微晶电子衍射技术测定制剂中的药物晶型及其在注册申请中的应用

汤　佳[1]，李子依[2]，刘　翔[2]，马　健[2]，黄晓龙[1*]

（1. 国家药品监督管理局药品审评检查大湾区分中心，广东深圳 518000；2. 深圳晶泰科技有限公司，广东深圳 518000）

摘要： 在固体药物制剂的质量评价中，药物晶型的准确测定至关重要。然而，传统测定方法存在一定局限性。该文采用微晶电子衍射（MicroED）技术对甲磺酸仑伐替尼胶囊原研药、他达拉非片原研药与仿制药开展了系统性研究。先采集制剂中大量颗粒的衍射数据，再依据晶胞参数对衍射数据进行分类，最后通过解析目标晶型的晶体结构，成功确定了制剂中的药物晶型。此外，该研究讨论了 MicroED 技术在测定固体制剂中药物多晶型方面的优势与局限，展现了其应用潜力，并就该技术在药品注册申报中的应用提出了相关注意事项。

关键词： 微晶电子衍射；药物多晶型；固体制剂；质量评价；药品注册申请；甲磺酸仑伐替尼；他达拉非；测定

中图分类号： TQ460.7^{+}2；TG115.23　　**文献标志码：** A　　**文章编号：** 1001-8255(2026)08-0958-10

引用： 汤佳, 李子依, 刘翔, 等. 微晶电子衍射技术测定制剂中的药物晶型及其在注册申请中的应用[J]. 中国医药工业杂志, 2026, **57**(8): 958-967. DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2026.08.010

Microcrystal Electron Diffraction Technique for Determining Drug Crystal Forms in Formulations and Its Application in Drug Registration Submissions

TANG Jia[1], LI Ziyi[2], LIU Xiang[2], MA Jian[2], HUANG Xiaolong[1*]

(*1. Guangdong-Hong Kong-Macao Greater Bay Area Center for Drug Evaluation and Inspection of NMPA, Shenzhen 518000; 2. Shenzhen Jingtai Technology Co., Ltd., Shenzhen 518000*)

ABSTRACT: In the quality evaluation of solid pharmaceutical formulations, the accurate identification of drug crystal forms is crucial. Conventional characterization methods possess inherent limitations. This study employed microcrystal electron diffraction (MicroED) to investigate the original capsules of lenvatinib mesylate, as well as the original and generic tablets of tadalafil. Diffraction data were collected from a large number of particles within each formulation sample. Then, the data were classified based on the unit cell parameters, enabling successful structure determinations of the active pharmaceutical ingredients. This paper discusses the advantages and limitations of MicroED technology for polymorph analysis in solid formulations, demonstrates its application potential, and puts forward practical recommendations for its implementations in drug registration submissions.

Key Words: microcrystal electron diffraction; drug polymorph; solid preparation; quality evaluation; drug registration application; lenvatinib mesylate; tadalafil; determination

制剂中的药物晶型直接影响安全性与临床疗效[1]。因此，在晶型药物制剂的开发和评价过程中，必须确保制剂中的药物晶型与目标药用晶型一致，避免晶型转变对药品产生负面影响，从而保障药品的质量和疗效[2]。然而，在固体药物制剂的研发过程中，直接测定和表征制剂中的药物晶型往往面临诸多挑战。其中较常见的是，某制剂中活性成分的占比相对较低，且检测结果易受辅料干扰，这大幅增加了制剂中药物晶型的检测难度。目前，用于测定固体

收稿日期： 2025-11-19

基金项目： 国家药品监督管理局药品审评检查大湾区分中心 2023 年委托课题“微晶电子衍射在药品研发及监管中的应用研究”（GBA-JGKX-003）

作者简介： 汤　佳，主管药师，博士，从事药品注册申请和审评研究。

通信作者： 黄晓龙，主任药师，从事各类化学药药学审评报告的技术审核工作。

制剂中药物晶型的常用方法包括X射线粉末衍射（X-ray powder diffraction，XRPD）、DSC以及拉曼光谱（Raman spectroscopy）等[3-5]。然而，这些方法均存在一定的局限性。例如，通常要求制剂的载药量高于设备的检出限，载药量极低时可能无法准确识别目标晶型。此外，当制剂中的待测晶型未知时，由于缺乏与已知晶型标准图谱进行全面对比的条件，传统方法难以直接完成制剂中药物晶型的鉴定。

微晶电子衍射（microcrystal electron diffraction，MicroED）技术凭借其对粉末中单颗晶粒晶型的测定能力，有效克服了传统方法的局限性[6]。其原理是采用透射电镜仪中的高能电子束照射样品中的晶体颗粒，产生电子衍射图样，再通过对晶体颗粒在旋转过程中产生的一系列衍射图样进行处理和分析，解析得到晶体的结构信息，包括空间群、晶胞参数、原子坐标等[7]。与单晶X射线衍射（single crystal X-ray diffraction，SCXRD）技术相比，MicroED技术对晶体样品的尺寸要求仅为纳米级至微米级，因此可直接使用结晶粉末样品，无需进行单晶培养[8]。这一特性使得MicroED技术在测定难以培养单晶的小分子药物晶体结构方面具有显著优势[9]。同时，MicroED技术可实现粉末样品中单颗晶粒的结构解析。只要样品内存在晶体颗粒，即便目标晶型含量不足1%，通过采集大量晶粒的电子衍射数据，也可从中筛选并解析出目标晶体结构。文献[10]对多种组分、配比各异的小分子原料药混合粉末展开MicroED测试，成功实现了对混合物样品中多种晶型的测定。这种测定混合物中特定晶型的方法，为测定固体制剂中药物晶型提供了有效解决方案，有望在药物研发和质量控制领域发挥重要作用。

