

## **Porównanie metod oznaczania ilościowego związków cyjanogennych w surowcach zielarskich**

### **Comparison of methods for the quantitative determination of cyanogenic compounds in raw herbs**

Henryk Różański\*, Anna Pietrasz\*, Izabela Betlej\*, Joanna Anglart-Różańska\*,  
Angelika Uram\*, Grzegorz Domański\*, Mikhael Hakim\*

\*Państwowa Wyższa Szkoła Zawodowa im. Stanisława Pigoń w Krośnie

---

**Słowa kluczowe:** związki cyjanogenne, nitrylozydy, cyjanowodór, fitotoksykologia

**Keywords:** cyanogenic compounds, nitrilosides, hydrogen cyanide, phytochemistry, phytotoxicology

---

#### **Streszczenie**

Praca omawia metody wykrywania i ilościowego oznaczania związków cyjanogennych w roślinach. Charakteryzuje właściwości i znaczenie toksykologiczne oraz farmakologiczne wybranych substancji cyjanogennych.

#### **Summary**

The work describes methods of the detection and quantification of the cyanogenic compounds in plants. In this work the properties and the importance of toxicological and pharmacological selected cyanogenic substances is characterized.

#### **Wstęp**

Związki cyjanogenne występują u ok. 2000 gatunków roślin należących do 110 rodzin (np. *Rosaceae*, *Poaceae*, *Linaceae*, *Papilionaceae* = *Fabiaceae*, *Euphorbiaceae*, *Cruciferae* = *Brassicaceae* *Scrophulariaceae*). Podczas hydrolytycznego rozpadu uwalniają cyjanowodór HCN (kwas pruski, cyjanowodorowy, hydrocyanic acid).

Glikozydy cyjanogenne są produktami przemian aminokwasów, w których po dekarboksylacji z grupy  $\text{NH}_2$  utworzona zostaje grupa nitrylowa  $\text{C} \equiv \text{N}$ . W czasie cyjanogenezy (biosyntezy nitrylozydów) najpierw powstaje ketoksym aminokwasu, który podlega dekarboksylacji do aldoksymu, który z kolei ulega redukcji z przekształceniem do nitrylu. W dalszych etapach przez hydroksylację przy atomie węgla sąsiadującym z grupą – CN możliwe

jest powstanie cyjanohydryny, która jest akceptorem reszty glikozyłowej. Nitryle wywodzą się najczęściej z alaniny, seryny, waliny, fenyloalaniny i tyrozyny [1,2,3].

Surowce zawierające związki cyjanogenne były wykorzystywane w dawnej medycynie do pobudzania ośrodków wegetatywnych i ośrodków rdzenia kręgowego, przede wszystkim w celu przyspieszenia wentylacji płuc. Do celów leczniczych stosowano 0,1% roztwory wodne cyjanowodoru w postaci wody laurowej *Aqua Laurocerasi* oraz wody migdałowej *Aqua Amygdalarum amararum*. Wody te podawano doustnie w dawkach jednorazowych do 2 g oraz dawkach dziennych do 6 g [8].

Małe dawki glikozydów cyjanogennych (nitrylozydów) obecnych w wielu surowcach zielarskich pobudzają ośrodek oddechowy. Działają przy tym antyseptycznie, przeciwkaszlowo i przeciwskurczowo.

