

108年度推廣教育訓練班

木薯製品中總氰酸之檢驗方法



衛生福利部
食品藥物管理署
Food and Drug Administration

Outline

背景介紹

- 氰糖苷
- 木薯
- 法規規範

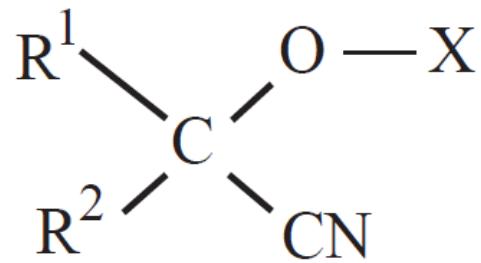
檢驗方法流程

確效結果

結語



Introduction



Name		CAS No.	R ¹	R ²	X
苦杏仁苷	Amygdalin	29883-15-6	Phenyl	H	Gentiobiose
亞麻苦苷	Linamarin	554-35-8	Methyl	Methyl	Glucose
野黑櫻糖苷	Prunasin	99-18-3	Phenyl	H	Glucose
龍膽二糖丙 酮氰醇	Linustatin	72229-40-4	Methyl	Methyl	Gentiobiose
百脈根苷	Lotaustralin	534-67-8	Methyl	Ethyl	Glucose
龍膽二糖甲 乙酮氰醇	Neolinustatin	72229-42-6	Methyl	Ethyl	Gentiobiose
紫杉氰糖苷	Taxiphyllin	21401-21-8	p-Hydroxyphenyl	H	Glucose
蜀黍氰苷	Dhurrin	499-20-7	p-Hydroxyphenyl	H	Glucose

(FAO/WHO, 2012)

Introduction

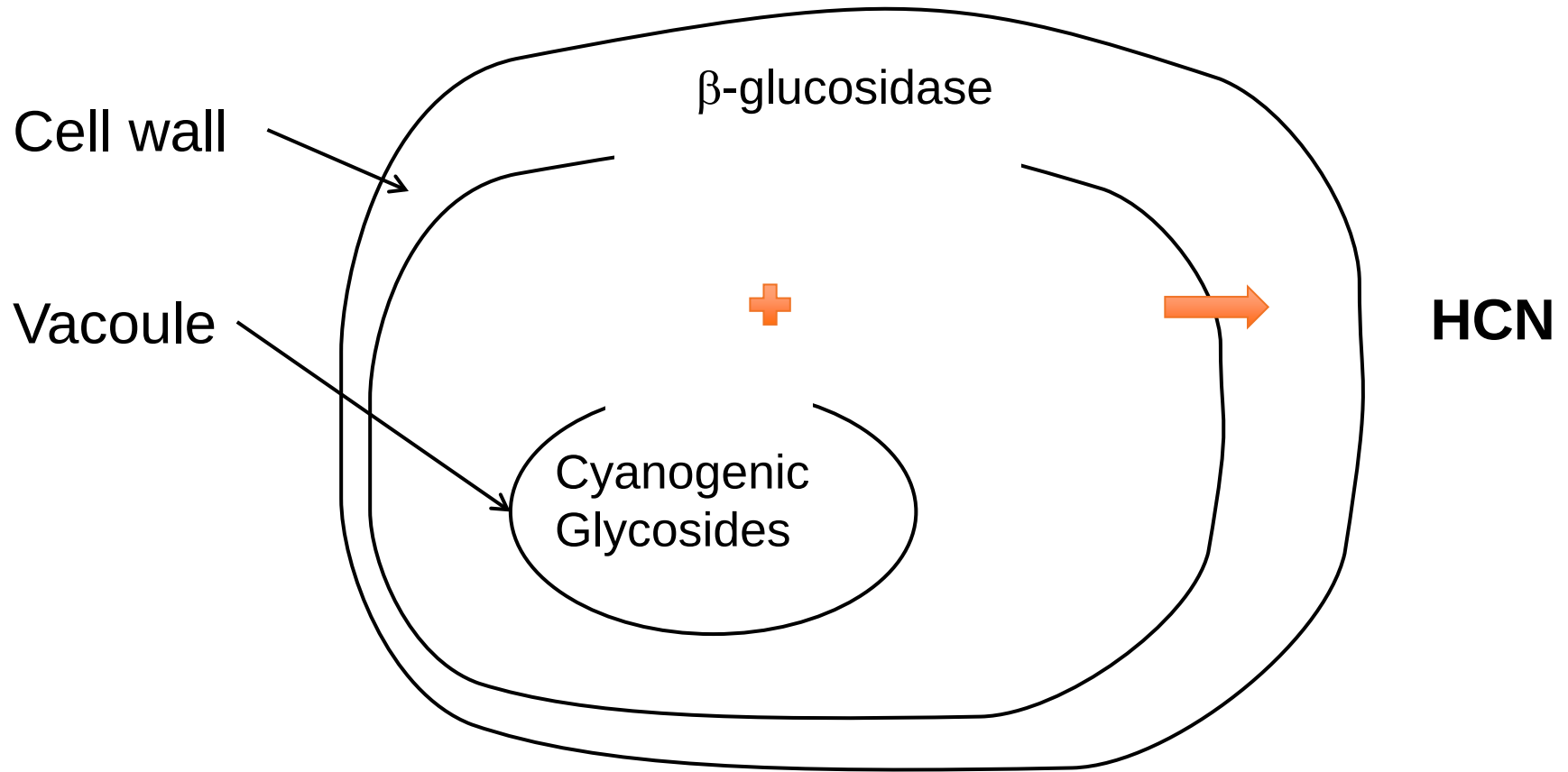
Food	Major cyanogenic glycoside present	Cyanogen content (mg HCN/kg)
Cassava (<i>Manihot esculenta</i>) - root	Linamarin	15-1000
Sorghum (<i>Sorghum vulgare</i>) – leaves	Dhurrin	750-790
Flax (<i>Linum usitatissimum</i>) – seed meal	Linamarin, linustatin, neolinustatin	360-390
Lima beans (<i>Phaseolus lunatus</i>)	Linamarin	2000-3000
Giant taro (<i>Alocasia macrorrhizos</i>) – leaves	Triglochinin	29-32
Bamboo (<i>Bambusa arundinacea</i>) – young shoots	Taxiphyllin	100-8000
Apple (<i>Malus</i> spp.) – Seed	Amygdalin	690-790
Peach (<i>Prunus persica</i>) – Kernel	Amygdalin	710-720
Apricot (<i>Prunus armeniace</i>) – Kernel	Amygdalin	785-813 89-2170 2.2 (juice)
Plum (<i>Prunus</i> spp.) – Kernel	Amygdalin	696-764
Nectarine (<i>Prunus persica</i> var <i>nucipersica</i>) – Kernel	Amygdalin	196-209
Cherry (<i>Prunus</i> spp.)	Amygdalin	4.6 (juice)
Bitter almond (<i>Prunus dulcis</i>)	Amygdalin	4700

