亚麻籽中生氰糖苷的 LC-MSMS 定量与氢氰酸换算研究

吴海燕[1] 曾珂[1] 胡鹏飞[1] 李锦晶[1] 李凡*[1] 张沿军[2]
1 康宝莱蕾硕（湖南）天然产物有限公司，湖南 长沙 410100；
2 宝莱全球测试中心 HP1 实验室，加利福尼亚州 托伦斯 90502

摘要：【目的】建立一种 LC-MS/MS 测定亚麻籽中的 8 种生氰糖苷，并通过转换因子换算为氢氰酸含量的分析方法。【方法】采用液相色谱 - 串联质谱（LC-MS/MS）检测亚麻籽中 8 种生氰糖苷的含量。【结果】因亚麻籽中氢氰酸主要以生氰糖苷形式存在，游离态极少，本方法通过直接测定 8 种生氰糖苷，再折算为总氢氰酸含量，结果可靠、重复性良好。【结论】该方法具有快速、准确、安全稳定、重现性好等特点，适用于亚麻籽中生氰糖苷的定量分析及氢氰酸含量质量控制。

关键词：LC-MS/MS；亚麻籽；生氰糖苷；氢氰酸；含量测定

Study on LC-MSMs Quantification and Hydrocyanic Acid Conversion of Cyanogenic Glycosides in Flax Seeds

Wu Haiyan[1], Zeng Ke[1], Hu Pengfei[1], Li Jinjing[1], Li Fan*[1], Zhang Yanjun[2]

1Herbalife Natsource (Hunan) Natural Products Co. Ltd., Changsha, Hunan, 410100, China

2Herbalife Nutrition Global Quality HP1 laboratory, Torrance, CA, 90502, USA

Abstract: Objective: A LC-MS/MS method was established to determine 8 kinds of cyanogenic glycosides in flaxseed, which were converted into hydrocyanic acid by conversion factors. Method: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was used to detect the contents of 8 cyanogenic glycosides in flaxseed. Result: Because hydrocyanic acid in flax seeds mainly exists in the form of cyanogenic glycosides, and there are few free forms, this method directly determines 8 cyanogenic glycosides and converts them into total hydrocyanic acid content, and the results are reliable and reproducible. Conclusion: The method is rapid, accurate, safe, stable and reproducible, and is suitable for quantitative analysis of cyanogenic glycosides in flax seeds and quality control of hydrocyanic acid content.

Keywords: LC-MS/MS; Flaxseed; Cyanogenic glycoside; Hydrocyanic acid; Content determination

DOI: 10.62639/sspfmi06.20260201

亚麻籽因其具有预防肥胖和降血糖、降血脂的功效而广泛应用于各类食品当中[1-2]。据报道亚麻籽中含有生氰糖苷[3]，它们经过水解后会产生有毒的氢氰酸，存在潜在的食品安全风险。目前，欧盟等国际标准对亚麻籽中氢氰酸（包括游离态和结合态）的含量设立了明确限量，因此建立一个准确可靠的分析方法对食品安全控制具有重要意义[4]。现在质量控制通常氢离子选择电极法、比色法及酸水解 - 滴定法等方法测定氢氰酸，但存在灵敏度有限、选择性不足及操作安全性等局限性。据文献查询可知，亚麻籽中的氢氰酸主要来源于生氰糖苷[5]，几乎不含游离的氢氰酸，所以可以通过测定生氰糖苷的量来进行质量控制。本研究建立了一个使用 LC-MS/MS 同时检测亚麻籽中 8 种生氰糖苷的分析方法[6]，再根据每种生氰糖苷转换因子换算成氢氰酸的含量。该方法在开发过程中通过优化前处理条件，在提取溶剂中添加甲酸改善了目标化合物的色谱峰；采用优化后的色谱条件，成功实现了紫杉氰苷与蜀黍苷同分异构体的基线分离，并通过方法学验证该方法能准确定量亚麻籽中的生氰糖苷。

一、材料与方法

（一）标准品：8 种生氰糖苷混标，天津阿尔塔科技有限公司

（二）实验仪器：Agilent Technologies LCMSMS 1290+6460A

（三）色谱条件：色谱柱：Phenomenex catalog# AF0-8497；流动相 A：20mM 甲酸铵 + 0.1% 甲酸水溶液；流动相 B：甲醇；柱温：40℃；进样体积：2 μL，采用梯度洗脱方式分析测试。

