

## 复方注射液中肾上腺素及其代谢产物的 HPLC-ECD 检测方法研究

李萍<sup>1</sup>, 张福田<sup>2</sup>, 刘刚<sup>1</sup>, 周磊<sup>1</sup>, 吴守国<sup>1</sup>

(1. 中国科学技术大学化学系, 安徽合肥 230026;

2. 合肥大众医药科技开发有限责任公司, 安徽合肥 230001)

**摘要:**建立了系统测定利多卡因肾上腺素注射液中肾上腺素、去甲肾上腺素、亚硫酸肾上腺素及肾上腺素红含量的高效液相色谱-电化学(HPLC-ECD)方法。其中前3种物质用氧化模式分析,肾上腺素红用还原模式分析,优化了电位、流动相pH及离子对试剂含量、灵敏度参数等色谱条件,并对该方法进行了论证;在各物质的线性浓度范围内,该方法显示出良好的线性关系, $R^2$ 均为0.9999,肾上腺素、去甲肾上腺素、亚硫酸肾上腺素和肾上腺素红的检出限依次为0.27, 0.50, 0.20, 50  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,回收率依次为(100.34 $\pm$ 0.62)%, (100.16 $\pm$ 1.07)%, (100.26 $\pm$ 1.21)%, (97.97 $\pm$ 0.72)% ( $n=9$ )。该方法快速简单、选择性好、灵敏度及准确度高,可用于肾上腺素及其相关物质的分析测定。

**关键词:**肾上腺素;肾上腺素红;高效液相色谱-电化学检测;利多卡因肾上腺素注射液

**中图分类号:** O657.1; O657.7 **文献标识码:** A **doi:** 10.3969/j.issn.0253-2778.2013.02.008

**引用格式:** Li Ping, Zhang Futian, Liu Gang, et al. An HPLC-ECD assay for determining epinephrine and its metabolites in a compound injection[J]. Journal of University of Science and Technology of China, 2012, 43(2): 135-142.

李萍, 张福田, 刘刚, 等. 复方注射液中肾上腺素及其代谢产物的 HPLC-ECD 检测方法研究[J]. 中国科学技术大学学报, 2012, 43(2): 135-142.

### An HPLC-ECD assay for determining epinephrine and its metabolites in a compound injection

LI Ping<sup>1</sup>, ZHANG Futian<sup>2</sup>, LIU Gang<sup>1</sup>, ZHOU Lei<sup>1</sup>, WU Shouguo<sup>1</sup>

(1. Department of Chemistry, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China;

2. Hefei Dazhong Medical Science and Technology Development Company, Hefei 230001, China)

**Abstract:** An reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) assay coupled with electrochemical detection (ECD) for systematically measuring epinephrine, norepinephrine, epinephrine sulfonate and adrenochrome in lidocaine epinephrine injection was developed. Analyses of epinephrine, norepinephrine and epinephrine sulfonate were conducted in oxidation mode, while adrenochrome was analysed in reduction mode. Chromatographic conditions such as potential, pH and ion-pair reagent

收稿日期: 2012-05-18; 修回日期: 2012-06-19

基金项目: 国家自然科学基金(20975095)资助。

作者简介: 李萍, 女, 1986年生, 硕士。研究方向: 电分析化学。E-mail: lipinglp@mail.ustc.edu.cn

通讯作者: 吴守国, 副教授。E-mail: sgwu@ustc.edu.cn

content of mobile phase and sensitivity range were optimized. The proposed method was demonstrated strictly. The method shows good linear relationship ( $R^2 = 0.9999$ ) in the linear concentration range of four analytes. The detection limit of epinephrine, norepinephrine, epinephrine sulfonate and adrenochrome is  $0.27$ ,  $0.50$ ,  $0.20$ ,  $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectively, and the recovery of these substances is  $(100.34 \pm 0.62)\%$ ,  $(100.16 \pm 1.07)\%$ ,  $(100.26 \pm 1.21)\%$ ,  $(97.97 \pm 0.72)\%$  ( $n=9$ ), respectively. The method is fast and simple and showed high sensitivity, precision, selectivity and recovery, and can thus be used as a quality control method for drugs containing epinephrine and related substances.

