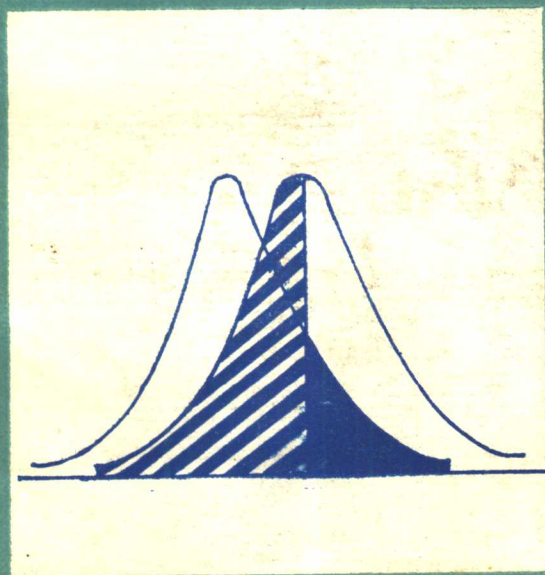


卫生统

生物检定统计

孙瑞元 宋建国 编著



人民卫生出版社

卫生统计应用丛书

生物检定统计

孙瑞元 宋建国 编著

杨树勤 审

人民卫生出版社

责任编辑 董 明

封面设计 王杏云

卫生统计应用丛书编委会

主任委员 田凤调

委 员 (按姓氏笔划排列)

丁道芳 田凤调 李天霖

汤旦林 杨树勤 顾杏元

秘 书 金水高

生物检定统计

孙瑞元 宋建国 编著

人民卫生出版社出版

(北京市崇文区天坛西里10号)

河北省遵化人民印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行

787×1092毫米32开本 3½印张 77千字

1989年11月第1版 1989年11月第1版第1次印刷

印数: 00,001—10,000

ISBN 7-117-01083-5/R·1034 定价: 1.40元

[科技新书目200—146]

卫生统计应用丛书编写说明

为了提高我国卫生统计知识水平，促进卫生统计工作的发展，更好地适应我国四化建设的需要，经过较长时间的同行酝酿，并经与人民卫生出版社协商，决定编写出版这套丛书。

本套丛书以介绍卫生统计基础知识、基本方法为主，注意实用性、科学性。既照顾到读者实际接受的可能性，又要求反映出时代的特点，介绍新的内容。

主要读者对象是：卫生统计专业工作者；医务人员和卫生防疫人员；医学界有关专业的科研与教学工作者；也可作为医学院校学生与研究生的参考书。

卫生统计应用丛书的选题包括下列几个方面：医学统计方法，居民健康统计，卫生资源统计，卫生业务统计，计算机应用技术，卫生统计工作改革等。每册一般为10~15万字，分批出版。

卫生统计应用丛书编委会

1988年12月

目 录

第一节 生物检定概论	1
一、生物检定的意义	1
二、生物检定的特殊性	2
三、生物检定的价值和地位	3
第二节 生物检定中的统计分析	6
一、生物检定统计的特点	6
二、生物检定中常用的统计符号	7
三、生物检定的实验类型	8
四、效价计算的基本法则	12
第三节 生物检定的实验设计	19
一、影响因素	19
二、分组及随机设计	20
三、交叉设计	22
四、拉丁方设计	23
第四节 最小有效量检定法	26
第五节 平行线生物检定法	32
一、平行线法的基本原理	32
二、量反应4点法	37
三、质反应4点法	50
四、量反应6点法	54
五、质反应6点法	61
六、K·K法及K'·K'法	63
第六节 斜率比生物检定法	68
一、斜率比法的基本原理	68

二、斜率比3点法	69
三、斜率比5点法	74
第七节 半数有效量生物检定法	81
一、概述	81
二、加权概率单位法	84
三、点斜法	88
四、简化概率单位法	91
五、半数有效量法的效价计算	94
附录	104
附表1 概率单位表	104
附表2 由预期概率单位查表计算有关参数	106
参考文献	108

第一节 生物检定概论

一、生物检定的意义

生物检定 (Bioassay) 是利用药物的生物学效应 (如药效或毒效) 来检定药物质量的一种方法。

为了保证药物的确切疗效, 在药物制成产品以前, 我们必须首先检定这批药物是否具有规定强度的药效, 其含量或浓度是否符合所标示的药量。多数化学结构比较简单的药物可以用化学方法 (如比色法、滴定法、高压液相色谱法等) 或物理学方法 (如比重法、旋光法等) 加以检定。但是, 有一些药物如: 青霉素、胰岛素、肝素、洋地黄强心甙等, 现有的理化检测方法不能令人满意, 或是因为灵敏度不高, 或是特异性不强, 或是检测手续过繁、价格昂贵, 或是检测结果与实际药效不相符等等。对于这类药物应用生物学方法来比较药效或毒效往往可以得到较好的检测结果。