（四）分析方法

1. 80% 甲醇水溶液为提取溶剂；0.1% 的甲酸至 10% 甲醇溶液为复溶溶剂。

2. 标准工作溶液的制备：分别配置浓度为 20ng/mL，50ng/mL，100ng/mL，150ng/mL，以及 200ng/mL 的标准溶液组；

3. 样品制备：称取约 1g 样品至 35ml 离心管中，加入 20mL 提取溶剂，涡旋约 15 秒后超声处理约 15 分钟，7000 转 / 分钟离心 5 分钟，移取上清液至 50ml 容量瓶中。重复上述提取步骤。

（稿件编号：FMI-26-1-324001）

作者简介：吴海燕（1998-），女，本科，研究方向：中草药化学分析。
通讯作者：李凡（1984-），男，本科，研究方向：中草药化学分析。

合并上清液后用提取溶剂定容。移取 10ml 溶液到 15ml 离心管中，于 50±5℃水浴锅下用氮气吹干，再加 10ml 复溶试剂并超声后，取 1ml 样品溶液到 100mL 的容量瓶中，用复溶试剂定容。过 0.2μm 膜后上机检测。（样品可依据生氰糖氰苷含量进行适当稀释）。

二、实验分析

（一）方法开发：我们通过两方面的优化有效解决了色谱分离的难点。首先，通过在提取溶剂中添加甲酸，显著改善了亚麻苦苷的峰形；其次，针对紫杉氰苷与蜀黍苷这对同分异构体分离不开的问题，通过筛选合适的色谱柱并优化流动相条件，成功实现了基线分离。经过上述两方面的参数优化提升了分析方法的专属性与可靠性。（如下图 1 和图 2 所示）