**Wodę migdałową** – *Aqua amygdalarum amararum* podawano doustnie w dawce 10–15 kropeł jako środek przeciwpadaczkowy, w formie dodatku do leków złożonych przy bronchicie, koklusz, astmie i ogólnym osłabieniu. Woda migdałowa recepturowa przygotowywana w XIX i na początku XX wieku zawierała ok. 0,1% kwasu pruskiego (Farmakopea Pruska, Farmakopea Rosyjska). Wg Farmakopei Polskiej II *Aqua Amygdalae amarae* powinna zawierać nie mniej niż 0,095% i nie więcej niż 0,105% cyjanowodoru. Farmakopea Polska III dopuściła do użycia wodę migdałową sztuczną (*Aq. Amygdalae amarae artificialis*), którą sporządzano z benzaldehydu (4,5 części), spirytusu 95% (245,5 cz.), kwasu pruskiego 2% (55 cz.) i wody (650 cz., q.s.). Podobne właściwości wykazuje **woda wawrzynowiśniowa** – *Aq. Laurocerasi* uzyskiwana z liści wawrzynowiśni – *Folium Laurocerasi* (*Prunus laurocerasus* L., z rodziny różowatych – *Rosaceae*). W medycynie ludowej alternatywą dla tych surowców jest czeremcha – *Prunus padus* L. i tarnina – *Prunus spinosa* L., z których sporządzany jest napar i odwar. Z czeremchy pospolitej *Prunus padus* L. (ewentualnie z czeremchy amerykańskiej – *Prunus serotina* Ehrh.) pozyskuje się młode gałązki, kwiatostany, liście i korę, natomiast ze śliwy tarniny – *Prunus spinosa* L. – korowinę, młode gałązki i kwiaty. W medycynie ludowej korę i młode gałązki gotuje się 3–5 minut, natomiast kwiaty i liście służą do przyrządzania naparu. 1 łyżkę surowca zalewa się 1 szklanką wody. Napar lub odwar pije się 4 razy dziennie po 50 ml. Najbardziej zasobne w nitrylozydy są wyciągi wodne sporządzone ze świeżych surowców [9].

Celem badań było wykazanie praktycznej przydatności różnych metod na wykrywanie i ilościowe oznaczanie związków cyjanogennych w surowcach i ekstraktach roślinnych.

Właściwości toksyczne związków cyjanogennych:

- Szybko są wchłaniane przez skórę, płuca i z przewodu pokarmowego.
- Wolne jony cyjanowe są metabolizowane do rodanków z udziałem enzymu siarkotransferazy tiosiarczanowej.
- Rodanki są 200 razy mniej toksyczne od cyjanków.
- Cyjanki hamują układ enzymatyczny oksydazy cytochromowej.
- Uniemożliwiają wykorzystanie tlenu przez komórki (uduszenie organizmu na poziomie komórkowym).

Objawy zatrucia:

- Utrata przytomności.
- Osoba zatruta wydaje charakterystyczny okrzyk i upada na skutek porażenia ośrodka oddechowego.
- Porażenie czynności serca.
- Stężenie cyjanowodoru  $0,3 \text{ mg/dm}^3$  powoduje szybki zgon. Stężenie  $0,2 \text{ mg/dm}^3$  powoduje zgon po 10 minutach.

Dawka śmiertelna: 1 mg cyjanowodoru na 1 kg masy ciała. Cyjanek potasu: 150–250 mg/70 kg masy ciała powoduje zgon.

Surowce zielarskie zawierające związki cyjanogenne (nasiona lnu, kora, liście, gałązki czeremchy, śliwy tarniny, ziele lniczy, liści laurowiśni i in.) wymagają precyzyjnego dozowania, aby nie została przekroczona toksyczna dawka cyjanowodoru [18].

### **Charakterystyka wybranych związków cyjanogennych występujących w roślinach**

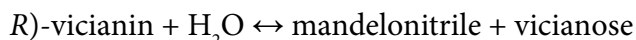
**Amigdalina** ( $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{NO}_{11}$ ) występuje u roślin z rodziny *Rosaceae*. Krystalizuje z alkoholu etylowego w postaci białych płytek. Z roztworów wodnych krystalizuje w postaci pryzmatów. Kryształki topią się w temperaturze 214–216°C. Rozpuszcza się w 12 częściach zimnej wody, bardzo łatwo we wrzącym etanolu i wrzącej wodzie. Nie jest rozpuszczalna w eterze i chloroformie. W cząsteczce zawiera gencjobiozę (dwucukier zbudowany z dwóch cząsteczek D-glukozy połączonych wiązaniem  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-glikozydowym). Pod względem chemicznym jest gencjobiozydem mandelonitrylu (D-(-)-mandelonitrile-gentiobioside). *Prunus dulcis* var. *amara* zawiera w nasionach do 8% amigdaliny. Amigdalina jest jednym z najwcześniej odkrytych związków cyjanogennych w roślinach. Wöhler i Liebig wykryli amigdalinę w migdałowcu już w 1837 roku [4,5,6].