MicroED技术测定固体制剂中药物晶型的流程如图1所示。本研究分别选取甲磺酸仑伐替尼原研胶囊（载药量约4%），以及他达拉非片的原研药和2种仿制药（载药量为5%～6%）作为研究对象，采用MicroED技术进行检测。上述2种模型药品的载药量接近，但其中活性成分的药用晶型在XRPD图谱中分别为可检出与不可检出状态，具有一定代表性。甲磺酸仑伐替尼药用晶型的特征峰几乎不能被识别，而他达拉非片药用晶型仅检出的若干较强特征峰。

1 仪器与试药

Glacios 200 kV型冷冻透射电镜（采用X-FEG场发射型电子枪，电子波长为0.002 508 nm，信息分辨率为0.23 nm）、配备Ceta-D型探测器的相机（分辨率为4 096×4 096，像素



图1 MicroED技术测定固体制剂中药物晶体结构的流程示意图

Fig.1 Flowchart of the MicroED Technique for Determining Drug Crystal Structures in Solid Formulations

为 0.14 μm，视频模式下占空比为 100％）和 Vitrobot Mark Ⅳ型冷冻制样仪（美国赛默飞世尔科技公司）；D8 Advance 型 X 射线粉末衍射仪（德国布鲁克公司，采用铜靶靶材）。

甲磺酸仑伐替尼胶囊（原研制剂，日本 Eisai 公司，规格 4 mg，批号 136970）；他达拉非片（原研制剂：美国 Lilly del Caribe 公司，规格 20 mg，批号 D470583；仿制制剂①：规格 20 mg；仿制制剂②：规格 20 mg）。基于商业保密性，暂不披露仿制药制造商。

2　方法与结果

2.1　载网样品制备

依据文献[10]方法制备载网样品，具体步骤如下。①用研钵将片剂或胶囊内容物研磨成细粉。②取少量粉末均匀分散在 TEM 载网上，并用橡胶球轻轻吹去载网表面的粉末，以便确保载网上只附着有合适数量的样品颗粒以供测试。③利用液氮将气态乙烷液化，随后借助冷冻制样仪将上述载网迅速浸入液态乙烷中进行冷冻处理。④将冷冻的载网转移到液氮中保存，以维持样品的低温状态，防止其在后续过程中由于温度波动而发生结构变化。

2.2　数据收集

在本研究中，冷冻透射电镜的电子加速电压设置为 200 kV，对应的电子波长为 0.002 508 nm。在成像模式下，可清晰观察到载网上分布的样品颗粒，再根据形貌挑选合适颗粒，采集衍射数据。

在衍射数据采集过程中，样品台会以 1 (°)/s 的角速度在 ±40° 范围内旋转。在旋转过程中，以约 9 $e \cdot nm^{-2} \cdot s^{-1}$ 的电子束剂量率照射样品颗粒，同时以连续曝光模式持续采集衍射图谱。每张衍射图谱的曝光时间为 0.5 s，每个颗粒总共采集 160 张衍射图片。通过这种方法，能获取大量高质量的衍射数据，为后续的晶体结构解析提供坚实基础。

本试验中，共采集了甲磺酸仑伐替尼胶囊 365 个颗粒的衍射数据，他达拉非片原研制剂、仿制制剂①和②各 277、118 和 100 个颗粒的衍射数据。

2.3　结构解析

采用 X-ray Detector 软件（迭代号 2023063）对所得衍射数据进行处理，还原出每个颗粒的晶胞参数及对应的 HKL 衍射数据[11]。晶胞参数和空间群是描述晶体结构的基本参数。其中，晶胞参数包括晶胞的边长（a、b、c）和晶胞棱边之间的夹角（α、β、γ），空间群反映晶体内部结构的对称性。对于具有相同晶胞参数和空间群的数据，根据信噪比、Rint 值等质量参数筛选出质量较好的若干组数据。使用 XScale 软件（迭代号 20230630）从中筛选质量上佳的若干组数据进行融合，生成融合后的 HKL 文件[12]。随后利用 SHELXT 软件（迭代号 2018/2）对融合后的 HKL 文件进行解析，得到初始晶体结构[13]，最后采用 SHELXL 软件对初始结构进行精修[14]，进一步优化晶体结构参数，确保解析结果的准确性和可靠性。

解析采集到的甲磺酸仑伐替尼胶囊中 365 个颗粒的衍射数据，观察到其中大部分颗粒为辅料甘露醇（其余辅料可能由于处于非晶态、含量过低、晶体颗粒太小或混杂而未检出），仅 4 个颗粒为甲磺酸仑伐替尼。本研究基于这 4 个颗粒的衍射数据，成功解析出原研制剂中甲磺酸仑伐替尼的药用晶型。晶体学数据和精修结果如表 1 所示。

甲磺酸仑伐替尼药用晶型属于三斜晶系，空间群为 $\overline{P}_1$(No. 2)，相对分子质量为 522.95 g/mol。由于受到电子衍射的多重散射效应等因素影响，采用 MicroED 技术对晶体结构精修所得的 R 值（包括残差因子 R_1 值与加权残差因子 wR_2 值），相较于 SCXRD 技术所得结果明显偏高，但 MicroED 技术解析得到的结构信息（如原子坐标、空间群等）与 SCXRD 结果并无明显区别[15]。甲磺酸仑伐替尼的晶体结构如图 2 所示，其非对称单元中分子数 Z' 值为 1，即非对称单元由 1 个仑伐替尼阳离子与 1 个甲磺酸阴离子组成。图 3 展示了晶胞沿不同坐标轴的堆积方式。