以青霉素为例, 大家知道, 青霉素每瓶含量是40万单位, 为什么它不象其他药物那样用重量 (g 或 mg) 来标示药量呢? 因为, 一来医药用的青霉素并不是结晶纯品, 二来青霉素的提纯和理化检测非常困难。考虑到青霉素的含量与其抑菌强度或抑菌圈的大小成正比关系, 所以当抑菌强度相等时, 可以认为其中所含的青霉素药量也相等。早在青霉素问世不久, 就规定了在 50ml 肉汤培养基中抑制某特定菌株金黄色葡萄球菌生长繁殖的量就称为一个牛津单位 (Oxford unit)。后来结晶的青霉素G纯品出现, 又规定 $0.6\mu\text{g}$ 的青霉素

G钠盐相当于一个国际单位 (international unit), 即现在习惯上简称的“单位”。

检测时, 为了减少实验误差, 应当在条件一致的情况下比较供试品 (T, tested) 与标准品 (S, standard) 的相对药效。假如供试品4ml的药效与标准品2ml相当, 说明供试品的药效相当于标准品的一半, 其效价比 (potency ratio) 为50%, 如果已知标准品的效价是20u/ml或12 μ g/ml, 就可以推算出供试品的效价是10u/ml或6 μ g/ml。效价 (P, potency) 是生物检定中的专业术语, 它是表达药效强度的计量单位, 表示每ml或每g样品的药效相当于多少国际单位 (这时效价用u/ml或u/g表示), 或相当于多少mg标准品 (这时效价用mg/ml或mg/g表示)。

现在, 我们可以确切地理解生物检定的定义了: 生物检定是以定量药理为基础, 利用药物对生物体 (或离体组织、微生物等) 的生物学效应 (药效或毒效), 通过合理的实验设计, 将供试品与已知效价的标准品在同等条件下进行特定的实验, 再经过药效统计分析和量效关系分析, 求得供试品的效价值比, 进而计算出供试品的实测效价及其95%可信限。

二、生物检定的特殊性

生物检定的任务是检定药物的效价和含量, 生物检定是否合格, 意味着药物质量是否合格。因此各国对于生物检定均有明确的规定并记载于药典之中, 使生物检定有了统一的标准和要求, 带有一定的法典性、国际性和规范性。

首先, 各国药典均收录了应进行生物检定的药物品种, 有些还详细地制定了该药物生物检定的实验方法, 实验设计和统计分析方法。

其次各国参照世界卫生组织分发的国际标准品，建立和制备了有关药物的国家标准品。我国规定的国家标准品见表1-1。

表1-1 我国的国家标准品

青霉素	链霉素	氯霉素
金霉素	土霉素	四环素
红霉素	新生霉素	新霉素
多粘菌素B	制霉菌素	万古霉素
卡那霉素	庆大霉素	巴龙霉素
杆菌肽	抗敌素	强力霉素
洁霉素	利福霉素	平阳霉素
绒促性素	促皮质激素	胰岛素
脑垂体后叶素	肝素	洋地黄
毒毛旋花子甙G	新肿凡纳明	

药物的国际单位已被各国所普遍接受。由世界卫生组织明确规定各药物的国际单位标准及其定义。我国药典规定标准品以单位（u或iu）表示其效价，其定义与国际标准品相对应。

生物检定的具体方法是不断发展更新的，因此，各国药典对某些药物的检定方法也略有不同，同一国家不同年代出版的药典中所载的检定方法也会不尽相同。但是，由于规定了标准品作为同步对比，实际测得的药物效价基本上还是相近的，可以满足对药物质量检定的要求。

三、生物检定的价值和地位

生物检定是以生物的药效反应为指标，与理化测定相比，

实验的误差较大，精确度也较差，实验条件较难控制，实验操作繁琐复杂，由于生物的个体差异，实验数据要经过细致的统计处理才能得到确切的结论，这些都是生物检定的不足之处。的确，一旦较满意的理化测定方法建立之后，很快就取代了该药的生物检定方法。