Amigdalinę (*Amygdalinum*) uzyskiwano do celów leczniczych z migdałów przez ekstrakcję. Liebig zalecał ją do przygotowywania mieszanki mającej zastąpić wodę z gorzkich migdałów. 17 części amigdaliny w obecności emulsyny dawały 1 część kwasu pruskiego (cyjanowodoru), czyli 8 części olejku gorzkich migdałów [7].

**Linamaryna** ( $C_{10}H_{17}NO_6$ ) znajduje się w rodzaju fasola – *Phaseolus*, len – *Linum*, maniok – *Manihot*. W czystej postaci jest krystalicznym proszkiem o temperaturze topnienia 142–143°C, bardzo dobrze rozpuszczalnym w wodzie oraz w roztworach wodnych alkoholi. Nie rozpuszcza się w absolutnych alkoholach i eterach. Enzym linamaraza rozkłada linamarynę do acetonu, kwasu pruskiego i glukozy. Pod względem chemicznym jest to glikozyd acetonocyjanohydryny (acetone-cyanohydrin-glucoside).

**Prunazyna** ( $C_{14}H_{17}NO_6$ ) występuje w rodzaju *Prunus*. Krystalizuje z octanu etylu w postaci iglastych kryształków o temperaturze topnienia 147–150°C. Bardzo dobrze rozpuszcza się w wodzie, metanolu i acetonie. Emulsyna hydrolizuje prunazynę do aldehydu benzoowego, cyjanowodoru i glukozy. Jest glikozydem mandelonitrylu (D-(-)-mandelonitrile-D-glucoside).

**Wicjanina** ( $C_{19}H_{25}NO_{10}$ ) rozpowszechniona jest w rodzaju wyka – *Vicia*. Krystalizuje w postaci igieł o temperaturze topnienia 147–148°C. Łatwo rozpuszcza się w gorącej wodzie, trudno w zimnej. Bardzo słabo rozpuszczalna w spirytusie. Nie rozpuszcza się w eterach, chloroformie i benzenie. Enzym vicianin beta-glucosidase (glikozydaza wicjaninowa) rozkłada wicjanozę do mandelonitrylu i cukru wicjanozy (dwucukier zbudowany z arabinozy i glukozy)



Kwasami można zhydrolizować wicjaninę do aldehydu benzoowego, kwasu pruskiego i cukrów prostych.

**Sambunigryna** ( $C_{14}H_{17}NO_6$ ) występuje w rodzaju bez – *Sambucus*. Krystalizuje z mieszaniny benzen + alkohol amyłowy w postaci bezbarwnych igieł o temperaturze topnienia 151–152°C. Smak ma słabo gorzki. Rozpuszcza się w 3,5 części wody o temperaturze 20° C oraz bardzo dobrze w spirytusie zimnym. Pod względem chemicznym jest to L-mandelonitril-β-D-glucopyranosid. Stereoizomer prunazyny, stąd nazwa synonimowa sambunigryny: L-prunazyna. Pod wpływem kwasów i enzymów hydrolitycznych rozkłada się do aldehydu benzoowego, kwasu pruskiego i glukozy.

**Prulaurazyna** ( $C_{14}H_{17}NO_6$ ) jest glikozydem mandelonitrylu = glikozydem nitrylu kwasu DL-migdałowego (DL-mandelonitrile-D-glucoside),

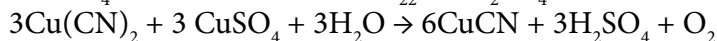
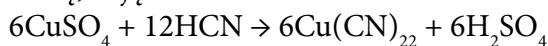
rozpowszechnionym w rodzaju *Prunus*. Krystalizuje w postaci bezbarwnych igieł lub pryzmatów o temperaturze topnienia 122–122,5°C. Jest łatwo rozpuszczalna w wodzie, spirytusie i octanie etylu. Nie rozpuszcza się w eterach. Posiada gorzki smak [10,5,11,1].

### Materiał i metody

Wbrew pozorom niewiele jest opracowanych metod wykrywania i ilościowego oznaczania związków cyjanogennych. Spośród kilku istniejących, w praktyce fitochemicznej wykorzystuje się 2 metody ilościowego oznaczania związków cyjanogennych: reakcja z kwasem pikrynowym (kolorymetryczna) oraz metoda argentometryczna.