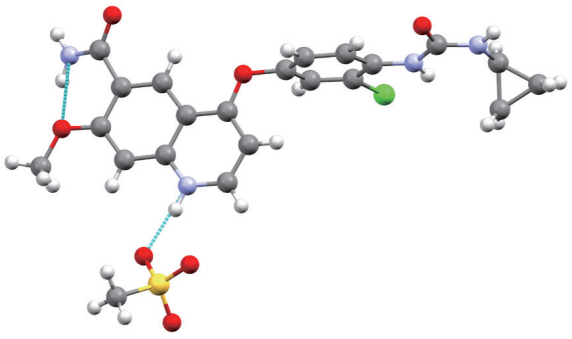
采用与甲磺酸仑伐替尼胶囊相同的方法测定他达拉非原研药及其 2 款仿制药制剂中的药用晶型。经解析后发现，在原研制剂的 277 个颗粒中，大部分属于辅料乳糖一水合物，仅有 4 组数据为他达拉非。解析得到的晶体学数据和精修结果如表 2 所示，非对称单元与堆叠情况如图 4、5 所示。他达拉非晶型属于单斜晶系，空间群为 $P2_1$(No. 4)，相对分子

表 1　MicroED 技术测得的甲磺酸仑伐替尼与甘露醇的参数对比

Tab.1　Comparisons of MicroED-derived Parameters between Lenvatinib Mesylate and Mannitol

晶体参数	甲磺酸仑伐替尼	甘露醇
晶系，空间群	三斜，$P\bar{1}$ (No. 2)	正交，$P2_12_12_1$ (No. 19)
晶胞参数	a=0.902 (3) nm	a=0.556 (14) nm
	b=0.923 (6) nm	b=0.871 (16) nm
	c=1.512 (12) nm	c=1.71 (5) nm
	α=78.1 (4)°	α=90°
	β=74.3 (3)°	β=90°
	γ=81.2 (3)°	γ=90°
分辨率 /nm	0.100	0.090
完整度 /%	79.7	100.0
拟合优度	1.068	1.201
R_1 [all data] [1)]	0.216 9	0.134 2
wR_2 [all data] [1)]	0.438 9	0.311 4

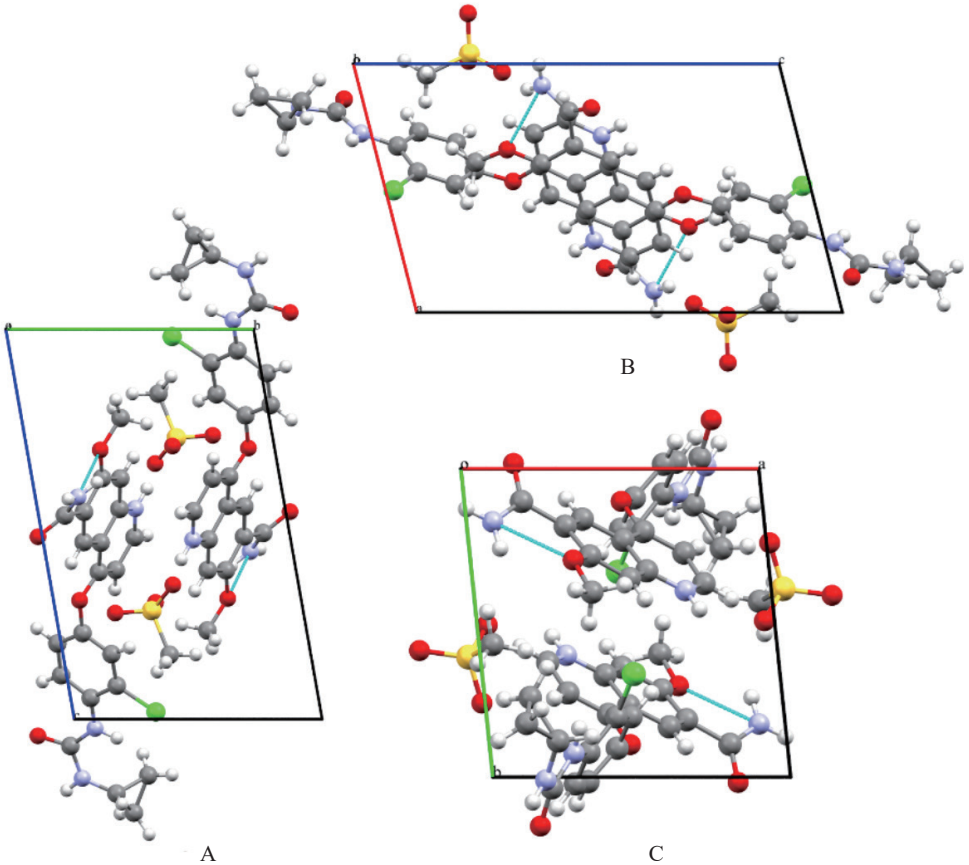
注：[1)]R_1 [all data] 和 wR_2 [all data] 是所有衍射点分别基于结构因子和结构因子平方的残差因子；表 2 同。



—C；—H；—N；—O；—S；—Cl。

图 2　原研制剂中甲磺酸仑伐替尼晶体的非对称单元（蓝色虚线为氢键）

Fig.2　The Asymmetric Unit of Lenvatinib Mesylate Crystal in the Original Capsulse (Hydrogen bonds are shown in blue dashed lines.)



A—晶胞 a 轴方向；B—晶胞 b 轴方向；C—晶胞 c 轴方向堆积图。

—C；—H；—N；—O；—S；—Cl。

图 3　原研制剂中甲磺酸仑伐替尼晶体堆积方式（蓝色虚线为氢键）

Fig.3　Packed Arrangements of Lenvatinib Mesylate Crystal in the Original Capsules (Hydrogen bonds are shown in blue dashed lines.)