**Key words:** epinephrine; adrenochrome; HPLC-ECD; lidocaine epinephrine injection

## 0 引言

利多卡因肾上腺素注射液在国外得到广泛应用,肾上腺素的加入能有效减少病人对利多卡因的吸收而延长其药效.该注射液被收录于英国药典和美国药典中,其贮藏稳定性分析被美国食品药品监督管理局-美国卫生系统药师协会(FDA-ASHP)列为药物稳定性研究项目<sup>[1-3]</sup>.然而,目前此注射液在中国还未正式上市,受到众多研究者的强烈关注.该注射液的主要成分肾上腺素(epinephrine, EP)是一种儿茶酚胺类神经递质,因其对心血管系统的疗效被广泛用作抢救濒危病人的药物<sup>[4]</sup>.注射液中的肾上腺素易因氧化、去甲基化或与制剂中的辅料物质反应而失活(图1),这些反应的产物,即去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)、亚硫酸肾上腺素和肾上腺素红在含量过高时会影响正常药效.因此,利多卡因肾上腺素注射液中的 EP、NE、亚硫酸肾上腺素和肾上腺素红的检测具有极为重要的临床意义.

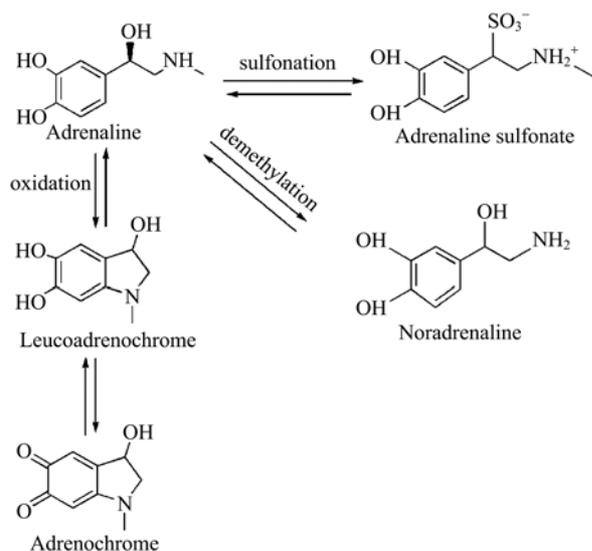


图1 EP的降解反应

Fig. 1 Degradation reactions of EP in solution

关于药物制剂、大脑、血液和血浆等样品中肾上腺素及其降解产物的检测已有诸多报道.如早期的薄层色谱法<sup>[5-6]</sup>、气相色谱法<sup>[7]</sup>、同位素放射酶分析<sup>[8-9]</sup>、紫外可见光谱法<sup>[10]</sup>、荧光光谱法<sup>[11]</sup>、毛细管电泳法<sup>[12-13]</sup>等.随着分析技术的发展,气相色谱-质谱(GC-MS)<sup>[14]</sup>和高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)<sup>[15-16]</sup>联用技术在儿茶酚胺类物质分析中得到越来越多的应用.质谱法具有灵敏度高、选择性好等优点,但同时也存在耗时、成本高、前处理复杂等缺点.电化学方法<sup>[17-18]</sup>除了以上优点之外,还具备便于实时监测样品、简单易行及免受有色样品干扰等优点.高效液相色谱-电化学检测技术(HPLC-ECD)结合了二者的优点,灵敏度高、选择性好且成本较低,因而在肾上腺素及其降解产物分析方面的应用引起了人们的浓厚兴趣.在相关报道中,HPLC-ECD绝大部分被用于EP和NE的分析检测<sup>[11,19-22]</sup>,只有极少数人将HPLC应用于亚硫酸肾上腺素和肾上腺素红的研究<sup>[19,22-24]</sup>.Juenge等<sup>[22]</sup>使用HPLC方法讨论了亚硫酸肾上腺素和肾上腺素红的分离和定量分析,但因其使用的紫外检测器灵敏度较低而未实现两种物质的准确定量.

为了克服以上方法的限制,建立一种可靠、系统的分析利多卡因肾上腺素注射液的方法,以期在此注射液上市后用于其质量评价,并为其他肾上腺素类药物分析提供研究方法,我们首次应用HPLC-ECD方法对利多卡因肾上腺素注射液中的EP、亚硫酸肾上腺素、NE和肾上腺素红的含量进行了系统测定.值得注意的是,这也是首次应用HPLC-ECD的还原模式对肾上腺素红进行分析测定.