然而，迄今为止生物检定仍然具有重要的价值，虽然一些陈旧的方法被取代了，但整个生物检定不仅没有被淘汰，反而日益发展。这是因为通过生物检定可以得到与药物临床实际疗效密切相关的效价指标，这是理化方法所无法比拟的优点。例如肝素可使天青A变色，用比色法可以快速精确的测出肝素含量，但抗凝血作用已失活的肝素仍能使天青A变色，因此肝素的比色法并不能反映其抗凝血活性。另一方面新药层出不穷，在研制新药时必不可少的要研究其药理活性和量效关系，这就为建立生物检定法奠定了基础，而可靠的理化检测方法则较难建立。例如多肽类药物中个别几个氨基酸的变化，会对其活性产生很大的影响，甚至L构型转成D构型，都会使一种活性增强数倍，而另一种活性减弱几千倍，用生物检定法是轻而易举的事，用理化方法却无能为力了。

生物检定中历经实践考验而发展起来的药效统计分析方法，部分地弥补了生物差异的干扰，同时也为药效的定量研究提供了有力的手段。当前生物检定法已突破了药物质量检定的范畴，在新药寻找，新药评价和定量药理学中取得了不可忽视的地位。概括地说，生物检定应用有以下几方面。

1. 药品与生物制品的效价测定。
2. 新药研究中比较各种衍生物的相对活性及效比值，为探索药物的构效关系提供定量数据。

3. 新药评价中比较新药与传统老药在各种药效及毒效上的相对效力,从而对新药的作用强度,选择性,安全性做出全面评价。

4. 在中草药研究中利用药效的效价比值进行中草药的质量检定和药效评价。由于采用生物学效应为指标,对于合剂组方也可以进行药效统计分析。

5. 在毒理学研究中可以比较农药及化学药品的残留效应,特别是对于药物及其代谢物均具有活性时,采用生物检定法更为可取。

6. 在基础药理学的研究中,生物检定法以量效关系的比较分析和严密合理的设计和统计处理,为体内介质、递质和局部激素的研究提供了高效率、高特异性和高灵敏度的研究方法。有的已达到 $0.05\sim 0.2\text{ng/ml}$ 的水平(如大鼠胃实验检定组织胺,离体大鼠子宫检定缓激肽……等)。

小 结

1. 生物检定是利用药物的生物学效应(药效或毒效)来检定药物质量的一种方法。其主要目的是进行药品与生物制品的效价测定,在新药评价、衍生物活性对比及定量药理学研究中,也有重要的价值。

2. 效价是表达药效强度的计量单位,通常用 $\mu\text{/ml}$ 或 mg/ml 表示。在测定供试品效价时,一定要在条件一致的情况下,将供试品与标准品进行药效强度对比。求得产生同等药效或毒效时,供试品与标准品相应剂量的比值(效价比),再检定出供试品的实测效价。

3. 生物检定中采用的实验设计和统计分析比较严密合理,大多数已收载于各国药典,成为定型的检定分析方法。

第二节 生物检定中的统计分析

生物检定自建立的第一天开始就与统计分析结下了不解之缘。许多统计学家如Burn, Finney, Gaddum等系统地发展了生物检定的原理和统计方法,有些方法已成为经典的模式广泛地应用于生物检定及定量药理学的研究中。正如Fisher所指出的:“生物检定贯穿了各种重要的统计原理及其应用,它是应用统计学中最有教育意义的一门学科。”

一、生物检定统计的特点

生物检定是建立在生物学效应基础上的,而生物的反应性受个体差异的影响非常大,实验波动大,实验条件难以控制。另一方面,检定的目的又要求从定量的水平上做出比较,因此,生物检定与生物统计不仅有着极为密切的联系,而且生物检定中运用的生物统计方法还有以下几个特点:

1. 实验设计严密合理。常常是各组例数相同,各剂量的间距或比值相等。这种高效率的实验设计有利于应用较少的动物,在较短的时间内得到确切的结论。同时,也为简化计算提供了条件。

2. 实验中多应用小样本。常采用多批多组同步性实验。一般很少有一组例数超过50例的情况。因此计算方法上很少用到大样本处理方法。

3. 实验条件要求严格。因为实验目的并非是为了阐明药物的药理作用,而是借助于药物的药理作用来检定供试品的效价,因此,对实验所用的动物品系、体重、年龄范围、雌雄选择、预处理措施、环境条件、注射速度及药液容量等条件限制较严。甚至有些实验只能用雄性动物而不能用雌性动

物等等。这些条件的严格要求与一般药理实验有所不同。

4. 所用的统计方法已基本定型。生物检定中常用的实验设计是经过精心安排的, 已有一定的模式, 因此, 统计方法也基本定型, 如 4 点法、6 点法等。检定中除计算效价外, 还应进行方差分析、可靠性测验, 对检定作出估价和确切的结论。

