

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2026)04-0113-04  
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2026.04.021



## 酮苯丙氨酸钙原料药中有机酸杂质分析\*

何佳佳<sup>1</sup>, 郑国钢<sup>2</sup>, 张文琦<sup>3</sup>, 付馨慰<sup>1</sup>

(1. 浙江省食品药品检验研究院·国家药品监督管理局仿制药评价关键技术重点实验室·全省生物医药接触材料重点实验室, 浙江 杭州 310052; 2. 浙江昂利康制药股份有限公司, 浙江 绍兴 312400; 3. 浙江工业大学绿色制药协同创新中心, 浙江 杭州 310052)

**摘要:**目的 建立测定酮苯丙氨酸钙原料药中有机酸杂质含量的离子色谱法。方法 采用 Dionex IonPac AS11-HC 柱(250 mm × 4.0 mm), 淋洗液为氢氧化钾溶液(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 30 °C, 进样量为 25 μL。结果 DL-3-苯基乳酸、苯乙酸、苯甲酸质量浓度分别在 1.518 5~37.962 0 μg/mL、1.540 5~38.511 5 μg/mL、1.573 0~39.325 0 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好( $r \geq 0.999 7$ ), 检测限分别为 0.303 7, 0.308 1, 0.314 6 μg/mL, 定量限分别为 0.759 2, 0.770 2, 0.786 5 μg/mL; 精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 5.0%, 平均加样回收率分别为 107.09%, 96.36%, 99.48%, RSD 分别为 2.20%, 5.60%, 1.50% ( $n=9$ )。结论 建立的方法操作简便、结果准确、灵敏度高, 且对环境污染小, 适用于酮苯丙氨酸钙中有机酸杂质控制。

**关键词:** 离子色谱法; 酮苯丙氨酸钙; 有机酸杂质; DL-3-苯基乳酸; 苯乙酸; 苯甲酸

### Analysis of Organic Acid Impurities in Calcium Ketophenylalanine Raw Material

HE Jiajia<sup>1</sup>, ZHENG Guogang<sup>2</sup>, ZHANG Wenqi<sup>3</sup>, FU Xinwei<sup>1</sup>

(1. Zhejiang Institute for Food and Drug Control·NMPA Key Laboratory for Core Technology of Generic Drug Evaluation·Zhejiang Key Laboratory of Biopharmaceutical Contact Materials, Hangzhou, Zhejiang 310052, China; 2. Zhejiang Anglikang Pharmaceutical Co., Ltd., Shaoxing, Zhejiang 312400, China; 3. Collaborative Innovation Center of Green Pharmaceuticals Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou, Zhejiang 310052, China)

**Abstract: Objective** To establish an ion chromatography method for the determination of organic acid impurities in calcium ketophenylalanine raw material. **Methods** The ion chromatography column was Dionex IonPac AS11-HC column (250 mm × 4.0 mm), the eluent use potassium hydroxide solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 30 °C, and the injection volume was 25 μL. **Results** The linear ranges of DL-3-phenyllactic acid, phenylacetic acid, and benzoic acid were 1.518 5-37.962 0 μg/mL, 1.540 5-38.511 5 μg/mL, and 1.573 0-39.325 0 μg/mL, respectively ( $r \geq 0.999 7$ ). The limits of detection (LOD) were 0.303 7 μg/mL, 0.308 1 μg/mL, 0.314 6 μg/mL, and the limits of quantification (LOQ) were 0.759 2 μg/mL, 0.770 2 μg/mL, and 0.786 5 μg/mL, respectively. The RSDs of precision, stability, and repeatability test

\*基金项目: 浙江省药品监管系统科技计划项目[2022026]。

第一作者: 何佳佳, 女, 硕士研究生, 主管药师, 研究方向为药品检验和药品质量控制, (电子信箱)hjj1217@126.com。

中国民族民间医药, 2017, 26(7): 21-23.

[3] 尹东阁, 杜豫吉, 廖诗朗, 等. 中药制剂整体质量控制方法及中药对照提取物研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2025, 40(1): 337-342.

