替代基质顶空气相色谱法测定健儿清解液中游离氢氰酸的含量

张元杰，周兰，李哲媛，郝文梅(云南省食品药品监督检验研究院，昆明 650106)

摘要：目的 建立顶空进样气相色谱法测定健儿清解液中游离氢氰酸的含量。**方法** 采用 Agilent PLOT-Q 毛细管柱(30 m×0.32 mm，40 μm)，进样口温度 200 ℃，分流比为 5∶1，柱温箱程序升温，FID 检测器温度为 300 ℃；使用 HPLC 评估顶空加热过程中样品内氢氰酸前体化合物杏仁腈的稳定性，优化顶空平衡温度为 50 ℃，平衡时间 30 min；为降低基质效应的影响，以 0.10 g·mL^{-1} 的氯化钠溶液为替代基质，配制替代基质标准曲线。**结果** 氢氰酸在 0.519~20.775 μg·mL^{-1} 内与峰面积线性关系良好(r=1.000 0)；平均加样回收率为 96.7%，RSD 为 2.6%(n=9)；替代基质标准曲线法与标准加入法的测定结果相对偏差<7%；5 家企业生产的 10 批次样品中游离氢氰酸的含量为 0.653~16.540 μg·mL^{-1}。**结论** 该方法简单、准确，可以用于健儿清解液的质量控制及安全性评价。

关键词：健儿清解液；顶空气相色谱；游离氢氰酸；替代基质

中图分类号：R284.1　　**文献标志码：**B　　**文章编号：**1007-7693(2023)11-1520-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20222986

引用本文：张元杰，周兰，李哲媛，等. 替代基质顶空气相色谱法测定健儿清解液中游离氢氰酸的含量[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(11): 1520-1525.

Quantitation of Free Hydrogen Cyanide in Jian’er Qingjie Mixture by Headspace Gas Chromatography Using a Surrogate Matrix Approach

ZHANG Yuanjie, ZHOU Lan, LI Zheyuan, HAO Wenmei(*Yunnan Institute for Food and Drug Control, Kunming 650106, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for quantitation of free hydrogen cyanide in Jian’er Qingjie mixture by headspace gas chromatography. **METHODS** The assay was performed on an Agilent PLOT-Q capillary column(30 m×0.32 mm, 40 μm) combined with an oven temperature program. The GC injection port was maintained at 200 ℃ and the split ratio was 5∶1. The temperature for FID detector was set at 300 ℃. Samples were incubated at 50 ℃ for 30 min before headspace sampling and injection according to the stability evaluation of mandelonitrile which the unstable coexisting precursor of hydrogen cyanide by HPLC after incubation under different temperature conditions. The standard curves were prepared using 0.10 g·mL^{-1} sodium chloride solution as surrogate matrix to overcome matrix effects. **RESULTS** The linear range of hydrogen cyanide was 0.519–20.775 μg·mL^{-1}(r=1.000 0). The average recovery was 96.7% with RSD of 2.6%(n=9). The relative deviation of the measurement results of the alternative matrix standard curve method and the standard addition method was <7%. The content range of free hydrogen cyanide in the 10 batches of Jian’er Qingjie mixture produced by 5 manufactures was 0.653–16.540 μg·mL^{-1}. **CONCLUSION** The established method is simple, accurate and reproducible. It can be useful for the quality control and safety evaluation of Jian’er Qingjie mixture.

KEYWORDS: Jian’er Qingjie mixture; headspace gas chromatography; free hydrogen cyanide; surrogate matrix

健儿清解液收载于《卫生部药品标准》中药成方制剂第十册，是由苦杏仁、金银花、菊花、连翘、山楂及陈皮制成的儿科用药[1]。处方中的苦杏仁为制备芳香水入药，故仅苦杏仁苷的低沸点酶解产物杏仁腈及其进一步降解产生的游离氢氰酸等能够随水蒸气蒸馏工艺最终进入健儿清解液[2-3]。由于游离氢氰酸有毒性，且能够通过呼吸道、消化道黏膜迅速吸收[4]，加之杏仁腈稳定性差，在制剂及储存过程中也易降解生成游离氢氰酸，因此游离氢氰酸的检测对于健儿清解液等含杏仁水制剂的安全性评价及稳定性研究有重要意义。