(FSANZ, 2008)

(國家衛生研究院，2017) 4

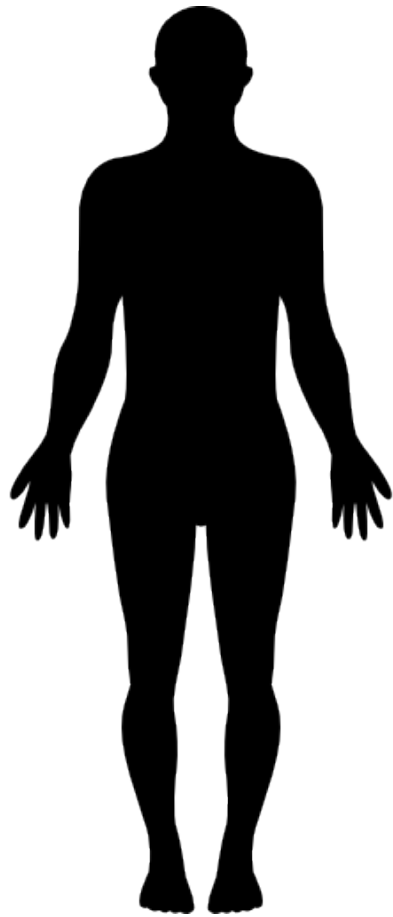


Introduction





Introduction



Cyanogenic
Glycosides

+ Acid, Alkali,
 β -glucosidase



HCN



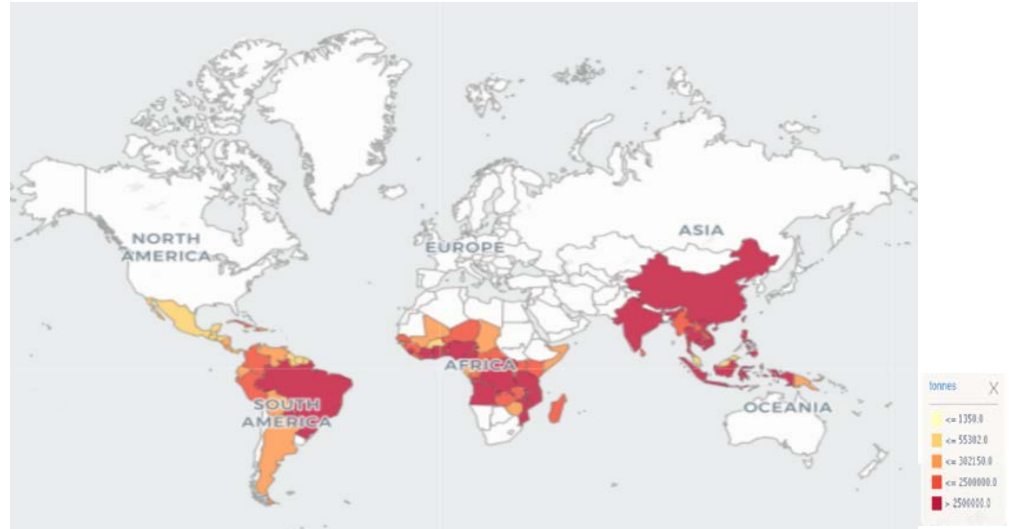
	ARfD (mg/kg b.w)
亞麻苦苷 (linamarin)	0.9
氰離子(cyanide)	0.09

(FAO/WHO, 2012)

Introduction



木薯(*Manihot esculenta* Crantz,
Cassava) 又稱作樹薯



(FAOSTAT, 2017)

木薯粉

木薯片

發酵製品
ex. Gari

飼料



Konzo

Introduction



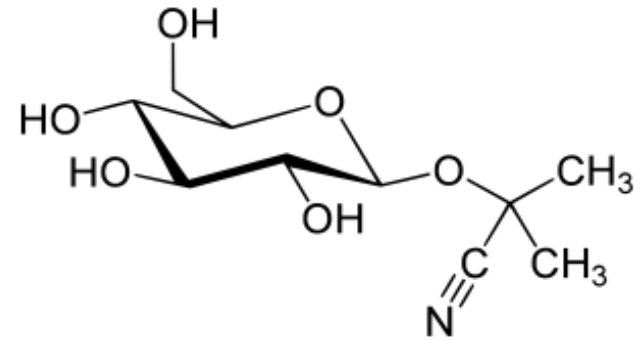
氰酸
或氰離子
7%

丙酮氰醇
23%

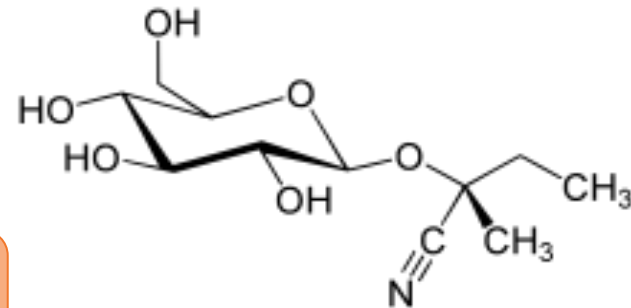
氰糖苷
70%

92-98%
Linamarin

2-8%
Lotaustralin



Linamarin (亞麻苦苷)



Lotaustralin (百脈根苷)