Do wykrywania związków cyjanogennych stosuje się najczęściej 6 metod:

**1. Metoda Schoenbeina** polega na reakcji siarczanu miedzi i cyjanowodoru, w wyniku której uwolniony zostaje ozon, który utlenia żywicę gwajakową, dając niebieskie zabarwienie.



Odczynniki:

Papierki Schoenbeina: skrawki bibuły nasyczone etanolowym roztworem żywicy gwajakowej;

Roztwór  $\text{CuSO}_4$  (1:2000);

5% roztwór kwasu winowego.

Wykonanie. Próbkę badanego materiału umieszcza się w kolbie, dodaje 5% roztworu kwasu winowego do odczynu kwaśnego, zamyka korkiem, w którym umieszczony jest papierek Schoenbeina. Kolbkę ogrzewa się łagodnie na łaźni wodnej. Zniebieszczenie papierka wskazuje na obecność kwasu pruskiego. Papierki Schoenbeina mogą być użyte do oceny stężeń cyjanowodoru w powietrzu. Po 7 sekundach ulegają one wybarwieniu:

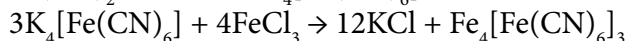
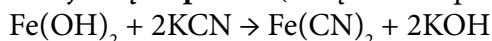
Przy stężeniu 0,062–0,07 mg/L – zabarwienie silnie niebieskie.

Przy stężeniu 0,038–0,046 mg/L zabarwienie niebieskie.

Przy stężeniu 0,015–0,022 mg/L zabarwienie słabo niebieskie.

Przy stężeniu 0,007 mg/L brak zabarwienia.

**2. Reakcja z siarczanem żelaza i chlorkiem żelaza, w wyniku której powstaje błękit pruski** (związek kompleksowy):



Odczynniki:

0,5% roztwór siarczanu żelaza II  $\text{FeSO}_4$

0,5% chlorku żelaza III  $\text{FeCl}_3$

10% roztwór kwasu solnego

Wykonanie. Do części destylatu dodaje się po kropli świeżo przygotowanego roztworu siarczanu żelaza i chlorku żelaza, miesza starannie, lekko podgrzewa i ostrożnie zakwasza kwasem solnym. Zależnie od ilości cyjanowodoru powstaje niebieski osad błękitu pruskiego, a przy mniejszych ilościach zabarwienie zielononiebieskie lub zielone. Wykrywalność: 2  $\mu\text{g}$  HCN [12].

### 3. Reakcja z siarczkiem miedzi II $\text{CuS}$ .

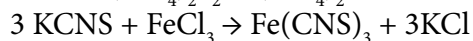
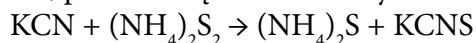
Bibułę zwilżoną amoniakalnym roztworem siarczanu miedzi II (1 g/l wody), bezpośrednio przed wykonaniem doświadczenia, trzymać krótko w strumieniu siarkowodoru – do zabarwienia żółtobrunatnego. Powstanie białej plamy na bibule po naniesieniu kropli badanego roztworu świadczy o obecności cyjanków. Wykrywalność: 1,25  $\mu\text{g}$ .

### 4. Reakcja z azotynem potasu $\text{KNO}_2$ .

Do części destylatu dodaje się kilka kropli roztworu azotynu potasu, 2–4 krople roztworu chlorku żelaza i tyle rozcieńczonego kwasu siarkowego. Zabarwienie żółtobrunatne zmienia się na jasnożółte. Jeżeli w badanej próbie jest cyjanowodor wówczas powstaje w wyniku reakcji nitroprusydek potasu  $\text{Fe}(\text{CN})_3(\text{NO})\text{K}_2$ . Całość należy ogrzewać do wrzenia, wytrącić nadmiar żelaza amoniakiem, przesączyć i zadać przesącz 2 kroplami rozcieńczonego siarczku amonowego. Powstaje wówczas zabarwienie fioletowe, przechodzące w niebieskie, zielone i żółte. Wykrywalność 1:312000.

### 5. Reakcja z wielosiarczkiem amonowym $(\text{NH}_4)_2\text{S}_x$ .

Do części zasadowego destylatu dodaje się kilka kropel wielosiarczku amonu i odparowuje do sucha na łaźni wodnej. W obecności jonów cyjanowych tworzy się rodanek, który po zakwaszeniu kwasem solnym i dodaniu kropli rozcieńczonego roztworu chlorku żelaza II daje krwistoczerwone zabarwienie, przechodzące do warstwy eterowej.



