兽用化学原料药制备和结构确证研究技术指导原则

一、兽用化学原料药制备研究的技术指导原则

（一）概述

兽用化学原料药的制备是兽药研究和开发的基础，是兽药研发的起始阶段，其主要目的是为兽药研发过程中药理毒理研究、制剂研究、临床研究提供合格的原料药，为质量研究提供详细的信息，为工业化生产提供稳定、可行的生产工艺，为上市兽药的生产提供符合要求的原料药。

本指导原则是一个通用的原则，适用于经化学全合成或半合成以及从动、植物中提取的兽用原料药的研制，包括新兽药、进口兽药和已有国家标准的兽药，经微生物发酵得到的兽药也可参考该指导原则的要求。因此本指导原则只是给予兽药研发者原料药制备研究中应关注的基本问题，可根据原料药研发的实际情况，采用其他更有效的方法和手段，但是必须符合兽药研发的规律，能够科学、合理地解释和处理兽药研发中的问题。

（二）原料药制备研究的一般过程

原料药制备研发过程一般包括以下六个阶段：

1、确定目标化合物：通过文献调研、药效学筛选实验或其它有关基础研究工作，确定所需要进行研发的化合物。

2、设计合成路线：根据目标化合物的结构特性，参考国内外相关文献，综合分析，确定一条工艺简单、成本合理、收率相对较高、终产品易于纯化的合成路线。

3、制备目标化合物：通过化学反应、生物发酵或其他方法制备出质量符合要求的目标化合物，为产品进行结构确证、质量控制等药学方面的研究，以及药理毒理研究和临床研究提供合格的样品。

4、结构确证：经过物理或化学的方法，准确无误地确证目标化合物的结构（包含立体结构）（参考原料药结构确证研究的技术指导原则）。

5、工艺优化：综合考虑工艺路线的反应条件、环保情况、产品精制与纯化的可行性、原材料获得的难易程度等对生产工艺进行优化。

6、中试放大研究、工业化生产：通过对中试、工业化生产工艺路线的研究，确定稳定、可行的工艺，为兽药的制剂生产提供符合要求的原料药。

（三）原料药制备研究的一般内容

### 1、工艺的选择

制备工艺选择的目的是通过对拟合成的目标化合物的文献调研，设计或选择合理的合成路线；对所选择的路线进行初步分析，对该化合物的国内外研究情况、知识产权状况有一个总体的认识；对所采用的工艺有一个初步的评价，也为兽药的评价提供可靠依据，这个阶段是原料药制备工艺研究的必然阶段。

对于新的化学实体，根据其结构特征，综合考虑起始原料获得的难易程度、合成步骤的长短、收率的高低以及反应的后处理、反应条件是否符合工业生产、环保要求等因素后，确定合理的合成路线；或者根据国内外对类似结构化合物的文献报道，进行综合分析，确定适宜的合成方法。

对于通过微生物发酵获得的原料药或者从动、植物中提取获得的原料药，经对原材料和工艺过程的可控性分析，综合考虑成本、环保情况等，确定一条可以确保产品质量可控、收率较高的工艺路线。

对于结构已知的兽药，通过文献调研，对有关该兽药制备的研究情况有一个全面的了解；对所选择的路线从收率、成本、“三废”处理、起始原料是否易得、是否适合工业化生产等方面进行综合分析，选择相对合理的合成路线。若所选择的路线为创新路线，通过对现有的路线进行分析，与文献报道路线进行比较，说明采用该路线的理由；若使用文献报道的路线，也要对文献报道路线进行全面的比较、分析，这样有利于研发者对此路线有较深入的理解和认识。

### 2、起始原料、试剂的选择原则

主要分为起始原料的选择，溶剂、试剂的选择，内控标准等三部分。

2.1 起始原料的选择

起始原料应质量稳定、可控，应有来源、标准和供货商的检验报告，必要时应根据合成工艺的要求建立内控标准。对由起始原料引入的杂质、异构体，必要时应进行相关的研究并提供质量控制方法，对具有手性中心的起始原料，应制订作为杂质的对映体异构体或非对映异构体的限度，同时应对该起始原料在制备过程中可能引入的杂质有一定的了解。

2.2 溶剂、试剂的选择

一般来说应选择毒性较低的试剂；有机溶剂的选择一般避免使用一类溶剂，控制使用二类溶剂，同时应对所用试剂、溶剂的毒性进行说明，这样有利于在生产过程中进行控制，也有利于劳动保护。有机溶剂选择的详细内容请参阅化学兽药有机溶剂残留量研究的技术指导原则。

2.3 内控标准

在兽药的制备工艺中，起始原料、试剂可能存在着某些杂质，若在反应过程中无法将其去除或者参与了副反应，对终产品的质量有一定的影响，因此需要制定相应的内控标准对其进行控制。一般要求对产品质量有一定影响的起始原料、试剂制订内控标准，同时还应注意在工艺优化和中试放大过程中起始原料和重要试剂规格的改变对产品质量的影响。