## 1 实验

### 1.1 化学试剂

L重酒石酸肾上腺素、酒石酸去甲肾上腺素、肾

上腺素红均购自 Sigma-Adrich 公司(USA),纯度大于 99%。亚硫酸肾上腺素、利多卡因肾上腺素注射液由合肥大众医药科技开发有限责任公司(Hefei, China)提供,注射液中肾上腺素的含量在标示量( $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )的 90%~105%之间,相当于  $4.5 \sim 5.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。注射液含有焦亚硫酸钠、NaCl 等辅料。 $\text{CH}_3\text{OH}$  和乙腈为 HPLC 级别。实验用水为超纯水。其他试剂均为分析纯。

### 1.2 色谱条件

HPLC: Waters 系统(含 Waters 515 型泵和 Waters 464 型脉冲电化学检测器);色谱柱: Elite  $\text{C}_{18}$  反相柱( $150 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$ ); EP、NE 和亚硫酸肾上腺素的分析采用氧化模式,氧化电位为  $+0.65 \text{ V}$ ,灵敏度范围为  $5 \text{ nA}$ ,流动相为  $0.05 \text{ mol/L}$  醋酸盐缓冲液( $\text{pH} = 3.40$ , 含  $0.15 \text{ mmol/L}$  EDTA-2Na,  $2.7 \text{ mmol/L}$  庚烷磺酸钠)-乙腈(95:5);肾上腺素红的分析采用还原模式,还原电位为  $-0.45 \text{ V}$ ,灵敏度范围为  $500 \text{ nA}$ ,流动相为  $0.05 \text{ mol/L}$  醋酸盐缓冲液( $\text{pH} = 3.40$ , 含  $0.15 \text{ mmol/L}$  EDTA-2Na)-甲醇(95:5);流动相流速  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。流动相在使用前经  $0.22 \mu\text{m}$  滤膜过滤,超声、通氮除氧。所有实验均在室温下进行。

### 1.3 溶液配制

将肾上腺素、去甲肾上腺素、亚硫酸肾上腺素和肾上腺素红的标准品均配成  $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的溶液,然后用流动相稀释至目标浓度并保存在冰箱中待用。利多卡因肾上腺素注射液原液中 EP 的含量约为  $5$

$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,而 NE、亚硫酸肾上腺素和肾上腺素红的含量很低,故测定注射液样品中 EP 和其他降解产物时注射液原液被稀释的倍数不同,分别是 50 倍、10 倍,详见节 2.3。

## 2 结果与讨论

### 2.1 HPLC - ECD 条件优化

本工作主要目的是建立同时测定 EP 及其降解产物的方法,以满足肾上腺素类药物的分析和临床评估。为了实现待分析物质的准确分离,电极电位、流动相 pH、仪器灵敏度范围、流动相中离子对试剂庚烷磺酸钠的用量等色谱条件均需要优化。鉴于 EP 和 NE 的 HPLC-ECD 测定已有相关报道,本工作重点研究了亚硫酸肾上腺素和肾上腺素红测定条件的优化。

本工作研究发现,亚硫酸肾上腺素在 EP 和 NE 的常规测定条件下具有良好的电化学响应,最佳实验条件是:电极氧化电位为  $+0.65 \text{ V}$ ,溶液 pH 为 3.40。下面将对肾上腺素红的最佳分析条件进行详细介绍。

如图 2(a)所示,随着还原电位由  $-0.30 \text{ V}$  降至  $-0.70 \text{ V}$ ,肾上腺素红的响应信号先增加,在  $-0.38 \text{ V}$  和  $-0.55 \text{ V}$  之间响应值基本不变,然后稍微降低。为兼顾信噪比和响应信号强度,我们选择  $-0.45 \text{ V}$  作为最佳还原电位。另外,对测定肾上腺素红的流动相的 pH 值进行了优化。研究发现肾上腺素红在 pH 为 3.40 时有最佳响应(图 2(b)),推