Wykrywalność: 0,1  $\mu\text{g}$   $\text{CN}^-$ .

**6. Mikroreakcja Brunswika.** Na szkiełku przedmiotowym z wgłębieniem umieszcza się kroplę destylatu i nakrywa szkiełkiem nakrywkowym, którego dolną stronę zwilżono 1 kroplą 10% roztworu azotanu srebra, zabarwionego lekko błękitem metylenowym. Należy obserwować w mikroskopie. Po pewnym czasie roztwór azotanu srebra zmętnieje, a pod mikroskopem będą widoczne kryształy  $\text{AgCN}$  w postaci błękitnych igieł [12,13].

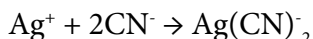
### Metody ilościowe

Metoda Liebiga–Denigesa [13,14] opiera się na reakcji kompleksowania (kompleksometria). Należy do analizy miareczkowej i wchodzi w zakres argentometrii. W argentometrii wykorzystywane są mianowane roztwory azotanu srebra, a ich podstawą jest powstawanie podczas miareczkowania trudno rozpuszczalnych związków srebra. Została opracowana w XIX wieku i jest do dziś szeroko wykorzystywana w chemii analitycznej.

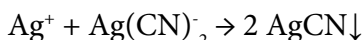
Niestety metoda ta ma pewien mankament, mianowicie nie nadaje się do oznaczania ilościowego związków cyjanogennych w wyciągach roślinnych bez wprowadzenia istotnej modyfikacji na etapie przygotowania próbki przeznaczonej do zmiareczkowania [16].

### Miareczkowanie roztworem $\text{AgNO}_3$

W metodzie Liebiga-Denigesa wykorzystuje się rozpuszczalność cyjanokowego kompleksu srebra  $\text{Ag}(\text{CN})_2^-$ . Podczas miareczkowania badanego roztworu cyjanoków mianowanym roztworem azotanu srebra zachodzi reakcja:



Po związaniu całej ilości jonów cyjanokowych w rozpuszczalny kompleks  $\text{Ag}(\text{CN})_2^-$  nadmiar jonów srebra powoduje zmętnienie roztworu spowodowane powstawaniem trudno rozpuszczalnego cyjanunku srebra:



W rzeczywistości zmętnienie powstaje przed punktem równoważnikowym reakcji, bowiem strącający się przejściowo osad  $\text{AgCN}$  wolno rozpuszcza się w nadmiarze jonów cyjanokowych, znajdujących się jeszcze w badanym roztworze.

Możliwe jest dokładne określenie PK (punktu końcowego) miareczkowania, jeżeli miareczkuje się cyjaniki w środowisku amoniakalnym i w obecności jonów jodkowych. Po odmiareczkowaniu cyjanoków zgodnie z równaniem reakcji, pojawia się zmętnienie spowodowane wytrąceniem się  $\text{Ag}$ , który jest trudniej rozpuszczalny niż  $\text{AgCN}$ . Jodek srebra rozpuszczalny w roztworze cyjanunku ( $\text{KCN}$ ) nie rozpuszcza się w amoniaku. Zgodnie z równaniem 1 równoważnik  $\text{CN}^-$  równa się podwojonej masie mola  $\text{CN}^-$ .

Przygotowanie 0,1 M roztworu  $\text{AgNO}_3$

Odważyć 16,9890 g azotanu srebra odpowiedniej czystości, wysuszonego w czasie 2 h w temperaturze  $150^\circ\text{C}$  i ostudzonego w eksykatorze. Rozpuścić odważkę w wodzie (nie zawierającej jonów chlorkowych) i dopełnić roztwór wodą w kolbie miarowej do 1 litra.

Sposób wykonania

Badany roztwór w kolbie stożkowej o poj. 500 ml, zawierający 0,15–0,20 g  $\text{CN}^-$ , rozcieńczyć wodą do ok. 150 ml, dodać 0,2 g jodku potasowego, 4 ml stęż. amoniaku i dobrze mieszając miareczkować 0,1 M roztworem  $\text{AgNO}_3$  do pojawienia się trwałego zmętnienia (obserwacja nad czarnym papierem).