一般来说内控标准应重点考虑以下几个方面：（1）对名称、化学结构、理化性质要有清楚的描述；（2）要有具体的来源，包括生产厂家和简单的制备工艺；（3）提供证明其含量的数据，对所含杂质情况（包含有毒溶剂）进行定量或定性的描述；（4）如果需要采用起始原料或试剂进行特殊反应，对其质量应有特别的要求，如：对于必须在干燥条件下进行的反应，需要对起始原料或试剂中的水分含量进行严格的要求和控制；若起始原料为手性化合物，需要对对映异构体或非对映异构体的限度有一定的要求；（5）对于不符合内控标准的起始原料或试剂，应对其精制方法进行研究，这样有利于对工艺和终产品的质量进行控制。通常，在工艺路线稳定的条件下，所采用的起始原料、试剂的质量也应相对稳定。

### 3、工艺数据的积累

在兽药研发过程中，原料药的制备工艺研究是一个不断探索和完善的动态过程，兽药研发者需要对制备工艺不断地进行试验，反复进行优化，以达到获得一个可行、稳定、收率较高、成本合理并适合工业化生产的工艺路线。在这个重复完善的过程中，积累充足的实验数据对判断工艺路线的可行性、稳定性具有重要意义，同时也可以为质量研究提供有关信息。因此，在兽药研发过程中，研发者应积极主动收集有关的工艺研究数据，并尽可能提供充分的原料药制备数据的报告，并对此进行科学的分析，作出合理的结论，充分的数据报告也将有利于药品评价者对原料药制备工艺的评价，需要说明的是，数据的积累贯穿兽药研发的整个过程。

工艺数据的报告一般从以下几个方面考虑：对工艺有重要影响的参数、投料量、产品收率及质量检验结果（包括外观、熔点、沸点、比旋度、晶型、结晶水、有关物质、异构体、含量等），并说明样品的批号、生产日期、制备地点。

工艺数据报告一般分为临床研究和生产研究两个阶段，可采用表格的形式进行汇总，参考式样见附件。

### 4、中间体的研究及质量控制

在原料药制备研究的过程中，中间体的研究和质量控制是不可缺少的部分，其结果对原料药制备工艺的稳定具有重要意义，也可以为原料药的质量研究提供重要信息，同时也可以为结构确证研究提供的重要依据，对中间体结构进行确证，可以为终产品的结构确证起辅助作用（详见原料药结构确证研究的技术指导原则）。

一般来说，由于关键中间体对终产品的质量和安全性有一定的影响，因此对其质量进行控制有较大意义。对于新结构中间体，由于没有文献报道，因此其结构研究对于认知该化合物的特性、判断工艺的可行性和对终产品的结构确证具有重要作用。对关键中间体、新结构中间体质量进行控制，对工艺的稳定性、终产品的质量研究具有重要的意义。对于一般中间体的质量要求可相对简单，对其质量可以进行定量控制。有时，因终产品结构确证研究的需要，有必要对已知结构中间体的结构进行研究。

4.1 已知结构的关键中间体

一般情况下应对其理化常数、质量（定性、定量）进行研究，根据结构确证研究的需要，提供相应的结构研究资料。理化常数研究一般应包括：熔点、沸点、比旋度、溶解性等，并与文献报道的有关数据进行比较。质量控制一般包括：性状、异构体（对于具有立体异构的化合物）、有关物质、含量等。结构研究：如果因终产品结构确证的需要，应对其结构进行确证，并应与有关的文献资料进行比较。

4.2 新结构的中间体

一般情况下应对其结构进行确证，并对理化常数、质量控制（定性、定量）进行研究。结构研究：一般来说应进行红外、紫外、核磁共振（碳谱、氢谱，必要时进行二维相关谱研究）和质谱（包括高分辨质谱）等的研究，以确证该中间体的结构。理化常数研究一般包括：熔点、沸点、比旋度、溶解性等。质量研究一般包括：性状、异构体（对于具有立体异构的化合物）、有关物质、含量等。

4.3 已知结构的一般中间体

一般情况下应对其理化常数进行研究，并与文献资料进行比较，同时还应对其质量进行研究，并根据结构确证研究的需要，提供相应的结构研究资料。理化常数研究一般包括：熔点、沸点、比旋度、溶解性等。质量研究一般包括：采用TLC、HPLC 、GC 等方法，对其在反应过程中进行定量或定性控制。结构研究：如果由于终产品结构确证研究的需要，应对其结构进行确证，并应与有关的文献资料进行比较。

4.4 中间体的再精制

对于不符合标准的中间体，应对其再精制的方法进行研究。

### 5、工艺的优化与中试放大

在原料药的工艺研究中，工艺的优化与中试放大是原料药制备从实验室阶段过渡到工业化阶段不可缺少的环节，也是该工艺能否工业化的关键，同时对评价工艺路线的可行性、稳定性具有重要的意义。

