

# LC/MS 用于匹多莫德有关物质结构鉴定

周瑞琪<sup>1</sup>, 刘 洁<sup>2</sup>, 刘 辉<sup>2</sup>, 杭太俊<sup>1</sup>

(1. 中国药科大学药物分析教研室, 江苏 南京 210009;

2. 海南省食品药品检验所, 海南 海口 570100)

**摘要:**采用液相色谱-质谱(LC/MS)技术鉴定匹多莫德的有关物质, 选取 Sepax GP-C8 色谱柱(250 mm×4.6 mm×5 μm), 以甲醇-三氟乙酸溶液为流动相, 梯度洗脱, 对匹多莫德有关物质进行分离; 采用电喷雾正离子化-高分辨飞行时间质谱法(ESI-TOF MS)测定各有关物质离子的准确质量和元素组成, 三重四极杆串联质谱(ESI-MS/MS)测定子离子特征。结果表明: 在所建立条件下, 匹多莫德及其有关物质的分离良好, 检测并鉴定出 11 个主要有关物质。该技术能有效地分离鉴定匹多莫德中的有关物质, 其鉴定结果可为质量控制和工艺优化提供参考。

**关键词:**匹多莫德; 有关物质; 降解产物; 结构鉴定; 液相色谱-质谱(LC/MS)

**中图分类号:** O657.63      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1004-2997(2017)04-0433-10

**doi:** 10.7538/zpxb.2016.0207

## Identification of the Related Substances of Pidotimod by LC/MS

ZHOU Rui-qi<sup>1</sup>, LIU Jie<sup>2</sup>, LIU Hui<sup>2</sup>, HANG Tai-jun<sup>1</sup>

(1. *China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;*

2. *Hainan Provincial Institute for Drug and Food Control, Haikou 570100, China*)

**Abstract:** Pidotimod (3-*L*-pyroglutamyl-*L*-thiazolidine-4 carboxylic acid) is a synthetic dipeptide molecule with immunomodulatory properties. Since the early 90's, a wide scientific production has been published about it. As it's effective in the treatment of people infected with bacteria and viruses, it is used in the treatment of repeated infections of the respiratory, urogenital, and ear, nose, throat systems. Pidotimod therapy is a reliable, simple, and safe approach to treat children with recurrent respiratory infections. Liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS) method has been used for determination of pidotimod in different biological matrices. Only a few HPLC-UV methods have been reported for the quantification of the related substances in pidotimod and its formulation. The reported LC/MS methods usually use formic acid or acetic acid in the mobile phase which are not suitable for UV detector, and the separation is not feasible for the related substances. And the reported HPLC-UV methods usually use phosphate and phosphoric acid in the mobile phase which are not suitable for mass spectrom-

收稿日期: 2016-12-22; 修回日期: 2017-05-10

作者简介: 周瑞琪(1991—), 女(汉族), 山东人, 硕士研究生, 药物分析专业。E-mail: ruiqi\_qiqi@163.com

通信作者: 杭太俊(1963—), 男(汉族), 江苏人, 博士生导师, 从事药物分析研究。E-mail: hangtj@cpu.edu.cn

etry detector. However, there is no reliable LC/MS method for identification of the related substances in pidotimod. In this paper, a LC/MS method was developed for the separation and characterization of process related substances and the major degradation products in pidotimod. Electrospray positive ionization high resolution time-of-flight mass spectrometer (ESI-TOF MS) was used for the determination of the accurate mass and elemental composition of the parent ions of the related substances, and triple quadrupole tandem mass was employed for the product mass spectra determination. The separation was performed on a Sepax GP-C8 column (250 mm×4.6 mm×5 μm) using 0.005% trifluoroacetic acid (TFA) in water as mobile phase A and methanol as mobile phase B. The flow rate was 1.0 mL/min and the column temperature was set at 30 °C. Analytes were monitored at 210 nm. The injection volume was 20 μL. Pidotimod was tending to degrade under acid, alkaline, oxidative, thermal stress and photolytic stress. The structures of the related substances were then figured out through elucidation of the fragment ions. A total of 11 related substances were detected and characterized, including process related substances (related substances 1 and 4) and degradation products. Related substances 4 and 10 were identified by synthetic reference and related substances 1, 2, 8 and 9 were reported before this study, while related substances 3, 5, 6, 7 and 11 were reported for the first time. The method is effective for separation and identification of the related substances of pidotimod, and the results are useful for the quality control and process optimization of pidotimod.

**Key words:** pidotimod; related substances; degradation products; structure identification; liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS)

匹多莫德 (pidotimod, (*R*)-3-[(*S*)-(5-氧代-2-吡咯烷基)羰基]-四氢噻唑-4-羧酸) 是一种化学合成的口服免疫促进剂, 其化学结构类似于二肽, 示于图 1。20 世纪 80 年代后期, 该化合物由意大利 Poli 化学公司成功合成, 并于 1993 年获准上市应用于临床, 目前上市剂型有片剂、胶囊、口服溶液和散剂等<sup>[1]</sup>。它既可以促进非特异性免疫反应, 又可以促进特异性免疫反应, 具有显著的抗病毒、抗感染、抗氧化和抗刺激等作用<sup>[2-4]</sup>。匹多莫德可以用于多种疾病的辅助治疗, 比如, 临床上常用于呼吸道疾病的预防及治疗<sup>[5-9]</sup>, 及细菌感染、病毒感染和复发

性口疮、白癜风、过敏性紫癜等与免疫功能失衡的有关疾病的治疗<sup>[3,10-11]</sup>。

关于匹多莫德的质量研究和生物样本分析已有文献报道<sup>[12-19]</sup>, 其中涉及到的液相色谱-质谱 (LC/MS) 方法的建立尚不完善。该方法多在流动相中添加甲酸和乙酸等存在末端吸收的成分<sup>[12-16]</sup>, 对匹多莫德及其有关物质的紫外吸收干扰较大, 目前仍未有完善的 LC/MS 方法对匹多莫德有关物质进行分析鉴定。有关物质检测方法的液相条件多在流动相中添加磷酸和磷酸盐等非挥发性物质<sup>[17-19]</sup>, 不适用于 LC/MS 检测。