Oznaczoną zawartość cyjanów (w gramach) oblicza się ze wzoru:

$$x = v c(\text{AgNO}_3) \cdot 0,05204$$

w którym  $v$  i  $c(\text{AgNO}_3)$  oznaczają objętość (ml) i stężenie (mol/l) roztworu  $\text{AgNO}_3$ , 0,05204 – ilość  $\text{CN}^-$  (g) odpowiadającą 1 ml 1 M roztworu  $\text{AgNO}_3$

Do przeliczenia wyniku miareczkowania na zawartość KCN stosuje się milirównoważnik 0,13023 g/mol.

Związki cyjanogenne oznaczano w świeżych gałązkach czeremchy zwyczajnej – *Prunus padus* L. (*Rosaceae*), świeżym ziele lniczy pospolitej *Linaria vulgaris* Mill. (*Scrophulariaceae*) i w świeżych gałązkach bzu czarnego *Sambucus nigra* L. (*Caprifoliaceae*), świeżym ziele orlika pospolitego *Aquilegia vulgaris* L. (*Ranunculaceae*).

Czeremcha zwyczajna pochodziła z doliny rzeki Lubatówka (Krosno-Suchochód), dziki bez czarny zebrano w dolinie rzeki Badoń (Krosno-Suchochód) natomiast lnicę pospolitą pozyskano z łąk w pobliżu linii kolejowej Krosno-Zagórz w dzielnicy Krosno Nowe Miasto. Orlik pochodził z uprawy prywatnej (Krosno) i był to gatunek/podgatunek typowy *Aquilegia vulgaris* L. subsp. *vulgaris*.

Materiał roślinny, w którym chciano oznaczyć związki cyjanogenne, ekstrahowano w aparacie Dragendorffa i częściowo wg metody Dragendorffa. Rozpuszczalnikiem była woda destylowana. Z tego samego surowca zielarskiego otrzymywano dwa rodzaje wyciągów:

- 1) Wyciąg płynny 1:5 bez destylacji;
- 2) Wyciąg poddawany destylacji z parą wodną (destylat) w aparacie Dragendorffa.



1. Wyciąg płynny 1:5 bez destylacji. Świeży lub suchy materiał poddawano szybkiej homogenizacji za pomocą homogenizatora przy 2000–3000 obr./min. Następnie 100 g materiału zalewano 500 ml wody destylowanej zimnej i doprowadzano do wrzenia pod chłodnicą zwrotną (chłodzoną wodą). Stan wrzenia utrzymywano przez 5 minut, po czym wyciąg filtrowano przez bibułę przez sączki w układzie próżniowym i od razu miareczkowano mianowanym roztworem azotanu srebra.

2. Destylat. Świeży lub suchy materiał poddawano szybkiej homogenizacji za pomocą homogenizatora przy 2000–3000 obr./min. Następnie 100 g materiału zalewano 500 ml wody destylowanej zimnej i poddawano destylacji. Uzyskany destylat miareczkowano mianowanym roztworem azotanu srebra.

Przy ocenie metod na wykrywanie cyjanowodoru w surowcach wykorzystano macerat ze świeżych roślin. Świeże surowce homogenizowano do konsystencji papki, następnie zalewano wodą destylowaną w proporcji 1:1, sączono i uzyskany macerat od razu poddawano badaniom.

Rośliny były zbierane w czasie kwitnienia.

#### **Metoda kolorymetryczna. Reakcja z kwasem pikrynowym.**

Dla ilościowych oznaczeń CN<sup>-</sup> można wykorzystać reakcję z kwasem pikrynowym, w wyniku której w alkalicznym środowisku powstaje kwas pikrynocyjaminowy o czerwonym zabarwieniu. Bibuły nasączone 5% roztworem kwasu pikrynowego, po wysuszeniu również zmieniają zabarwienie z żółtego na pomarańczowe, fioletowe lub czerwone w obecności kwasu pruskiego [15].