原料药制备工艺优化与中试放大的主要任务是：（1）考核实验室提供的工艺路线在工艺条件、设备、原材料等方面是否有特殊的要求，是否适合工业化生产；（2）确定所用起始原料、试剂或有机溶剂的规格或标准；（3）验证小试工艺是否成熟合理，主要经济指标是否接近生产要求；（4）进一步考核和完善工艺条件，对每一步反应和单元操作均应取得基本稳定的数据；（5）根据中试研究资料制订或修订中间体和成品的质量标准、分析方法；（6）根据原材料、动力消耗和工时等进行初步的技术经济指标核算；（7）提出“三废”的处理方案；（8）提出整个合成路线的工艺流程，各个单元操作的工艺规程。一般来说，中试所采用的原料、试剂的规格应与工业化生产时一致。通过动、植物中提取的有效单体、通过微生物发酵得到的原料药的实验室研究、中试与合成兽药基本相似，仅用提取、分离、纯化等工序代替各步化学反应。在工艺优化和放大过程中，中试规模的工艺在兽药评价中具有非常重要的意义，该阶段是连接实验室研究和工业化生产的重要部分，是评价原料药制备工艺可行性、真实性的关键，是质量研究的基础，兽药研发者应特别重视原料药的中试放大研究，需要说明的是中试规模工艺的设备、流程应与工业化生产一致。

原料药的中试的规模问题一直存在争议，主要是因为不同兽药规模的要求应该是不同的。应根据不同兽药（创新兽药、发酵兽药、提取兽药以及剂量较小的兽药等）的特点，可分别采用下述之一为中试规模的要求：（a）单剂量的10000 倍以上；（b）终产品达到公斤级；（c）单元反应器体积不小于20 升。一般来说，对于创新兽药、剂量较小的兽药（如：单剂量为微克级的兽药）可采用（a）的要求；对于发酵、提取的兽药可采用（b）的要求；一般的合成兽药可采用（b）或（c）的要求。

原料药的工艺优化过程是一个动态的过程，随着工艺路线的不断优化，反应条件、所使用的起始原料、试剂或溶剂的规格等会发生改变，研发者应注意这些改变对产品的晶型或者质量的影响，因此应对重要的变化，如：所使用的起始原料、关键试剂的种类或规格、重要的反应条件、产品的精制方法等发生改变前后对产品晶型的影响以及可能引入新的杂质情况进行说明，并对变化前后产品的质量进行比较。

### 6、杂质的分析

原料药制备过程中产生的杂质是原料药杂质的主要来源，该方面的工作是质量研究的基础。通过对工艺过程中产生的杂质进行详细的研究、分析，兽药研发者可以对工艺过程中产生的杂质有一个全面的认识，为终产品的质量研究可以提供十分有用的信息。需要说明的是，这里所述的杂质是指原料药制备过程中由于副反应产生的杂质、所用的起始原料引入的杂质以及有机溶剂等，不包括降解产物。杂质的研究可参阅兽用化学药物杂质研究的技术指导原则。

制备过程中产生的杂质一般要从以下几个方面考虑：

（1）起始原料引入的杂质

（2）副反应产生的杂质

（3）异构体

（4）残留溶剂、试剂、中间体

（5）痕迹量的催化剂

（6）无机杂质

### 7、“三废”处理

在原料药制备研究的过程中，“三废”的处理应符合国家对环境保护的要求。在工艺研究中需对工艺过程中可能产生的“三废”问题进行考虑，尽可能避免使用有毒、污染环境的溶剂或试剂，在确定合成路线时尽可能避免采用可能会对环境造成污染的路线，并需要结合生产工艺制订合理的“三废”处理方案。

### 8、工艺的综合分析

在原料药制备研究的过程中，工艺的综合分析也是一个重要的方面，通过综合分析可以使兽药研发者对整个工艺的利弊有一个明确的认识，同时也有利于药品评价工作。兽药研发者在以上研究的基础上，经对实验室工艺、中试工艺、工业化生产工艺这三个阶段的深入研究，应对整个工艺有一个全面的认识，对原料药的制备工艺从工艺路线、反应条件、产品质量、经济效益、环境保护、劳动保护等方面进行综合评价。