本工作拟建立适用于匹多莫德有关物质检查的 LC/MS 方法, 通过飞行时间质谱 (TOF MS) 和三重四极杆串联质谱 (MS/MS) 分别测定有关物质的准确质量和二级质谱, 并且通过与对照品比对、二级质谱裂解解析、合成工艺分析, 推测它们的结构, 希望为匹多莫德的生产工艺和质量控制提供方法参考和依据。

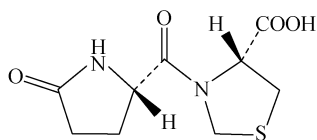


图 1 匹多莫德的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of pidotimod

## 1 实验部分

### 1.1 主要仪器与装置

1290 Infinity 液相色谱-6224 飞行时间质谱仪:美国 Agilent 公司产品,配有二极管阵列检测器、电喷雾离子源和 MassHunter 工作站;TSQ Quantum Ultra AM 型 MS/MS 联用仪:美国 Thermo 公司产品,配有电喷雾离子源和 Xcalibur3.0 数据处理系统。

### 1.2 试剂与试剂

匹多莫德原料药(批号:04.1015-160613);浙江仙琚制药股份有限公司产品;杂质 A、B 对照品:江苏吴中医药集团有限公司苏州制药厂产品;三氟乙酸:纯度 99%,萨恩化学技术有限公司产品;甲醇:色谱纯,美国 Tedia 公司产品;去离子水:杭州娃哈哈公司产品。

### 1.3 实验条件

**1.3.1 色谱条件** 色谱柱为 Sepax GP-C8 (250 mm × 4.6 mm × 5 μm);流动相:A 为 0.005% 三氟乙酸溶液, B 为甲醇;线性梯度洗脱:0 min(95% A) → 20 min(95% A) → 35 min(90% A) → 36 min(95% A) → 40 min(95% A);流速 1 mL/min;柱温 30 °C;进样量 20 μL;检测波长 210 nm。

**1.3.2 TOF MS 质谱条件** 电喷雾离子源,正离子检测模式;喷雾电压 3.5 kV;雾化器压力 275 kPa;流量 12 L/min;温度 350 °C;碎片电压 135 V;参比离子  $m/z$  121.050 873(质子化嘌呤,  $C_5H_5N_4^+$ ) 和  $m/z$  922.009 798(质子化氟代磷嗪 HP-921,  $C_{18}H_{19}O_6N_3P_3F_{24}^+$ );质量扫描范围  $m/z$  100~1 000。

**1.3.3 MS/MS 质谱条件** 三重四极杆质谱电喷雾离子源,正离子检测模式;喷雾电压 3.5 kV;鞘气( $N_2$ )压力 310 kPa;辅助气( $N_2$ )压力 10 kPa;毛细管温度 350 °C;碰撞气(Ar) 0.20 Pa;碰撞能量 10~30 eV。

### 1.4 样品制备

**1.4.1 供试品溶液的制备** 精密称定 10 mg 匹多莫德原料药,置于 10 mL 容量瓶中,加入甲醇-水溶液(5:95, V/V)溶解样品并稀释至刻度,摇匀即得供试品溶液。精密量取适量上述溶液,加溶样液定量稀释,分别制成 1% 和 0.1% 的自身对照溶液。

**1.4.2 对照品溶液的制备** 取适量各对照品,

分别精密称定,加溶样液溶解并定量稀释成 1 g/L 样品;各取 1 mL 对照品溶液和碱破坏样品,混合均匀,即得混合对照品溶液。

**1.4.3 强制降解实验溶液的制备** 强制降解条件如下:酸破坏(1 mL 4 mol/L HCl, 室温, 3 h), 碱破坏(1 mL 1 mol/L NaOH, 室温, 2 h), 氧化破坏(1 mL 3%  $H_2O_2$ , 室温, 5 min), 热破坏(2 mL 溶样液, 90 °C 水浴, 5 h) 和光照破坏(4 500 lx ± 500 lx, 15 d)。酸破坏和碱破坏在稀释前使用相应的 NaOH 溶液和 HCl 溶液中和, 所有破坏样品最终使用溶样液稀释成约含 1 g/L 的强制降解实验溶液。