Introduction

食品中污染物質及毒素衛生標準

附表三、食品中其他污染物質及毒素之限量

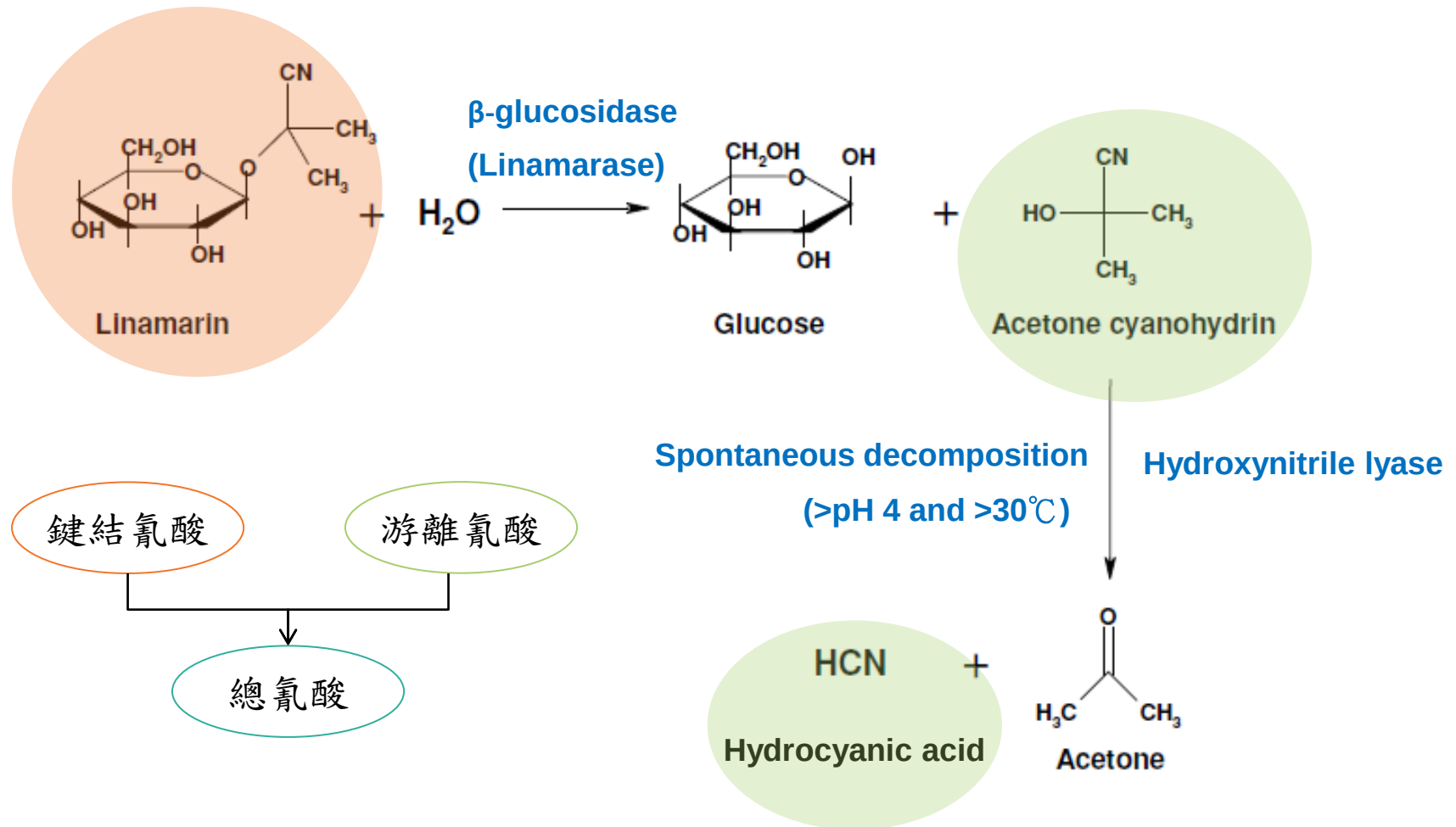
3	植物毒素	
3.1	氰酸 (Hydrocyanic acid)	
	食品	限量(mg/kg)
3.1.1	木薯粉、即食木薯片	10 ⁽¹¹⁾
3.1.2	Gari (發酵木薯製品)	2 ⁽¹²⁾

備註：

(11)以總氰酸計。

(12)以游離氰酸計。

Introduction



(adapt from Julie A. Montagnac *et al.*, 2009)



Method

	AOAC. 915.03	食基發第 1121001号	J. Howard Bradbury, 2009	Hye-Jeon Cho <i>et al.</i> , 2013	GB 5009.36	CEN/TC 327 Animal feedingstuffs
食品 基質	豆子	木薯粉	Gari	多種植物來源 (含木薯、木薯粉)	木薯粉	飼料
水解 氰糖苷	內生酵素	外加酵素	外加酵素	酸水解	-	外加酵素
蒸餾	蒸氣蒸餾	蒸氣蒸餾	-	蒸餾	蒸氣蒸餾	蒸氣蒸餾
定量 分析	酸滴定或 鹼滴定	氯胺T反應 +分光光度計	苦味酸鹽試紙 +分光光度計	離子層析	1. 氯胺T反應 +分光光度計 2. 氯胺T反應 +頂空GC- ECD	taurine & NDA衍生化 + HPLC-FLD
優點		外加酵素較能 完全水解氰糖 苷	外加酵素較能 完全水解氰糖 苷	1.分析不易受 干擾 2.分析時間快		外加酵素較 能完全水解 氰糖苷
缺點	1.滴定易受干 擾 2.內生酵素可 能不足完全 水解氰糖苷	1.分析易受干 擾影響 2.靈敏度不夠 滿足法規需求	1.反應時間長 (16h)	1.水解過程易 造成氰酸溢散 2.儀器、管柱 成本高	內生酵素可 能不足完全 水解氰糖苷	衍生化步驟 較繁瑣

