

5- 酮基米尔贝霉素杂质谱的研究

朱明新 沈敢锋 滕云*

(浙江海正药业股份有限公司, 台州 318000)

摘要: **目的** 对发酵生产的 5- 酮基米尔贝霉素的杂质谱进行了研究。**方法** 采用制备硅胶色谱法, 以正庚烷 - 丙酮 (95:5, *V/V*) 为流动相, 从 5- 酮基米尔贝霉素 A3/A4 粗品中分离制备了两个工艺杂质 C、D, 以及两个降解杂质 E、F。通过质谱、核磁共振波谱法对 4 个杂质进行了结构确证。**结果** 通过 HPLC 图谱比对及液质联用确定了粗品液相色谱图中两个未知杂质峰 E、F 分别为 5- 酮基米尔贝霉素 A3、A4 的碱降解杂质。简要分析了上述杂质间的关系, 以及在米尔贝肟成品中的残留。**结论** 为 5- 酮基米尔贝霉素完整杂质谱研究奠定了基础, 也为 5- 酮基米尔贝霉素及成品米尔贝肟质量控制策略的制定提供了参考。

关键词: 5- 酮基米尔贝霉素; 杂质谱; 制备; 鉴定

中图分类号: R978.1+5 **文献标志码:** A

Study on the impurity profile of 5-keto milbemycin

Zhu Ming-xin, Shen Gan-feng and Teng Yun

(Zhejiang Hisun Pharmaceutical Co., Ltd., Taizhou 318000)

Abstract Objective The impurity profile of 5-keto milbemycin which was produced by genetically engineered strain fermentation was investigated. **Methods** The preparative silica gel chromatography was adopted to isolate impurities, with n-heptane-acetone (95:5, *V/V*) as the eluent. Two process impurities (C, D) and two degraded impurities (E, F) were prepared from the crude product of 5-keto milbemycin A3/A4. Via MS and NMR, the structures of these four impurities had been identified and confirmed. **Results** By means of comparing the HPLC chromatograms and the results of LC-MS, two unknown peaks (E, F) in the HPLC chromatogram of the crude product were confirmed to be the alkaline degradation impurity of A3 and A4 respectively. Then, we briefly analyzed the structural relationship between these impurities and the residue of these impurities in the final product milbemycin oxime. **Conclusion** Experimental results showed that parts of the oximation reaction product of impurity C still existed in the final product milbemycin oxime, and the other three impurities were mostly removed. The study result provided a solid foundation for the complete impurity profile study of 5-keto milbemycin, and also provided reference for establishing the quality control strategy of 5-keto milbemycin and the final product milbemycin oxime.

Key words 5-Keto milbemycin; Impurity profile; Preparation; Identification

5- 酮基米尔贝霉素是由米尔贝霉素制备米尔贝肟的中间体。米尔贝霉素 (milbemycins) 是由链霉菌产生的十六元环大环内酯类驱虫药物, 由日本三共株式会社于 1967 年发现^[1], 经过近 20 年的改良于 1986 年以米尔贝肟 (milbemycin oxime) 上市, 为当时唯一

单一成分可以同时防治犬恶丝虫及肠道寄生虫的产品^[2]。

米尔贝肟在中国、欧洲、日本、美国被广泛用于控制和预防动物体内大部分常见寄生虫, 具有很好的效果^[3-5]。由于米尔贝肟杀虫活性高、毒性小,

收稿日期: 2019-02-19

作者简介: 朱明新, 男, 生于 1982 年, 硕士, 工程师, 主要从事微生物药物分离纯化研究, E-mail: mingxinzhu@qq.com

* 通讯作者, E-mail: yteng@hisunpharm.com

LD_{50} 是临床推荐用量的 2000 倍以上,同时对阿维菌素类药物敏感的犬毒性较小,所以具有很好的市场前景^[6]。

目前,米尔贝肟较为普遍是通过发酵半合成生产的^[7-9],主要步骤包括链霉菌发酵产米尔贝霉素 A3/A4,米尔贝霉素 A3/A4 经过氧化反应生成 5-酮基米尔贝霉素 A3/A4,再经过肟化反应生成米尔贝肟 A3/A4。由米尔贝霉素氧化生成 5-酮基米尔贝霉素这一步骤存在氧化收率低,氧化剂价格昂贵,氧化所用催化剂易产生恶臭、环保压力大的问题。

目前,海正药业项目团队已经开发了由基因改造链霉菌发酵直接产 5-酮基米尔贝霉素^[6],经提取纯化后得到 5-酮基米尔贝霉素晶体^[10],再经一步肟化反应生成米尔贝肟。该工艺简化了合成路线,提高了收率,避免了氧化步骤带来的环境污染。由于工艺路线变化较大,也会使得米尔贝肟的杂质发生改变,所以有必要对中间体 5-酮基米尔贝霉素的杂质谱进行系统性研究,满足药监部门对杂质研究日益提高的要求。