现阶段已有顶空气相色谱法测定中成药中游离态氰化物的报道[5]。但对于杏仁腈与游离氢氰酸共存的样品体系，受限于缺乏专属性强的方法评估检测过程中杏仁腈的稳定性，难以实现游离氢氰酸的针对性检测，目前仅基质简单的杏仁水原料药及杏仁腈溶液的执行标准中收载了游离氢氰酸的检查法[6-7]。该方法为化学反应检查，专属性、

基金项目：2020 年度药品国家抽检(124)

作者简介：张元杰，男，硕士，副主任药师　　E-mail: yx8996@163.com

灵敏度不足且无法定量[8]。因此，本研究以本实验室自行建立的 HPLC 对模拟顶空加热平衡过程中杏仁腈的稳定性进行了评估，在评估结果的基础上，引入了生物标志物分析中的替代基质法[9-10]以降低基质效应的影响，最终建立了替代基质顶空气相色谱法测定健儿清解液中游离氢氰酸的含量。

1 仪器与试剂

Agilent 7890B 气相色谱仪(配备 Agilent 7697A 顶空自动进样器，美国 Agilent 公司)，色谱柱为 PLOT-Q 毛细管柱(30 m×0.32 mm，40 μm)；LC-2040 高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司)，色谱柱为 TC-C_{18} 键合硅胶柱(250 mm×4.6 mm，5 μm)；BP211D 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司)；PURELAB ultra 超纯水系统(英国 ELGA 公司)；Delta 320 pH 计(瑞士 Mettler Toledo 公司)。

乙腈(色谱纯，德国默克公司)；磷酸(分析纯)、氢氧化钠(分析纯)均购自国药集团化学试剂有限公司；水为超纯水；杏仁腈对照品(上海阿拉丁生化科技股份有限公司，批号：B2019085；标示纯度 97.067%)；水中氰成分分析标准物质[中国计量科学研究院，批号：GBW(E)080115-20045；标示量 50.0 μg·mL^{-1}(以氰酸根计)]；苦杏仁饮片(安徽汇中州中药饮片有限公司，批号：20030601)；方法学考察及含量测定等所用的健儿清解液均为 2020 年度药品国家抽检样品。

2 杏仁腈的热稳定性评估与替代基质标准曲线法的建立

2.1 色谱条件

2.1.1 高效液相色谱法(杏仁腈) Agilent TC-C_{18} 色谱柱(250 mm×4.6 mm，5 μm)；流动相：乙腈-0.1%磷酸水溶液(23∶77)，等度洗脱；流速：1.0 mL·min^{-1}；柱温：30 ℃，检测波长：207 nm；进样体积：10 μL。

2.1.2 顶空气相色谱法(游离氢氰酸) Agilent PLOT-Q 键合聚苯乙烯-二乙烯基苯毛细管柱(30 m×0.32 mm，40 μm)，顶空平衡温度 50 ℃，平衡时间 30 min，定量环温度 75 ℃，传输线温度为 100 ℃；进样口温度为 200 ℃，分流比为 5∶1；柱温箱程序升温(初始温度 40 ℃，保持 1 min；再以 24 ℃·min^{-1}，升温至 270 ℃，保持 7 min)；FID 检测器温度为 300 ℃。

2.2 基体酸化方法的优化

“水中氰成分分析标准物质”的基体为 0.1 mol·L^{-1} 的氢氧化钠溶液，需对基体进行酸化，使氰酸根转化为挥发性的氢氰酸待测。取水中氰成分分析标准物质适量，用 0.1 mol·L^{-1} 氢氧化钠稀释，制成含氰酸根为 20 μg·mL^{-1} 的对照品储备溶液，分取 10 mL，分别加入 5%，6%，7%，8%，9%，10%，11%及 12%的磷酸溶液 1 mL，密封，摇匀，测定 pH 为 2.1~6.4，分取 2 mL，置 10 mL 顶空瓶中，密封，在相同条件下顶空进样检测，峰面积 RSD 为 1.1%(n=8)，酸化后的 pH 对检测结果无影响。考虑到操作便利性及顶空瓶内气液体积比的一致，后续各对照品及供试品溶液均采用 10%磷酸溶液酸化，加入量为基体体积的 10%。