### **Wyniki**

<b>Metoda ilościowego oznaczenia</b>	Zawartość związków cyjanogennych [mg/g] <i>Prunus padus</i>	Zawartość związków cyjanogennych [mg/g] <i>Linaria vulgaris</i>	Zawartość związków cyjanogennych [mg/g] <i>Sambucus nigra</i>	Zawartość związków cyjanogennych [mg/g] <i>Aquilegia vulgaris</i>
Metoda Liebiga-Denigesa dla wyciągu	4,67–4,81	1,05–1,52	0,917–1,140	0,580–0,601
Metoda Liebiga-Denigesa dla destylatu	1,80–2,55	0,42–0,50	0,111–0,114	0,489–0,497
Metoda kolorymetryczna z kwasem pikrynowym destylatu	2,60–2,88	0,618–0,630	0,122–0,123	0,411–0,429

### **Metody wykrywania**

Wszystkie metody wykrywania cyjanowodoru wykorzystano do badań maceratu ze świeżych roślin.

Niestety, dla maceratów nie nadawała się reakcja z siarczanem żelaza i chlorkiem żelaza ze względu na obecność w maceracie związków fenolowych (reakcja typowa dla odczynnika Bartona do wykrywania fenoli). Z tego też powodu metoda ta nie nadaje się do kolorymetrycznego oznaczania związków cyjanogennych.

Reakcja z siarczkiem miedziowym nie była przydatna z powodu obecności w maceracie białek, aminokwasów i cukrów, przez co zmiana barwy mogła pochodzić z innych związków kompleksowych niż cyjanowodór.

Próba Schoenbeina nie była efektywna z powodu substancji balastowych w maceracie.

Reakcja z siarczkiem miedziowym okazała się bezwartościowa, nie następowało bowiem odbarwienie bibuły. Jedynie w przypadku destylatu z czeremchy następowało lekkie odbarwienie.

Także reakcja z wielosiarczkiem amonu nie dała pozytywnego wyniku z powodu przechodzenia do warstwy eterowej lotnych fenoli, również reagujących z solami żelaza.

Reakcja z azotynem potasu nie zaszła w prawidłowy sposób z powodu obecności cukrów redukujących w maceracie.

Reakcja z kwasem pikrynowym nie była wyraźna z powodu obecności organicznych związków redukujących w maceracie.

W przypadku destylatu zawierającego związki cyjanogenne wartościowe okazały się: próba Schoenbeina, reakcja z azotynem potasu, reakcja z kwasem pikrynowym oraz reakcja z siarczkiem miedzi. Do destylatu przechodzą wraz z kwasem pruskim również lotne związki fenolowe, niektóre aminy i terpeny.

### **Dyskusja**

Zarówno metody wykrywające związki cyjanogenne, jak i służące do ilościowego oznaczenia cyjanowodoru niestety nie są bez wad. Reakcjom polegającym na powstawaniu związków kompleksowych o określonym zabarwieniu bardzo przeszkadzają substancje balastowe, które zawsze występują w maceratach, ekstraktach, a nawet w destylatach. Najbardziej niepożądane w destylatach są aminy, fenole, terpeny, węglowodory cykliczne, lotne alkohole (np. salicylowy, cynamonowy), kwasy organiczne (np. octowy, walerianowy, propionowy, fenylooctowy), które są bardzo reaktywne i dają związki barwne

z podobnymi odczynnikami, jakie są stosowane do wykrywania HCN. Maceraty i ekstrakty zawierają sole mineralne, a oprócz tego całą masę substancji organicznych, również przeszkadzających w oznaczaniu związków cyjanogennych, np. cukry, alkohole cukrowe, białka, kwasy tłuszczowe.

Wykorzystując metodę Liebiga-Denigesa trzeba pamiętać o reagowaniu azotanu srebra z cukrami oraz chlorkami (metoda Mohra). Im więcej chlorków w próbie badanej, tym bardziej zawyżony i zafałszowany będzie wynik na zawartość związków cyjanogennych. Stąd ważna jest także czystość wody stosowanej do sporządzania odczynników, ekstrakcji, a także czystość odczynników chemicznych. Kwas pikrynowy zanieczyszczony i stary daje wyniki zawyżone o kilkaset procent. Źle przechowywany, rozłożony kwas pikrynowy w ogóle nie daje prawidłowych reakcji z cyjanowodorem lub przyczynia się do zaniżenia wyników. Zawartość związków cyjanogennych w roślinach jest bardzo zmienna i zależy od warunków glebowych, okresu biologicznego rośliny oraz czynników ekotoksykologicznych. Rośliny pod wpływem czynników stresowych zwiększają zawartość nitrylozydów w tkankach [17].