[4] 巨珊珊, 李耀磊, 林志健, 等. 中药质量控制模式的现状分析与思考[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(18): 269-274.

[5] 闫艳, 杜晨晖. 一测多评法在中药质量控制中的应用及研究进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2022, 24(6): 2378-2387.

[6] 冯亚茹, 周荣荣, 耿佳乐, 等. 一测多评法同时测定大黄药材中 8 个结合型蒽醌含量的系统研究[J]. 药物分析杂志, 2022, 42(11): 1884-1894.

[7] BAO YR, FENG YD, ZENG WZ, et al. Application of fingerprint combined with QAMS in quality evaluation of *Blumea balsamifera* [J]. *J Ginseng Res*, 2021, 33(3): 21-27.

[8] 徐倩, 杨满琴, 鲍学梅, 等. HPLC 法同时测定十三味和中丸中 9 种成分[J]. 中成药, 2020, 42(2): 297-300.

[9] 吴璐叶, 杨正英, 于上林. 反相高效液相色谱法同时测定五味香连丸中 10 种成分含量[J]. 中国药业, 2024, 33(9): 114-118.

[10] 阮洪生, 张兆远. HPLC 法测定金荞麦药材中表儿茶素、金丝桃苷、槲皮苷的含量[J]. 人参研究, 2021, 33(4): 25-28.

[11] 田金苗, 李军帅, 王晓月, 等. UPLC 同时测定伤科跌打片中 6 种有效成分的含量[J]. 中国药品标准, 2024, 25(4): 366-371.

[12] 云南省药品监督管理局. 云南省药品监督管理局关于印发云南省医疗机构中药(民族药)制剂研究技术指导原则的通知[A/OL]. (2024-02-02)[2024-08-02]. <https://mpa.yn.gov.cn/newSite/ZwgkNewsView.aspx?ID=62ce82f4-efec-4748-bae8-d8e5c35def53>.

[13] 李怀伟, 王劲, 任仲丽, 等. 一测多评法同时测定蒲元和胃胶囊中 7 种成分含量[J]. 中国药业, 2024, 33(9): 110-114.

[14] 许庆, 肖植国, 钱洲, 等. 基于制剂中多种内参物的一测多评法测定双香消食化积胶囊中 5 种成分的含量[J]. 西北药学杂志, 2024, 39(6): 1-8.

[15] 郭威, 田雨晴, 沈庆国, 等. 一测多评法同时测定金藤清痹颗粒中 7 种成分的含量[J]. 中成药, 2024, 46(7): 2334-2338.

(收稿日期: 2025-01-21; 修回日期: 2025-05-27)

results were all lower than 5.0%. The average recoveries were 107.09%, 96.36%, and 99.48%, with RSDs of 2.20%, 5.60%, and 1.50% ( $n = 9$ ), respectively. **Conclusion** The established method is simple, accurate, sensitive, environmental contamination is low, which is suitable for the control of organic acid impurities in calcium ketophenylalanine.

**Key words:** ion chromatography; calcium ketophenylalanine; organic acid impurity; DL-3-phenyllactic acid; phenylacetic acid; benzoic acid

酮苯丙氨酸钙, 化学名2-氧代-3-苯基丙氨酸钙, 是酮苯丙氨酸的钙盐形式。对于慢性肾脏病(CKD)患者, 酮苯丙氨酸可在转氨酶(如苯丙氨酸转氨酶)或脱氢酶(如苯丙氨酸脱氢酶)催化下通过还原氨基化反应, 利用尿素氮合成相应的人体必需氨基酸(即苯丙氨酸), 从而减少体内氮代谢废物的积累<sup>[1-3]</sup>, 缓解尿毒症症状, 同时通过尿素氮的再利用, 可降低血尿素氮水平, 减轻肾脏负担<sup>[4-5]</sup>。此外, 作为一种钙盐, 酮苯丙氨酸钙还能提供生物可利用的钙, 改善CKD患者的低钙血症症状<sup>[6-7]</sup>。酮苯丙氨酸钙制备过程中易生成包括DL-3-苯基乳酸、苯乙酸、苯甲酸在内的小分子有机酸类杂质。目前, 国内外主流药典均未收载该品, 国内生产企业多采用离子交换色谱法以硫酸溶液为流动相对该品中未知杂质及杂质总量进行控制, 未对上述有机酸杂质进行控制且方法专属性、耐用性均较差。近年来, 离子色谱法测定有机酸的应用已有较多报道<sup>[8-11]</sup>, 该法具有灵敏度高、选择性强等优势, 且淋洗液由仪器自动生成, 操作简单、绿色环保。本研究中建立了测定酮苯丙氨酸钙原料药中上述有机酸杂质的离子色谱法, 旨在为酮苯丙氨酸钙原料药的质量控制提供技术支持。现报道如下。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