质量为 389.40 g/mol。同时，2 款他达拉非仿制药中的药用晶型也被检出，具体数据如表 2 所示。

2.4　MicroED 技术的应用实例

2.4.1　甲磺酸仑伐替尼原研药

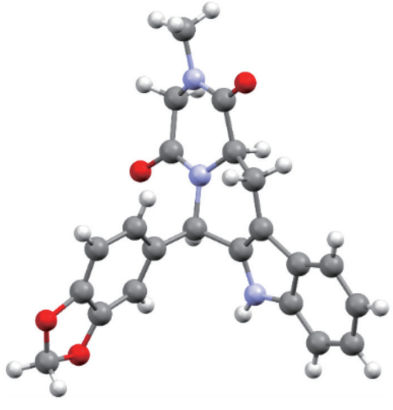
MicroED 解析出的甲磺酸仑伐替尼晶体结构参数与剑桥结构数据库（The Cambridge Structural Database，CSD）中的 SCXRD 解析结果（CSD Entry：HEFFEH）[16] 的对比情况如表 3 所示。2 种来源数据的对比结果基本一致，可认为对比物质是同一晶型。值得注意的是，MicroED 结构解析时需要融合多个颗粒的衍射数据，而不同颗粒的晶胞参数存在一定的测量误差，导致最终融合得到的晶胞参数误差偏大，如 MicroED 测定结果的有效数字位数较 SCXRD 结果的有效数字位数偏少。

表 2　MicroED 技术测得的他达拉非片原研药及其 2 种仿制药中 API 的参数对比

Tab.2　Comparisons of MicroED-derived Parameters for API in the Original and Two Generic Tadalafil Tablets

评价指标	原研制剂	仿制制剂①	仿制制剂②
收集的数据组数	277	118	100
药物组数	4	6	5
晶系，空间群	单斜，$P2_1$ (No. 4)	单斜，$P2_1$ (No. 4)	单斜，$P2_1$ (No. 4)
晶胞参数	a=0.965 8 (9) nm b=0.768 0 (4) nm c=1.205 (8) nm α=90° β=99.3 (2)° γ=90°	a=0.987 9 (14) nm b=0.781 6 (19) nm c=1.206 (3) nm α=90° β=99.41 (11)° γ=90°	a=0.994 6 (13) nm b=0.776 (2) nm c=1.220 (3) nm α=90° β=99.98 (15)° γ=90°
分辨率 /nm	0.070	0.090	0.086
完整度 /%	86.3	88.55	83.8
拟合优度	1.027	1.051	1.087
R_1 [all data]	0.255 4	0.269 2	0.191 5
wR_2 [all data]	0.480 0	0.414 4	0.369 9
仿制药与原研药 API 晶型中原子结构的 RMSD[1)]	—	0.219 0	0.219 6

注：[1)]RMSD 为均方根差值（root mean square deviation，RMSD）。



●—C；●—H；●—N；●—O。

图 4　原研制剂中他达拉非晶体的非对称单元

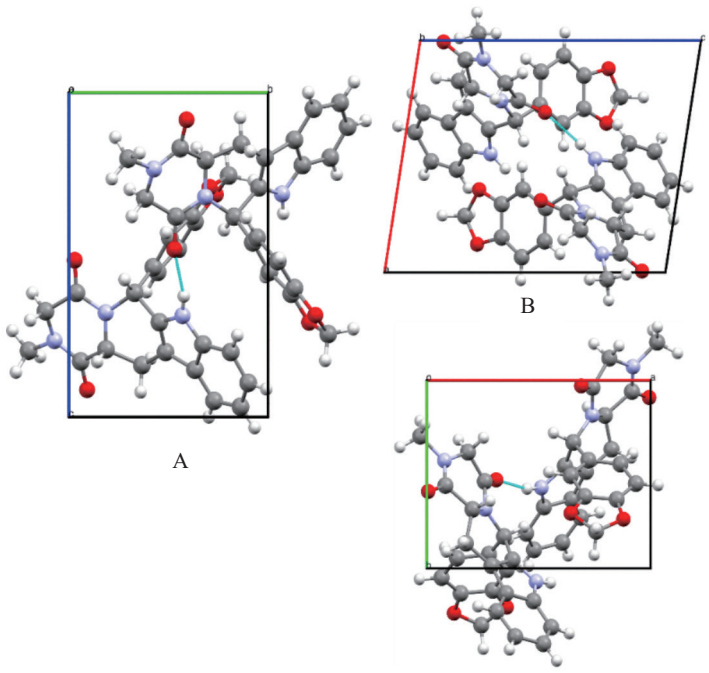
Fig.4　The Asymmetric Unit of Tadalafil Crystal in the Original Tablets

2 种方法所得晶体结构的 RMSD 能直接量化晶体结构之间的异同。具体计算方法 [17] 如下：将 2 个晶体结构通过旋转和平移操作对齐后，对比结构中对应原子的坐标，计算坐标值的 RMSD。为了更准确地评估 2 个晶体结构之间的差异，本文在计算 RMSD 时对晶体结构进行了扩展，获得一个包含 30 个分子的簇结构，并计算这 30 个分子之间的 RMSD。通常，RMSD 小于 0.5 即可认为 2 个晶体结构一致 [18]。对比结果表明，MicroED 的解析结果与单晶结构 HEFFEH 之间的 RMSD 为 0.121 8。这一数值表明 2 种晶体结构在原子级别上高度一致。

为了进一步验证 MicroED 解析出的甲磺酸仑伐替尼晶体结构与 SCXRD 结构（CSD Entry：HEFFEH）是否相同，基于 MicroED 解析出的结构和单晶结构 HEFFEH，分别计算二者的模拟 XRPD 谱。结果（图 6）显示，2 种晶体结构的模拟 XRPD 谱中的特征峰位置和强度基本一致，提示结构一致。

综上所述，模拟 XRPD 对比结果与 RMSD 值均表明，MicroED 测得的结构与单晶结构 HEFFEH 一致。这不仅验证了 MicroED 解析结果的正确性，还进一步证明了 MicroED 技术在低载药量制剂药物晶型解析中的可靠性和准确性。

在解析甲磺酸仑伐替尼胶囊的衍射数据时，观察到制剂晶体中甘露醇的占比最高。其解析得到的晶胞参数与 CSD 中甘露醇的 SCXRD 解析结果（CSD Entry：DMANTL09）基本一致。因此，基于该结构计算了甘露醇的模拟 XRPD 图谱。对比甲磺酸仑伐替尼与甘露醇 2 个组分的 XRPD 模拟图谱与制剂的实测 XRPD 图谱，所得结果如图 7 所示。由于制剂中甘露醇颗粒存在较强的择优取向，导致实测图谱与甘露醇模拟图谱中的峰强差异较大，但模拟图谱中的峰位与实测图谱中的峰位可互相对应。从图 7



