

# 用高效液相色谱法测定肾上腺素注射液给药制剂中肾上腺素的含量

## Determination of epinephrine in epinephrine hydrochloride injection by high performance liquid chromatography

何灵艳, 王晨倩, 王若琪,  
袁 慧, 王雨豪, 陈建华,  
高 洁, 秦秀军, 李建国

(中国辐射防护研究院 药物安全性评价中心、  
药物毒理与放射损伤药物山西省重点实验室、  
中核放射毒理与放射性药物临床前评价重点  
实验室, 山西 太原 030006)

HE Ling - yan, WANG Chen - qian,  
WANG Ruo - qi, YUAN Hui,  
WANG Yu - hao, CHEN Jian - hua,  
GAO Jie, QIN Xiu - jun,  
LI Jian - guo

(Drug Safety Evaluation Center, Shanxi  
Key Laboratory of Drug Toxicology and  
Drug for Radiation Injury, China Nuclear  
Key Laboratory on Radiotoxicology and  
Radiopharmaceutical Preclinical  
Evaluation, China Institute for Radiation  
Protection, Taiyuan 030006, Shanxi  
Province, China)

基金项目: 山西省科技合作交流专项基金资助  
项目(202104041101032)

作者简介: 何灵艳(1996 -), 女, 实习研究员, 主  
要从事新药安全性评价的相关研究

通信作者: 李建国, 研究员, 博士生导师  
Tel: (0351) 2202239  
E - mail: ljg2547@163.com

**摘要:**目的 建立一种高效液相色谱法测定肾上腺素注射液给药制剂中肾上腺素的浓度。方法 用 Waters XBridge C<sub>18</sub> (150.0 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱等度洗脱, 以离子对溶液(取磷酸二氢钾 5.0 g 和辛烷磺酸钠 2.6 g, 溶于水 1 000 mL 中, 用磷酸调节 pH 值至 3.7) - 乙腈(85:15) 为流动相, 流速为 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 柱温为 40 °C, 检测波长为 280 nm, 进样量为 10 μL。考察该方法的专属性、标准曲线与定量下限、系统适用性、稳定性、精密度与回收率。**结果** 肾上腺素在 2.09 ~ 83.66 μg · mL<sup>-1</sup> 内, 线性关系良好, 标准曲线方程为  $y = 8.74 \times 10^3 x - 2.72 \times 10^3$  ( $r = 1.000\ 0$ ), 定量下限为 2.09 μg · mL<sup>-1</sup>。主峰峰面积相对标准偏差(RSD)为 0.19%, 保留时间 RSD 为 0.18%, 系统适用性良好; 高、中、低 3 个质量浓度的供试品溶液测定结果的 RSD 均小于 0.5%, 平均回收率为 105.09% ~ 107.86%。肾上腺素注射液供试品溶液在 4 h 内稳定。**结论** 本方法具有良好的稳定性、回收率、精密度和专属性, 适用于测定肾上腺素注射液给药制剂中肾上腺素的含量。

**关键词:** 肾上腺素; 药物非临床研究; 供试品分析; 高效液相色谱法

**DOI:** 10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.04.021

**中图分类号:** R971.9 **文献标志码:** A

**文章编号:** 1001-6821(2025)04-0552-04

**Abstract: Objective** To develop a high performance liquid chromatographic method for determination of epinephrine in epinephrine hydrochloride injection. **Methods** The separation was carried out on a Waters XBridge C<sub>18</sub> column (150.0 mm × 4.6 mm, 5 μm) with isocratic elution. The mobile phase consisted of 5.0 g · L<sup>-1</sup> potassium dihydrogen phosphate and 2.6 g · L<sup>-1</sup> octanesulfonic acid sodium solution (adjusting pH to 3.7 by phosphoric acid) - acetonitrile (85:15) with the flow rate of 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, the column temperature of 40 °C, the detection wavelength of 280 nm and the injection volume of 10 μL. The specificity, standard curve and lower limit of quantitation (LLOQ), system suitability, stability, precision and recovery were investigated. **Results** The calibration curve of epinephrine was linear in the range of 2.09 - 83.66 μg · mL<sup>-1</sup>. The standard curve of epinephrine was  $y = 8.74 \times 10^3 x - 2.72 \times 10^3$  ( $r = 1.000\ 0$ ). The LLOQ was 2.09 μg · mL<sup>-1</sup>. The system applicability was proved to be good since the relative standard deviation (RSD) of the main peak area was 0.19% and the RSD of retention time was 0.18%. The RSD of the test solution at high, medium and low concentrations was less than 0.5%, and the

average recovery rate was 105.09% – 107.86%. The test solution was stable within 4 h. **Conclusion** The method validation proved that the proposed method was stable, recovery, precise and specificity, which could be used for the measurement of epinephrine in epinephrine hydrochloride injection administration preparation.