## 2 结果与讨论

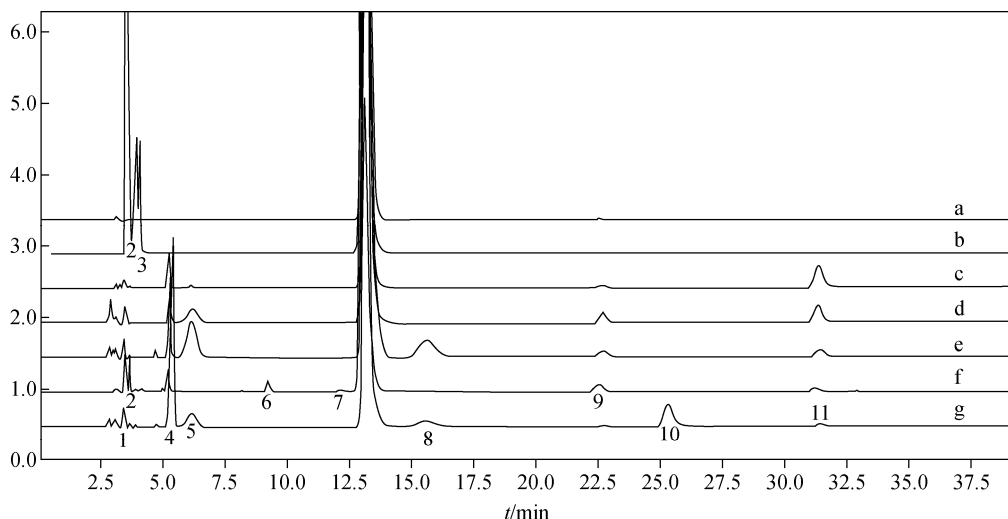
### 2.1 有关物质检测

本实验采用 HPLC 法分析匹多莫德有关物质,在优化的色谱条件下,匹多莫德原料药及强制降解实验供试溶液的各有关物质均得到良好分离,测得的各有关物质保留时间从小到大依次编号,其色谱图示于图 2。图 2a 显示原料药中杂质含量较少,采用自身 0.1% 对照法估算有关物质含量,只有杂质 9 的含量大于 0.1%。强制降解实验结果表明:在氧化条件下主要降解为有关物质 2 和 3(图 2b);在高温条件下主要降解为有关物质 1、4、9 和 11(图 2c);在强酸条件下主要降解为有关物质 1、4、5、9 和 11(图 2d);在强碱条件下主要降解为有关物质 1、4、5、8、9 和 11(图 2e);在光照条件下主要降解为有关物质 1、2、4、6、7、9 和 11(图 2f)。未在供试品及强制降解样品中检测到杂质对照品 B(有关物质 10)。

### 2.2 有关物质结构分析

HPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF MS 测得各有关物质母离子的准确质量与离子组成,三重四极杆质谱获取二级质谱碎片信息,通过与匹多莫德及其有关物质对照品二级质谱碎片离子的对比分析,鉴定各有关物质结构,结果示于表 1 和图 3。

ESI<sup>+</sup>-TOF MS 测得匹多莫德  $[M+H]^+$  离子的准确质量为 245.058 3,与离子式  $C_9H_{13}N_2O_4S^+$  相应,MS/MS 主要特征碎片离子为  $m/z$  227、199、134、88、84;匹多莫德的二级碎片离子中,  $m/z$  88 碎片与有关物质 10 一致,来源于相同的噻唑烷结构;  $m/z$  84 碎片与有关物质 4—



注:a. 原料药供试品;b. 氧化破坏;c. 高温破坏;d. 酸破坏;e. 碱破坏;f. 光照破坏;g. 混合对照品

图2 匹多莫德及其强制降解样品的高效液相色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of pidotimod and the degradation samples from stress tests

表1 匹多莫德有关物质结构的LC-TOF MS和LC-MS/MS鉴定结果

Table 1 Identified results of related substances of pidotimod by LC-TOF MS and LC-MS/MS

有关物质 Related substances	保留时间 $t_R$ / min	母离子分子式 Parent ion formulas	准确质量 Exact mass ( $m/z$ )	偏差 Deviations/ $10^{-6}$	二级质谱碎片离子 Fragment ions ( $m/z$ )
1	3.4	$C_4H_8NO_2S^+$	134.0266	3.07	88
2	3.6	$C_9H_{13}N_2O_5S^+$	261.0511	10.99	243, 225, 215, 197, 150, 132, 104, 84
3	4.0	$C_9H_{11}N_2O_4S^+$	243.0404	12.25	225, 215, 197, 132, 104, 84
A/4	5.1	$C_5H_8NO_3^+$	130.0499	-2.59	84
5	6.1	$C_9H_{15}N_2O_5S^+$	263.0694	0.99	245, 227, 134
匹多莫德	13.2	$C_9H_{13}N_2O_4S^+$	245.0583	3.08	227, 199, 134, 88, 84
6	9.3	$C_3H_6NOS^+$	104.0165	-0.3	86, 60, 58, 45
7	12.0	$C_9H_{13}N_2O_5S^+$	261.0553	-5.07	215, 84
8	15.5	$C_9H_{13}N_2O_4S^+$	245.0589	0.78	227, 188, 134, 88, 84
9	22.5	$C_9H_{11}N_2O_3S^+$	227.0488	-1.5	199, 181, 170, 88, 84
B/10	25.4	$C_6H_{12}NO_2S$	162.0583	-0.54	88
11	31.3	$C_9H_{13}N_2O_4S^+$	245.0590	0.16	227, 199, 88, 84

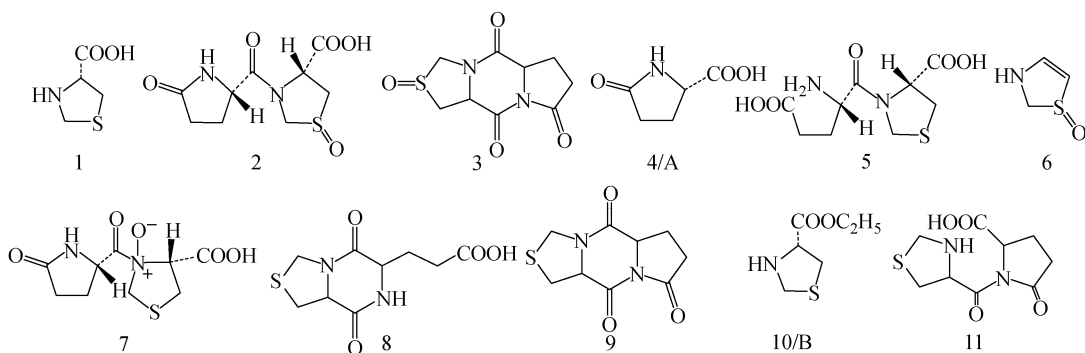


图3 匹多莫德有关物质结构图

Fig. 3 Chemical structures of the related substances of pidotimod

致,来自相同的吡咯烷酮结构; $m/z$  227 与  $[M+H]^+$  离子中氨基与羧基缩合脱去  $H_2O$  相应; $m/z$  134 为酰胺键断裂而产生的特征碎片; $m/z$  199 与  $[M+H]^+$  离子中噻唑烷环脱去