Dionex ICS-6000型色谱仪(美国Thermo Fisher公司); XPE205DU型电子分析天平(瑞士Mettler Toledo公司, 精度为0.01 mg); Vibax VXR basic型涡旋仪(德国IKA公司); Milli-Q型纯水机(德国Merck Millipore公司)。

### 1.2 试剂

14批酮苯丙氨酸钙原料药, 均为《中国药典》标准

提高样品, 由国内5家生产企业提供(编号A-E), 批号分别为C022170917、C022170916、C022170920、170501、170502、170601, BB170601、BB170602、BB170603, Y1609101、Y1609102、Y1609103, 052101711、052101710(编号S1-S14); DL-3-苯基乳酸对照品(批号为BCBV2363, 含量98%), 苯甲酸对照品(批号为MK-BV5544V, 含量100%), 苯乙酸对照品(批号为20140112, 含量99.9%), 均来自浙江新和成股份有限公司; 试验所用试剂均为分析纯, 水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

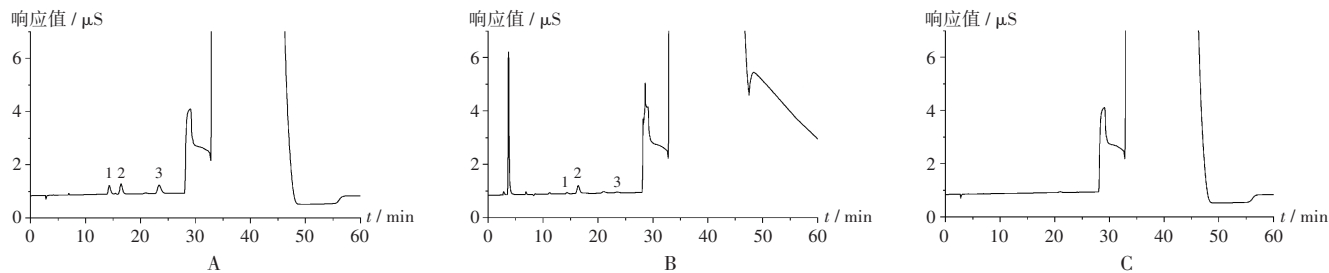
分析柱: Dionex IonPac AS11-HC柱(250 mm × 4.0 mm); 保护柱: Dionex IonPac AG11-HC柱(50 mm × 4.0 mm); 淋洗液: 氢氧化钾溶液, 梯度洗脱(0~25 min时10 mmol/L, 25.1~35 min时40 mmol/L, 35.1~60 min时10 mmol/L); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 25 μL。

### 2.2 溶液制备

取DL-3-苯基乳酸、苯甲酸与苯乙酸对照品各适量, 精密称定, 用水溶解并制成每1 mL中约含各成分75 μg的混合对照品贮备液。取适量, 用水稀释, 制成每1 mL约含各成分7.5 μg的混合对照品溶液。取样品约0.1 g, 置20 mL容量瓶中, 加水适量, 振摇使溶解, 用水定容, 即得供试品溶液。以水为空白溶剂。

### 2.3 方法学考察

专属性试验: 取2.2项下混合对照品溶液、供试品溶液及空白溶剂各适量, 按2.1项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。结果空白溶剂及供试品溶液中其他杂质峰均不干扰目标杂质峰的检测, 分离度良好。见图1。