### Podsumowanie

Najbardziej przydatną metodą do ilościowego oznaczania związków cyjanogennych okazała się argentometria. Warunkiem uzyskania poprawnych wyników jest jednak uprzednia destylacja ekstraktów i maceratów z parą wodną i miareczkowanie czystego destylatu. Również najpewniejsze jest, gdy reakcje na wykrywanie będą zachodziły w destylacie, a nie w maceratach i ekstraktach, w których zawsze występują substancje balastowe, dające również barwne związki kompleksowe. Destylacja ogranicza ilość substancji balastowych i tym samym reakcje poboczne niepożądane. Sama świadomość o reakcji Bartona dyskwalifikuje metody barwne wykorzystujące związki żelaza i żelazocyjanek potasu, bowiem reagują one z lotnymi fenolami.

Do wykrywania związków cyjanogennych w maceratach wodnych i wodno-alkoholowych z surowców sprawdziła się metoda Brunswika (mikroskopowa), choć trzeba mieć na uwadze możliwość powstania artefaktów z powodu reakcji z chlorkami ( $\text{AgCl}\downarrow$ ).

Tabela z zestawieniem metod ilościowego oznaczenia dla destylatu i ekstraktów z poszczególnych gatunków wskazuje, że najbliższe rzeczywistości są wyniki uzyskane na destylatach.

## Literatura

- [1] Evans W.Ch., Pharmacognosy. Saunders, Elsevier Limited 2002, s. 327–329.
- [2] Kączkowski J., Biochemia roślin, t. 2, Metabolizm wtórny, PWN Warszawa 1993, s. 203–207.
- [3] Miller L.P., Phytochemistry, t. I, Van Nostrand Reinhold Company New York, Cincinnati, Toronto, London, Melbourne 1973, s. 298–311.
- [4] Czapek F., Biochemie der Pflanzen, t. III, Verlag von Gustav Fischer, Jena 1925, s. 205–220.
- [5] Büchner S., Fitochemia roślin leczniczych, PZWL, Warszawa 1955, s. 482–488.
- [6] Rimpler H., Biogene Arzneistoffe, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart 1999, s. 185.
- [7] Wiorogórski W., Słownik środków lekarskich, Unitas, Warszawa 1914, s. 120–121.
- [8] Supniewski J., Podręcznik farmakologii. Nakładem Warszawskiej Agencji Wydawniczej Delta Sp. z o.o., Warszawa 1935, s. 306.
- [9] Różański H.: Surowce roślinne stosowane w fitoterapii schorzeń układu oddechowego, Z nami zdrowiej. Magazyn dla Farmaceutów, 2008, 8 s. 15–19.
- [10] Rochleder F., Phytochemie, Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig 1854, s. 20–23.
- [11] Gibbs R. D., Chemotaxonomy of Flowering Plants, t. 1, McGill-Queen's University Press, Montreal and London 1974, s. 629–635.
- [12] Dutkiewicz T., Chemia toksykologiczna, PZWL Warszawa 1968, s. 406–408.
- [13] Szymczyk F., Analiza toksykologiczna, PZWL Warszawa 1959, s. 34–41.
- [14] Minczewski J., Marczenko Z., Chemia analityczna, część 2., PWN, Warszawa 1997, s. 272–273.
- [15] Defour D, O'Brien G. M., Best R., Cassava flour and starch: progress in research and development, CIRAD, CIAD, Columbia 2002, s. 157.
- [16] Różański H., Zaburzenia składu chemicznego roślin leczniczych, pastwiskowych i warzywnych pochodzących z gleb i wód zanieczyszczonych ropą naftową oraz produktami ropopochodnymi, w: Techniczne i społeczne aspekty gospodarki odpadami. III Międzynarodowe Forum Gospodarki Odpadami, Poznań 1999, s. 364–374.
- [17] Różański H., Włodkovic D., Skutki oddziaływania zanieczyszczeń ropopochodnych na środowisko przyrodnicze, Wszechświat 2002, 103, 07–09, s. 223–225.
- [18] Różański H., Materiały do ćwiczeń z biochemii. Skrypt, PWSZ Krosno 2003.