$HCOOH$  相应,该离子进一步发生酰胺键断裂产生  $m/z$  84 离子。匹多莫德的二级质谱分析结果示于图 4,该结果对其有关物质的解析确证具有参考意义。

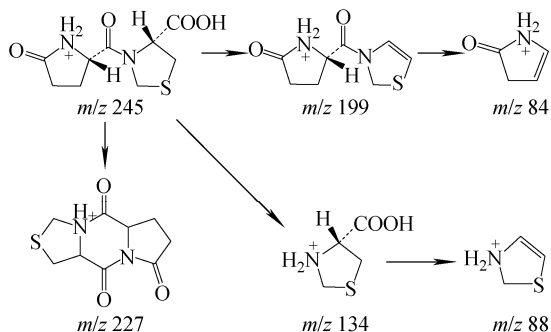
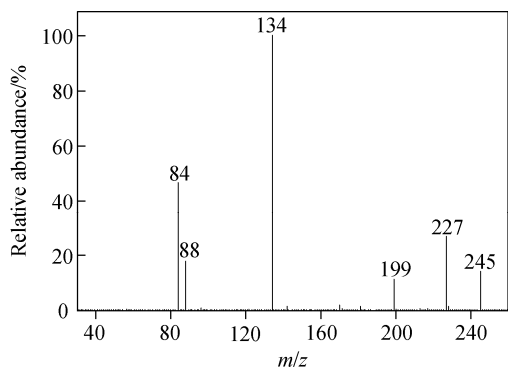


图 4 匹多莫德  $[M+H]^+$  ( $m/z$  245) 离子的二级质谱图及其裂解途径

Fig. 4 MS/MS spectrum of pidotimod  $[M+H]^+$  ( $m/z$  245) ion and its fragmentation pathways

有关物质 1: ESI<sup>+</sup>-TOF MS 测得有关物质 1  $[M+H]^+$  离子的准确质量为 134.026 6, 与离子式  $C_4H_8NO_2S^+$  相应, MS/MS 主要特征碎片离子为  $m/z$  88, 与噻唑烷结构相应。该有关物质在酸、碱、热和光照破坏中均有产生, 为易降解产生的杂质, 结合其质谱信息, 鉴定为匹多莫德两个环之间酰胺键的水解产物, 结果示于图 5。

有关物质 2: ESI<sup>+</sup>-TOF MS 测得有关物质 2  $[M+H]^+$  离子的准确质量为 261.051 1, 与离子式  $C_9H_{13}N_2O_5S^+$  相应, 比匹多莫德质量数多 16, 与增加 1 个氧原子相应; MS/MS 主要特征碎片离子为  $m/z$  243、225、215、197、150、132、104 和 84, 其中  $m/z$  243、150 均比匹多莫德相应的特征碎片离子  $m/z$  227 和 134 多 16, 故有关物质 2 可能为匹多莫德的噻唑烷环生成亚砷后的产物, 其质谱信息及裂解途径示于图 6。

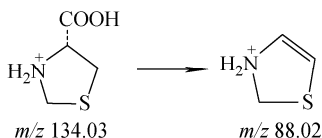
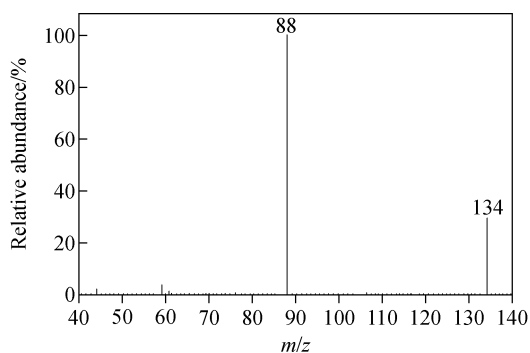


图 5 有关物质 1  $[M+H]^+$  ( $m/z$  134) 离子的二级质谱图及其裂解途径

Fig. 5 MS/MS spectrum of related substance 1  $[M+H]^+$  ( $m/z$  134) ion and its fragmentation pathways

有关物质 3: ESI<sup>+</sup>-TOF MS 测得有关物质 3  $[M+H]^+$  离子的准确质量为 243.040 4, 与离子式  $C_9H_{11}N_2O_4S^+$  相应, 比有关物质 2 质量数少 18, 与脱去一分子  $H_2O$  相应; MS/MS 主要特征碎片离子为  $m/z$  225、215、197、132、104 和 84, 均存在于有关物质 2 的二级碎片离子中, 故推测其为有关物质 2 的羧基与氨基缩合产生, 其质谱信息及裂解途径示于图 7。

有关物质 4: ESI<sup>+</sup>-TOF MS 测得有关物质 4  $[M+H]^+$  离子的准确质量为 130.049 9, 与离子式  $C_5H_8NO_3^+$  相应, MS/MS 主要特征碎片离子为  $m/z$  84, 测得其保留时间 ( $t_R = 5.1$  min) 和二级碎片离子均与有关物质 A 对照品一致。该有关物质在酸、碱、高温和光照破坏样品中均明显增加, 确证为 L-焦谷氨酸。