1. DL-3-苯基乳酸 2. 苯乙酸 3. 苯甲酸  
A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 空白对照品溶液

图1 离子色谱图

1. DL-3-phenyllactic acid 2. Phenylacetic acid 3. Benzoic acid  
A. Mixed reference solution B. Test solution C. Blank solvent

Fig. 1 Ion chromatograms

线性关系考察:分别精密量取混合对照品贮备液1,1,2,3,5,10 mL,各置50,20,20,20,25,20 mL容量瓶中,用水定容,摇匀,制得系列对照品溶液。取适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度( $X, \mu\text{g}/\text{mL}$ )为横坐标、峰面积( $Y$ )为纵坐标进行线性回归。结果见表1。

表1 线性关系与检测限、定量限考察结果

Tab.1 Results of linear relation, LOD and LOQ

待测成分	回归方程	线性范围 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	$r$	检测限 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	定量限 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
DL-3-苯基乳酸	$Y_1 = 0.0205X_1 - 0.0141$	1.5185~37.9620	0.9997	0.3037	0.7592
苯乙酸	$Y_2 = 0.0248X_2 - 0.0061$	1.5405~38.5115	0.9999	0.3081	0.7702
苯甲酸	$Y_3 = 0.0324X_3 - 0.0060$	1.5730~39.3250	1.0000	0.3146	0.7865

检测限与定量限考察:精密量取2.2项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,按2.1项下色谱条件进样测定,以信噪比( $S/N$ )约为3:1,10:1时的质量浓度作为检测限和定量限。结果见表1。

精密度试验:取2.2项下混合对照品溶液适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果DL-3-苯基乳酸、苯乙酸、苯甲酸峰面积的RSD分别为0.32%,0.71%,0.09%( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取2.2项下混合对照品溶液与供试品溶液适量,室温放置0,7,9,18,30,42,66,85 h时按2.1项下色谱条件进样,记录峰面积。结果混合对照品溶液各杂质峰面积的RSD均小于5.0%( $n=8$ ),供试品溶液中各杂质检出量的绝对差值均小于0.02%( $n=8$ ),表明混合对照品溶液与供试品溶液室温放置85 h内基本稳定。

重复性试验:取样品(批号为C022170917)适量,精密称定,各6份,按2.2项下方法制备供试品溶液,再按

2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果DL-3-苯基乳酸、苯乙酸、苯甲酸平均含量分别为0.02%,0.12%,0.01%( $n=6$ ),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量样品(批号为170502)约0.1 g,精密称定,共9份,置20 mL容量瓶中,分别精密加入2.2项下对照品贮备液1.0,2.0,3.0 mL,加水溶解并定容,按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率。结果见表2。

耐用性试验:取2.2项下系统适用性溶液、混合对照品溶液与供试品溶液(批号为C022170917)各适量,分别在不同淋洗液浓度(8,10,12 mmol/L),柱温(25,30,32 °C)、流速(0.9,1.0,1.1 mL/min)条件下,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果在较小范围内改变测定条件时,DL-3-苯基乳酸、苯甲酸与苯乙酸色谱峰及相邻色谱峰之间的分离度均大于2.0,且各杂质检出量无明显差异,表明方法耐用性良好。

#### 2.4 样品中杂质含量测定

取5家企业14批样品,按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并按外标法计算含量。结果见表3。

### 3 讨论

#### 3.1 色谱柱选择

色谱柱的选择对于目标杂质峰的分离很重要,预试验中比较了药物分析中常用阴离子分析柱Dionex IonPac AS18柱(250 mm × 4.0 mm)与Dionex IonPac AS11-HC柱(250 mm × 4.0 mm)的分离效果。结果显示,使用后者进行浓度梯度洗脱时,各有机酸杂质峰峰形较好、灵敏度较高且保留时间适宜。试验中色谱图25 min以后的色谱峰为淋洗液浓度升高后洗脱出来

表2 加样回收试验结果( $n=9$ )

Tab.2 Results of the recovery test( $n=9$ )