**Key words:** epinephrine; nonclinical drug study; test sample analysis; high performance liquid chromatography

肾上腺素是肾上腺素类受体激动药,其受体广泛分布于心脏、血管、支气管、眼睛、消化器官、生殖器官中,并在多种代谢过程中发挥重要作用<sup>[1-2]</sup>。肾上腺素注射液在临床上常作为急危重症用药,广泛应用于抢救过敏性休克或心搏骤停,治疗支气管哮喘或消化性溃疡出血等疾病<sup>[1,3]</sup>,对肾上腺素注射液进行充分的临床前研究有利于指导该药物的临床合理用药,减少药物不良反应事件发生概率。本实验通过高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 法建立了肾上腺素注射液给药制剂的分析方法并进行验证,为非临床安全性和评价奠定基础。

## 材料与方法

### 1 材料

**药品与试剂** 肾上腺素注射液,规格:每支 1 mL/1 mg,批号:54604,国家药品验证号:42023-159-01,美国 Par pharmaceutical 公司生产;肾上腺素对照品,含量:99.6%,批号:100154-202106,中国食品药品检定研究院生产;葡萄糖注射液,规格:每瓶 100 mL/5 g,批号:2201230904,批准文号:国药准字 H20033724,石家庄四药有限公司生产;磷酸二氢钾,规格:每瓶 500 g,批号:20180308,天津市科密欧化学试剂有限公司生产;辛烷磺酸钠,规格:每瓶 25 g,批号:F2206247,上海阿拉丁生化科技股份有限公司生产。

**仪器** 2695-2996 高效液相色谱仪,美国 Waters 公司产品;JE1002 电子天平,杭州恒仪仪表科技有限公司产品;FiveEasy Plus pH 计,瑞士 METTLER TOLEDO 公司产品;BS124S 电子天平,北京赛多利斯仪器系统有限公司产品。

### 2 色谱条件与溶液配制<sup>[3-6]</sup>

本研究方法学建立和给药制剂样本检测由中国辐射防护研究院完成。

**色谱条件** 色谱柱:Waters XBridge C<sub>18</sub> (150.0 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:离子对溶液(取磷酸二氢钾 5.0 g 和辛烷磺酸钠 2.6 g,溶于水 1 000 mL 中,用磷酸调节 pH 值至 3.7)–乙腈(85:15),流速:1.0 mL · min<sup>-1</sup>;柱温:40 °C;检测波长:280 nm;进样体积:10 μL。

**给药制剂的配制** 量取肾上腺素注射液 1 mL,加入葡萄糖注射液 4 mL,摇匀,作为高浓度组给药制剂(含肾上腺素 200 μg · mL<sup>-1</sup>)。量取高浓度组给药制剂 1 mL,加入葡萄糖注射液 3 mL,摇匀,吸取 1 mL,加入葡萄糖注射液 9 mL,摇匀,即得低浓度组给药制剂(含肾上腺素 5 μg · mL<sup>-1</sup>)。

**肾上腺素对照品储备液的配制** 称取肾上腺素标准物质 10.5 mg,置于 10 mL 量瓶中,加入流动相稀释制成质量浓度为 1.05 mg · mL<sup>-1</sup> 的肾上腺素对照品储备液。

### 3 方法学考察

**专属性** 量取葡萄糖注射液、溶剂(流动相)、肾上腺素对照品溶液和肾上腺素注射液供试品溶液,分别注入液相色谱仪,记录色谱图。

**标准曲线与定量下限** 取肾上腺素对照品储备液适量,加入适量流动相逐级稀释制成质量浓度分别为 83.66、62.75、41.83、20.92、10.46、2.09 μg · mL<sup>-1</sup> 的对照品溶液,进样测试并记录色谱图,分别以质量浓度和峰面积作为横坐标和纵坐标进行线性回归。标准曲线上的最低浓度点为分析方法的定量下限。

**系统适用性** 量取肾上腺素对照品储备液适量,用流动相定量稀释成质量浓度为 41.83 μg · mL<sup>-1</sup> 的系统适用性溶液,连续进样 6 次,并计算主峰峰面积和保留时间的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。