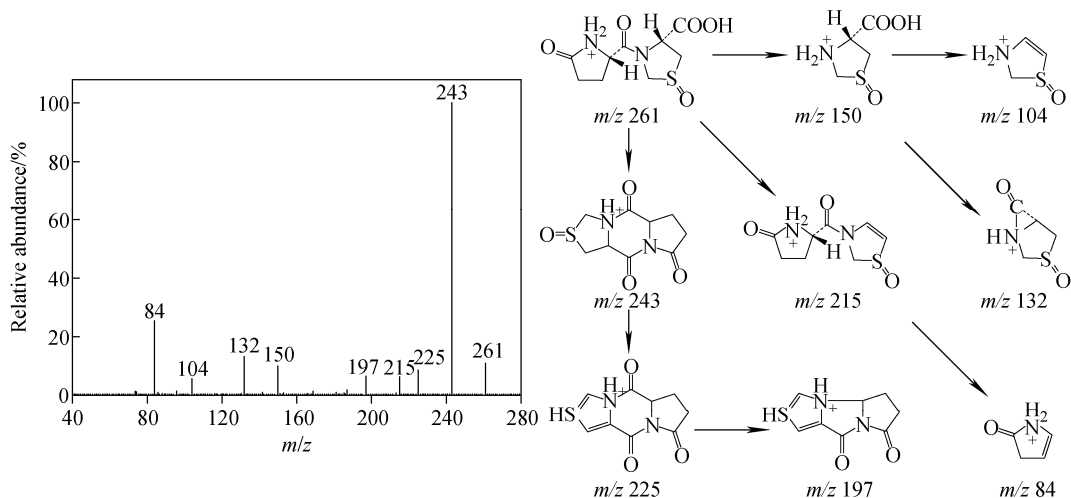


图 6 有关物质 2  $[M+H]^+$  ( $m/z$  261) 离子的二级质谱图及其裂解途径

Fig. 6 MS/MS spectrum of related substance 2

$[M+H]^+$  ( $m/z$  261) ion and its fragmentation pathways

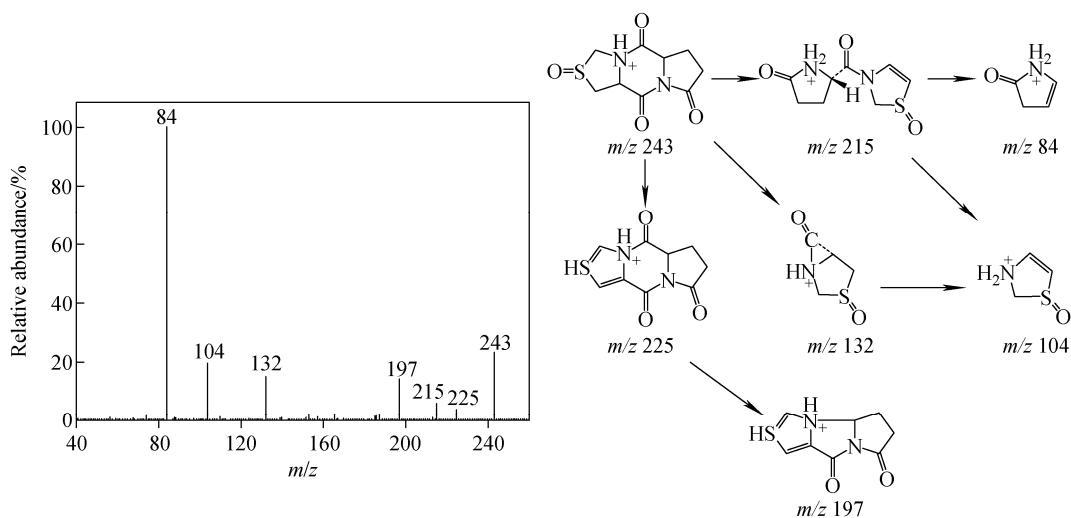


图 7 有关物质 3  $[M+H]^+$  ( $m/z$  243) 离子的二级质谱图及其裂解途径

Fig. 7 MS/MS spectrum of related substance 3

$[M+H]^+$  ( $m/z$  243) ion and its fragmentation pathways

有关物质 5: ESI<sup>+</sup>-TOF MS 测得有关物质 5  $[M+H]^+$  离子的准确质量为 263.069 4, 与离子式  $C_9H_{15}N_2O_5S^+$  相应, 比匹多莫德质量数多 18, 与增加一分子  $H_2O$  相应, MS/MS 主要特征碎片离子为  $m/z$  245、227、134。该有关物质在酸、碱和高温破坏样品中均明显增加, 其二级碎片离子与匹多莫德及其特征碎片一致, 故推测为吡咯烷酮环上的酰胺键水解产生, 其质谱信息及裂解途径示于图 8。

有关物质 6: ESI<sup>+</sup>-TOF MS 测得有关物

质 6  $[M+H]^+$  离子的准确质量为 104.016 5, 与离子式  $C_3H_6NOS^+$  相应, MS/MS 主要特征碎片离子为  $m/z$  86、60、58、45。该有关物质仅存在于光照破坏样品中, 分子质量较小, 且  $m/z$  104 存在于氧化破坏产生的有关物质 2 和 3 的二级碎片中, 故推测为氧化产物断裂产生的小分子有关物质, 其质谱信息及裂解途径示于图 9。