シアン化合物が検出されたタピオカでん粉の取扱について

平成 14 年 11 月 21 日
食基発第 1121001 号・食監発第 1121001 号
各都道府県・各政令市・各特別区衛生主管部(局)長宛
厚生労働省医薬局食品保健部基準課・監視安全課長連名通知

シアン化合物が検出されたタピオカでん粉に関する食品衛生法第 4 条第 2 号の適用については、これまで個別に判断してきたところですが、FAO/WHO 合同食品規格委員会において、タピオカでん粉と同様にキャッサバから製造される「食用に供するキャッサバ粉」に関し、HCN として 10mg/kg を上限とする基準が設定されていること、また、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会合において、定量的な毒性及び疫学情報が欠如していることから、シアン配糖体の安全な摂取量を推定することはできないが、FAO/WHO 合同食品規格委員会がキャッサバ粉について定めた HCN としての基準値 10mg/kg までの量であれば、急性毒性との関連性はないと結論づけられていることから、今後、食品衛生法第 4 条第 2 号の適用の判断を下記のとおりとしたので、ご了承ください。

なお、本件については、各検査所長あてに別添のとおり通知していることを申し添えます。

記

- 1 食用に供するタピオカでん粉について、その HCN の定量値が 10mg/kg を超えるものについては食品衛生法第 4 条第 2 号に該当するものとして措置すること。
- 2 タピオカでん粉中の HCN の定量については、別添の試験法により実施すること。

なお、本試験法と同等以上の性能を有すると認められる試験法により実施しても差し支えない。

(別添) タピオカでん粉中のシアン化合物試験法

1 試薬

クエン酸緩衝液: クエン酸 ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) 128.1 g 及び水酸化ナトリウム 64.4 g を水に溶かして 1,000ml とし、用時 10 倍に薄め、クエン酸溶液及び水酸化ナトリウム溶液で pH を 5.9 に調整する。

酵素溶液: リナマラーゼをクエン酸緩衝液に溶かして 10 ユニット/ml とする。

1%水酸化カリウム溶液: 水酸化カリウム 10 g を水に溶かして 1,000ml とする。

リン酸緩衝液: リン酸二水素カリウム 17.0 g 及びリン酸水素二ナトリウム (12 水塩) 36.0 g を水に溶かして 1,000ml とする。

クロラミンT溶液: クロラミンT 1.25 g を水に溶かして 100ml とする。用時調製する。

Determination of Cyanogenic Compounds in Edible Plants by Ion Chromatography

Hye-Jeon Cho¹, Byung-Kyung Do¹, Soon-Mi Shim², Hoonjeong Kwon^{1,2}, Dong-Ha Lee³, Ahn-Hee Nah², Youn-Ju Choi³ and Sook-Yeon Lee³

¹Department of Food and Nutrition and

²Research Institute of Human Ecology, Seoul National University, Seoul, Korea

³Korea Food and Drug Administration, Osong, Korea

(Received June 21, 2013; Revised June 27, 2013; Accepted June 27, 2013)

Cyanogenic glycosides are HCN-producing phytochemicals; HCN is a powerful and a rapidly acting poison. It is not difficult to find plants containing these compounds in the food supply and/or in medicinal herb collections. The objective of this study was to investigate the distribution of total cyanide in nine genera (*Dolichos*, *Ginkgo*, *Hordeum*, *Linum*, *Phaseolus*, *Prunus*, *Phyllostachys*, *Phytolacca*, and *Portulaca*) of edible plants and the effect of the processing on cyanide concentration. Total cyanide content was measured by ion chromatography following acid hydrolysis and distillation. Kernels of *Prunus* genus are used medicinally, but they possess the highest level of total cyanide of up to 2259.81 CN/g dry weight. Trace amounts of cyanogenic compounds were detected in foodstuffs such as mungbeans and bamboo shoots. Currently, except for the WHO guideline for cassava, there is no global standard for the allowed amount of cyanogenic compounds in foodstuffs. However, our data emphasize the need for the guidelines if plants containing cyanogenic glycosides are to be developed as dietary supplements.