2.3 基于杏仁腈热稳定性选择顶空平衡温度

取健儿清解液样品(企业 A 生产，批号：08220006)，按“2.1.1”项下方法直接进样测定，计算杏仁腈含量。再分置 40，50，60，70 及 80 ℃水浴中密封恒温处理 1h 后，按“2.1.1”项下方法分别进样测定，结果与未恒温处理者相比，杏仁腈的含量依次降低 0.9%，1.9%，3.2%，11.41%，24.5%，同时能够检测到苯甲醛峰面积的增加，提示在模拟顶空加热过程中，新的游离氢氰酸由杏仁腈降解产生。

另取同一批号的健儿清解液样品，按“2.2”项下方法制备酸化样品溶液，同前述方法处理后，按“2.1.1”项下方法分别进样测定，结果与未恒温处理者相比，杏仁腈的含量依次降低−0.1%，0.3%，0.2%，0.8%，1.6%，RSD 为 1.0%(n=5)。该基体酸化方法能使健儿清解液中的杏仁腈在 40~80 ℃顶空加热平衡 1 h 内保持相对稳定，避免干扰游离氢氰酸的检测。因此在满足灵敏度要求的前提下，选择顶空平衡温度为 50 ℃。

2.4 基质效应评估

健儿清解液中含有大量的挥发性成分且杏仁腈稳定性较差，与真实样品基质组成接近的多批次空白样品基质较难获取。因此本实验以不同厂家生产的 5 批健儿清解液为样品基质，分别在 25%，50%，75% 3 个相对样品基质含量水平，采用标准加入法，测定游离氢氰酸的峰面积并拟合得到了 15 条样品基质标准加入曲线。参考文献报道[11]，以样品基质标准加入曲线的斜率(A)与同法制备的水基质标准加入曲线斜率(B)的比值评估基质效应(matrix effect，ME/%)，即 ME/%=A/B×100%。若 ME%=100%，提示无基质效应；ME%>100%，提示存在基质增强效应，反之则提示存在

基质抑制效应。操作过程：取水及相当于含氢氰酸为 4.155，20.775，41.550 μg·mL^{-1} 的对照品溶液各 0.5 mL，分置预先加入 10%磷酸溶液 0.2 mL 的 10 mL 顶空瓶中，作为系列对照品溶液。另取健儿清解液 0.5，1.0 或 1.5 mL 作为样品基质，加入上述系列对照品溶液中，酌情加水使加入的样品基质总体积为 1.5 mL，迅速密封，摇匀，分别制成相对样品基质含量为 25%，50%或 75%的系列标准加入溶液。另取含氢氰酸为 2.077，10.387，20.775，41.550 μg·mL^{-1} 的对照品溶液各 1.0 mL，分置预先加入 10%磷酸溶液 0.2 mL 的 10 mL 顶空瓶中，加水 1.0 mL，迅速密封，摇匀，制成水基质标准加入溶液。取上述各标准加入溶液，按“2.1.2”项下方法进样，以氢氰酸加入量(μg)为横坐标，氢氰酸峰面积为纵坐标，进行线性回归，拟合标准加入曲线并计算 ME，结果见表 1。

表 1 基质效应评估结果

Tab. 1 Results of matrix effect evaluation

厂家	批号	相对样品基质含量/%	斜率	截距	相关系数	ME/%
/	/	水	2.064 4	–0.074 0	1.000 0	100.0
A	05519106	25	2.121 1	11.864 0	0.999 7	102.7
		50	2.201 9	25.777 0	0.999 9	106.7
		75	2.264 8	40.680 0	0.999 8	109.7
B	200304	25	2.118 8	6.742 6	0.999 9	102.6
		50	2.191 8	13.786 1	0.999 9	106.2
		75	2.277 2	22.126 4	0.999 9	110.3
C	191254	25	2.105 6	4.852 3	0.999 9	102.0
		50	2.229 8	10.294 9	0.999 9	108.0
		75	2.351 0	15.638 4	0.999 9	113.9
D	200301	25	2.104 7	0.455 0	1.000 0	102.0
		50	2.191 0	1.267 6	0.999 9	106.1
		75	2.263 2	2.142 5	0.999 9	109.6
E	B190630	25	2.156 1	0.707 9	1.000 0	104.4
		50	2.260 6	1.254 5	0.999 9	109.5
		75	2.337 9	1.564 4	1.000 0	113.2