有关物质 7: ESI<sup>+</sup>-TOF MS 测得有关物质 7  $[M+H]^+$  离子的准确质量为 261.055 3,

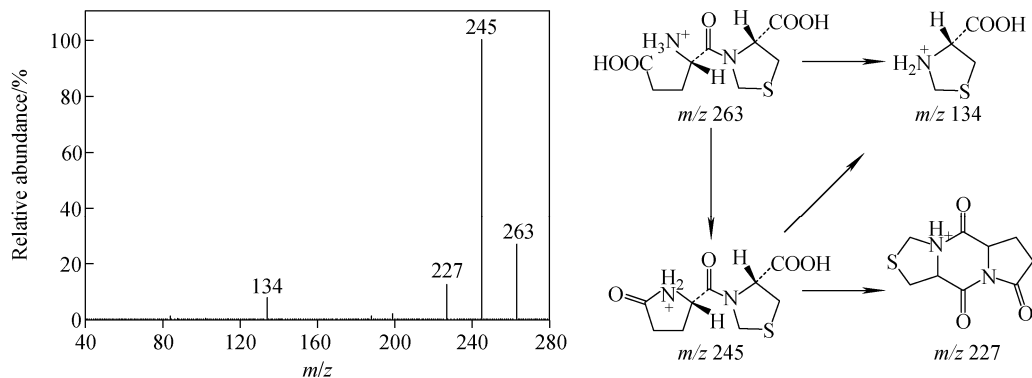
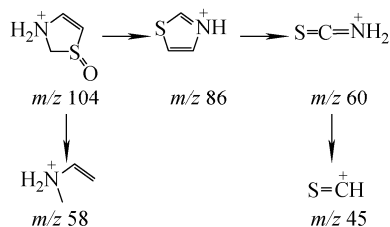
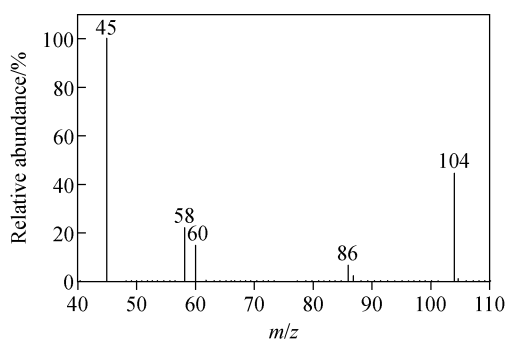
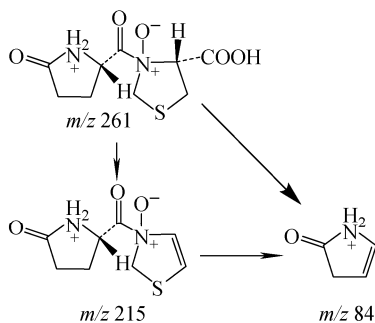
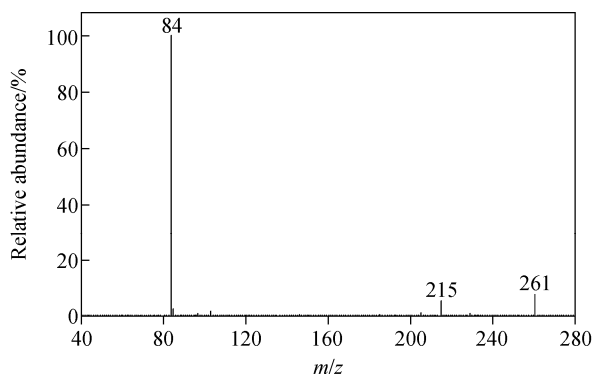
图 8 有关物质 5  $[M+H]^+$  ( $m/z$  263) 离子的二级质谱图及其裂解途径Fig. 8 MS/MS spectrum of related substance 5  $[M+H]^+$  ( $m/z$  263) ion and its fragmentation pathways图 9 有关物质 6  $[M+H]^+$  ( $m/z$  104) 离子的二级质谱图及其裂解途径

Fig. 9 MS/MS spectrum of related substance

6  $[M+H]^+$  ( $m/z$  104) ion and its fragmentation pathways

与离子式  $C_9H_{13}N_2O_5S^+$  相应, MS/MS 主要特征碎片离子为  $m/z$  215、84。该有关物质比匹多莫德质量数多 16, 可能为匹多莫德氧化产物, 其二级碎片离子  $m/z$  84 为吡咯烷酮结构特征碎片, 且无明显的噻唑烷结构碎片离子, 推测其噻唑烷结构发生变化不易在二级质谱中携带正电荷, 有关物质 7 为匹多莫德噻唑烷环的氮被氧化为氧化胺后的产物, 其质谱信息及裂解途径示于图 10。

有关物质 8: ESI<sup>+</sup>-TOF MS 测得有关物质 8  $[M+H]^+$  离子的准确质量为 245.0589, 与离子式  $C_9H_{13}N_2O_4S^+$  相应, MS/MS 主要特征碎片离子为  $m/z$  227、188、134、88、84, 该有关物质为碱破坏的典型产物, 与匹多莫德互为同分异构体, 二级碎片多数与匹多莫德一致,  $m/z$  188 为其特有的碎片离子, 推测为匹多莫德环合再水解产生的同分异构体, 其质谱信息及裂解途径示于图 11。

图 10 有关物质 7  $[M+H]^+$  ( $m/z$  261) 离子的二级质谱图及其裂解途径Fig. 10 MS/MS spectrum of related substance 7  $[M+H]^+$  ( $m/z$  261) ion and its fragmentation pathways

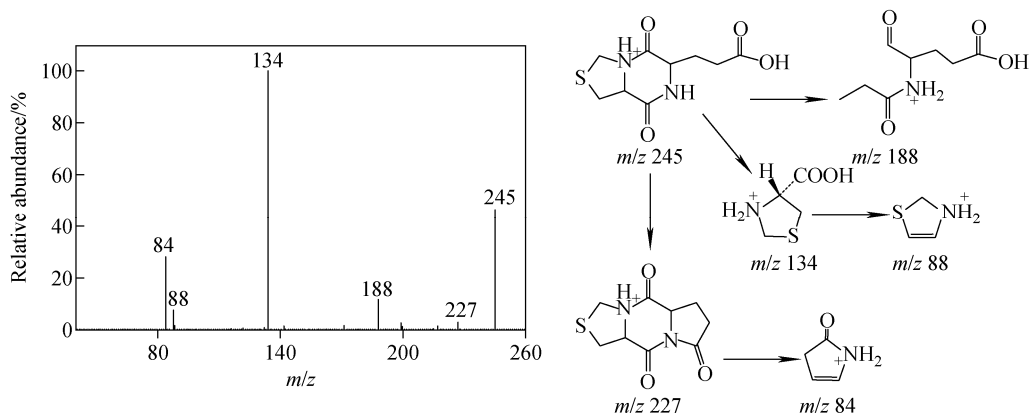


图 11 有关物质 8  $[M+H]^+$  ( $m/z$  245) 离子的二级质谱图及其裂解途径

Fig. 11 MS/MS spectrum of related substance 8

$[M+H]^+$  ( $m/z$  245) ion and its fragmentation pathways

有关物质 9: ESI<sup>+</sup>-TOF MS 测得有关物质 9  $[M+H]^+$  离子的准确质量为 227.048 8, 与离子式  $C_9H_{11}N_2O_3S^+$  相应, 比匹多莫德质量数少 18, 与脱去一分子  $H_2O$  相应; MS/MS 主要特征碎片离子为  $m/z$  199、181、170、88、84, 该有关物质在供试品和酸、碱、高温、光照样品中均被检测到, 为较易产生的杂质, 推测为匹多莫德分子内形成酰胺键环合产生, 其质谱信息及裂解途径示于图 12。