Key words: Cyanogenic compounds, Herbal medicines, Ion chromatography

INTRODUCTION

There are various forms of cyanogenic compounds that release hydrogen cyanide upon breakdown. The cyanogenic compound is present mainly as glycoside in more than 2650 plant species. Apricot kernel, peach kernel, cassava, almond, bamboo shoot, sorghum, Japanese apricot, flaxseed among others have been consumed by human worldwide either as food or as herbal medicine (1,2). About ten cyanogenic glycosides including amygdalin, prunasin, dhurrin, linamarin, and taxiphyllin have been reported in edible plants (3). Hydrogen cyanide derived from cyanogenic glycoside can cause health concerns including cell death by blocking cytochrome oxidase and the arrest of the ATP production.

Correspondence to: Hoonjeong Kwon, Department of Food and Nutrition and Research Institute of Human Ecology, Seoul National University, 1 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul 151-742, Korea
E-mail: hijkwon@snu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Several symptoms have been related to the consumption of cyanogen containing foodstuff including vomiting, nausea, dizziness, weakness, konzo, and occasional death. Chronic intake has been linked to goiter especially in iodine deficiency cases (4,5).

Various methods have been used for the quantitative analysis of cyanogenic compounds of edible plants. The colorimetric method via König reaction after acid hydrolysis, picrate method, and the chromatographic method are the most common ones (6-13). The analysis using the colorimetric method involves three steps: (1) extraction of cyanogenic compounds from the plants material, (2) acid hydrolysis of cyanogenic glycoside, and (3) the color development and detection of cyanide (14). The König reaction used in the color development step detects not only cyanide but also thiocyanate, other plant secondary metabolites, making the method less specific to cyanide. Also during the acid hydrolysis, HCN gas may dissipate, resulting in an underestimation. The colorimetric method may employ enzymatic hydrolysis either intrinsic or extrinsic, however, tannin from the plant tissue may inhibit the enzyme giving rise to another source of underestimation (14,15). A gas chromatographic measurement of hydrogen cyanide released