结果在 25%，50%，75%相对样品基质含量水平，ME 平均值(n=5)分别为 102.8%，107.3%及 111.4%，均存在基质增强效应。进一步分析，上述不同来源的健儿清解液，其标准加入曲线的斜率与样品基质的相对含量均呈现较好的线性关系(r>0.995)，据此可预测相对样品基质含量为 100%时，标准加入曲线的斜率约为 2.339 6~2.474 2，对应的 ME 为 113.3%~120.0%(RSD 为 2.6%)，提示在顶空进样测定健儿清解液中游离氢氰酸含量的过程中，存在不可忽视的基质增强效应，影响纯溶剂基质的外标标准曲线法定量结果的准确性。同时，各相对样品基质含量水平 ME/%值的 RSD 均<3.0%(n=5)，提示不同来源健儿清解液间的“相对基质效应”较小[12]。

2.5 替代基质标准曲线法的建立

由于存在基质增强效应，采用纯溶剂基质的外标标准曲线法难以获得准确的定量结果，而常用的基质稀释、标准加入法、基质匹配标准曲线法等方式存在对仪器灵敏度要求高、操作繁琐、空白基质难以制备等不足。因此本实验参考生物标志物分析中的替代基质法，以顶空进样过程中常用氯化钠等中性盐增加待测成分在顶空部分的浓度为切入点，考察了以氯化钠溶液作为替代基质，建立替代基质标准曲线法，取健儿清解液不经稀释，直接测定游离氢氰酸含量的可行性。操作过程：取相当于含氢氰酸为 1.039，5.194，10.387，20.775 μg·mL^{-1} 的对照品溶液各 2 mL，分置预先加入氯化钠 0.10，0.20 或 0.30 g 的 10 mL 顶空瓶中，各加入 10%磷酸溶液 0.2 mL，迅速密封，摇匀，分别制成相当于以 0.05，0.10，0.15 g·mL^{-1} 氯化钠溶液为替代基质的系列对照品溶液，按“2.1.2”项下方法进样，记录峰面积。以氢氰酸加入量(μg)为横坐标，峰面积为纵坐标，进行线性回归，拟合标准加入曲线。其斜率依次为 2.200 2，2.332 6，2.477 9，与氯化钠溶液质量浓度呈线性正相关(r=0.999 6)，提示在一定范围内，可以通过改变氯化钠溶液的质量浓度实现替代基质标准加入曲线斜率的线性调整。

使用 SPSS 26.0 软件，进行单样本 t 检验，分别比较“2.4”项下相对样品基质含量为 50%的标准加入曲线斜率均值(n=5)与上述各替代基质标准加入曲线斜率的差异，结果与 0.05 g·mL^{-1} 氯化钠溶液标准加入曲线比较的 P 值为 0.330，无显著性差异。进一步使用 SPSS 26.0 软件，进行单样本 t 检验，比较“2.4”项下预测的相对样品基质含量为 100%的标准加入曲线斜率均值(n=5)与 0.10 g·mL^{-1} 氯化钠溶液替代基质标准加入曲线斜率的差异，结果 P 值为 0.106，无显著性差异。因此推测以 0.10 g·mL^{-1} 氯化钠溶液作为替代基质，能够匹配相对样品基质含量为 100%时(即健儿清解液原液)所产生的基质效应，加之不同来源健儿清解液的“相对基质效应”较小，理论上能够使用替代基质标准曲线法测定不同来源健儿清解液中游离氢氰酸的含量。