A—晶胞 a 轴方向；B—晶胞 b 轴方向；C—晶胞 c 轴方向。

●—C；●—H；●—N；●—O。

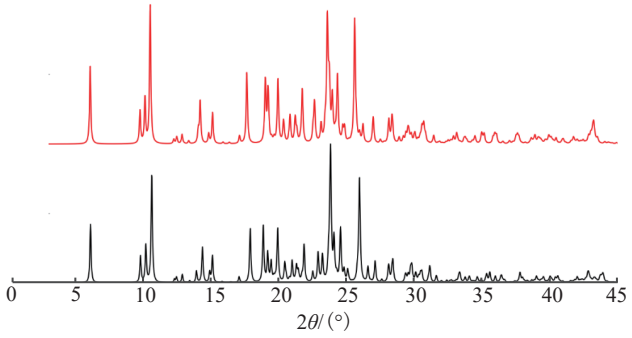
图 5 原研制剂中他达拉非晶体的堆积方式

Fig.5 Packed Unit Arrangements Tadalafil Crystals in the Original Tablets

表 3 MicroED 和 SCXRD 解析得到的甲磺酸仑伐替尼晶胞参数及空间群的对比

Tab.3 A Comparison of Unit Cell Parameters and Space Groups of Lenvatinib Mesylate Structures Obtained by MicroED and SCXRD

数据来源	*a*/nm	*b*/nm	*c*/nm	*α*/(°)	*β*/(°)	*γ*/(°)	空间群
CSD	0.902 44(10)	0.928 42(11)	1.513 04(17)	77.499(5)	75.524(4)	81.265(4)	*P*1
本试验结果	0.902(3)	0.923(6)	1.512(12)	78.1(4)	74.3(3)	81.2(3)	*P*1



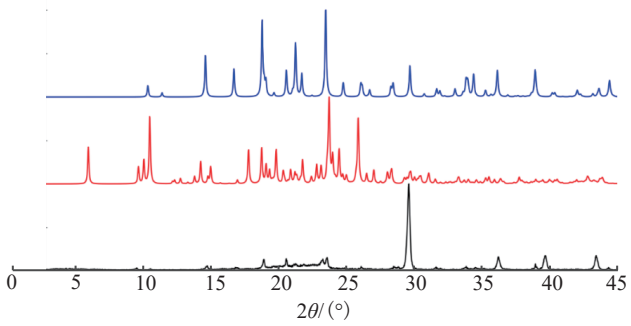
黑色—MicroED 解析晶型；红色—单晶结构（CSD Entry：HEFFEH）。

图 6 甲磺酸仑伐替尼晶体结构的模拟 XRPD 图谱

Fig.6 Simulated XRPD Patterns of Lenvatinib Mesylate from Its Crystal Structures

可见，在制剂样品的实测 XRPD 图谱中，大部分衍射峰来自甘露醇晶体，甲磺酸仑伐替尼的衍射峰几乎不可识别。这一现象表明，采用传统检测方法分析低载药量制剂中的药用晶型存在较大难度。需要注意的是，MicroED 检测在液氮温度（约 －196 ℃）和超高真空条件下进行；在这种极端条件下，晶体的晶胞体积相较于室温和常压时会有一定程度收缩，导致基于 MicroED 解析结构计算的模拟 XRPD 图谱与室温 XRPD 谱中的衍射峰存在少许偏移[19]。纯相样品或特定晶型含量较高样品的实测 XRPD 图谱中特定晶型对应的特征峰较清晰，可通过 Rietveld 精修的方式修饰 MicroED 的解析结构，使精修后结构

的模拟 XRPD 图谱与实测 XRPD 图谱能互相匹配。然而，由于实测 XRPD 图谱中甲磺酸仑伐替尼的衍射峰几乎不可见，因此无法使用该方法对 MicroED 测得的晶胞参数进行精修。此为 MicroED 检测技术，尤其是低温下 MicroED 检测的一个技术局限。



黑色—甘露醇和甲磺酸仑伐替尼的实测 XRPD 图谱；红色—MicroED 解析所得的甲磺酸仑伐替尼晶型模拟图谱；蓝色—甘露醇单晶结构（CSD Entry：DMANTL09）的模拟图谱。

图 7　甲磺酸仑伐替尼胶囊的 XRPD 图谱

Fig.7　XRPD Patterns of Lenvatinib Mesylate Capsules

2.4.2　他达拉非片原研药与仿制药

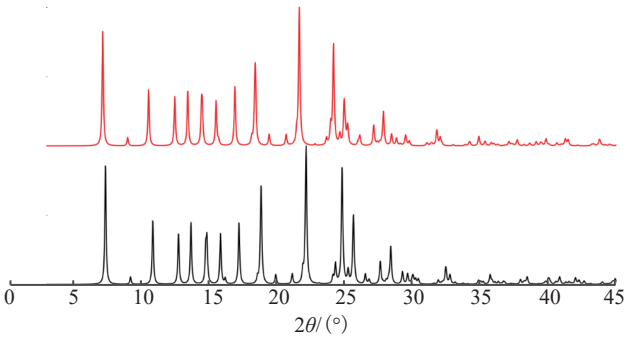
MicroED 解析出的原研他达拉非晶型与 CSD 中他达拉非的 SCXRD 解析结果（CSD Entry：IQUMAI）[20] 基本一致，二者对比情况如表 4 所示。基于解析出的结构和单晶结构 IQUMAI 计算的模拟 XRPD 图谱如图 8 所示，可见 2 种模拟 XRPD 图谱中特征峰的位置和强度基本一致。此外，通过将 MicroED 解析出的结构与单晶结构 IQUMAI 进行对齐，计算得二者间的 RMSD 为 0.272 7。这表明 MicroED 解析出的结构与单晶结构高度一致，进一步验证了 MicroED 结果的准确性。