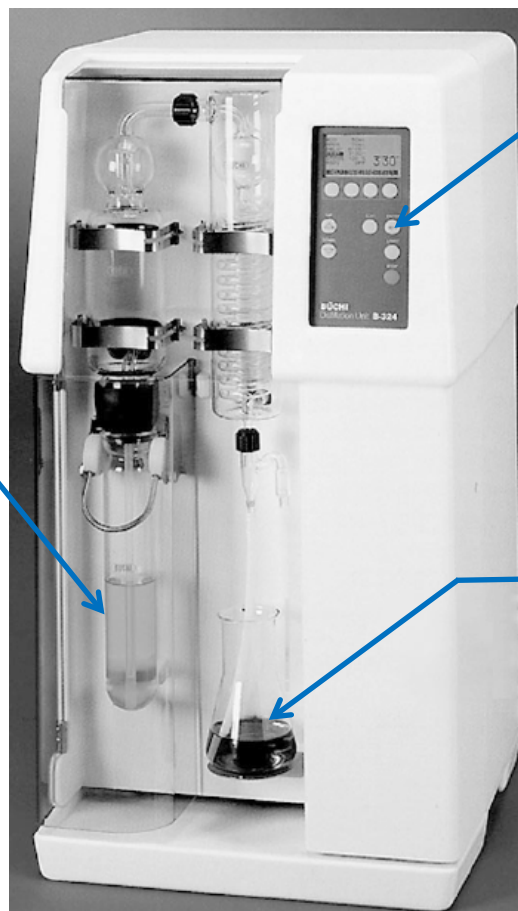
Method

酵素水解

蒸餾

離子層析

Sample blank
CN⁻ standard solution
Citric acid buffer 50 mL



Distillation rate: 20 mL/min

0.625N NaOH 10 mL

Method

酵素水解

蒸餾

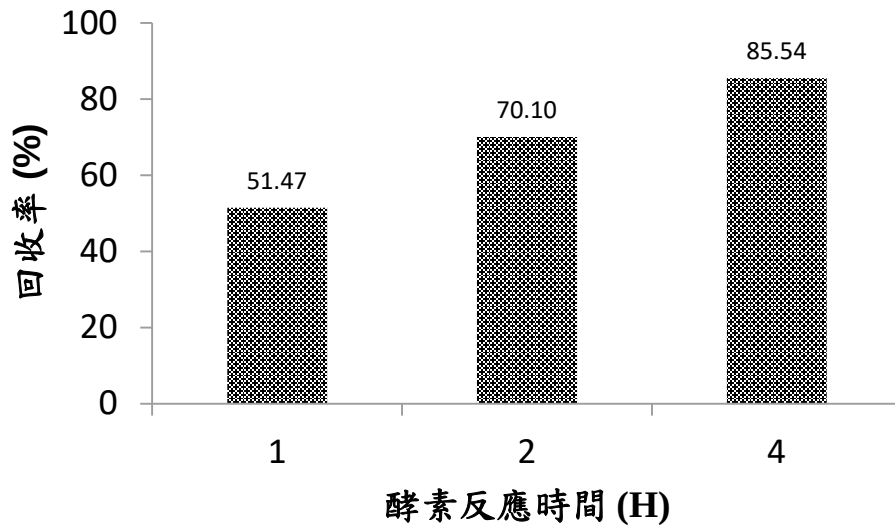
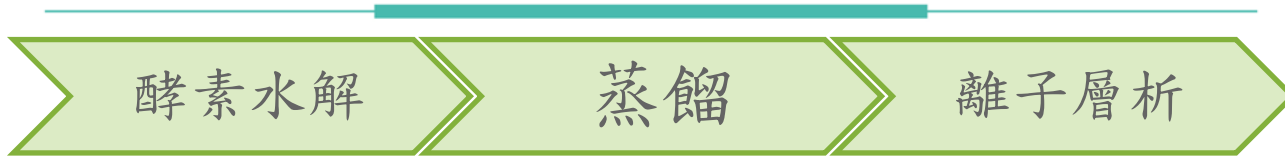
離子層析

空白檢體添加氰離子標準溶液經蒸餾後之回收率

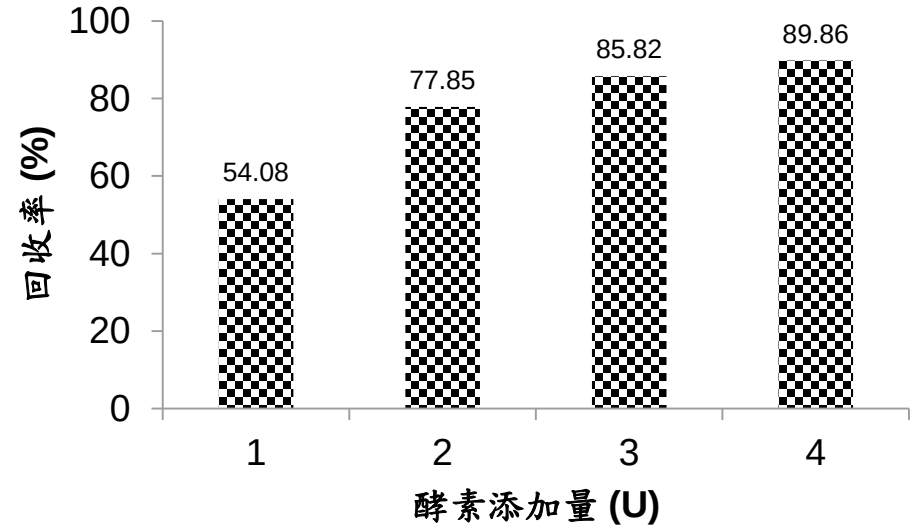
檢體取樣量 (g)	檢體濃度 (mg/kg)	平均值 (%)	CV (%)
2.5	1	99.1	3.9
	10	89.2	2.8
	20	89.1	1.1
	40	90.4	0.8
5	1	94.0	2.7
	10	89.2	0.7

* n=3

Method



空白檢體添加亞麻苦苷及3 U亞麻苦苷酶反應不同時間後之回收率



空白檢體添加亞麻苦苷及不同量酵素反應4小時後之回收率

Method

稱取檢體 2.5 g

+ 50 ml 檸檬酸緩衝溶液
+ 4U 亞麻苦苷酶
蓋緊軟塞，vortex

酵素水解反應

38°C, 150 rpm, 4 hours

水蒸氣蒸餾

捕集溶液: 0.625 N NaOH 10 mL
蒸餾速率: 20 mL/min
蒸餾液體積: 80 mL

以水定量體積至 100 mL

↓ 過膜 (Nylon, 0.45 µm)