（四）名词解释

起始原料: 起始原料是指稳定的、批量生产的化合物，其质量应是可控的。

中间体：在原料药化学合成中产生的、需要进一步的结构改造才能生成原料药的化合物。

关键中间体：对终产品的质量或安全性有影响的物质，其中也包括对产品质量、安全性有影响的试剂或起始原料。

已知结构中间体：是指已有文献报道的中间体。

新结构中间体：是指尚没有文献报道的中间体。

试剂：一种与起始物或溶剂不同的物质，在原料药的制备中使用。

溶剂：在原料药制备中用于制备溶液或混悬液的无机或有机液体。

杂质：是在合成或发酵工艺中由于原料、试剂、溶剂或副反应引入的与终产品结构不一样的任何一种成分。

内控标准：是指根据工艺路线的要求，生产企业或研发单位制订的某一化合物的质量控制标准。

（五）参考文献

1、ICH Q3a Impurities In New Drug Substances

2、FDA Guidance for Industry Drug Product Chemistry，Manufacturing，and

Controls Information

3、EMEA Note For Guidance On Chemistry of The New Active Substance

4、化学药物原料药制备研究的技术指导原则[，http://www.cde.org.cn](http://www.cde.org.cn).

（六）附件



二、兽用化学原料药结构确证研究的技术指导原则

（一）原料药结构确证的一般过程

结构确证的一般过程：根据化合物的结构特征制订科学、合理、可行的结构确证研究方案，制备符合研究要求的样品，进行有关的研究，对各个研究结果进行综合分析，确证测试品的结构（包括立体结构）。主要包括了药物的命名，理化常数研究，样品的制备，样品的测试，常用的分析测试方法有紫外可见吸收光谱（简称：紫外光谱）（Ultraviolet-Visible Absorption Spectra ，UV）、红外吸收光谱（Infrared Absorption Spectrum，IR）、核磁共振谱（Nuclear Magnetic Resonance，NMR）、质谱（Mass Spectrum，MS）、比旋度（[α]D）、X-射线单晶衍射（简称：单晶X-衍射）（X-ray Single Crystal Diffraction，XRSD）或/和X-射线粉末衍射（简称：粉末X-衍射）(X-ray Powder Diffraction，XRPD)、热分析法（Differential Scanning Calorimetry，DSC）、热重（Thermo-Gravimetry，TG）等，同时可根据化合物结构特征而增加其它测试方法，进行综合解析等。

（二）原料药结构确证研究的基本内容

1、研究方案的制订

兽药结构千差万别，制备（获得）方法也各不相同，因此根据兽药的自身结构特征和制备（获得）方法制订出合理、可行、有效的结构确证方案，才能有效地进行兽药的结构研究。

结构确证的方案应根据兽药自身的结构特点制订，以下是对不同结构类型兽药的测试方案作一简要概述。

1.1 一般兽药

采用常规方法如元素分析（必要时采用高分辨质谱）、UV、IR、NMR、MS、热分析（差热或热重）、粉末X-衍射(XRPD )等即可确证药物的结构。对于结构比较特殊的兽药，也可采用制备衍生物的方法间接证明药物的结构。

对于存在顺反异构的兽药，尤其是因顺反结构不同而导致兽药稳定性、理化性质、药效及安全性等不同的兽药，在一般结构确证的基础上，应增加顺反结构确证的研究。

1.2 手性兽药

除进行上述各项化学结构确证和比旋度测定工作外，还应增加其它有效的测试方法进行研究。

1.2.1 单一对映体 其绝对构型（或通过衍生物的构型）确证常用的方法为：比旋度测定、手性柱色谱（Chiral High Pressure Liquid Chromatography 和Gas Chromatography ，手性HPLC 和GC）、核磁共振（NMR）、单晶X-衍射（XRSD）以及旋光色散（Optical Rotatory Dispersion，ORD）、圆二色谱（Circular Dichroism，CD）等，其中单晶X-衍射为直接方法，可提供最直接的信息。也可采用间接的方法，如：在说明化合物（兽药）在反应过程中构型没有变化的情况下，根据已知的起始原料构型、化学合成方法的立体选择性以及中间体的结构也可间接获得终产品（兽药）的构型信息。

1.2.2 兽药分子中含有多个不对称因素应对其绝对构型、对映体纯度（非对映体纯度）进行相关的研究，并尽可能提供更多的构型确证信息。

1.2.3 立体异构混合物增补各立体异构体比例的确证研究。对于已有实验证据或文献报道不同立体异构体在药效、药代或毒理等方面有明显不同或有相互作用的兽药，其混合物中各组分的构型确证和比例测定更有必要。

1.2.4 外消旋或富集对映体 可通过测定比旋度或采用手性柱色谱（Chiral HPLC、Chiral GC）及核磁共振谱等方法阐明其对映体的比例。

1.3 不含金属元素的有机盐类或复合物

根据结构确证的需要，可提供成盐前后的两套波谱和试验数据。对于某些波谱测定有困难或不易说明兽药结构的盐或复合物，测定药物的有机酸根或有机碱基的波谱，并结合其它试验项目亦可对其结构确证提供有效的信息。

1.4 金属盐类和络合物

在进行一般要求的各项测试基础上，考虑以适当手段反映兽药中金属元素的种类、存在形式和含量的确证试验；不适于或不能测试金属盐本身的项目，可考虑以成盐前的酸分子或配位体的相应测试结果进行佐证。