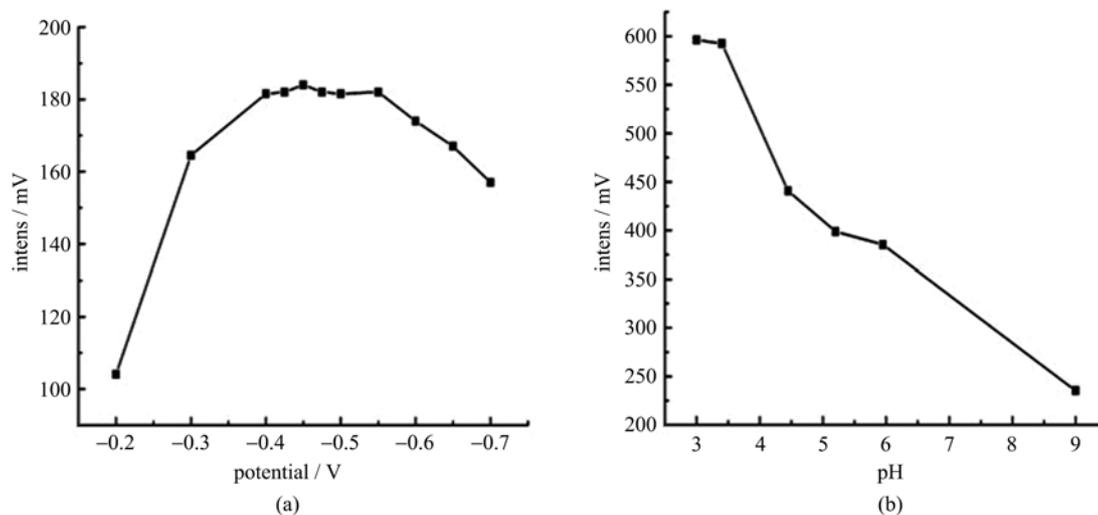


图 2 肾上腺素红响应信号和还原电位、pH 关系图

Fig. 2 The relationship between the potential value, pH and the signal of adrenochrome

测原因是肾上腺素红的还原过程有质子参加,酸性条件更有利于其还原过程的进行,故我们选择此 pH 为分析条件.

另外需要优化的色谱条件是流动相中离子对试剂的含量,它会与分析物相互作用而影响分离效果.报道指出,尽管离子对试剂对儿茶酚胺类物质的酸性代谢物的保留作用较小,但是它们在儿茶酚胺类物质的反向液相色谱中分析仍然是必需的<sup>[25]</sup>.我们发现庚烷磺酸钠的浓度为 2.7 mmol/L 时可以实现 EP、NE 和亚硫酸肾上腺素的快速准确分离,更高浓度的庚烷磺酸钠可使分离效果更好,但与此同时会增加成本,且将高浓度盐分引入色谱柱而延长了洗柱时间.对于肾上腺素红而言,我们发现庚烷磺酸钠的加入与否不影响其测定,因为两者之间并不存在相互作用,故本实验中分析肾上腺素红时流动相不含庚烷磺酸钠.

因本注射液中主成分 EP 的降解产物含量均在  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  数量级以下,所以准确快速的测定 NE、亚硫酸肾上腺素和肾上腺素红的含量有一定困难.另外,注射液中主成分 EP 与其降解产物的含量相差很大,因此有必要确定合适的灵敏度范围,以实现氧化模式下 EP、NE 和亚硫酸肾上腺素的同时测定.经研究本实验的氧化模式和还原模式分别采用 5 nA, 500 nA 的灵敏度.

## 2.2 方法论证

### 2.2.1 选择性、线性、检出限和定量限

在氧化模式下分析 EP、NE、亚硫酸肾上腺素,保留时间分别为 3.89, 2.89, 1.63 min, 肾上腺素红在还原模式下进行分析,保留时间为 2.32 min (相应数据见表 1). 注射液中的辅料成分不影响分析测定,以上所有物质的分析时间均在 5 min 内,该方法实现了快速分离且选择性好.

表 2 给出了 4 种待测物质的线性范围、检出限

表 1 待分析物质和主要辅料的保留时间

Tab. 1 Mean retention times of catecholamines and main additional components

compound	retention time/min
EP	3.89
NE	1.89
epinephrine sulfonate	1.63
adrenochrome	2.32
sodium metabisulfite	1.38

【Note】 Each value is determined by direct injection of mixed standard solution of each compound, and represents the mean of three injections.

及定量限的相关数据. EP、NE、亚硫酸肾上腺素和肾上腺素红的线性范围分别为 6.87~137.43, 2.51~100.32, 2.00~20.00 和 800~10 000  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $R^2$  均为 0.999 9. 以信噪比等于 3 为标准,以上物质的检出限 (LOD) 分别为 0.27, 0.50, 0.20 和 50  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ . 以信噪比等于 10 为标准,以上物质的定量限 (LOQ) 分别为 1.65, 1.35, 0.75 和 200  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ . 本实验进样量为 20  $\mu\text{L}$ , 即 EP、NE 和亚硫酸肾上腺素的 LOD 均低于 15 pg, 肾上腺素红的 LOD 为 1 ng, 此结果与已有的紫外可见法检测亚硫酸肾上腺素和肾上腺素红的文献报道相比,两者的测定灵敏度得到大幅度提高<sup>[19,22]</sup>.