二、生物检定中常用的统计符号

除了与生物统计学通用的一些符号外, 生物检定还有一些专用的符号及习惯用法, 例如以 S (标准品) 或 T (供试品) 组成的许多组合符号; 以 FL 表示 95% 可信限但省去 95 的符号等等。表 2-1 列出了生物检定中常用的一些统计符号。

表 2-1 生物检定中常用统计符号

主要符号	组合符号及有关符号
S: 标准品	$S_1, S_2, \dots, S_K$, 第 1, 2, $\dots$ K 组标准品反应值之和。
T: 供试品	$T_1, T_2, \dots, T_K$, 第 1, 2, $\dots$ K 组供试品反应值之和。
d: 剂量	$d_S, d_{S_1}, \dots, d_{S_K}, d_T, d_{T_1}, \dots, d_{T_K}$, 各脚注组剂量。
x: 对数剂量	$x_S, x_{S_1}, \dots, x_{S_K}, x_T, x_{T_1}, \dots, x_{T_K}$, 各脚注组对数剂量。
n: 量反应重复次数	n_S, n_T , 各脚注组重复次数。
n': 质反应组内例数	n'_S, n'_T , 各脚注组内例数。
R: 效比值	R_U, R_L , 效比值的高、低限。
P: 效价	P_S , 标准品的已知效价; P_T , 供试品的实测效价; A_T , 供试品的标示效价。
FL, (或 CL): 效价的 95% 可信限	FL_U, FL_L , 效价可信限的高、低限; $FL\%$, 效价的平均可信限率。
ML: 效价的平均可信限值	$P_T \pm ML$, 效价加、减其平均可信限值。

三、生物检定的实验类型

根据生物检定中药效反应的特征，可以将其分为质反应和量反应两大类。

质反应是指药效反应只有“出现反应”和“不出现反应”两种情况，例如动物死亡或存活；惊厥或不惊厥；细菌生长或不生长……。这种反应只有质的差别而不存在程度上的大小，故称为质反应。质反应的基本参数有： n （例数）， r （阳性反应数）及 p （阳性反应率（ $p=r/n$ ））。

量反应指药效反应有程度大小的量的差别。例如血压的 mmHg 值，心跳每分钟的次数，平滑肌收缩曲线上升的高度……。对于以时间来度量药效反应的，如凝血时间、动物生存时间等也属于量反应，特称之为时反应。量反应的基本参数是： n ，（例数）， $\bar{x}$ ，（均数）， s ，（标准差）。

质反应与量反应虽然不同，但当供试品与标准品各用几个剂量进行对比分析时，却又存在一定的共性，即反应强度与对数剂量间可以转化为直线关系。因此，生物检定中常用的 4 点法及 6 点法，既可以用于质反应，也可以用于量反应。

生物检定的具体实验类型主要有以下几种。

1. 直接检定法（最小有效量法）将供试品及标准品分别给动物进行连续静脉输注，一直到产生某种质反应为止，记录最小有效量（MED, minimum effective dose）或最小致死量（MFD, minimum fatal dose）。例如，以猫心搏停止为质反应指标检定洋地黄类强心甙；以家兔垂头为指标检定箭毒类肌肉松弛药等。显然，这种直接检定法只适用于药物作用迅速、质反应指标明显、在用药过程中就能判断终

点的药物，应用范围受到很大限制。

2. 半数有效量法 (ED_{50})及半数致死量法 (LD_{50}) 供试品与标准品各用2~5个剂量组，测定出供试品或标准品能使50%动物发生阳性反应的剂量 (即 ED_{50}) 或能使50%动物死亡的剂量 (即 LD_{50})，再计算效价比值。 ED_{50} 法或 LD_{50} 法可用静脉注射、肌肉注射、腹腔注射以及灌胃等多种给药方式，三天内出现反应或致死的动物均可参与数据计算，因此适用范围较前述最小有效量法大得多。

3. 平行线检定法 其中又以4点法和6点法最为常用，质反应和量反应均可应用。

(1) 4点法 供试品及标准品各取高低两个剂量，在量效坐标图上共有4个均值点，即 S_1 , S_2 , T_1 , T_2 ，故称为“4点法”。无论反应的类型是属于质反应还是量反应，经过将剂量的对数值和效应强度做适当的转换，都可以得到呈平行关系的两条直线。通过方差分析可以计算出①组间（处理间）变异；②剂量间变异；③偏离平行变异。在确认了两条直线平行，而且可靠性测验符合要求之后，即可进行效价计算。