2.6 替代基质标准曲线法与标准加入法测定结果的比较

取“2.4”及“2.5”项下的水基质、0.10 g·mL^{-1}氯化钠溶液替代基质标准加入溶液的峰面积检测结果，以氢氰酸质量浓度(μg·mL^{-1})为横坐标，峰面积为纵坐标，进行线性回归，分别拟合得到水基质标准曲线及 0.10 g·mL^{-1}氯化钠溶液替代基质标准曲线。另取“2.4”项下的 5 批健儿清解液样品各 2 mL，分置预先加入 10%磷酸溶液 0.2 mL 的 10 mL 顶空瓶中，迅速密封，摇匀，按“2.1.2”项下方法进样测定，将峰面积分别代入上述回归方程，计算游离氢氰酸的含量并与“2.4”项下 50%相对样品基质含量的标准加入法测定结果比较。结果采用替代基质标准曲线法测得的结果与标准加入法的结果相比，相对平均偏差为 0.5%~6.2%，绝对偏差为–0.035~0.192 μg·mL^{-1}；采用水基质标准曲线法测得的结果与标准加入法的结果相比，相对平均偏差为 5.0%~14.3%，绝对偏差为–0.028~1.632 μg·mL^{-1}，见表 2。说明替代基质标准曲线法准确度良好，能够有效还原标准加入法的测定结果，以 0.10 g·mL^{-1}氯化钠溶液作为替代基质的替代基质标准曲线法可行。

表 2 标准曲线法与标准加入法的游离氢氰酸含量测定结果

Tab. 2 Contents of free hydrogen cyanide obtained from standard calibration method and standard addition method

厂家	批号	标准加入法含量/μg·mL^{-1}	替代基质标准曲线法		水基质标准曲线法	
			含量/μg·mL^{-1}	RAD/%	含量/μg·mL^{-1}	RAD/%
A	05519106	11.707	11.862	1.3	13.339	13.0
B	200304	6.290	6.482	3.0	7.260	14.3
C	191254	4.617	4.638	0.5	5.177	11.4
D	200301	0.579	0.544	6.2	0.551	5.0
E	B190630	0.555	0.587	5.6	0.599	7.6

注：RAD–相对平均偏差。

Note: RAD–relative average deviation.

3 方法学考察与含量测定

3.1 溶液的制备

3.1.1 对照品溶液 取水中氰成分分析标准物质适量，加 0.1 mol·L^{-1}氢氧化钠溶液逐级稀释，制成每 1 mL 分别含氢氰酸 0.519，1.039，2.077，5.194，10.387，15.581，20.775 μg 的系列浓度对照品溶液。分取 2 mL，置预先加入 0.20 g 氯化钠的 10 mL 顶空瓶中，分别加入 10%磷酸溶液 0.2 mL，迅速密封，摇匀，即得。

3.1.2 供试品溶液 取健儿清解液样品 2 mL，置预先加入 10%磷酸溶液 0.2 mL 的 10 mL 顶空瓶中，迅速密封，摇匀，即得。

3.1.3 缺苦杏仁阴性样品溶液 取按健儿清解液处方工艺制备的缺苦杏仁阴性样品 2 mL，置预先加入 10%磷酸溶液 0.2 mL 的 10 mL 顶空瓶中，密封，摇匀，即得。

3.1.4 苦杏仁芳香水 取苦杏仁饮片 50 g，捣碎，水蒸气蒸馏提取并收集蒸馏液 50 mL，精密量取 5 mL，置 100 mL 量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀，取 2 mL，置预先加入 10%磷酸溶液 0.2 mL 的 10 mL 顶空瓶中，迅速密封，摇匀，即得。

3.2 方法学考察

3.2.1 专属性试验 取“3.1”项下对照品溶液、缺苦杏仁阴性样品溶液、供试品溶液及苦杏仁芳香水，按“2.1.2”项下条件进样测定，记录色谱图，见图 1。结果显示，供试品溶液、苦杏仁芳香水色谱图中均呈现与氢氰酸对照品保留时间相同的色谱峰，而缺苦杏仁阴性样品溶液色谱图中在与氢氰酸对照品色谱峰保留时间相同处，无色谱干扰，方法专属性良好。