### 2.2.2 精密度和稳定性

通过测定日间不同时间进样时响应信号的变化来反映所建立方法的精密度和稳定性. 对每一个分析物均配制 3 个不同浓度的溶液,分别在 1 h 内进行 6 次平行测定,然后计算所得数据的相对标准偏差 (RSD),数据列于表 3 中(最后一列). 数据显示该方法精密度良好.

方法的稳定性表征:配制 3 个不同浓度的每种待分析物质,分别在配制后的 0, 2, 4, 6, 24 h 内进行测定. 表 3 给出了每种分析物质这 5 个时间点的测

表 2 线性回归数据和检出限、定量限

Tab. 2 Linear regression data and validation of developed method

analyses	linear range / ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	regression equation	$R^2$	LOD / ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	LOQ / ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )
EP	6.87~137.43	$y=53\ 503.x+3\ 364.5$	0.999 9	0.27	1.65
NE	2.51~100.32	$y=58\ 502.x+7\ 441.0$	0.999 9	0.50	1.35
epinephrine sulfonate	2.00~20.00	$y=64\ 410.x+2\ 573.9$	0.999 9	0.20	0.75
adrenochrome	800~10 000	$y=33\ 1053.x-14\ 229.0$	0.999 9	50	200

【Note】 The data was presented as average of three determinations;  $R^2$ , squares of correlation coefficients for the standard curves; LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification.

表 3 方法的稳定性和精密度

Tab. 3 Stability and precision of the developed method

analytes	concentration / $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	RSD <sup>a</sup> / % ( $n=5$ )	RSD <sup>b</sup> / % ( $n=6$ )
EP	82.46	0.20	0.47
	54.97	0.35	0.75
	27.49	1.08	0.94
NE	75.24	0.56	0.57
	50.16	0.69	0.46
	25.08	1.60	0.69
epinephrine sulfonate	15.00	0.85	0.72
	10.00	0.92	0.92
	5.00	1.30	1.59
adrenochrome	8.00	4.14	0.69
	5.00	6.43	1.35
	3.00	7.26	2.73

【Note】 a, RSD of injecting standard solution in 0, 2, 4, 6, 24 h after it was prepared; b, RSD of six determinations.

定相对标准偏差(第 3 列),表明该方法在 24 h 内有良好的稳定性.

### 2.2.3 准确度

向 3 种批次的注射液样品分别添加 3 个不同的已知浓度的分析物质,进行该方法的准确度实验.注射液中每种分析物的含量是由表 2 中的回归方程计算而来.加标后测出的浓度扣除加入的标液浓度,得到的数值与测定的样品浓度的比值即为回收率,以此作为方法准确度的评价标准.实验结果如表 4 所示,EP、NE、亚硫酸肾上腺素和肾上腺素红的平均回收率分别为 $(100.34 \pm 0.62)\%$ , $(100.16 \pm 1.07)\%$ , $(100.26 \pm 1.21)\%$ , $(97.97 \pm 0.72)\%$ .从表 4 数据可以看出,该方法准确度良好.

### 2.3 注射液样品的测定

注射液样品中 EP 的原始浓度约为  $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

表 4 方法的准确度

Tab. 4 The accuracy of the developed method

analytes	batch	original / $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	spiked / $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	found / $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	recovery / %	RSD / %
EP	1	51.87	27.49	79.32	99.90	0.62
		51.87	13.74	66.23	101.20	
		51.87	7.02	59.04	100.70	
	2	52.84	27.49	80.24	99.80	
		52.84	13.74	66.44	99.70	
		52.84	7.02	59.67	99.60	
	3	56.43	27.49	84.34	100.80	
		56.43	13.74	70.79	101.10	
		56.43	7.02	63.63	100.30	
NE	1	1.46	45.14	46.62	101.50	1.07
		1.46	30.10	31.56	100.50	
		1.46	15.05	16.49	98.90	
	2	1.72	45.14	46.84	98.60	
		1.72	30.10	31.82	100.60	
		1.72	15.05	16.77	100.40	
	3	1.29	45.14	46.42	98.90	
		1.29	30.10	31.40	101.10	
		1.29	15.05	16.35	100.90	
epinephrine sulfonate	1	2.00	15.00	17.03	101.30	1.21
		2.00	10.00	11.98	98.90	
		2.00	5.00	6.99	99.90	
	2	2.19	15.00	17.19	100.40	
		2.19	10.00	12.16	98.90	
		2.19	5.00	7.17	99.50	
	3	0.91	15.00	15.94	102.00	
		0.91	10.00	10.93	101.90	
		0.91	5.00	5.91	99.50	
adrenochrome	1	—	8000	7903	98.80	0.74
	2	—	6000	5851	97.50	
	3	—	4000	3903	97.60	