1.5 半合成兽药

分子中母核的结构为已知并在可提供明确证据证明原分子母核结构在半合成全过程中未发生改变的前提下，适当简化对母核部分结构的确证工作，仅对新引入的基团结构进行确证。

1.6 多晶型兽药

在进行一般要求的各项测试基础上，应以适宜方法获得兽药晶型数据。药物晶型测定常用方法为粉末X-衍射(XRPD)、红外吸收光谱法、熔点、热分析、光学显微镜等。

该类兽药一般可分为以下几种情况：

1.6.1 创新兽药 应进行兽药在不同结晶条件下（溶剂、温度、结晶速度等）是否存在多种晶型的研究。

1.6.2 已有文献报道存在多晶型的兽药 应明确药物晶型的类型和纯度。对于混晶兽药，应测试其晶型组成（种类、比例），并与文献数据比较。对于因晶型影响其溶解性、稳定性、生物利用度和活性的兽药，在无相应药理、药效等研究证明该晶型的安全性和有效性时，应确证自制品与国外上市药用晶型的一致性。

1.7 含有结晶水或结晶溶剂的兽药

该类兽药在进行一般分析时，热分析研究已经提供了兽药中的结晶水或结晶溶剂的信息，如果结合干燥失重、水分或单晶X-衍射(XRSD)等方法的测定结果，基本上可以达到对兽药中结晶水/溶剂以及吸附水/溶剂进行定性、定量的目的。

1.8 合成多肽兽药和多糖类兽药

1.8.1 合成的多肽兽药 通过氨基酸分析、质谱测定、序列分析以及肽图测绘（含有20 个以上的氨基酸残基兽药）等实验可基本获得合成多肽兽药的结构信息。兽药结构中如有半胱氨酸，应明确其状态（氧化态或还原态），对含有多个半胱氨酸的多肽兽药，应明确二硫键正确连接位点。

如各步中间体均进行了质谱测定，可根据相关中间体的结构信息，推测出进行反应的氨基酸的种类。

质谱是多肽兽药结构确证的重要手段，紫外、红外、核磁共振、多种流动相HPLC、比旋度测定等方法亦可对的结构确证提供帮助。

对于多肽兽药，应对目标物的化学纯度和对映体或非对映体纯度进行研究。

1.8.2 多糖类兽药 通过对单糖组成、分子量、糖苷键连接方法和连接位置等的分析，可获得多糖类兽药的基本结构信息。单糖的分离和鉴定可采用纸色谱法、薄层色谱法、高效液相色谱法、气－质联用等技术；多糖的相对分子量及分子量分布测定可用凝胶色谱等方法。红外光谱、核磁共振、化学反应后产物的分析等实验，可帮助确定糖苷键的连接方式及糖苷键的位置。

1.9 多组份兽药 应明确各组份的组成比例，对其主要成分应进行结构确证，具体方法可参照本指导原则的相关要求。

1.10 其它对于上述未提及的具有特殊结构，需特殊方法进行说明、确证的兽药，可根据其结构特征，制订能反映兽药自身结构特征的方法进行结构研究。

2、测试样品的要求

在结构确证的研究中，供试样品的纯度需要进行一定的控制，只有使用符合要求的供试品进行结构研究，才能获得兽药正确的结构信息

一般情况下，采用原料药制备工艺中产品的精制方法对样品进行精制，并采用质量标准中的方法测其纯度、杂质，供试样品的纯度应大于99.0%，杂质含量应小于0.5%。

3、结构确证研究的一般内容

3.1 一般兽药的结构确证

3.1.1 兽药元素组成

通常采用元素分析法。这种方法可获得组成兽药的元素种类及含量，比较测试结果与理论结果差值的大小（一般要求误差不超过0.3％），即可初步判定供试品与目标化合物（兽药）的分子组成是否一致。

对于因兽药自身结构特征而难于进行元素分析时，在保证高纯度情况下可采用高分辨质谱方法获得兽药元素组成的相关信息。

3.1.2 紫外吸收光谱（UV）

通过对兽药溶液在可见-紫外区域内在不同波长处吸收度的测定和吸收系数（尤其是摩尔吸收系数）的计算，以及对主要吸收谱带进行归属（如K 带、R 带、E 带、B 带），可获得兽药结构中可能含有的发色团、助色团种类以及初步的连接方式等信息，同时对兽药的鉴别亦有指导意义。

对于发色团上存在酸性或碱性基团的兽药，通过在酸或碱溶液中（常用0.1mol/L HCl溶液或0.1mol/L NaOH溶液）最大吸收波长的测试，观察其紫移或红移现象，可为上述酸性或碱性基团的存在提供进一步的支持。