按照来源,原料药中杂质可以分为工艺杂质(包括合成中未反应完全的反应物及试剂、中间体、副产物、从反应物及试剂中混入的杂质等)和降解产物(生产、贮藏、运输过程中因原料药不稳定产生的杂质)等^[11]。

本研究对 5-酮基米尔贝霉素的两个工艺杂质和两个降解杂质进行了样品制备、结构鉴定和初步研究。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

5-酮基米尔贝霉素 A3/A4 粗品以及 A3、A4 单组分样品都是由本公司实验室制得的小试样品。硅胶(青岛海洋化工有限公司生产,300~400 目);乙腈(Merck,色谱纯);DMSO(北京伊诺凯科技有限公司,分析纯);甲醇及其它试剂(国药集团化学试剂有限公司,分析纯)。

1.2 仪器

Agilent-1260 高效液相色谱仪,Agilent-6540 QTOF 质谱仪,Bruker-Avance400 核磁共振仪。

1.3 杂质分离制备方法

1.3.1 工艺杂质 C、D 的制备

5-酮基米尔贝霉素 A3/A4 粗品按照沈敢锋等^[10]专利中的方法制得,将粗品用甲醇溶解,加载至硅胶柱,上柱量约 5g/L 硅胶,用正庚烷-丙酮(95:5, V/V)洗脱。杂质 D、杂质 C、5-酮基米尔贝霉素 A4、5-酮基米尔贝霉素 A3 依次被洗出,分段收集。将杂质

C、杂质 D 纯度高的部分分别混合后再浓缩降温结晶,得到高纯度的杂质 C 和 D。A3、A4 单组分样品亦是采用上述方法制得。

1.3.2 5-酮基米尔贝霉素 A3 碱降解杂质及 A4 碱降解杂质的制备

将 5-酮基米尔贝霉素 A3、A4 单组分样品分别溶于 70% 甲醇,再用 1mol/L 的 NaOH 调节 pH 至 12.5 左右,静置 4h,经 HPLC 检测碱降解较完全,再用 1mol/L 盐酸回调 pH 至中性。分别加载至硅胶柱,上柱量约 5g/L 硅胶,用正庚烷-丙酮(95:5, V/V)洗脱,分段收集,将 A3 碱降解杂质、A4 碱降解杂质纯度高的部分分别混合并浓缩干即得到 5-酮基米尔贝霉素 A3 碱降解杂质、5-酮基米尔贝霉素 A4 碱降解杂质。

1.4 分析方法

1.4.1 高效液相色谱(HPLC)分析条件

色谱柱:Aglient C_{18} 或 C_8 反相柱(4.6mm×150mm, 3.5 μ m);流动相:A 相:0.01mol/L 乙酸铵,B 相:乙腈,梯度洗脱:0~60min,B 相从 70% 升高至 80%;波长:240nm;流速:1mL/min;进样量:10 μ L。该方法是基于黄隽等^[12]论文中的分析方法进行的优化。

1.4.2 质谱分析条件

离子源:电喷雾电离源(ESI);离子极性:正离子;雾化器温度:325℃;雾化器干气流速:8L/min;喷雾器压力:35psig;喷雾电压:+3500V。取适量样品于进样瓶中,用 50% 乙腈水溶液溶解、摇匀,作为样品检测溶液进行质谱分析。

1.4.3 液质联用分析条件

将“1.4.1”项的液相分析条件和“1.4.2”项的质谱分析条件联用,对样品进行液质联用分析。

1.4.4 核磁共振波谱分析条件

溶剂:丙酮,内标物:TMS。取适量样品加入核磁管内,加入约 0.5mL DMSO 试剂,振荡使样品充分溶解,作为样品溶液,分别进行核磁共振氢谱(1H NMR)、碳谱(^{13}C NMR,DEPT135°)以及相关谱(1H - 1H COSY、HSQC 和 HMBC)分析。

2 结果与讨论

2.1 HPLC 法分析 5-酮基米尔贝霉素 A3/A4 粗品主要杂质

采用 HPLC 法跟踪 5-酮基米尔贝霉素提取工艺各步骤料液组分的变化,发现粗品中杂质 C、D 为两个最主要的工艺杂质,是菌体代谢过程产生的。杂质 C、D 在发酵液及粗品 HPLC 图谱中的位置如图 1~2 所示。