HPIC

精確量取檢液及標準溶液各25 µL，分別注入高效離子層析儀中，依下列條件進行分析。就檢液及標準溶液所得波峰之滯留時間比較鑑別之，並依下列計算式求出檢體中總氰酸之含量(mg/kg)：

$$\text{檢體中總氰酸之含量(mg/kg)} = \frac{C \times V \times 1.0387}{M}$$

C：由標準曲線求得檢液中氰離子之濃度(µg/mL)

V：檢體最後定容之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

1.0387：氰離子與氰酸之轉換係數

本方法定量極限為1 mg/kg

儀器參數

Method

層析條件

管柱	Guard column: IonPac AG7 (40 mm × 50 mm) Analytical column: IonPac AS7 (40 mm × 250 mm)
移動相	0.5 M Sodium Acetate/0.1 N Sodium Hydroxide/0.5% (v/v) Ethylenediamine
流速	1.0 mL/min
注射體積	25 µL

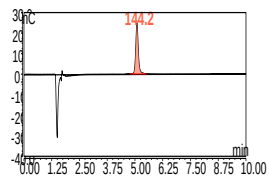
脈衝電化學檢出器條件

工作電極 Ag
參考電極 Ag/AgCl

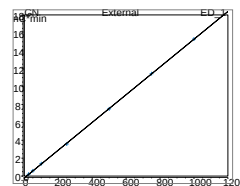
Waveform

Times (s)	Voltage (V)	Gain Region
0	-0.1	off
0.2	-0.1	on
0.9	-0.1	off
0.91	-1	off
0.93	-0.3	off
1	-0.3	off

Method



$y = 0.0155x - 0.2019$
 $R^2 = 0.99995$
Type: Linear, Origin: Ignore



添加
回收

Method

稱取檢體 2.5 g + 適量 亞麻苦苷(linamarin)

+ 50 ml 檸檬酸緩衝溶液
+ 4U 亞麻苦苷酶
蓋緊軟塞，vortex

酵素水解反應

38°C, 150 rpm, 4 hours

水蒸氣蒸餾

捕集溶液: 0.625 N NaOH 10 mL

蒸餾速率: 20 mL/min

蒸餾液體積: 80 mL

以水定量體積至 100 mL

↓ 過膜 (Nylon, 0.45 µm)

HPIC

添加 回收

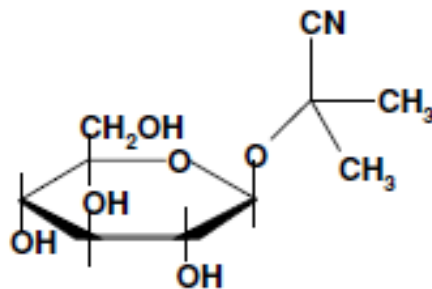
Method

$$\text{回收率(\%)} = \frac{C_c}{C_a \times F} \times 100$$

C_c ：添加回收檢體氰酸之回收含量(μg)

C_a ：檢體中添加之亞麻苦苷含量(μg)

F ：亞麻苦苷與氰酸之轉換係數， $F=0.1093$



Linamarin
MW 247.248

HCN

Hydrocyanic acid
MW 27.025

Validation

空白檢體(木薯粉)添加亞麻苦苷之回收率

Compound	Spiked level (HCN equ. mg/kg)	Recovery ^a (%)	CV (%)
linamarin	1	94.7	1.9
	10	97.2	1.3
	40	90.7	1.1

^a n=5.

同日、異日添加回收試驗結果

Compound	Spiked level (HCN equ. mg/kg)		Recovery (%)	CV (%)
linamarin	1	Intra-day precision ^a	94.7	1.9
		Inter-day precision ^b	97.3	3.2

^a n=5. ^b n=10.

Conclusion

- ◆木薯食品中之氰糖苷主要為亞麻苦苷，基於酵素專一性，水解酵素必須選擇亞麻苦苷酶。
- ◆本方法外加酵素水解亞麻苦苷，經蒸氣蒸餾收集氰酸後，以IC定量分析。
- ◆添加回收試驗符合食品化學檢驗方法確效規範，LOQ訂定為1 mg/kg。

Thanks for your attention

.....



衛 生 福 利 部
食 品 藥 物 管 理 署
Food and Drug Administration

<http://www.fda.gov.tw/>