3.1.3 红外吸收光谱（IR）

通过对兽药进行红外吸收光谱测试，可推测出兽药中可能存在的化学键、所含的官能团及其初步的连接方式，获得兽药可能的几何构型、晶型、立体构象等信息。固态兽药红外测试可分为压片法、糊状法、薄膜法，液态兽药可采用液膜法测试，气态兽药则可采用气体池测定。应注意的是，部分含多晶型的兽药在研磨和压片过程中，其晶型也可能发生变化，此时可改用糊法等方法测定。由于糊剂自身有吸收，因此应根据兽药的结构特点对糊剂的种类进行选择。另外值得注意的是盐酸盐药物在采用KBr 压片时可能会发生离子交换现象，应分别对氯化钾压片和溴化钾压片法测得的结果进行比较，并根据结果选择适宜的压片基质。

3.1.4 核磁共振谱（NMR）

本项测试可获得兽药中的组成元素类型、数目、相互连接方式、周围化学环境、甚至空间排列等信息，进而推测出化合物相应官能团的连接状况及其初步的结构。常用的有氢核磁共振谱（1H-NMR）和碳核磁共振谱（13C-NMR）等。核磁共振测试的重要参数有：化学位移（δ）、偶合常数（J 值）、峰形、积分面积等。

溶剂峰或部分溶剂中的溶剂化水峰可能会对兽药部分信号有干扰，因此测试时应选择适宜的溶剂或方法，以使兽药所有信号得到充分显示。

3.1.4.1 氢核磁共振谱（1H-NMR） 该项测试可提供供试品中氢原子数目、周围化学环境、可能相互间关系、空间排列等信息。此外属于1H-NMR测试的NOESY或NOE（Nuclear Overhauser Effect）试验，还可给出某些官能团在分子中位置、优势构象及构型。

氘代实验可以提供活泼氢的存在以及种类的信息。

3.1.4.2 碳核磁共振谱（13C-NMR） 该项测试可提供供试品中不同碳原子的类型以及所处的化学环境信息，便于对化合物进行初步的结构解析。DEPT（Distortionless Enhancement by Polarization Transfer）谱可进一步明确碳原子属于伯碳、仲碳、叔碳或季碳。

3.1.4.3 二维核磁共振谱 目前常用的二维核磁共振谱包括1H-1H相关谱、13C-1H相关谱、13C-1H远程相关谱等。对于结构复杂或用一维NMR方法难以进行结构确证的化合物，进行二维核磁共振谱的测试可更有效地确证兽药的结构。

3.1.4.4 其它核磁共振谱 对于分子式中含F、P 等元素的兽药，进行相应的F、P 谱测试，除可提供相应元素的种类、在分子中所处的化学环境等信息外，对兽药元素组成确定亦有重要的佐证作用。

3.1.5 质谱（MS）

用于原子量和分子量的测定、同位素的分析、定性或定量的化学分析，重要参数有分子离子峰、碎片峰、丰度等。

分子离子峰是确证兽药分子式的有力证据，应根据药物自身结构特性选择适宜的离子源，同时尽可能地获得分子离子峰和较多的、可反映出兽药结构特征的碎片峰。对含有特殊同位素元素（如Cl、Br 等）的兽药，利用分子离子峰及其同位素峰丰度间的关系，可以判断兽药中这些组成元素的种类、数量。

高分辨质谱是通过精确测定分子量确定兽药分子式，但它不能反映兽药的纯度和结晶水、结晶溶剂、残留溶剂、无机酸根等情况。

随着科学的发展，GC-MS、MS-MS、LC-MS等方法也用于兽药研究中，研发者应根据兽药的组成和结构特征选择适宜的方法。

3.1.6 粉末X-衍射（PXRD）

可用于固态单一化合物的鉴别与晶型确定，晶态与非晶态物质的判断，多种化合物组成的多项（组分）体系中的组分（物相）分析（定性或定量），原料药（晶型）的稳定性研究等。

3.2 手性兽药的结构确证

手性兽药的结构（或通过生成其衍生物）确证应在上述一般研究的基础上，采用特殊手段对其绝对构型进行确证，特别是对于创新兽药，绝对构型的确定具有非常重要的意义。

常用方法为单晶X-衍射（XRSD）、核磁共振谱（NMR）、圆二色谱（CD）、旋光光谱（ORD）以及上述的NOESY 或NOE 差谱（主要适用于具有刚性结构的兽药）等。其中单晶X－衍射（XRSD）为直接方法，后三种为间接方法。

3.2.1 单晶X-衍射（XRSD） 可获得有关兽药晶型的相关信息、兽药的相对或绝对构型以及与兽药以结晶形式存在的水/溶剂及含量等一系列信息。

手性兽药绝对构型的测试，建议采用单晶X 射线四园衍射仪，CuKα靶，衍射实验的θ角范围不低于57°。

3.2.2 圆二色谱（CD ） 该项测试通过测定光学活性物质（兽药）在圆偏振光下的Cotton 效应，根据Cotton 效应的符号获得兽药结构中发色团周围环境的立体化学信息，并与一个绝对构型已知的与待测兽药结构相似化合物（兽药）的Cotton 效应相比较，即可能推导出待测物（兽药）的绝对构型。