(标示值), 但此浓度会因为保存时间的增加、氧化、光照条件等发生变化. 样品中含有的辅料主要包括焦亚硫酸钠、氯化钠和水, 其中焦亚硫酸钠可能在电化学检测器中产生响应. 虽然 EP 和其降解产物的测定条件相同, 但因为它们在注射液样品中的含量差别巨大, 在仪器已有的灵敏度范围

内未能实现同时测定. 我们在测定 NE、亚硫酸肾上腺素和肾上腺素红时将样品原液稀释 10 倍, 而测定 EP 时将样品原液稀释 50 倍. 待分析物质的浓度由标准曲线的回归方程计算得到. 我们测定了 3 个批次的利多卡因肾上腺素注射液, 得到的色谱图如图 3 和图 4 所示, 相应的数据列于表 5

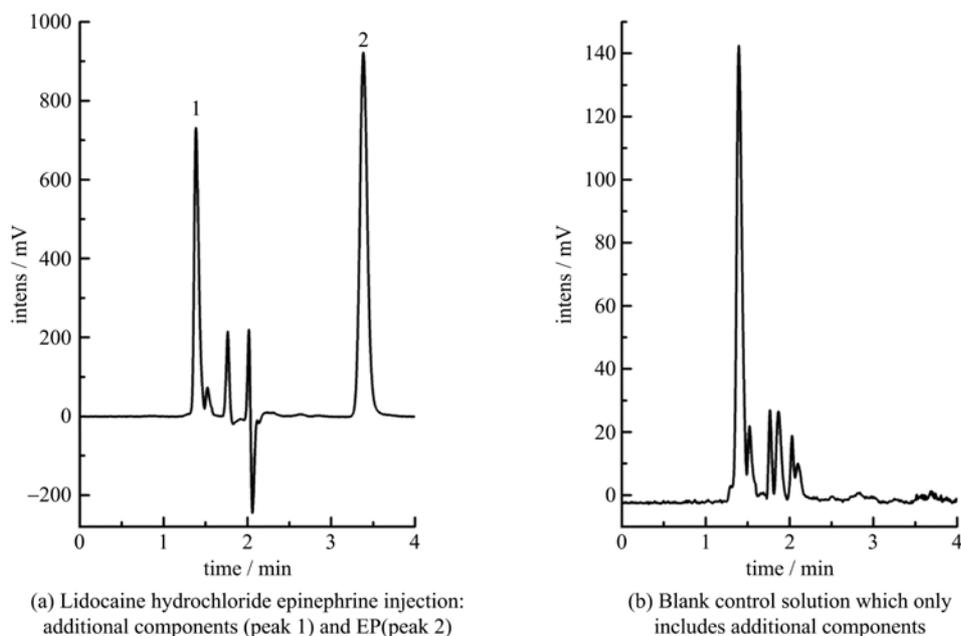


图 3 利多卡因肾上腺素注射液测定 EP 的色谱图

Fig. 3 The chromatograms of EP in lidocaine hydrochloride epinephrine injection and blank control solution