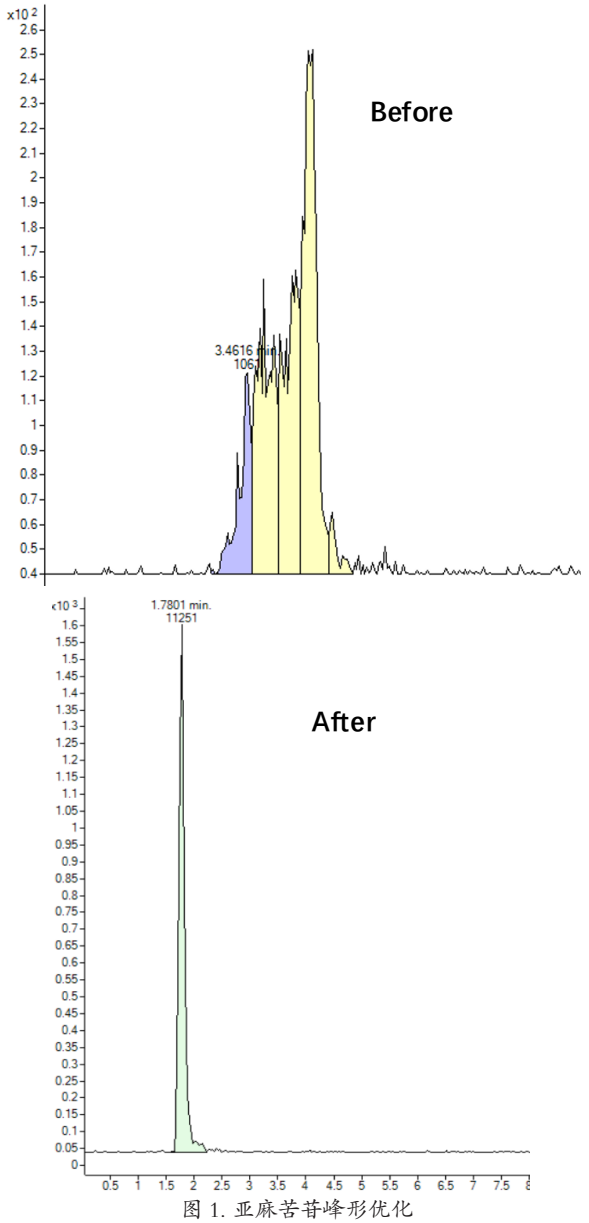

图 1. 亚麻苦苷峰形优化

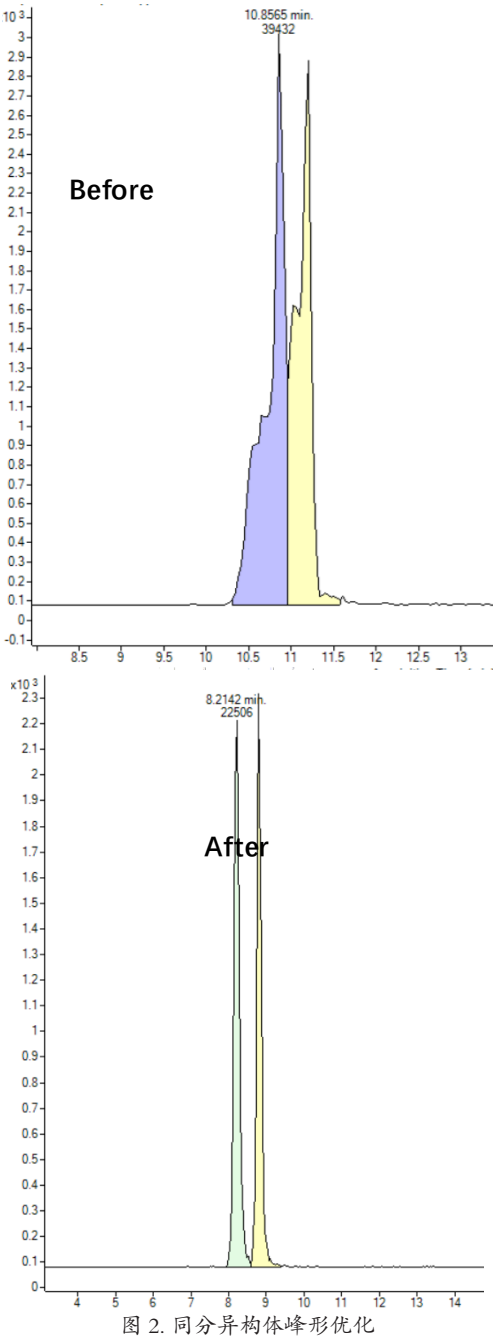

图 2. 同分异构体峰形优化

（二）特异性试验

1. 各生氰糖苷组分在未加标样品和加标样品中的保留时间与在混合标准溶液中的保留时间一致。

2. 加标样品溶液中各组分特异性离子比率为 91−104%。

（三）线性关系

制备 8 种氰苷 20、50、100、150、200 ng/ml 的 5 种工作标准液，分别进行 3 次重复注射。将各溶液得到的 8 种氰苷平均峰面积为中坐标与相应的理论浓度为横坐标，进行线性回归分析。

结果：8 种氰苷的线性曲线相关系数均大于 0.99。（图 3 所示为亚麻氰苷）

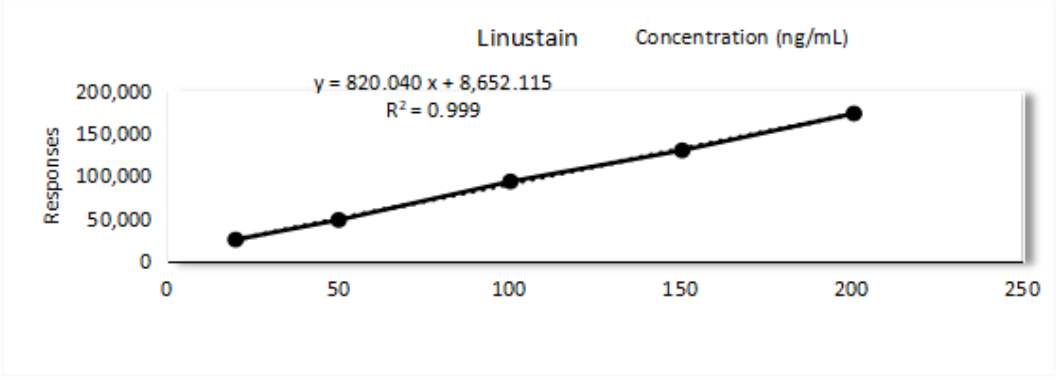

图 3. 线性 / 范围（如亚麻氰苷示例）

（四）LOD 检出限

制备系列稀释标准品，用仪器软件计算信噪比。结果：测得 LOD 浓度为 6 ng/mL，信噪比均为 NLT 3:1。

（五）LOQ 定量限

制备估算 LOQ 水平的标准溶液平行分析 6 次，并通过仪器软件计算信噪比。结果：测定的定量限浓度为 20 ng/mL，信噪比均为 NLT 10:1。估计各组 LOQ 的 RSD 未超过 7%。