在他达拉非原研片中，占比最高的辅料为乳糖一水合物。通过 MicroED 解析，得到的乳糖一水合物晶胞参数为：a=0.478(2) nm，b=2.144(3) nm，c=0.776(2) nm，α=90°，β=106.1(3)°，γ=90°。经比对表明，这些参数与 CSD 中乳糖一水合物的 SCXRD 解析结果（CSD Entry：LACTOS11）基本一致。与 MicroED 技术只能检测样品中有限数量颗粒的衍射数据不同，XRPD 能更准确地反映样品整体的晶体结构信息。通过对比基于解析结构的模拟 XRPD 图谱与制剂样品的实测 XRPD 图谱，可验证 MicroED

表 4　MicroED 和 SCXRD 解析得到的他达拉非晶胞参数及空间群的对比

Tab.4　Comparisons of Unit Cell Parameters and Space Groups between the Tadalafil Structures Resolved by MicroED and SCXRD

数据来源	a/nm	b/nm	c/nm	β/(°)	空间群
CSD Entry: IQUMAI	0.989 4(2)	0.778 20(10)	1.239 5(2)	99.75(2)	$P2_1$
本试验结果	0.965 8(9)	0.768 0(4)	1.205(8)	99.3(2)	$P2_1$



黑色—MicroED 解析晶型；红色—单晶结构（CSD Entry：IQUMAI）。

图 8　他达拉非晶体结构的模拟 XRPD 图谱

Fig.8　Simulated XRPD Patterns of Tadalafil from Its Crystal Structures

解析结果具有代表性。将他达拉非与占比最高的辅料乳糖一水合物这 2 个组分的 XRPD 模拟图谱与制剂的实测 XRPD 图谱进行对比，结果如图 9 所示，实测 XRPD 图谱中大部分衍射峰来自乳糖一水合物晶体；同时，在他达拉非晶体模拟图谱中的几个较强峰位处（如 2θ 为 7.4°、10.7°、18.6° 等处），实测图谱中均存在对应的、强度较弱的特征峰，证明 MicroED 检测得到的他达拉非晶体结构为实际的药用晶型。此外，制剂的实测 XRPD 图谱中未出现明显无法与乳糖一水合物或他达拉非的模拟图谱相匹配的额外特征峰。

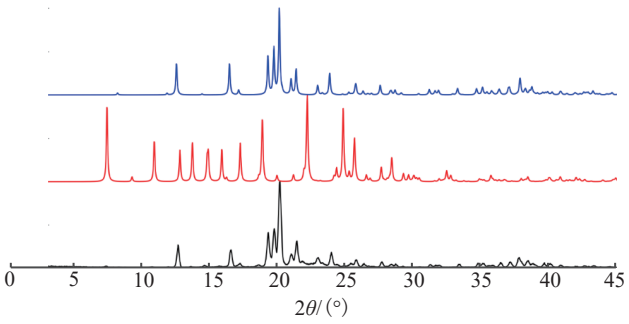
如图 10 所示，2 种仿制药与原研药的晶型模拟 XRPD 谱在峰位和强度上基本一致，表明 2 种仿制药中的药物晶型与原研药晶型高度一致。此外，计算 2 种仿制药与原研药中 API 晶型原子排布的 RMSD，结果分别为 0.219 0 和 0.219 6（表 2），进一步验证 2 种仿制药与原研药的 API 晶型在原子级别

上具有高度一致性。

3 讨论

3.1 MicroED 技术测定固体制剂中药物晶型方法的优势和局限

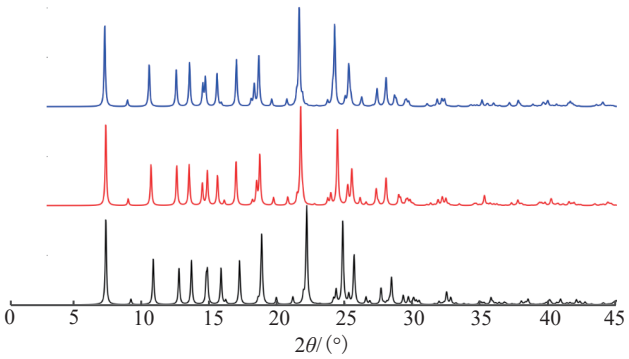
上述试验结果表明，MicroED 技术测定固体制剂中药物晶型的方法相比传统的 XRPD 等方法，具有两方面优势。一是对载药量无要求。虽然本研究中涉及的四款制剂载药量为 4%～6%，但 MicroED 技术可通过增加数据收集量，对载药量低于 1% 的制剂进行药物晶型测定。目前，MicroED 技术领域有多种自动收集数据的软件被广泛应用，这些软件可显著提高数据收集效率[21]。二是可测定制剂中的未知晶型。传统的 XRPD 等技术往往难以通过谱图对比方法来确定未知晶型，而 MicroED 方法可直接解析出未知晶型的结构，通过衍射数据重建晶体结构，从而提供详细的晶体学信息，包括空间群、晶胞参数、原子坐标等，因此在研究药物新晶型和复杂制剂中的应用价值较高。



黑色—乳糖一水合物和他达拉非的实测 XRPD 图谱；红色—MicroED 解析所得的他达拉非晶型模拟图谱；蓝色—乳糖一水合物单晶结构（CSD Entry：LACTOS11）的模拟图谱。

图 9 他达拉非片的 XRPD 图谱

Fig.9 XRPD Patterns of Tadalafil Tablets



黑色—他达拉非原研制剂；红色—他达拉非仿制制剂①；蓝色—他达拉非仿制制剂②。

图 10 3 种品牌他达拉非片的模拟 XRPD 图谱

Fig.10 Simulated XRPD Patterns of Three Brands of Tadalafil Tablets

MicroED 技术也存在一定的局限性。MicroED 技术能否解析出晶体结构，取决于目标药物晶型的结晶度。只有制剂中药物晶型的结晶度较高时，才能产生足够的衍射信号，解析出晶体结构。此外，无定形药物由于缺乏长程有序的晶体结构，也不适用于 MicroED 方法。