2.2 强制降解实验

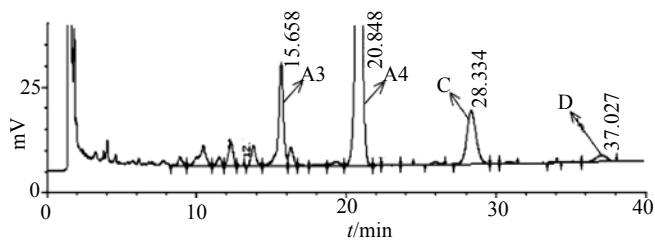


图 1 5-酮基米尔贝霉素发酵液的典型 HPLC 图谱
Fig. 1 The typical HPLC chromatogram of 5-keto milbemycin A3/A4 fermentation broth

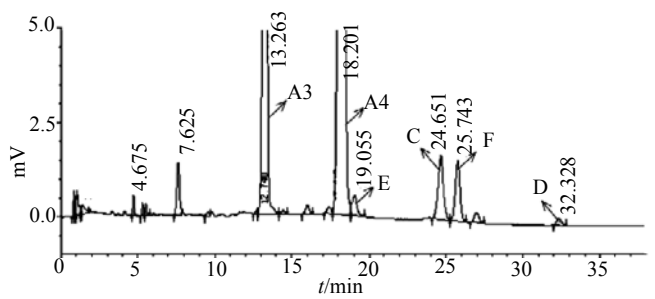


图 2 5-酮基米尔贝霉素 A3/A4 粗品的典型 HPLC 图谱
Fig. 2 The typical HPLC chromatogram of 5-keto milbemycin A3/A4 crude product

将 5-酮基米尔贝霉素 A3/A4 粗品进行高温、高湿、光照、氧化、酸碱等降解实验，实验发现：高温、高湿条件下样品较稳定；氧化、光照条件下样品略微降解；碱性条件下粗品中 A3、A4 组分几乎完全降解，杂质 E、F 含量显著增加。

加速稳定性实验发现样品稳定性良好，降解缓慢。稳定性数据如表 1 所示。

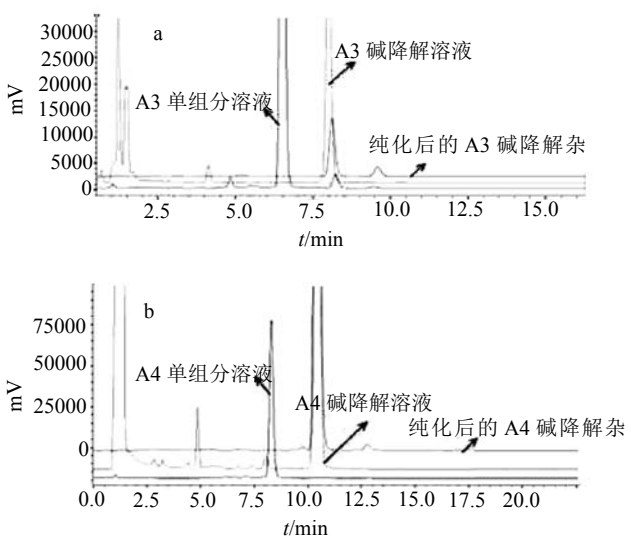
2.3 杂质制备

采用“1.3”项方法制备工艺杂质 C、D 及 5-酮基米尔贝霉素 A3 单组分、A4 单组分样品，并根据“1.3.2”项的方法进行碱降解试验，制备 5-酮基米尔贝霉素 A3 碱降解杂质和 A4 碱降解杂质。图 3 分别为 A3 单组分、A4 单组分碱降解前后的 HPLC 对比图谱。图 4 为制备的 4 个杂质与粗品的 HPLC 对比图谱。

从图 4 可以看出 A3、A4 单组分碱降解杂质峰出峰时间分别与粗品溶液杂质 E、杂质 F 出峰时间重合，

表 1 5-酮基米尔贝霉素 A3/A4 粗品加速稳定性试验结果
Tab. 1 The accelerated stability test results of 5-keto milbemycin A3/A4 crude product

放置周期	起始点	1 周	1 个月	2 个月	3 个月
A3 纯度 /%	23.2	23.2	23.1	23.1	23.1
A4 纯度 /%	75.6	75.5	75.5	75.5	75.4
总纯度 /%	98.8	98.7	98.6	98.6	98.5



a: A3 碱降解前后对比; b: A4 碱降解前后对比
图 3 5-酮基米尔贝霉素 A3/A4 单组分碱降解前后 HPLC 对比图谱
Fig. 3 The comparison of HPLC chromatogram before and after