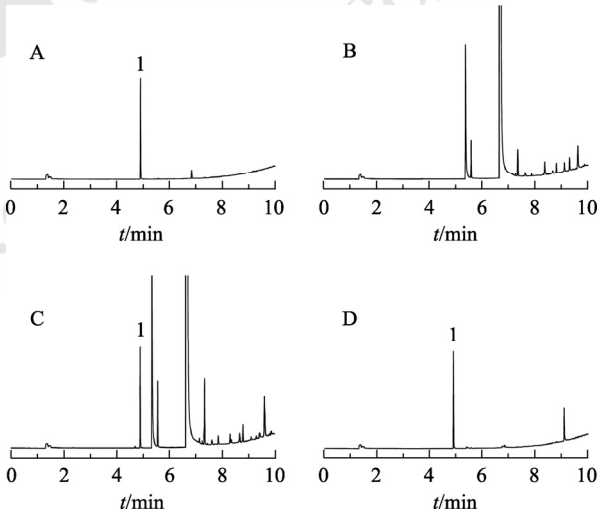

图 1 气相色谱图

A–对照品溶液；B–缺苦杏仁阴性样品溶液；C–供试品溶液；D–苦杏仁芳香水；1–氢氰酸。

Fig. 1 GC chromatograms

A–standard solution; B–negative sample solution without Armeniacae Semen Amarum; C–sample solution; D–aromatic water of Armeniacae Semen Amarum; 1–hydrogen cyanide.

3.2.2 线性关系考察 取“3.1.1”项下的对照品溶液，按“2.1.2”项下条件进样检测，以溶液质量浓度(X，μg·mL^{-1})以为横坐标，峰面积(Y，pA*s)为纵坐标，进行线性回归。结果回归方程为 Y=4.966 X–

0.140，r=1.000 0。氢氰酸质量浓度在 0.519~20.775 μg·mL^{-1} 内与峰面积线性关系良好。

3.2.3 检测限与定量限 取未检出氢氰酸的健儿清解液样品(企业 C 生产，批号：191201)2 mL，置预先加入 10%磷酸溶液 0.18 mL 的 10 mL 顶空瓶中，加含氢氰酸 5.194 μg·mL^{-1} 的对照品溶液 0.02 mL，迅速密封，摇匀，按“2.1.2”项下条件进样检测，结果信噪比约为 3∶1，检出限为 0.052 μg·mL^{-1}。另取同一批健儿清解液样品 6 份，每份 2 mL，分置预先加入 10%磷酸溶液 0.16 mL 的 10 mL 顶空瓶中，各加含氢氰酸为 10.387 μg·mL^{-1} 的对照品溶液 0.04 mL，迅速密封，摇匀，按“2.1.2”项下条件进样检测，结果平均信噪比为 10∶1(n=6)，平均回收率为 90.9%，回收率 RSD 为 6.7%(n=6)。结果表明定量限为 0.208 μg·mL^{-1}，精密度与准确度良好。

3.2.4 仪器精密度试验 取“3.1.1”项下含氢氰酸为 15.581 μg·mL^{-1} 的对照品溶液，按“2.1.2”项下条件连续进样 5 次，结果峰面积 RSD 为 1.2%(n=5)，仪器精密度良好。

3.2.5 稳定性试验 取健儿清解液样品(企业 A 生产，批号：06119017)，按“3.1.2”项下方法平行制备供试品溶液 7 份，分别于制备后 0，2，4，6，8，10，12 h，按“2.1.2”项下条件进样检测，结果其峰面积 RSD 为 1.1%(n=7)，供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

3.2.6 重复性试验 取健儿清解液样品(企业 A 生产，批号：06119017)，按“3.1.2”项下方法平行制备供试品溶液 6 份，并按“2.1.2”项下条件连续进样测定并计算含量。结果氢氰酸平均含量为 10.482 μg·mL^{-1}，RSD 为 1.0% (n=6)，方法重复性良好。