MicroED 技术通过采集样品中少量微晶颗粒的电子衍射数据进行结构解析。由于采集数量有限，且颗粒筛选通常受尺寸、衍射质量、载网上的分布均匀性及取向等因素影响，该技术不可避免地存在较明显的抽样偏差。因此，MicroED 结果仅能定性证明检测区域内特定晶型的存在，不能排除样品整体中存在其他未检出晶型的可能性；同时，该法也难以在颗粒数量有限、代表性不足的情况下，准确反映制剂整体的晶型组成与分布，也无法实现对不同晶型及组分的精准定量分析。

MicroED 的实验条件（通常为低温与超高真空环境）与 XRPD 的常规测试条件（室温、常压）存在显著差异。晶胞体积易受温度、压力等环境因素影响而发生改变，进而使基于 MicroED 结构拟合得到的模拟 XRPD 图谱与样品实测图谱在特征峰位置上产生偏差。若制剂样品中目标晶型的 XRPD 特征峰清晰、信噪比高，可考虑采用 Rietveld 精修方式对晶胞参数进行优化，再对比基于精修结构的模拟图谱与实测 XRPD 图谱，以提升一致性判断的可靠性。然而，该方法无法用于药用晶型特征峰不清晰的样品。若目标晶型衍射峰强度较弱、峰形宽化，都会给基于 XRPD 的精修和比对带来困难，因而此场景不适宜采用 MicroED 技术。

需要强调的是，MicroED 技术检测前通常要对制剂样品进行前处理（如研磨分散、冷冻、与载网介质接触等），这些步骤可能诱发转晶。同时，电子束辐照及高真空条件亦可能增加转晶风险。因此，

对于 MicroED 的解析结果，应结合其他证据链进行交叉验证，如结合 XRPD、DSC/TGA、固态 NMR、Raman 光谱、FT-IR 等表征数据开展一致性比对；结合文献与专利调研，对已知晶型进行排查；必要时通过重复制样、采集不同区域 / 不同批次样品、统计更多晶粒数据来降低抽样偏差，并评估方法的可重复性。

3.2　MicroED 技术在药品注册申请中的应用及建议

相较于传统的晶体表征方法，MicroED 技术凭借样品消耗少、无需单晶培养、快速高效等突出优势，在药物晶型研究中展现出巨大应用潜力，近年来备受关注。事实上，已有企业或研发机构将 MicroED 技术作为药品研发过程中的关键技术手段，并成功将基于 MicroED 的研究结果应用于药品注册申请中，为药品的质量控制和研发提供了有力支持。

基于 MicroED 技术的特点及应用情况，若药品注册申请人采用该技术测定制剂中的药物晶型，建议在申报资料中结合产品开发目标，详细说明拟解决的问题（如直接鉴定药物制剂中的未知晶型、评估制剂生产和贮存过程中活性成分晶型的变化情况、评估仿制药与参比制剂晶型的一致性等）；同时，应提供完整、规范的研究资料，包括具体的实验过程、研究报告、支持性文献等，以证明测试过程的科学性和结果的可靠性。其中，关于测试过程，建议关注以下 3 个方面。

一是制样方法的合理性。药物制剂成分复杂，制样方法需谨慎选择，以避免引入额外试剂影响晶体结构。固体制剂优先采用干燥粉末制样法，即将片剂或胶囊内容物研磨成亚微米级粉末，转移至 TEM 载网并冷冻。若为黏稠膏状制剂，或颗粒板结难以分散，则可将样品与特定溶剂配制成悬液，附着于 TEM 载网后冷冻。溶剂种类的选择至关重要，应使用制剂中所有成分的不良溶剂，尤其须保证溶剂为 API 的不良溶剂，并确保其不干扰晶体结构。此外，制备混悬液易引发样品转晶，可通过比对基于解析结构得到的模拟 XRPD 图谱与原样品实测图谱，判断是否存在晶型转变的情况。对于载药量低的制剂样品，其药用晶型的特征峰一般无法分辨，因此一般不推荐使用悬液制样法。

二是数据量的充足性。MicroED 检测中，数据量的充足性直接影响药物晶体结构解析的成功率。多数小分子药物需采集 3 ～ 10 组 MicroED 数据，方可解析出高质量晶体结构。不同载药量制剂所需的数据组数不同，载药量越低，所需数据量越大。根据经验，载药量 1%～ 5%时至少需收集 200 ～ 500 组数据；载药量 5%～ 10%时至少需收集 50 ～ 200 组数据。

三是药物晶体的结晶度。MicroED 技术解析晶体结构的成功率高度依赖于晶体颗粒的结晶度。结晶度越高，MicroED 数据的分辨率越高（数值越小），解析出晶体结构的成功率越大。分辨率小于 0.12 nm 时，表明药物结晶度较高，解析出制剂中药物的三维晶体结构的可能性较大；若分辨率值大于 0.12 nm，则表明药物结晶度较低，可能无法解析出晶体结构。此时，可对衍射信号进行指标化处理以求解晶胞参数，再通过晶胞参数计算出该晶体结构的理论 XRPD 特征峰位，与制剂的实测 XRPD 图谱对比后确定制剂中该晶型的特征峰位。由于 MicroED 技术可解析出药物的三维晶体结构，因此在评价制剂中药物的实际晶型与目标晶型的一致性时，可从晶胞参数、晶体中分子堆积模式、分子结构、配体种类和数量、含水量等多个方面进行评价，系统评估晶型差异对制剂质量的影响。