取样量 (mg)	样品含量( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )			加入量( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )			测得量( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )			回收率(%)			$\bar{X}$ (%)			RSD(%)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
100.40	0.48	1.91	0.00	3.80	3.85	3.93	4.68	5.31	3.90	110.64	88.33	99.11						
101.72	0.48	1.93	0.00	3.80	3.85	3.93	4.42	5.33	3.80	103.72	88.19	96.69						
100.67	0.48	1.91	0.00	3.80	3.85	3.93	4.45	5.46	3.86	104.64	92.27	98.13						
101.05	0.48	1.92	0.00	7.59	7.70	7.87	8.64	9.60	7.83	107.53	99.77	99.53						
101.63	0.48	1.93	0.00	7.59	7.70	7.87	8.70	9.56	7.89	108.22	99.12	100.33	107.09	96.36	99.48	2.20	5.60	1.50
103.45	0.49	1.96	0.00	7.59	7.70	7.87	8.54	9.44	7.77	105.99	97.04	98.77						
102.22	0.49	1.94	0.00	11.39	11.55	11.80	12.93	13.72	11.88	109.25	101.93	100.73						
101.20	0.48	1.92	0.00	11.39	11.55	11.80	12.86	13.69	11.84	108.68	101.90	100.35						
100.95	0.48	1.92	0.00	11.39	11.55	11.80	12.45	13.32	11.99	105.15	98.71	101.64						

注:1、2、3分别指DL-3-苯基乳酸、苯乙酸、苯甲酸。

Note:1,2,and 3 indicates DL-3-phenylactic acid,2-phenylacetic acid,and 3-benzoic acid,respectively.

表3 样品中杂质含量测定结果

生产企业	编号	DL-3-苯基乳酸	苯乙酸	苯甲酸
A	S1	0.02	0.13	0.02
	S2	0.02	0.17	0.02
	S3	0.02	0.37	0.04
B	S4	0.01	0.03	ND
	S5	0.01	0.04	ND
	S6	0.01	0.11	ND
C	S7	0.02	0.40	ND
	S8	0.02	0.39	ND
	S9	0.02	0.50	ND
D	S10	0.03	0.18	ND
	S11	0.03	0.20	ND
	S12	0.03	0.21	ND
E	S13	ND	0.04	ND
	S14	ND	0.21	ND

注:ND为检出量低于检测限。

Note:ND indicates that the detected level is below the LOD.

的主成分酮苯丙氨酸钙峰、空白溶剂中可能存在的硫酸根离子等较难洗脱离子峰及相应的基线抬升导致。

### 3.2 淋洗液浓度选择

预试验中考察了等度洗脱阶段氢氧化钾淋洗液浓度分别为5, 10, 15 mmol/L时的分离情况。结果显示,当淋洗液浓度为5 mmol/L时洗脱能力较弱、分析时间过长;调整为10 mmol/L时,各有机酸杂质峰之间的分离度均不低于2.5,且30 min内出峰完毕;提高至15 mmol/L时,各有机酸杂质峰之间的分离度略有下降且DL-3-苯基乳酸峰与溶剂中一未知离子峰合并出峰。综合考虑,选择10 mmol/L作为等度洗脱阶段氢氧化钾淋洗液浓度。此外,鉴于主成分酮苯丙氨酸钙在色谱柱中保留能力较强且溶剂水中可能存在硫酸根等较难洗脱的阴离子,本试验中在等度洗脱阶段后增加了氢氧化钾淋洗液(浓度为40 mmol/L)的强洗脱阶段,以避免系统干扰。

### 3.3 样品测定结果分析

5家企业共14批样品中有机酸杂质的测定结果显示:1)不同企业样品呈不同的杂质分布,如企业A样品中3种有机酸杂质均有检出,企业B、C、D样品中仅检出DL-3-苯基乳酸、苯甲酸,而企业E样品中仅检出苯乙酸;2)各企业样品中主要存在的有机酸杂质均为苯乙酸,不同企业样品中该杂质含量存在明显差异,且不同批次样品检出量跨度较大(0.03%~0.50%);3)根据酮苯丙氨酸钙的合成工艺<sup>[12-13]</sup>,苯乙酸可能为中间体苯丙酮酸脱羧形成的工艺杂质,根据文献报道亦有可