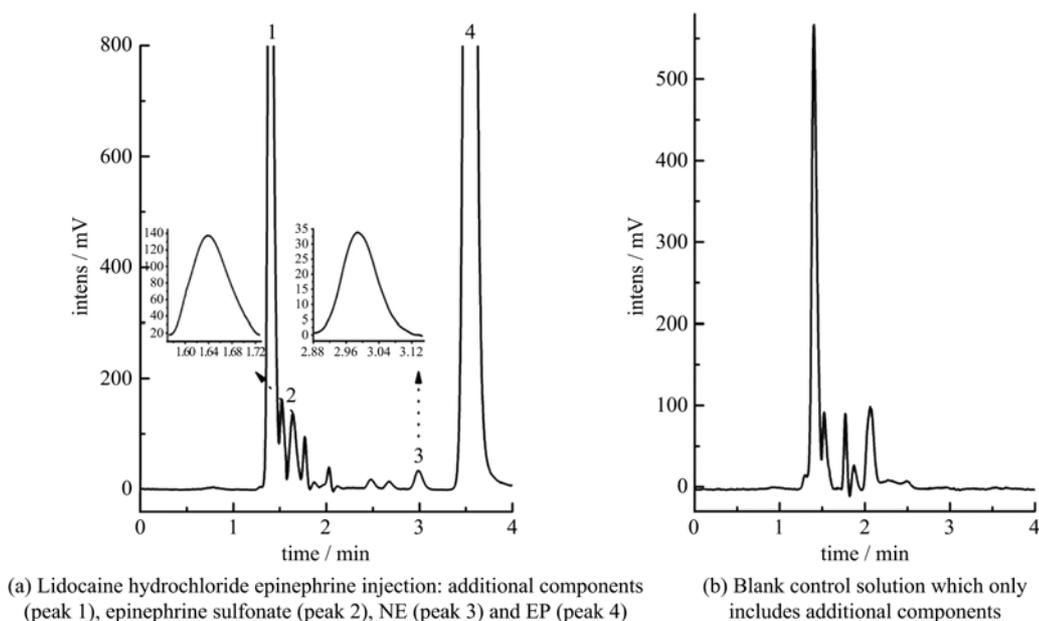


图 4 利多卡因肾上腺素注射液测定 NE 和亚硫酸肾上腺素的色谱图

Fig. 4 The chromatograms of NE and epinephrine sulfonate in lidocaine hydrochloride epinephrine injection and blank control solution

中. 图 3(b)和图 4(b)为样品中辅料的色谱峰,与待测物质的峰能很好地分离,说明该方法中辅料并不影响测定. 另外,样品中未检测出肾上腺素红,原因是注射液中加入的抗氧化剂抑制了肾上腺素红的产生.

表 5 3 个批次的样品中 4 种待分析物质的含量

Tab. 5 The content of 4 investigated components in injection

analytes	batch1 /( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	batch2 /( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	batch3 /( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )
epinephrine	99.85 $\pm$ 0.20	99.40 $\pm$ 0.41	100.48 $\pm$ 0.85
norepinephrine	3.01 $\pm$ 0.09	3.55 $\pm$ 0.12	2.53 $\pm$ 0.22
epinephrine sulfonate	3.83 $\pm$ 0.11	4.32 $\pm$ 0.24	2.19 $\pm$ 0.14
adrenochrome	not found	not found	not found

### 3 结论

首次建立了快速系统测定利多卡因肾上腺素注射液中 EP、NE、亚硫酸肾上腺素和肾上腺素红的方法,并第一次运用 HPLC-ECD 的还原模式对肾上腺素红进行了研究. 将 20  $\mu\text{L}$  待测溶液注入 HPLC 系统,在  $\text{C}_{18}$  反相柱中进行分析,检测器为电化学系统. 经过严格的方法验证,证明本分析方法灵敏度高、稳定性好、精密度和准确度高,并成功应用于注射液样品中 4 种分析物的检测,有望在利多卡因肾上腺素注射液上市后对其进行质量控制,并为其他儿茶酚胺类物质及其代谢产物的测定提供研究思路.