采用 MicroED 技术时，建议重点关注以下 2 个方面。

一是清晰展现解析过程和结果。建议简要阐述药物晶体结构解析的推理过程，明确说明所使用的实验数据来源、数据处理方法（包括采用的软件及其版本），以及引用的数据库或参考文献。关键数据，如晶胞参数、晶体物理参数、分子堆积方式和结合状态等，应通过表格、模型或图示进行清晰展示。统计学参数或用于一致性对比的参数，需详细说明其计算过程及所代表的意义。此外，如果分子中含有结晶水或溶剂化物，应明确指出其在每个晶体单元中的结合数量，并提供相应的实验数据支持。

二是必要时可与其他来源的晶型信息相互印证。在进行晶体结构鉴定时，尤其是已知化合物，建议将通过 MicroED 获得的晶型研究数据与其他来源

的晶型表征数据进行对比和验证，从而进一步确认MicroED解析结果的准确性。如果对比过程中发现数据存在差异，应深入分析这些差异产生的原因，不仅有助于证明MicroED解析结果的可靠性，而且能为监管机构的审评提供重要的参考依据。

3.3 总结

本研究基于MicroED技术可解析粉末中亚微米级单颗粒晶体结构的优势，系统探究其用于固体制剂中药物晶型表征的可行性。相较于传统表征手段，MicroED技术可通过增加颗粒采集数量适配低载药量制剂，且无需参照图谱即可直接解析多组分晶体结构，具备筛查未知晶型的独特优势，在制剂晶型研究中优势突出。同时，该技术存在样品代表性不足、实验条件差异及制样转晶等局限性，需结合多种表征手段交叉验证，以保障结果可靠性。基于研究结果，本文对MicroED技术在药品注册申请中的应用提出以下建议：实验阶段应规范制样操作，保证充足的数据采集量，并确保药物晶体具备良好结晶度；结构解析需完整呈现研究过程与结果，辅以多源晶型数据互证，进一步提升检测结果的科学性与说服力。

参考文献：

[1] 杨世颖, 周健, 张丽, 等. 我国化学药物晶型研究现状与进展[J]. 医药导报, 2019, **38**(2): 177-182.

[2] 徐晓宏, 李飞, 杨柳, 等. 多晶型药物的监管要求及其药学研究思考[J]. 中国医药工业杂志, 2023, **54**(5): 791-796.

[3] 杨敏, 徐亮. 采用差示扫描量热法定量分析固体分散体中的依折麦布晶型[J]. 中国医药工业杂志, 2023, **54**(3): 424-428.

[4] 田芳, Zimmermann A, Mcgoverin C, 等. 拉曼技术在药物逆向工程中的应用[J]. 药学进展, 2016, **40**(12): 897-905.

[5] 杨世颖, 邢逞, 张丽, 等. 基于粉末X射线衍射技术的固体制剂晶型定性分析[J]. 医药导报, 2015, **34**(7): 930-934.

[6] Nannenga B L, Shi D, Leslie A G W, *et al*. High-resolution structure determination by continuous-rotation data collection in MicroEDED [J]. *Nat Methods*, 2014, **11**(9): 927-930.

[7] Nannenga B L, Gonen T. The cryo-EM method microcrystal electron diffraction (MicroED) [J]. *Nat Methods,* 2019, **16**(5): 369-379.

[8] Rodriguez J A, Eisenberg D S, Gonen T. Taking the measure of MicroED [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2017, **46**: 79-86.

[9] Jones C G, Martynowycz M W, Hattne J, *et al*. The CryoEM method MicroED as a powerful tool for small molecule structure determination [J]. *ACS Cent Sci*, 2018, **4**(11): 1587-1592.

[10] Unge J, Lin J, Weaver S J, *et al*. Compositional analysis of complex mixtures using automatic MicroED data collection [J]. *Adv Sci* (Weinh), 2024, **11**(23): e2400081.

[11] Kabsch W. XDS [J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2010, **66**(Pt 2): 125-132.

[12] Kabsch W. Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement [J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2010, **66**(Pt 2): 133-144.

[13] Sheldrick G M. SHELXT: integrated space-group and crystal-structure determination [J]. *Acta Crystallogr A Found Adv*, 2015, **71**(Pt 1): 3-8.

[14] Sheldrick G M. Crystal structure refinement with SHELXL [J]. *Acta Crystallogr C Struct Chem*, 2015, **71**(Pt 1): 3-8.

[15] Unge J, Nannenga B L, Oliver A G, *et al*. Standards for MicroED [J]. *Acta Crystallogr C Struct Chem*, 2025, **81**(Pt 7): 376-390.

[16] Lu S Q, Yu K X, Wang S P, *et al*. Polymorphs and pseudopolymorphs of lenvatinib mesylate: crystal structure, equilibrium solubility, and stability study [J]. *Cryst Growth Des*, 2022, **22**(7): 10.

[17] Coutsias E A, Seok C, Dill K A. Using quaternions to calculate RMSD [J]. *J Comput Chem*, 2004, **25**(15): 1849-1857.

[18] Hunnisett L M, Nyman J, Francia N, *et al*. The seventh blind test of crystal structure prediction: structure generation methods [J]. *Acta Crystallogr B Struct Sci Cryst Eng Mater,* 2024, **80**(Pt 6): 517-547.

[19] Leung H W, Copley R C B, Lampronti G I, *et al*. From formulation to structure: 3D electron diffraction for the structure solution of a new indomethacin polymorph from an amorphous solid dispersion [J]. *IUCrJ*, 2024, **11**(Pt 5): 744-748.

[20] Daugan A, Grondin P, Ruault C, *et al*. The discovery of tadalafil: a novel and highly selective PDE5 inhibitor. 2: 2,3,6,7,12,12a-hexahydropyrazino[1',2':1,6]pyrido[3,4-*b*]-indole-1,4-dione analogues [J]. *J Med Chem*, 2003, **46**(21): 4533-4542.

[21] Wang B, Zou X, Smeets S. Automated serial rotation electron diffraction combined with cluster analysis: an efficient multi-crystal workflow for structure determination [J]. *IUCrJ*, 2019, **6**(Pt 5): 854-867.