

Simeonova F, Fishbein L. (2004). “Hydrogen Cyanide and Cyanides: Human Health Aspects.” *World Health Organization Geneva*.

Tunçel, G., Nout M. J. R., Brimer L. (1995). “The Effects of Grinding, Soaking and Cooking on the Degradation of Amygdalin of Bitter Apricot Seeds.” *Food Chemistry* 53(4):447–51.