**精密度与回收率** 取本品 600 μL,置于 10 mL 量瓶中,加入流动相稀释至刻度,摇匀,即得高浓度供试品溶液(含 60 μg · mL<sup>-1</sup> 肾上腺素),用流动相继续定量稀释制备含 40 和 20 μg · mL<sup>-1</sup> 肾上腺素的中、低浓度供试品溶液,每份溶液测定 3 次,记录肾上腺素峰面积,计算供试品溶液测得质量浓度的精密度,并根据标准曲线以测得质量浓度与加入质量浓度的比值考察方法回收率。

**稳定性** 按上述操作制备高、中、低浓度供试品溶液各 1 份,分别在进样盘放置 0、2、4 h 后进样测试,记录色谱图,通过峰面积变化来考察其稳定性。

**给药制剂预配制后的浓度、均一性和稳定性<sup>[7-8]</sup>**

由于药物临床前评价研究所需的供试品质量浓度各不相同,综合考虑溶血、血管刺激和被动过敏等实

验的剂量设置,选择低和高( $5、200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )2个质量浓度水平进行考察,将高质量浓度给药制剂用流动相定量稀释至标准曲线线性范围内,即得高质量浓度的供试品进样溶液,低质量浓度给药制剂无需稀释,可直接作为低质量浓度的供试品进样溶液。将配制好的低和高质量浓度的供试品进样溶液立即进样(0 h),以及室温放置4 h进样测定,分别记录色谱图,考察肾上腺素注射液供试品配制后的浓度、均一性及稳定性。

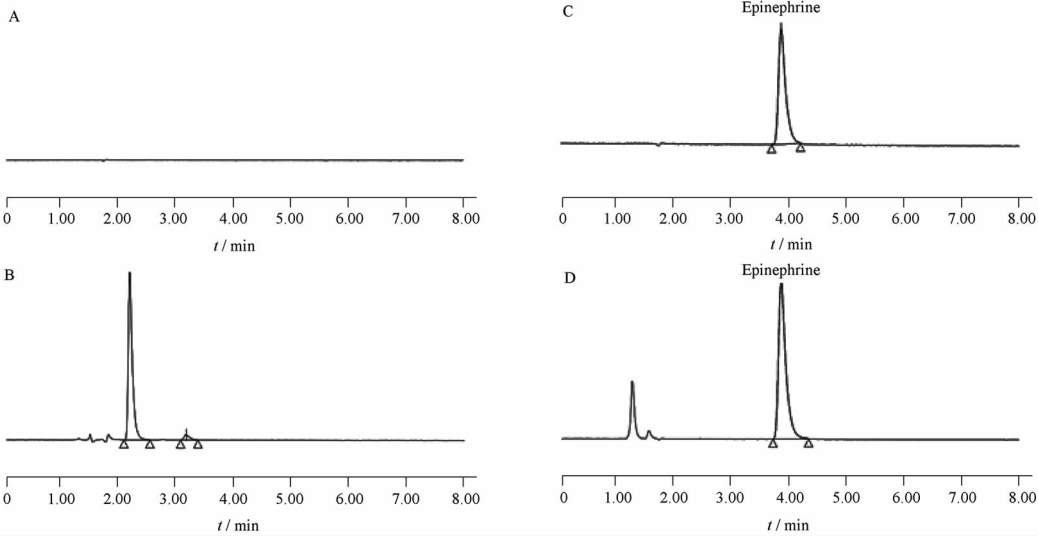


图1 肾上腺素注射液含量的典型色谱图

Figure 1 Typical chromatograms of epinephrine injection

A: Mobile phase;B: Glucose solution;C: Epinephrine test solution;D:Epinephrine reference solution.