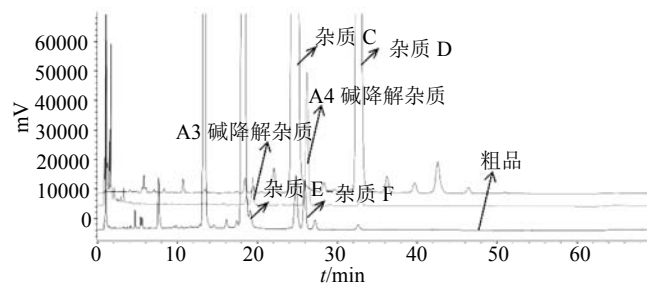


图 4 4 个杂质与 A3/A4 粗品的 HPLC 对比图谱
Fig. 4 The comparison of HPLC chromatogram of A3/A4 crude sample with impurities

它们可能分别为同一物质。

2.4 杂质结构鉴定

经质谱、核磁共振谱分析，对上述制备的 4 个杂质进行了结构确证，波普数据和结构解析结果如下。

2.4.1 杂质 C

样品质谱图中 $m/z=549.3187$ 的离子峰为 $[M+Na]^+$ 的峰，表明该杂质的分子量为 526.7140，高分辨质谱确定 $[M+Na]^+549.3186$ 峰的元素组成为 $C_{32}H_{46}NaO_6$ ，证明本品的元素组成为 $C_{32}H_{46}O_6$ 。核磁共振碳谱中共有 32 个碳信号，分别为 6 个伯碳原子，8 个仲碳原子，11 个叔碳原子，7 个季碳原子。具体归属如下：

1H NMR(acetone- d_6 , 400MHz), δ : 6.60(s, 1H, H-24), 6.17~6.28(m, 2H, H-17-18), 5.30(dd, $J=13.6, 9.9$ Hz, 1H, H-16), 5.18~5.26(m, 1H, H-2), 4.94~4.96(m, 1H, H-12), 4.12(s, 1H, H-26-OH), 3.95(s, 1H, H-25), 3.58~3.65(m, 1H, H-9), 3.12(t, $J=9.4$ Hz, 1H, H-5), 2.99(d, $J=16.1$ Hz, 1H, H-21), 2.53(m, 1H, H-15), 2.17~2.27(m, 4H, H-11-

14-21), 2.00(dd, $J=11.4, 3.7\text{Hz}$, 1H, H-3), 1.85~1.93(m, 5H, H-20-10-14), 1.78(s, 3H, H-32), 1.62~1.71(m, 5H, H-30-8-27), 1.48~1.59(m, 3H, H-7-8), 1.28~1.37(m, 3H, H-3-27-6), 1.03(d, $J=6.4\text{Hz}$, 3H, H-31), 0.96(t, $J=7.2\text{Hz}$, 3H, H-28), 0.79~0.91(m, 4H, H-29-10); ^{13}C NMR(acetone- d_6 , 125MHz), δ : 197.08(C-22), 172.01(C-1), 141.22(C-16), 139.07(C-24), 137.85(C-19), 136.98(C-13), 136.00(C-23), 126.38(C-17), 125.59(C-18), 121.86(C-12), 98.08(C-4), 80.51(C-26), 76.59(C-5), 69.24(C-2), 68.58(C-9), 49.35(C-14), 49.31(C-25), 48.86(C-21), 42.28(C-3), 37.12(C-10-15), 36.47(C-8), 35.34(C-11), 35.21(C-6), 28.73(C-7), 26.51(C-27), 22.40(C-31), 18.10(C-29), 16.26(C-30), 15.78(C-32), 14.41(C-20), 10.44(C-28)。

2.4.2 杂质 D

样品质谱图中 $m/z=509.3264$ 的离子峰为 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 的峰, 表明该杂质的分子量为 508.6990, 高分辨质谱确定 $[\text{M}+\text{H}]^+509.3264$ 峰的元素组成为 $\text{C}_{32}\text{H}_{45}\text{O}_5$, 证明本品的元素组成为 $\text{C}_{32}\text{H}_{44}\text{O}_5$ 。核磁共振碳谱中共有 32 个碳信号, 分别为 6 个伯碳原子, 7 个仲碳原子, 11 个叔碳原子, 8 个季碳原子。具体归属如下:

^1H NMR(acetone- d_6 , 400MHz), δ : 8.71(s, 1H, H-22-OH), 7.33(s, 1H, H-24), 6.70(s, 1H, H-21), 6.19(dd, $J=14.9, 11.0\text{Hz}$, 1H, H-17), 5.61(d, $J=10.8\text{Hz}$, 1H, H-18), 5.39~5.45(m, 1H, H-2), 5.25(dd, $J=15.0, 9.6\text{Hz}$, 1H, H-16), 4.93(d, $J=10.2\text{Hz}$, 1H, H-12), 3.67~3.73(m, 1H, H-9), 3.13(t, $J=9.2\text{Hz}$, 1H, H-5), 2.47~2.59(m, 1H, H-15), 2.26~2.29(m, 1H, H-11), 2.14~2.22(m, 5H, H-32-11-14), 2.04~2.05(m, 3H, H-20), 1.96~1.99(m, 1H, H-10), 1.86~1.93(m, 2H, H-3-14), 1.69~1.75(m, 1H, H-27), 1.65(s, 3H, H-30), 1.58~1.63(m, 1H, H-27), 1.45~1.55(m, 3H, H-7-8), 1.27~1.37(m, 3H, H-3-27-6), 0.98(t, $J=7.3\text{Hz}$, 3H, H-28), 0.80(d, $J=6.6\text{Hz}$, 3H, H-29), 0.74~0.77(m, 1H, H-10); ^{13}C NMR(acetone- d_6 , 125MHz), δ : 168.49(C-1), 157.16(C-22), 144.19(C-26), 139.50(C-16), 135.67(C-13), 134.77(C-19), 131.94(C-24), 128.05(C-18), 125.78(C-17), 122.79(C-23), 122.77(C-25), 121.40(C-12), 113.81(C-21), 97.28(C-4), 75.67(C-5), 67.70(C-9), 67.44(C-2), 48.43(C-14), 41.44(C-3), 36.70(C-10), 36.14(C-15), 35.60(C-8), 34.33(C-6), 33.69(C-11), 27.83(C-7), 25.63(C-27), 21.14(C-31), 17.57(C-20), 17.15(C-29), 15.40(C-30), 14.76(C-32), 9.54(C-28)。

2.4.3 A3 碱降解杂质

样品质谱图中 $m/z=509.4380$ 的离子峰为 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 的峰, 表明该杂质的分子量为 508.6550, 高分辨质谱确定 $[\text{M}+\text{H}]^+509.4380$ 峰的元素组成为 $\text{C}_{31}\text{H}_{41}\text{O}_6$, 证明本品的元素组成为 $\text{C}_{31}\text{H}_{40}\text{O}_6$ 。核磁共振碳谱中共有 31 个碳信号, 分别为 5 个伯碳原子, 7 个仲碳原子, 10 个叔碳原子, 9 个季碳原子。具体归属如下:

^1H NMR(acetone- d_6 , 400MHz), δ : 9.53(s, 1H, H-22-OH), 6.92(s, 1H, H-24), 6.17~6.20(m, 1H, H-18), 5.92~6.01(m, 1H, H-17), 5.53(dd, 1H, H-16), 5.24~5.31(m, 3H, H-2-20), 5.07~5.09(m, 1H, H-12), 3.57~3.66(m, 1H, H-9), 3.25~3.30(m, 1H, H-5), 2.46~2.56(m, 1H, H-15), 2.24~2.31(m, 1H, H-14), 2.10~2.18(m, 6H, H-10-11-31), 2.04~2.07(m, 1H, H-3), 1.84~1.90(m, 1H, H-14), 1.55~1.56(m, 1H, H-8), 1.43~1.47(m, 6H, H-7-8-29), 1.18~1.21(m, 2H, H-3-6), 1.13(d, 3H, H-27), 0.99(d, 3H, H-30), 0.85~0.91(m, 1H, H-10), 0.80(d, 3H, H-28); ^{13}C NMR(acetone- d_6 , 125MHz), δ : 167.14(C-1), 151.32(C-21), 143.13(C-22), 142.91(C-16), 123.34(C-18), 122.35(C-12), 117.49(C-25), 97.66(C-4), 74.25(C-20), 71.10(C-5), 69.10(C-2), 67.80(C-9), 48.29(C-14), 41.49(C-3), 36.53(C-6), 36.06(C-10), 35.54(C-8), 35.41(C-15), 34.32(C-11), 27.81(C-7), 22.54(C-30), 19.83(C-27), 18.22(C-28), 16.01(C-31), 15.51(C-29)。

2.4.4 A4 碱降解杂质

样品质谱图中 $m/z=523.4401$ 的离子峰为 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 的峰, 表明该杂质的分子量为 522.682, 高分辨质谱确定 $[\text{M}+\text{H}]^+523.4401$ 峰的元素组成为 $\text{C}_{32}\text{H}_{43}\text{O}_6$, 证明本品的元素组成为 $\text{C}_{32}\text{H}_{42}\text{O}_6$ 。核磁共振碳谱中共有 32 个碳信号, 分别为 5 个伯碳原子, 8 个仲碳原子, 10 个叔碳原子, 9 个季碳原子。具体归属如下:

^1H NMR(acetone- d_6 , 400MHz), δ : 9.60(s, 1H, H-22-OH), 6.93(s, 1H, H-24), 6.19~6.22(m, 1H, H-18), 5.94~6.01(m, 1H, H-17), 5.52(dd, $J=9.6\text{Hz}, 9.8\text{Hz}$, 1H, H-16), 5.19~5.34(m, 3H, H-2-20), 5.04~5.07(m, 1H, H-12), 3.61~3.67(m, 1H, H-9), 3.04~3.09(m, 1H, H-5), 2.44~2.55(m, 1H, H-15), 2.23~2.25(m, 1H, H-14), 2.06~2.17(m, 7H, H-3-10-11-32), 1.87(t, $J=11.8\text{Hz}$, 1H, H-14), 1.65~1.70(m, 1H, H-27), 1.55~1.56(m, 1H, H-8), 1.47(s, 3H, H-30), 1.43~1.44(m, 3H, H-7-8), 1.18~1.35(m, 3H, H-3-27-6), 0.96~1.0(m, 6H, H-28-31), 0.83~0.92(m, 1H, H-10), 0.78(d, $J=6.2\text{Hz}$, 3H, H-29); ^{13}C NMR(acetone- d_6 , 125MHz), δ : 167.07(C-1), 151.33(C-

21), 143.16(C-22), 142.89(C-16), 136.68(C-13), 132.63 (C-19), 126.08(C-23), 125.57(C-24), 124.97(C-17), 124.23(C-26), 123.35(C-18), 122.24(C-12), 117.50(C-25), 97.48(C-4), 75.73(C-5), 74.23(C-20), 69.07(C-2), 67.78(C-9), 48.24 (C-14), 41.69(C-3), 36.15(C-10), 35.45(C-8), 35.37(C-15), 34.37(C-6), 34.31(C-11), 27.98(C-7), 25.70 (C-27), 22.49(C-31), 18.08 (C-29), 16.02(C-32), 15.53(C-30), 10.50(C-28)。

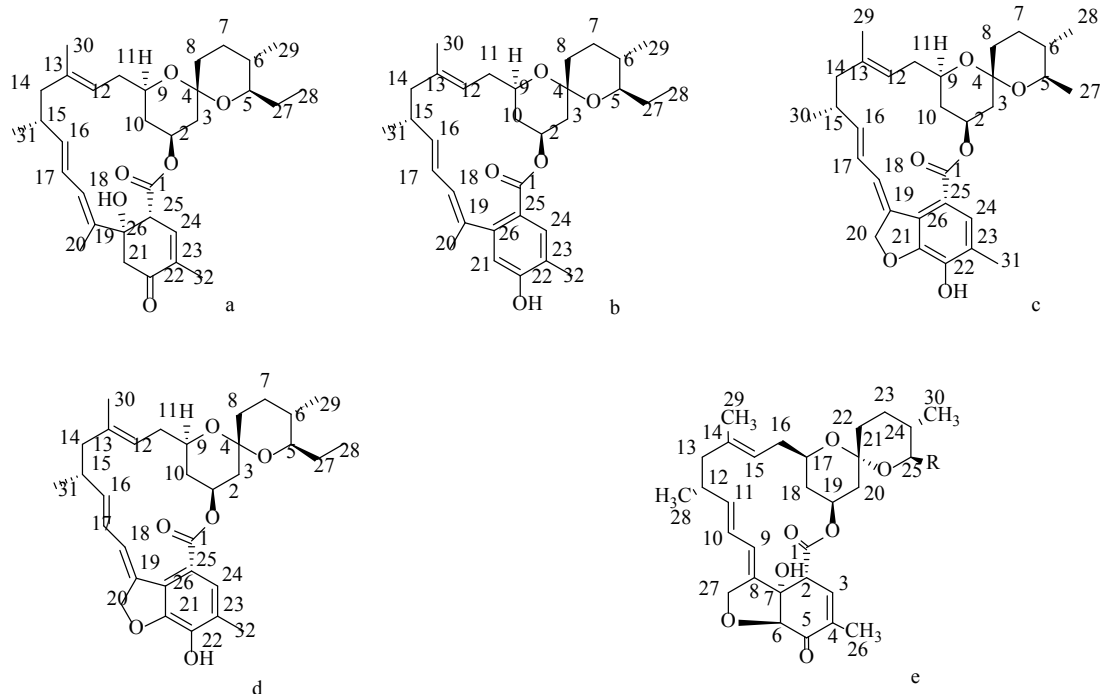
4 个杂质的结构式及 ^1H - ^1H COSY 和 HMBC 相关信号图如图 5~6 所示。