此外对于一般具有刚性结构的环体系的羰基兽药，通过比较其Cotton 效应的符号并结合经验规律“八区律”，亦可能预言某些羰基兽药的绝对构型。

3.2.3 旋光光谱 通过比较相关兽药的旋光性，可得到手性兽药的相对构型信息。如能得知兽药旋光的可测范围，则在一系列反应后，兽药绝对构型可从用于制备该兽药的底物构型推导得到。

应注意的是，在采用该方法测定兽药绝对构型时，要在相同的溶剂中以相同的浓度和近乎相同的温度测定旋光，以保证比较的可靠性。

3.2.4 NOESY 或NOE 差谱通过对具有刚性结构（或优势构象）兽药官能团上质子的选择性照射，致使与其相关质子峰强度的增减和相互间偶合作用的消失，从而推测出邻近官能团的空间构象，进而可获得兽药构型的信息。

3.2.5 其他方法 例如化学比较法、核磁共振法等。

3.3 兽药晶型的研究

在兽药研发过程中，多晶型现象是普遍存在的，其中有部分兽药因晶型不同具有不同的生物利用度和/或生物活性，特别是水溶性差的口服固体兽药。

创新兽药研究中，应对不同结晶条件下（溶剂、温度、结晶速率等）的晶型进行研究；通过不同晶型对兽药活性和毒性等影响的研究，可为其临床应用晶型的选择提供依据。

对于仿制已上市的兽药，应进行自制兽药的晶型与已上市兽药晶型比较的研究，以保证自制品晶型的正确性。

进行连续多批样品晶型一致性的研究，是判断工艺是否稳定的依据之一。

兽药晶型测定方法通常有粉末X-衍射、红外光谱、热分析、熔点、光学显微镜法等。

3.3.1 粉末X-衍射（XRPD ） 粉末X－射线衍射测试是判断研制兽药与其对照品晶型是否一致的首选方法。

3.3.2 红外光谱（IR） 某些结构相同但晶型不同的兽药，它们的红外光谱在某些区域可能存在一定的差异，因此比较兽药的红外光谱，可用于区分兽药的晶型。但应注意在研磨、压片的过程中，药物的晶型可能会改变。

3.3.3 熔点（mp） 结构相同但不同晶型的兽药其熔点可能存在一定的差异，熔点也可以用于晶型研究。

3.3.4 热分析 用于兽药的物理常数、熔点和沸点的确定，并作为鉴别和纯度检查的方法。晶型不同的兽药其热分析图谱有一定的差异，常用热分析方法有差示扫描量热法（DSC）和差热分析法（DTA）。

3.3.5 其他方法 光学显微镜法等。

3.4 兽药结晶水或结晶溶剂的分析

对于含有结晶水或结晶溶剂的兽药，应对兽药中的水分/溶剂进行分析。常用分析方法为热重、差热分析、干燥失重、水分测定、核磁共振以及单晶X-衍射（XRSD）。

3.4.1 热重 可获得测试兽药的吸附水／溶剂、结晶水/溶剂及初步的分解温度等信息，结合差热分析的信息，还可判断测试兽药在熔融时是否分解。

3.4.2 差热分析 该项测试可推测出测试兽药的吸附水/溶剂、结晶水/溶剂以及熔点、有无多晶型存在和热焓值等信息。

3.4.3 干燥失重 该方法可获得测试兽药中结晶水或溶剂、吸附水或溶剂的信息。

3.4.4 水分测定 可以获得测试兽药中总含水量的信息（吸附水或结晶水）。

3.4.5 单晶X-衍射（XRSD） 单晶X-衍射在提供兽药元素组成、分子量及结构信息的同时，还可提供兽药中以结晶形式存在的水或溶剂的信息，包括结晶水或溶剂的种类、数量、存在方式等。

3.4.6 其他方法 如通过核磁共振测试，有可能获得兽药中含有的部分结晶溶剂的信息。

以上分析方法均有各自的优、缺点，在兽药的结构确证研究中应根据兽药的结构特征，选择适宜的方法，同时也可利用不同方法所得结果进行相互补充、佐证，以确定存在于兽药中水或溶剂的种类、数量和形式。

3.5 其它具有特殊元素兽药的结构确证

对于结构中含有金属离子以及P、F 等元素的兽药，进行相应金属原子吸收测定以及F、P 等元素的测定结果，对其结构确证有重要意义。

3.5.1 原子发射光谱法、原子吸收分光光度法（ Atomic Emission Spectrophotometry、Atomic Absorption Spectrophotometry，AES 、AAS） 可用含有多种金属离子的兽药中无机微量元素的含量分析。