(2) 6点法 与4点法大体相似。但供试品和标准品各取高、中、低3个剂量，在量效坐标图上有6个均值点，即 S_1 , S_2 , S_3 , T_1 , T_2 , T_3 ，故称为“6点法”。本法获得的信息量较多，除了与4点法一样可以分析组间、剂量间和偏离平行的变异外，尚能分析3种剂量与反应间的关系是否符合直线关系，有无二次曲线性变异以及反向二次曲线性变异。参见图2-1。

6点法的实验设计较4点法更严密更合理，统计分析和可靠性测验也更精确，是生物检定中最常用的一种方法。

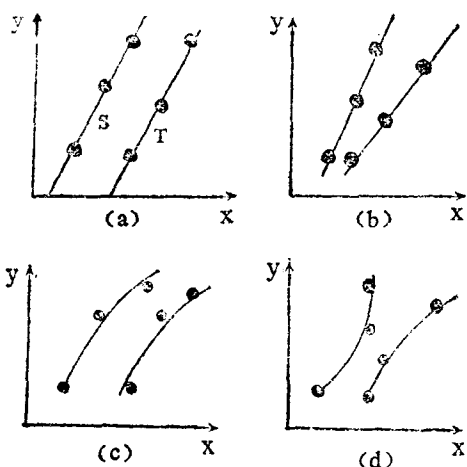


图2-1 6点法平行线分析中的变异

- (a) 两条平行线是经统计方法求得的回归平行线，实测点偏离不大。
- (b) 偏离平行的变异很大，两线不平行，实验不合格。
- (c) 二次曲线的变异很大，两线虽平行但不呈直线，实验不合格。
- (d) 反向二次曲线的变异很大，两线的弯曲方向相反，实验不合格。

此外，平行线检定法中也可以进行 3 : 2 法， 4 : 3 法，或 8 点法， 10 点法等等。这些方法统计处理的原理相似，但就效率而言仍以 6 点法更为实用。

4. 斜率比检定法 多用 3 点法和 5 点法。当反应强度与药物剂量（注意不是对数剂量）成直线关系时，供试品和标准品的两条量效关系线在剂量为零时，反应强度相同，因此两直线在纵轴上相交于一点，见图2-2。

由图2-2可以看出，两条直线的斜率 (b_s, b_T) 不相同，

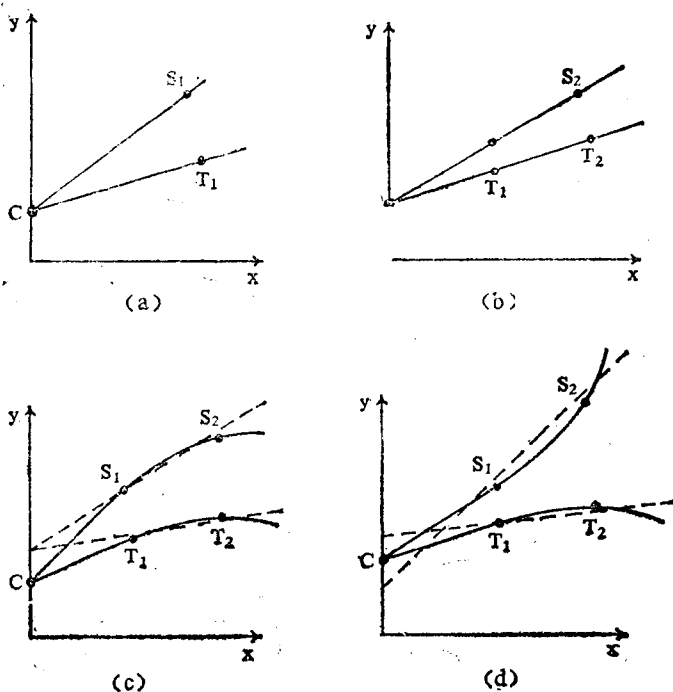


图 2-2 斜率比检定的各种变异

- (a) 3点法, 信息量少, 无法检验是否符合直线。
- (b) 5点法, 两线为交于纵轴C点的回归线。
- (c) 5点法, 截距的纵向变异大, 表示直线性不好, 实验不合格。
- (d) 5点法, 截距距离纵轴变异大, 两线不能交于Y轴, 实验不合格。

两直线不平行而交于截距点 (c)。3 点法较简单, 可以由两直线的斜率求出效价比值。5 点法可以提供较多信息, 该法可以用方差分析的方法计算①直线回归的变异; ②斜率偏移的变异 (如果变异很大说明回归线在接近零剂量时发生弯曲); ③斜率分离的变异 (如果变异过大说明两直线不能相交