2.5 杂质的来源及去向分析

为了进一步确认杂质 E、F 与 5-酮基米尔贝霉素 A3、A4 单组分碱降解杂质是否存在对应关系, 采用液质联用检测分析了 5-酮基米尔贝霉素 A3/A4 粗品溶液。

杂质 E 对应的质谱图中 $m/z=509.4320$ 的离子峰为 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 的峰, 表明该杂质的分子量为 508.6, 高分辨质谱确定 $[\text{M}+\text{H}]^+509.4320$ 峰的元素组成为 $\text{C}_{31}\text{H}_{41}\text{O}_6$, 推测该杂质的元素组成为 $\text{C}_{31}\text{H}_{40}\text{O}_6$, 分子量和分子式与 A3 碱降解杂质相同。杂质 F 对应的质谱图中 $m/z=523.4401$ 的离子峰为 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 的峰, 表明该杂质的分子量为 522.6, 高分辨质谱确定 $[\text{M}+\text{H}]^+523.4401$ 峰的元素组成为 $\text{C}_{32}\text{H}_{43}\text{O}_6$, 推测该杂质的元素组成为 $\text{C}_{32}\text{H}_{42}\text{O}_6$, 分子量和分子式与 A4 碱降解杂质相同。这就证实了杂质 E 即为 A3 碱降解杂质, 杂质 F 即为 A4 碱降解杂质。这两个杂质在粗品溶液中含量较少, 可见碱性条件能加速 A3、A4 分别降解成 E、F 这两个杂质。

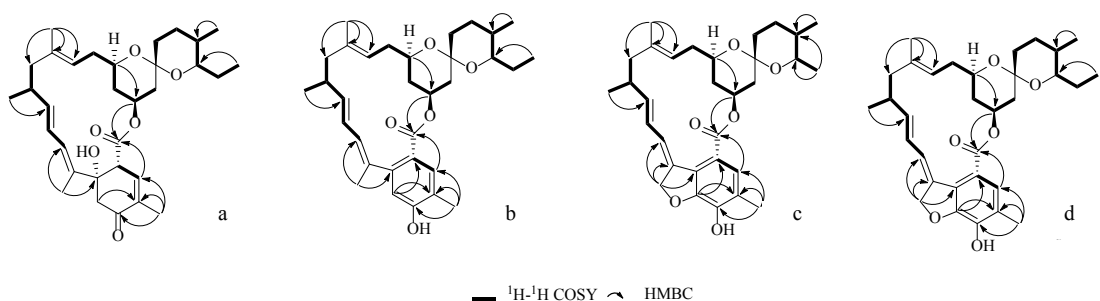
对比 5-酮基米尔贝霉素 A3/A4 及杂质 C~F 结构式可以看出: (1) 杂质 C 为 A4 第 6、27 位碳之间



a: 杂质 C; b: 杂质 D; c: A3 碱降解杂质; d: A4 碱降解杂质; e: 5-酮基米尔贝霉素 A3/A4 (A3: $\text{R}=\text{CH}_3$; A4: $\text{R}=\text{CH}_2\text{CH}_3$)

图 5 4 个杂质及 5-酮基米尔贝霉素 A3/A4 的结构式

Fig. 5 The structural formula of the four impurities and 5-keto milbemycin A3/A4



a: 杂质 C; b: 杂质 D; c: A3 碱降解杂质; d: A4 碱降解杂质

图 6 4 个杂质的 ^1H - ^1H COSY 和 HMBC 相关信号图

Fig. 6 ^1H - ^1H COSY and HMBC correlations of the four impurities

的氧开环后的产物；杂质 D 的结构就是杂质 C 的酮基转变成更加稳定的烯醇式结构。这与 Nonaka 等^[13]的研究分析一致，杂质 C 即文献中的杂质 $Mil\beta_6(1b)$ ，杂质 D 即文献中的杂质 $Mil\beta_3(5b)$ 。杂质 C 含有酮基可参与脞化反应，如图 7 所示，杂质 D 不含酮基，因此不能进行脞化反应，这也正好与脞化实验结果相符。

杂质 C 脞化后的产物也有部分残留于最终的米尔贝肟成品中；杂质 D 不能脞化，在脞化反应后的纯化步骤中去除较彻底。

(2)A3 碱降解杂质 (杂质 E) 及 A4 碱降解杂质 (杂质 F) 分别为 A3、A4 的 5 位上酮基转变为烯醇式结构的产物，如图 8 所示。杂质 F 即为 Wang 等^[14]公开的米尔贝肟 α_{31} 。