#### 参考文献(References)

- [1] Kerddonfak S, Manuyakorn W, Kamchaisatian W, et al. The stability and sterility of epinephrine prefilled syringe[J]. Asian Pac J Allergy, 2010, 28(1):53-57.
- [2] Sixsmith D G, Watkins W M, Kokwaro G O. The stability of adrenaline ophthalmic solutions on sterilization and storage[J]. J Clin Hosp Pharm, 1982, 7(3):205-207.
- [3] Bonhomme L, Benhamou D, Comoy E. Stability of adrenaline pH-adjusted solutions of local anaesthetics[J]. J Pharmaceut Biomed, 1991, 9(6):497-499.
- [4] Moore R Y, Bloom F E. Central catecholamine neuron systems-anatomy and physiology of the norepinephrine and epinephrine systems [J]. Annu Rev Neurosci, 1979, 2:113-168.
- [5] E Forrest Janet, Heacock R A. Thin-layer chromatography of some acetylated adrenaline derivatives [J]. J Chromatogr A, 1969, 44: 638-640.
- [6] Ebrahimian S, Paul J. Thin-layer chromatographic separation of serotonin from epinephrine and norepinephrine [J]. Microchem J, 1981, 26 (1): 127-131.
- [7] Jacob K, Vogt W, Knedel M, et al. Quantitation of adrenaline and noradrenaline from human plasma by combined gas chromatography-high-resolution mass fragmentography[J]. J Chromatogr B, 1978, 146(2): 221-226.
- [8] Passon P G, Peuler J D. Simplified radiometric assay for plasma norepinephrine and epinephrine [J]. Anal Biochem, 1973, 51(2):618-631.
- [9] Peuler J D, Johnson G A. Simultaneous single isotope radioenzymatic assay of plasma norepinephrine, epinephrine and dopamine [J]. Life Sci, 1977, 21(5): 625-636.
- [10] Barnum D W. Spectrophotometric determination of catechol, epinephrine, dopa, dopamine and other aromatic vic-diols [J]. Anal Chim Acta, 1977, 89(1): 157-166.
- [11] Ciarlone A E, Fry B W, Parker R L. A simple, rapid, and accurate fluorometric analysis of epinephrine in local anesthetic solutions [J]. Microchem J, 1981, 26(3): 436-439.
- [12] Britz-Mckibbin P, Wong J, Chen D D Y. Analysis of epinephrine from fifteen different dental anesthetic formulations by capillary electrophoresis [J]. J Chromatogr A, 1999, 853(1/2):535-540.
- [13] Wei Shoulian, Song Guanqun, Lin Jinming. Separation and determination of norepinephrine, epinephrine and isoprenaline enantiomers by capillary electrophoresis in pharmaceutical formulation and human serum [J]. J Chromatogr A, 2005, 1098(1/2): 166-171.
- [14] Lovelady H G, Foster L L. Quantitative determination of epinephrine and norepinephrine in the picogram range by flame ionization gas-liquid chromatography [J]. J Chromatogr A, 1975, 108(1): 43-52.
- [15] Carrera V, Sabater E, Vilanova E, et al. A simple and rapid HPLC-MS method for the simultaneous determination of epinephrine, norepinephrine, dopamine and 5-hydroxytryptamine: Application to the secretion of bovine chromaffin cell cultures [J]. J Chromatogr B, 2007, 847(2):88-94.
- [16] Ji C J, Walton J, Su Y, et al. Simultaneous determination of plasma epinephrine and norepinephrine

- using an integrated strategy of a fully automated protein precipitation technique, reductive ethylation labeling and UPLC - MS/MS[J]. *Anal Chim Acta*, 2010, 670(1/2):84-91.
- [17] Li Jing, Lin Xiangqin. Electrodeposition of gold nanoclusters on overoxidized polypyrrole film modified glassy carbon electrode and its application for the simultaneous determination of epinephrine and uric acid under coexistence of ascorbic acid [J]. *Anal Chim Acta*, 2007, 596(2):222-230.
- [18] Bryan L J, O'Donnell S R. Analysis of the o-methylated metabolites of isoprenaline, adrenaline and noradrenaline in physiological salt solutions by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection[J]. *J Chromatogr B*, 1989, 487:29-39.
- [19] Kirchhoefer R D, Sullivan G M, Allgire J F. Analysis of USP epinephrine injections for potency, impurities, degradation products, and d-enantiomer by liquid chromatography, using ultraviolet and electrochemical detectors[J]. *J Assoc Off Anal Chem*, 1985, 68(2): 163-165.
- [20] Erbil M K, Yildirim G, Kenar L, et al. Determination of urinary free norepinephrine (NE), epinephrine (E) and dopamine (DA) by reversed-phase HPLC with electrochemical detection and its clinical application[J]. *Clin Chem*, 1996, 42(6):556-556.
- [21] Qiao T, Jin J, Xie Q Z, et al. Determination of norepinephrine in human saliva by HPLC-ECD[C]// *The Regional Workshop of the International Society for the Study of Behavioural Development*. Nanjing: Research Center Learning Science, 2009:168-170.
- [22] Juenge E C, Flinn P E, Furman W B. Liquid chromatographic separation and detection of epinephrine and its oxidation products, adrenochrome and adrenolutin[J]. *J Chromatogr A*, 1982, 248(2): 297-302.
- [23] Kirchhoefer R D, Allgire J F, Juenge E C. Stability of sterile aqueous lidocaine hydrochloride and epinephrine injections submitted by U. S. hospitals[J]. *Am J Hosp Pharm*, 1986, 43(7):1 736-1 741.
- [24] Stepensky D, Chorny M, Dabour Z, et al. Long-term stability study of L-adrenaline injections: Kinetics of sulfonation and racemization pathways of drug degradation [J]. *J Pharm Sci*, 2004, 93(4): 969-980.
- [25] Wester P, Gottfries J, Johansson K, et al. Simultaneous liquid-chromatographic determination of 17 of the major monoamine neurotransmitters, precursors and metabolites: 1. optimization of the mobile phase using factorial-designs and a computer-program to predict chromatograms[J]. *J Chromatogr Biomed Appl*, 1987, 415(2):261-274.