（六）加标回收率测试

配置加标浓度为 50、100 和 150 ng/mL 的样品各 3 份。计算各生氰糖苷在加标样品中的测得量与其理论加入量，算出回收率。结果：在加标样品中，亚麻苦苷、百脉根苷、野黑樱苷、蜀黍苷、紫杉氰苷、亚麻氰苷、新亚麻氰苷及苦杏仁苷共八种生氰糖苷在所有加标浓度水平下的回收率结果均在 80% - 115% 范围内。（表 1）

表 1. 加标回收率测定结果（亚麻苦苷示例）

Flaxseed raw materials T2400107 (Spiked sample)	ID	Found Amount（mg）	Expected Amount (mg)	Recoveries%
Linamarin	50%-1	26.7249	25.0250	107%
	50%-2	28.5935		114%
	50%-3	28.2373		113%
	100%-1	56.2840	50.0500	112%
	100%-2	55.6156		111%
	100%-3	57.5566		115%
	150%-1	85.6978	75.0750	114%
	150%-2	85.1944		113%
	150%-3	84.9987		113%

（七）精密度测试结果

配制 6 份浓度为 100 ng/mL 的加标样品并进行平行测定，计算其 RSD。结果：在加标样品中，8 种生氰糖苷含量 6 次测定结果的 RSD 均不大于 6%。（表 2）

表 2. 精密度测试结果（如亚麻苦苷示例）

Samples		Linamarin	%RSD
Flaxseed raw materials, Lot # T2400107 (Spiked sample mg/kg)	1	56.22	4%
	2	55.63	
	3	57.59	
	4	61.18	
	5	57.07	
	6	59.86	

（八）耐受性

由另一名分析员在不同日期对同一样品进行测定。结果：亚麻籽 T2400107 加标样品中 8 种生氰糖苷含量的八次测定结果（6 次精密度 + 2 次耐受性）的 RSD 均未超过于 11%。

三、结论

本研究成功建立并系统验证了一种用于定量分析亚麻籽中多种生氰糖苷的 LC-MS/MS 方法。该方法在专属性、灵敏度（LOD/LOQ）、线性范围、准确度、精密度及耐用性等核心分析学指标上均表现优异，完全满足定量分析的要求，适用于亚麻籽及相关产品中生氰糖苷含量的准确、可靠测定，还可进一步通过理论换算系数，将各生氰糖苷含量折算为总氢氰酸当量。经多批次样品验证，最终所得总氢氰酸含量结果准确可靠、重复性良好，为亚麻籽及相关产品的质量控制和安全性评价提供了可靠的分析依据。

参考文献：

[1] 陈莎莎，苏晨玉，黎坚，王洪伦；亚麻籽活性成分及预防肥胖功能研究进展；1001-6880（2021）Suppl-0137-07；DOI：10.16333/j.1001-6880.2021.S.016.

[2] 赵利，党占海，李毅，张建平，谢小龙，王溪森，胡延萍；亚麻籽的保健功能和开发利用；《中国油脂》2006,31(3):71-74.

[3] 邹仙果，关晓倩，郑淼，曹宇钦，邓泽元，杨开，能静；亚麻籽主要功能成分及其生物活性研究进展；《食品与发酵工业》2024 年第 3 期.

[4] 周晓东，宋振超，薛燕；氢氰酸的检测技术研究；山西化工期刊 2018 年第 5 期.

[5] 孙兰萍，许晖；亚麻籽生氰糖苷的研究进展；《中国油脂》2007 年第 32 卷第 10 期.

[6] 陆柏益、张振文、李开绵、钟永恒;《农产品中生氰糖苷测定-液相色谱 串联质谱法》；编号 20213494-T-424.