有关物质 10: ESI<sup>+</sup>-TOF/MS 测得有关物质 10 (杂质对照品)  $[M+H]^+$  离子的准确质量为 162.058 3, 与离子式  $C_6H_{12}NO_2S^+$  相应; MS/MS 主要特征碎片离子为  $m/z$  88, 该有关物质在强制降解实验样品和供试品中均未检

出,  $m/z$  88 碎片离子来源于其结构中的噻唑烷环, 有关物质 10 的二级质谱分析结果对其他有关物质的解析具有参考意义。

有关物质 11: ESI<sup>+</sup>-TOF MS 测得有关物质 11  $[M+H]^+$  离子的准确质量为 245.059 0, 与离子式  $C_9H_{13}N_2O_4S^+$  相应, 与匹多莫德质量数相同; MS/MS 主要特征碎片离子为  $m/z$  227、199、88、84, 与匹多莫德二级碎片离子相比,  $m/z$  134 的二级碎片离子不明显, 说明噻唑烷环相关结构发生变化, 该有关物质在酸、碱、高温和光照实验中含量均明显增加, 推测为匹多莫德分子内脱水缩合后异位酰胺键水解产生, 其质谱信息及裂解途径示于图 13。

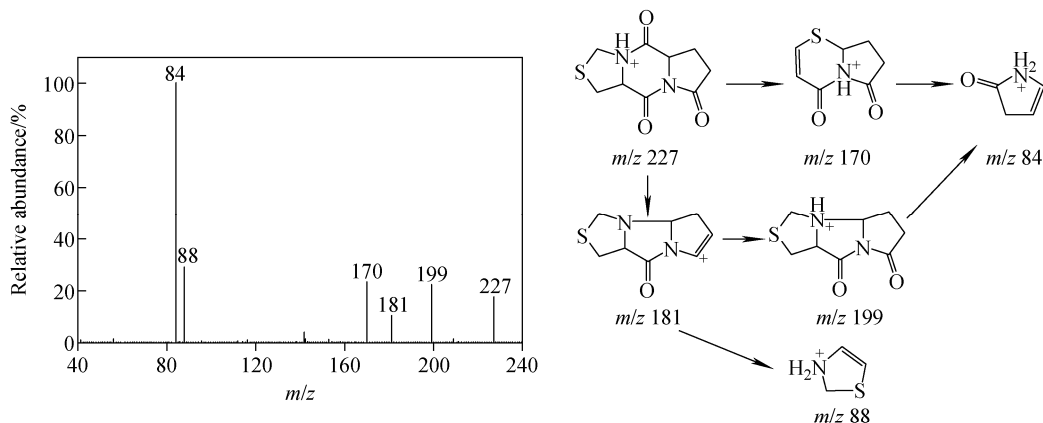


图 12 有关物质 9  $[M+H]^+$  ( $m/z$  227) 离子的二级质谱图及其裂解途径

Fig. 12 MS/MS spectrum of related substance 9

$[M+H]^+$  ( $m/z$  227) ion and its fragmentation pathways

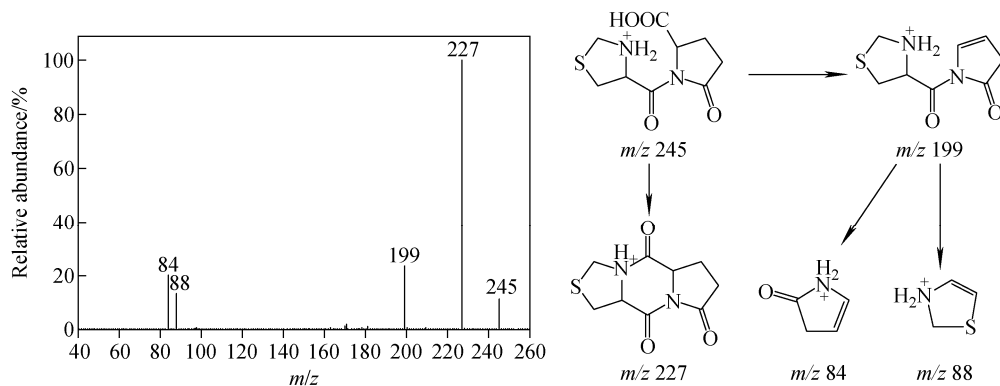


图 13 有关物质 11  $[M+H]^+$  ( $m/z$  245) 离子的二级质谱图及其裂解途径

Fig. 13 MS/MS spectrum of related substance 11

$[M+H]^+$  ( $m/z$  245) ion and its fragmentation pathways

### 3 结论

本研究建立了挥发性流动相液相色谱-质谱联用方法分析匹多莫德有关物质,匹多莫德与检出的 11 个主要有关物质均可得到有效分离。缓冲溶液 pH 值是影响色谱保留的关键因素,pH 降低可以增强高极性有关物质的色谱保留,而常用的甲酸和乙酸等 pH 调节剂对 210 nm 的检测波长干扰较大。为兼顾色谱分离和紫外检测灵敏度,本研究选用 0.005% 三氟乙酸溶液作为水相流动相,甲醇作为有机相流动相,结合梯度洗脱的色谱方法实现了匹多莫德与 11 种主要有关物质的良好分离。