AES常用于金属元素的定性研究， AAS 可用于金属元素的定量研究。

3.5.2 络合金属离子存在方式的检测 可采用单晶X-衍射等方法进行检测。

4、参考文献和对照品对结构确证的意义及要求

在结构确证研究中，参考文献和结构确证用对照品对结构确证具有重要的佐证意义，但不是兽药结构确证研究的必要条件。

4.1 参考文献对结构确证的意义和要求

参考文献对兽药的结构确证具有重要的佐证作用，所用的参考文献应引自国内外权威杂志或专利，但应注意的是不同的测试条件所得到的测试结果亦可能有所差异。兽药不同研发阶段的参考文献对兽药结构确证所起到的佐证作用可能不同。

4.2 对照品对结构确证的意义和要求

结构确证用对照品的结构信息对兽药的结构确证亦具有重要的佐证作用，不同来源的结构确证用对照品对兽药结构确证的佐证程度不同。对于从制剂中提取、精制所得的结构确证用对照品，如未能验证在提取过程中晶型是否变化，此结构确证用对照品不能作为晶型测定和与晶型有关的其它图谱（如IR、粉末X—射线衍射）以及理化性质（如熔点、差热分析、热重分析）检测的对照依据。

结构确证用对照品和测试样品应在同一仪器上采用相同的测试条件进行测试，其纯度应不低于精制品纯度，以保证结构确证用对照品对兽药结构确证的支持。

5、综合解析

以上每一种方法仅对兽药的结构研究提供相对分散的部分的信息，需要通过综合解析对这些信息进行综合全面分析，才能得到目标化合物完整的结构情况，综合解析不应是各项试验结果的罗列。

对于全新结构的兽药，由于没有相关的文献和对照品，单一的信息往往不能证明兽药的结构，需要对各种方法所得结果进行综合分析，才能准确的解析兽药结构，包括绝对构型以及晶型、结晶水或结晶溶剂的情况。

对于已有文献报道的兽药，结构确证工作可相对简单，特别是文献数据或对照品的数据对结构确证具有一定的参考价值。

对原料药制备工艺的分析可为兽药的结构确证提供间接的依据。

综合解析应遵循简明扼要、有机、合理、深入为原则。简明扼要即是以简洁的语言给出不同方法对兽药结构确证的结果，应避免过多的基本理论解说和繁杂的推导；有机是对不同方法所得的同一兽药结构不同方面信息的综合归纳，以求获得兽药较完整的结构信息；合理即是对数据进行合理的归属、解析，不牵强附会；深入即是在现有解析结果的基础上，根据相互间的关系，获得与药物结构有关的更深层次的信息，以求得对兽药结构的完整认识。

6.兽药的分子式、分子量、结构式及理化常数

6.1 分子式和分子量

6.1.1 分子式 分子式可提供兽药元素组成信息，为制订适宜的元素分析方法提供依据，如兽药分子中含有结晶水或结晶溶剂，应以适宜的形式注明。

6.1.2 分子量 分子量既可对前者进行验证并作为元素分析的基础，也有助于质谱的解析，其精确程度应根据所测试质谱的类型。

6.2 结构式

结构式是兽药结构的具体存在形式，是结构确证研究的目的,提供正确的结构式有助于深入理解兽药的结构、性质和制订测试方案。对于存在异构体、含有结晶水或溶剂、手性中心、络合离子、酸根、碱基的兽药，应在结构式中注明其异构的形式、手性中心的绝对构型、络合位置/方式、酸根/碱基、结晶水或溶剂的位置。

6.3 物理常数

物理常数是反映兽药物理性质的重要的数据，对于兽药物理常数的研究有助于了解兽药的物理性质，并为兽药的质量控制研究服务。

兽药的物理常数一般包括熔点、沸点、沸程、凝点、折光率、粘度、相对密度、溶解度、比旋度、紫外吸收系数等。

对于已有文献报道的兽药，将其物理常数的测试结果与文献报道值比较，对兽药的结构确证亦是一种有力的支持。

（三）名词解释

结构确证用对照品：是指申报兽药为已批准上市的兽药时，从有合法生产资格的非申报单位得到的符合法定标准的样品，包括来自药检所的样品、试剂公司的化合物等。

精制品：是按申报资料中所用生产工艺制得结构单一制品或在此基础上经进一步纯化后所得样品。

富集异构体：是指在一对对映体混合物或非对映体混合物中，某一对映体或非对映体过量的化合物。

（四）参考文献

1、FDA Guidance for Industry Drug Product，Manufacturing，and Controls

Information

2、EMEA Note For Guidance On Chemistry of The New Active Substance

3、林国强等. 手性合成——不对称合成及其应用科学出版社

4、化学药物原料药结构确证研究的技术指导原则，国家食品药品监督管理局。