能为本品贮藏过程中形成的降解杂质<sup>[14-15]</sup>,提示相关企业需优化生产工艺与贮藏条件。

### 3.4 小结

本研究中建立的方法操作简便、结果准确、灵敏度高,且对环境污染小,可用于酮苯丙氨酸钙原料药中有机酸杂质(DL-3-苯基乳酸、苯乙酸、苯甲酸)的控制。

### 参考文献

- [1] SHAH AP, KALANTAR - ZADEH K, KOPPLE JD. Is There a Role for Ketoacid Supplements in the Management of CKD? [J]. American Journal of Kidney Diseases, 2015, 65(5): 659 - 673.
- [2] VAN WEGBERG AMJ, VAN DER WEERD JC, ENGELKE UFH, et al. The clinical relevance of novel biomarkers as outcome parameter in adults with phenylketonuria [J]. Inherit Metab Dis, 2024, 47(4): 624 - 635.
- [3] LIU J, BAI Y, FAN TP, et al. Unveiling the Multipath Biosynthesis Mechanism of 2 - Phenylethanol in Proteus mirabilis [J]. Agric Food Chem, 2020, 68(29): 7684 - 7690.
- [4] LEGENDRE F, MACLEAN A, APPANNA VP, et al. Biochemical pathways to  $\alpha$  - ketoglutarate, a multi - faceted metabolite [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2020, 36(8): 123.
- [5] BRAVO INIGUEZ A, DU M, ZHU MJ.  $\alpha$  - Ketoglutarate for Preventing and Managing Intestinal Epithelial Dysfunction [J]. Advances in Nutrition, 2024, 15(4): 100200.
- [6] MURPHY HJ, CAHILL JB, TWOMBLEY KE, et al. Early Continuous Renal Replacement Therapy Improves Nutrition Delivery in Neonates During Extracorporeal Life Support Murphy [J]. Journal of Renal Nutrition, 2018, 28(1): 64 - 70.
- [7] 王文博, 许焱, 刘凤华, 等. 复方 $\alpha$ -酮酸联合血液透析和血液灌流治疗慢性肾衰竭的疗效及对钙磷代谢的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2020, 20(6): 1189 - 1192.
- [8] 母芹, 罗誓言, 姚诚, 等. 离子色谱法测定维格列汀片中基因毒性杂质氯乙酸含量 [J]. 中国药业, 2025, 34(3): 76 - 78.
- [9] 肖菁, 王蓉蓉, 张俊, 等. 离子色谱法同时测定低分子量肝素钠注射液中的有机酸和无机阴离子 [J]. 中南药学, 2024, 22(8): 2187 - 2190.
- [10] 王秀莉, 于雪荣, 刘柏林, 等. 离子色谱法同时测定水中氟化物和5种低分子有机酸 [J]. 分析试验室, 2025, 44(1): 122 - 127.
- [11] 莫利涛, 周云, 胡雷霞, 等. 离子色谱法检测短链脂肪酸的研究进展 [J]. 分析测试技术与仪器, 2024, 30(5): 310 - 320.
- [12] 周景良, 石秀伟, 郝宏山, 等.  $\alpha$ -酮苯丙氨酸钙的合成 [J]. 精细化工中间体, 2010, 40(1): 31 - 32.
- [13] 陈旻, 汪笑秋. 苯丙酮酸及其钠盐制备的研究概况 [J]. 中国药业, 2011, 20(11): 79 - 80.
- [14] 潘晨, 付迪, 张兆利, 等. 酮苯丙氨酸钙原料药有关物质的鉴定与含量测定 [J]. 分析测试学报, 2015, 34(4): 412 - 414.
- [15] 黄丹, 徐威驰, 甘加明, 等. 复方 $\alpha$ -酮酸片质量研究 [J]. 中国药物评价, 2022, 39(6): 466 - 472.

(收稿日期:2025-03-04;修回日期:2025-07-19)