**标准曲线与定量下限** 肾上腺素在 $2.09\sim83.66\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内,线性关系良好,其标准曲线为 $y=8.74\times10^3x-2.72\times10^3$ ( $r=1.000\ 0$ ),定量下限为 $2.09\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

**系统适用性** 系统适用性溶液中色谱峰对称,峰面积的RSD为 $0.19\%$ ( $n=5$ ),保留时间的RSD为 $0.18\%$ ( $n=5$ ),表明本方法适用性良好。

**精密度与回收率** 不同质量浓度供试品溶液测量结果的RSD均小于 $0.5\%$ ,高、中、低3个质量浓度的肾上腺素溶液的平均回收率在 $90\%\sim110\%$ 内,9次测量的回收率的RSD为 $1.13\%$ ,表明本方法精密度与回收率良好,结果见表1。

**稳定性** 高、中、低3个质量浓度的肾上腺素溶液在进样器中立即进样(0 h),以及室温放置2 h和4 h后进样测定,实测值与理论浓度的偏差均在 $\pm10\%$ 以内, $\text{RSD}\leq5\%$ ,表明溶液稳定性良好。

**给药制剂预配制后的浓度、均一性和稳定性** 由于肾上腺素注射液供试品为无色澄明液体,且在给药

结 果

1 方法学评价

**专属性** 在上述条件下,肾上腺素的保留时间为 $3.88\text{ min}$ ,空白溶剂(流动相)和葡萄糖注射液不干扰肾上腺素注射液给药制剂的含量测定,表明本方法的专属性良好,见图1。

制剂的配制浓度范围内,供试品与葡萄糖注射液混合后为真溶液体系,可认为给药制剂的均一性良好<sup>[7]</sup>。高、低质量浓度给药制剂测得的质量浓度分别为 $216.21$ 和 $5.45\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,与理论浓度的偏差分别为 $8.11\%$ 和 $8.98\%$ ,均小于 $15\%$ ,表明给药制剂的质量浓度符合要求。高、低质量浓度给药制剂配制后,与0 h检测结果相比,室温放置4 h后测得的质量浓度分

表1 用高效液相色谱法检测肾上腺素供试品溶液的精密度和回收率结果( $n=3$ )

Table 1 Precision and recovery results of epinephrine test solution were determined by high performance liquid chromatography ( $n=3$ )

| Theoretical concentration<br>( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) | Measured concentration<br>( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1},\bar{x}\pm s$ ) | RSD<br>(%) | RE<br>(%) | Recovery<br>(%, $\bar{x}\pm s$ ) | RSD<br>(%) |
|-------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|------------|-----------|----------------------------------|------------|
| 20.00                                                             | $21.02\pm0.04$                                                              | 0.21       | 5.09      | $105.09\pm0.22$                  | 1.13       |
| 40.00                                                             | $42.63\pm0.02$                                                              | 0.04       | 6.58      | $106.58\pm0.04$                  |            |
| 60.00                                                             | $64.71\pm0.11$                                                              | 0.17       | 7.86      | $107.86\pm0.18$                  |            |

RSD:Relative standard deviation;RE:Relative error.

别为 215.88 和 5.41  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 偏差分别为 -0.16% 和 -0.77%, 均在  $\pm 10\%$  以内, 表明肾上腺素注射液给药制剂在室温条件下放置 4 h 稳定。

## 2 方法学应用

在临床前安全评价研究的溶血试验、血管刺激试验和被动过敏试验中<sup>[9]</sup>, 测得肾上腺素注射液给药制剂的质量浓度分别为 106.40 和 106.90  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、106.70 和 106.80  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、13.18 和 13.66  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 各组给药制剂的实测质量浓度与理论质量浓度的偏差均不超过  $\pm 10\%$ , 满足实验要求。

## 讨 论

药物的非临床安全性研究是评价新药有效性和安全性必不可少的环节, 其使用的供试品配制准确和质量可控是获得可靠试验结果的重要前提<sup>[8]</sup>, 建立测定准确、操作简便的供试品分析方法是良好的非临床安全性研究开展的先决条件<sup>[10]</sup>。肾上腺素的质量标准在中国药典、美国药典、英国药典和日本药典中均有收载, 但未见对于肾上腺素给药制剂检测的相关报道。通常肾上腺素的含量测定用非水滴定法, 操作繁琐且灵敏度较低, 而美国药典采用的 HPLC 法分离度高、灵敏度好、更适用于较低浓度给药制剂的含量测定。因此, 本研究拟对流动相的组成、比例、pH、流速、检测波长和柱温等条件进行优化, 建立适用于肾上腺素注射液给药制剂中肾上腺素含量的 HPLC 检测方法。

检测波长参考药典中有关物质检测的紫外波长, 以达到在给药制剂的低肾上腺素浓度下对可能存在的杂质的较高检测能力, 同时对流动相的组成、比例和 pH 进行优化, 使用合适的离子对溶液以提高检测方法的分离和响应, 并在此基础上对洗脱条件进一步优化, 所得到的等度洗脱条件简单稳定, 系统压力低, 方法耐用性好, 且此条件下不受杂质和注射液其他成分的干扰, 结合更高的柱温和流速能提高洗脱效率, 减少检测时间, 使得非临床试验研究不需较长时间等待, 所建立的 HPLC 方法更适用于临床前研究中给药制剂的含量测定。