本实验检出并鉴定了匹多莫德的 11 个主要有关物质,其中 2 个(有关物质 4、10)为已知杂质,4 个(有关物质 1、2、8、9)已有文献报道<sup>[17]</sup>,另外 5 个为未知杂质。根据杂质来源可将所有有关物质分为工艺杂质和降解杂质。有关物质 1~9 和 11 均在强制降解样品中明显增加,可归属于降解杂质;有关物质 1、4 和 10 作为起始原料或中间体参与匹多莫德的合成,故也有可能来源于合成工艺杂质。

### 参考文献:

[1] 李慧,王永军,孙进. 匹多莫德及其制剂的研究进展[J]. 中国药剂学杂志,2012,10(4):68-73.  
LI Hui, WANG Yongjun, SUN Jin. Progress of pidotimod and its preparation[J], Chinese Journal of Pharmaceutics, 2012, 10(4): 68-73 (in Chinese).

[2] ZUCCOTTI G V, MAMELI C. Pidotimod: the

past and the present[J]. Italian Journal of Pediatrics, 2013, 39(1): 75-77.

- [3] FERRARIO B E, GARUTI S, BRAIDO F, et al. Pidotimod: the state of art[J]. Clinical and Molecular Allergy, 2015, 13(1): 8-17.
- [4] 田新平,曾小峰. 新型合成免疫调节剂——匹多莫德[J]. 中国新药杂志,2005,14(1):111-114.  
TIAN Xinping, ZENG Xiaofeng. A new synthetic immunomodulator—pidotimod[J]. Chinese Journal of New Drugs, 2005, 14(1): 111-114 (in Chinese).
- [5] BOZZETTO S, PIRILLO P, CARRARO S, et al. Metabolomic profile of children with recurrent respiratory infections[J]. Pharmacological Research, 2017, 115: 162-167.
- [6] MANIKAM L, REED K, VENEKAMP R P, et al. Limited evidence on the management of respiratory tract infections in down's syndrome: a systematic review[J]. Pediatric Infectious Disease Journal, 2016, 35(10): 1 075-1 079.
- [7] ESPOSITO S, GARZIANO M, RAINONE V, et al. Immunomodulatory activity of pidotimod administered with standard antibiotic therapy in children hospitalized for community-acquired pneumonia[J]. Journal of Translational Medicine, 2015, 13(1): 288-297.
- [8] ZUCCOTTI G V, MAMELI C. Respiratory infections and immunostimulants in childhood: an update[J]. Journal of Pediatric and Neonatal Individualized Medicine, 2015, 4(2): e040218.
- [9] NAMAZOVA-BARANOVA L S, ALEKSEEVA A A, KHARIT S M, et al. Efficacy and safety

- of pidotimod in the prevention of recurrent respiratory infections in children: a multicentre study[J]. *International Journal of Immunopathology & Pharmacology*, 2014, 27(3): 413-419.
- [10] LI E, RUAN Y, QIAN C, et al. Streptococcal infection and immune response in children with Tourette's syndrome[J]. *Child's Nervous System*, 2015, 31(7): 1 157-1 163.
- [11] 庄俊鹏,林小燕,王璟. 匹多莫德临床应用进展[J]. *哈尔滨医药*, 2015, 35(5): 401-403.  
ZHUANG Junpeng, LIN Xiaoyan, WANG Jing. Advances in clinical application of pidotimod[J]. *Harbin Medical Journal*, 2015, 35(5): 401-403 (in Chinese).
- [12] MADHURI BAGHEL, SADHANA J, RAJPUT. HPLC Separation of pidotimod enantiomers using beta-cyclodextrin based chiral stationary phase[J]. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 2016, 6(7): 6 182-6 189.
- [13] WANG G, WANG Q, RAO T, et al. A robust LC-MS/MS method for the determination of pidotimod in different biological matrixes and its application to in vivo and in vitro pharmacokinetic studies[J]. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical & Life Sciences*, 2016, (1 023/1 024): 36-43.
- [14] HUANG J H, HUANG X H, WANG K, et al. Bioequivalence evaluation of two formulations of pidotimod using a limited sampling strategy[J]. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2013, 67(6): 475-480.
- [15] LOU H G, RUAN Z R, JIANG B. Quantitative determination of pidotimod in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry: application to a bioequivalence study[J]. *Arzneimittel-Forschung*, 2012, 62(2): 99-104.
- [16] CHEN H S, SHEN M, CHEN L Y. HILIC-MS-MS for the quantification of pidotimod in human plasma[J]. *Chromatographia*, 2011, 73(7): 767-773.
- [17] 毛柯,徐斌,孔蓉,等. 匹多莫德口服液中有关注物质的 HPLC 法测定[J]. *中国医药工业杂志*, 2016, 47(12): 1 568-1 572.  
MAO Ke, XU Bin, KONG Rong, et al. Determination of related substances of pidotimod oral solution by HPLC[J]. *Chinese Journal of Pharmaceuticals*, 2016, 47(12): 1 568-1 572 (in Chinese).
- [18] 王建,张翼,李毓,等. 高效液相色谱法测定匹多莫德片的含量及有关物质[J]. *西南大学学报:自然科学版*, 2015, 37(12): 178-184.  
WANG Jian, ZHANG Yi, LI Yu, et al. Determination of the contents of pidotimod and its related substances in the tablet products by HPLC[J]. *Journal of Southwest University: Natural Science Edition*, 2015, 37(12): 178-184 (in Chinese).
- [19] 方克忠,范锋,于治国. HPLC 法测定匹多莫德中的有关物质[J]. *沈阳药科大学学报*, 2014, 31(10): 772-777.  
FANG Kezhong, FAN Feng, YU Zhiguo. Determination of pidotimod and its related substances by HPLC[J]. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University*, 2014, 31(10): 772-777 (in Chinese).