3.2.7 加样回收率试验 取含氢氰酸为 5.194，10.387，20.775 μg·mL^{-1} 的对照品溶液各 1 mL，每浓度 3 份，分置预先加入 0.10 g 氯化钠及 10%磷酸溶液 0.2 mL 的 10 mL 顶空瓶中，各加入“3.2.6”项下已知含量的健儿清解液样品 1 mL，迅速密封，摇匀，按“2.1.2”项下条件进样测定并计算加样回收率。结果平均回收率为 96.7%，RSD 为 2.6%(n=9)，见表 3。

3.2.8 替代基质标准曲线法准确性再验证 取企业 B、A 及 F 生产的健儿清解液样品各 1 批(批号依次为 190930，06119017 及 20191102)，采用替代基质标准曲线法测得游离氢氰酸的含量，结果分别为 3.508，10.482，16.540 μg·mL^{-1}。另采用标准加入法测定游离氢氰酸的含量，结果分别为 3.287，10.347，16.726 μg·mL^{-1}。不同方法测定结果的相对平均偏差为 1.1%~6.5%，说明替代基质标准曲线法在低、中、高含量水平的测定结果均较为准确。

表 3 加样回收率试验结果(n=9)

Tab. 3 Results of spike recovery test(n=9)

原有量/μg	加入量/μg	测得量/μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
	5.194	15.320	93.2		
	5.194	15.440	95.5		
	5.194	15.360	93.9		
	10.387	20.756	98.9		
10.482	10.387	20.394	95.4	96.7	2.6
	10.387	20.434	95.8		
	20.775	31.388	100.6		
	20.775	30.946	98.5		
	20.775	30.864	98.1		

3.3 样品测定

取 5 家企业生产的健儿清解液样品各 2 批，分别按“3.1.2”项下方法制备供试品溶液，并按“2.1.2”项下条件进样测定，以替代基质标准曲线法计算游离氢氰酸的含量，结果见表 4。

表 4 健儿清解液中游离氢氰酸的含量(n=2)

Tab. 4 Contents of free hydrogen cyanide in Jian’er Qingjie mixture(n=2)

厂家	批号	游离氢氰酸含量/μg·mL^{-1}
A	05519085	10.499
	05519108	11.506
B	190930	3.508
	191135	3.431
C	191172	2.485
	200308	3.149
E	B190634	0.653
	B190940	1.156
F	20191102	16.540
	20190909	14.828

4 讨论

本研究采用顶空气相色谱法，在杏仁腈热稳定性研究的基础上，实现了杏仁腈与游离氢氰酸共存的复杂样品体系中游离氢氰酸的专属性检测。同时，针对基质增强效应影响纯溶剂基质标准曲线法测定结果准确性的问题，参考生物标志物分析中的替代基质法，提出以氯化钠溶液作为替代基质的思路及方法优化的方向，建立了替代基质标准曲线法，能够避免标准加入法操作繁琐且对照品消耗

量大、基体稀释法对检测灵敏度要求高、基质匹配法空白样品基质制备困难等问题，实现游离氢氰酸含量的快速、准确测定。

在本实验室的前期研究中，采用自行建立的HPLC对杏仁腈在溶剂中的稳定性进行了考察，发现杏仁腈在水中极不稳定，其降解过程呈现出前期较快(于15 ℃密封避光放置，0.5 h内降解率即>50%)，后期平缓的趋势。而在pH 2.0~3.5(大部分健儿清解液样品的pH值均在此范围内)的水溶液中，杏仁腈较为稳定。由此可推测，按目前的工艺制法，在苦杏仁芳香水的制备、储存等制剂前环节，杏仁腈降解产生游离氢氰酸是不可避免的。此外，本品质量标准简单，制法中仅规定了“蒸馏提取芳香水”，缺少对蒸馏前是否浸泡等促进苦杏仁苷酶解进而提升杏仁腈得率的关键工艺参数的规定，也未附注芳香水的质量标准，若生产企业未采取有效的内控措施，易导致苦杏仁芳香水的质量处于失控状态，出现杏仁腈得率过低、游离氢氰酸累积或杏仁腈以游离氢氰酸形式大量挥发损失等质量安全风险，甚至出现文献报道中苦杏仁未按照标准工艺蒸馏提取苦杏仁芳香水的情况[13]。