此外, 在 HPLC 分析中, 稀释液和流动相的洗脱能力不一致可能会产生色谱溶剂效应, 从而改变色谱行为, 尤其当流动相的洗脱能力远小于稀释液时, 部分待测成分在固定相上的保留减弱, 随着稀释液被洗脱出色谱柱, 导致药物保留时间处峰面积变小, 甚至色谱峰峰形变差, 从而使得待测物的分离度不足、峰

形裂分或待测物浓度不准确等情况<sup>[11]</sup>。由此可以看出稀释液的选择对高效液相色谱测定结果有重要影响, 但关于药物, 尤其是肾上腺素相关制剂, 其供试品分析以及稀释液选择的相关报道很少。因此, 本实验使用流动相作为给药制剂测定时的稀释溶剂, 避免了溶剂效应带来的测定误差, 尤其是低浓度的给药制剂。同时, 流动相用含离子对试剂的磷酸盐缓冲液 (pH=3.7), 改善峰形的同时, 较低的 pH 可以有助于酚羟基等基团在溶液中保持分子形态<sup>[12]</sup>, 防止肾上腺素氧化变质和消旋化。

本研究建立了药物非临床研究质量管理规范 (Good Laboratory Practice, GLP) 体系下肾上腺素注射液给药制剂的 HPLC 分析方法并完成了方法学验证, 结果显示, 该方法具有较好的专属性、线性关系、准确度和精密度, 用流动相作为检测时的稀释溶剂能够有效改善峰形和减少误差, 使检测结果更加可信, 且能够满足肾上腺素注射液在溶血、血管刺激和被动过敏实验、遗传毒性试验、单次和多次给药毒性实验等临床前药物安全评价研究的检测需要。

## 参考文献:

- [1] 李爱莲. 肾上腺素临床应用研究进展[J]. 山西医药杂志, 2011, 40(2): 129—130.
- [2] 钮晓淑, 袁华峰, 钱桂英. HPLC 法测定盐酸肾上腺素注射液中乙二胺四乙酸二钠的含量[J]. 中国药师, 2013, 16(10): 1497—1499.
- [3] 周楚楚, 杜鹏, 孟雅, 等. 肾上腺素注射液中肾上腺素磺化物的 HPLC 检测方法研究[J]. 药学学报, 2022, 57(9): 2805—2810.
- [4] Ch. P(2010) Vol II, 中华人民共和国药典(2010 年版)[S]. 二部. 2010: 793—795.
- [5] EUROPEAN PHARMACOPOEIA COMMISSION. *European Pharmacopoeia* [M]. 10.3 ed. Strasbourg (France): European Directorate for Quality Medicines, 2021: 4901—4902.
- [6] 张杰, 蔡雪燕, 丁亚梅, 等. HPLC 法测定复方盐酸阿替卡因注射液肾上腺素及磺酸肾上腺素含量的分析方法[J]. 山东化工, 2021, 50(17): 126—128, 133.
- [7] 国家食品药品监督管理局. 非临床安全性评价供试品检测要求的 Q&A[M]. 北京: 国家食品药品监督管理局, 2014: 5—13.
- [8] 胡晓敏, 王庆利. 重视新药非临床安全性试验中供试品的检测[J]. 中国临床药理学杂志, 2014, 30(9): 838—839.
- [9] 尹茂山, 李峥, 尹华静, 等. 药物制剂安全性研究评价的常见问题讨论[J]. 中国临床药理学杂志, 2023, 39(11): 1667—1672.
- [10] 王若琪, 李炜宾, 岳娟, 等. 建立苯磺酸左旋氨氯地平片给药制剂的分析方法[J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(6): 738—741.
- [11] 翟文君, 骆翔, 孙姣, 等. 溶剂对醋酸奥曲肽 HPLC 色谱行为的影响[J]. 沈阳药科大学学报, 2012, 29(6): 448—455.
- [12] 王英超, 王鹏, 赵海艳, 等. 高效液相色谱法测定丁卡因软膏中盐酸丁卡因的含量[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(15): 1657—1659.

(收稿日期 2024-07-22)