杂质 E、F 都不含酮基，故不能进行脞化反应，在脞化反应后的纯化步骤中去除较彻底。

3 结论

由此可见，中间体 5-酮基米尔贝肟中杂质 C 的

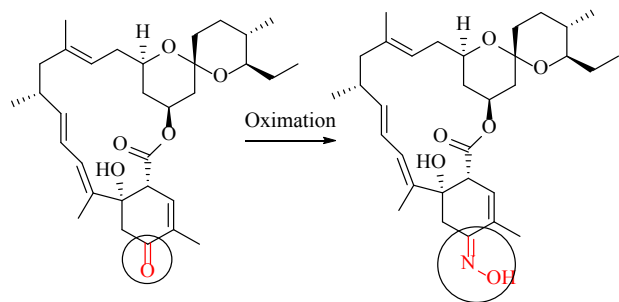
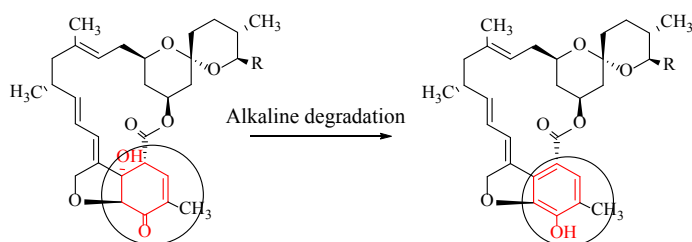


图 7 杂质 C 脞化反应

Fig. 7 The oxidation reaction of impurity C



R=CH₃ 即为 A3 及其碱降解杂质 (杂质 E)；R=CH₂CH₃ 即为 A4 及其碱降解杂质 (杂质 F)

图 8 5-酮基米尔贝肟 A3/A4 碱降解

Fig. 8 The alkaline degradation of 5-keto milbemycin A3/A4

含量对成品米尔贝肟的杂质含量会有较大影响，所以对 5-酮基米尔贝肟中杂质 C 的限度应进行进一步研究。

上述相关杂质的结构确证及相互间的关系，可以为 5-酮基米尔贝肟生产工艺改进、质量标准完善以及产品质量提高提供参考。对于会参与脞化反应生成米尔贝肟相关杂质的 5-酮基米尔贝肟相关杂质的杂质谱还需要更详细的研究，以便确定相关杂质的限度。

参考文献

- [1] Aoki A, Fukuda R, Nakayabu T, *et al.* Antibiotic substances b-41, their production and their use as insecticides and acaricides: US, 1976/3984564[P]. 1976-10-05.
- [2] 关丽辉, 王相晶, 向文胜. 抗生素类驱虫药米尔贝肟的研究进展 [J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(6): 157-159.
- [3] Mckellar Q A, Benchaoui H A. Avermectins and milbemycins[J]. *J Vet Pharmacol Ther*, 1996, 19(5): 331-351.
- [4] Rinaldi L, Pennacchio S, Musella V, *et al.* Helminth control in kennels: Is the combination of milbemycin oxime and praziquantel a right choice[J]. *Parasit Vectors*, 2015, 8(1): 853.
- [5] McCall J W. The safety-net story about macrocyclic lactone heartworm preventives: A review, an update, and recommendations[J]. *Vet Parasitol*, 2005, 133(2-3): 197-206.
- [6] 黄隽, 徐赛珍, 周敏. 一种产 5-酮基米尔贝肟的链霉菌菌及生产 5-酮基米尔贝肟的方法: CN, 103789339B[P]. 2014-05-14.
- [7] 付光明, 何福彪, 张文凯, 等. 一种米尔贝肟的制备方法: CN, 105254644B[P]. 2017-07-18.
- [8] 付光明, 何福彪, 张文凯. 一种米尔贝肟的合成方法: CN, 105061457B[P]. 2016-06-22.
- [9] 黄强, 杨勇, 温伟江, 等. 一种米尔贝肟中间体的制备方法: CN, 105949217A[P]. 2016-09-21.
- [10] 沈敢锋, 余贞, 滕云, 等. 5-酮基米尔贝肟发酵液的提取和结晶工艺: CN, 108586481A[P]. 2018-09-28.
- [11] 化学药物杂质研究的技术指导原则 (2005)[M]. 1 版, 北京: 中国医药科技出版社, 2006: 17.
- [12] 黄隽, 林甲檀, 周敏, 等. 吸水链霉菌 HS023 *milF* 基因敲除构建产 5-酮基米尔贝肟基因工程菌 [J]. 微生物学报, 2015, 55(01): 107-113.
- [13] Nonaka K, Tsukiyama T, Sato K, *et al.* Bioconversion of milbemycin-related compounds: Isolation and utilization of non-producer, Strain RNBC-5-51[J]. *J Antibiot*, 1999, 52(7): 620-627.