本次测定的10批次健儿清解液样品中游离氢氰酸的含量为0.653~16.540 μg·mL^{-1}，不同厂家的产品之间存在较明显的差异。部分企业的样品中游离氢氰酸的相对含量较低，结合本实验室前期研究的结果，其杏仁腈相对稳定的降解产物苯甲醛的含量也低于其他企业，但相对差异小于游离氢氰酸。因此推测存在杏仁水制备过程中杏仁腈的得率相对较低，且杏仁腈降解后以游离氢氰酸的形式大量挥发损失等情况。部分企业采用了滴定法控制总氢氰酸的含量，使其游离氢氰酸的含量相对稳定。

目前，国内外少见中成药中关于游离态氰化物限量制定的报道[8]。以本品日最大服用量45 mL计算，上述10批次样品的游离氢氰酸的摄入量为29.4~744 μg，除一批次相对较高外，其余均<520 μg。参考中国GB 5749-2022《生活饮用水卫生标准》中氰化物(以CN^-计)不得过0.05 mg·L^{-1}的规定，以日饮水量2 L计算，摄入量约100 μg。考虑到用药为短期暴露，整体上看健儿清解液中游离氢氰酸带来的直接安全风险相对较小。相较而言，解决苦杏仁芳香水质量失控的问题，确保能够生产游离氢氰酸及杏仁腈含量可控产品的需求更为迫切。同时，由于杏仁水及其制剂已有较长的使用历史，不可片面强调游离氢氰酸的毒性，建议在杏仁腈稳定性研究的基础上进行相关工艺参数的优化，并结合用药人群特点、药理毒理学研究、真实世界研究等的结果，为制定合理的游离氢氰酸限度范围提供支持。

REFERENCES

[1] 卫生部药品标准: 中药成方制剂第十册[S]. 1995: 148.

[2] DUAN S, WU X T, LI B. Research progress in structure of amygdalin and its degradation process[J]. Food Sci Technol(食品科技), 2020, 45(9): 233-237.

[3] LEE H H, AHN J H, KWON A R, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of apricot seed[J]. Phytother Res, 2014, 28(12): 1867-1872.

[4] BHATTACHARYA R, FLORA S. Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents[M]. 2nd Ed. San Diego: Academic Press, 2015.

[5] LIU Y, CHEN J, ZHU Y J, et al. Determination of free cyanide in Chinese patent medicines of cyanogenic glycosides based on surface-enhanced Raman spectroscopy and headspace/gas chromatography-nitrogen and phosphorus detection techniques[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2018, 38(7): 1202-1209.

[6] 国家药品标准: 化学药品地方标准上升国家标准第8册[S]. 2002: 83.

[7] 中国药典. 二部[S]. 1963: 519.

[8] CHEN X, LI J P. Discussion on quality control of Armeniacae Semen Amarum and its preparations[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2021, 27(19): 200-205.

[9] YIN F, LING Y H, MARTIN J, et al. Quantitation of uridine and L-dihydroorotic acid in human plasma by LC-MS/MS using a surrogate matrix approach[J]. J Pharm Biomed Anal, 2021(192): 113669.

[10] MISHRA S, RAJPUT N, JADAV T, et al. Advancement in analytical strategies for quantification of biomarkers with a special emphasis on surrogate approaches[J]. Crit Rev Anal Chem, 2022: 2022Feb9.

[11] ROMERO-GONZÁLEZ R, GARRIDO FRENICH A, MARTÍNEZ VIDAL J L, et al. Simultaneous determination of pesticides, biopesticides and mycotoxins in organic products applying a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction procedure and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2011, 1218(11): 1477-1485.

[12] MATUSZEWSKI B K, CONSTANZER M L, CHAVEZ-ENG C M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS[J]. Anal Chem, 2003, 75(13): 3019-3030.

[13] MAO J H, WU C Q, CHEN G Y, et al. Quality evaluation of Jian’er Qingjie oral liquid in market[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2020, 37(5): 587-590.

收稿日期：2022-08-23

(本文责编：陈怡心)