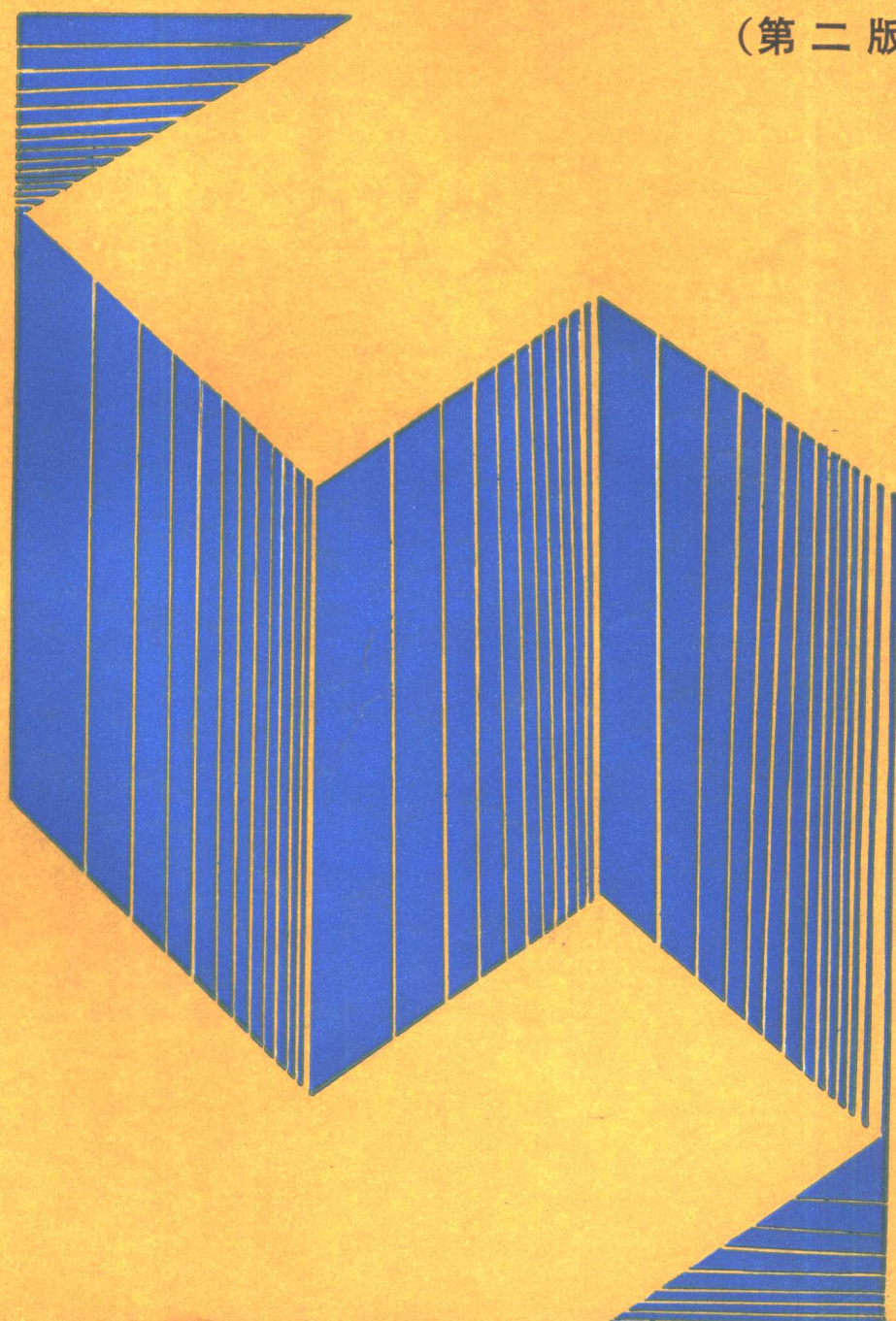


生物检定 统计方法

周海钧 申蕴如 主编

人民卫生出版社

(第二版)



R914.1
ZHJ

169547

生物检定统计方法

(第 二 版)

周海钧 申蕴如 主编

周海钧 申蕴如 汤仲明 编著
朱承伟 李君实

人 民 卫 生 出 版 社



A1C00782720

内 容 提 要

本书是根据作者多年来在药品的生物检定中应用数理统计的原理和方法,经过实践总结编写而成的参考书。

书中突出介绍生物检定中所特有的实验设计和数据分析方法,对此有关的医学中常用的统计方法亦作适当介绍。

本书内容浅显易懂,结合实际,可供检验人员、医药卫生科研人员和药院校师生参考。

生物检定统计方法

周海钧 申蕴如 主编

人民卫生出版社出版

(北京市崇文区天坛西里10号)

北京顺义北方印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行

787×1092毫米16开本 19 $\frac{1}{2}$ 印张 448千字

1983年9月第1版 1988年2月第2版第2次印刷

印数: 10,001—15,000

ISBN 7-117-00298-0/R·299 定价: 4.25元

统一书号: 14048·4440

〔科技新书目156—70〕

前 言

生物检定在药品质量控制、医学科学研究中占有重要地位。由于它是从定量的角度研究量和反应的关系，因此其实验设计、数据处理不但贯穿着数理统计的一般原理和应用，而且还包括了对比试验中所特有的一套试验设计和数据分析方法。鉴于目前国内还没有一本系统的专著，我们根据多年从事生物检定工作的实践体会，编写了这本重在实用的参考书。

作者1979年在浙江嘉兴举办了全国药检系统生物统计讲座，以后又逐步充实了一些新的内容，1981年初卫生部药典委员会在苏州召开了生化委员会，决定生物统计要作为质量控制的工具载入新版药典，故在内容上又增加了新版药典的生物统计部分。

本书共分十一章。一～四章是讨论生物检定和统计的一些基本概念，五～六章是医学中常用的统计方法，七～十一章是生物检定的统计方法。全书各章内容都力求结合生物检定统计方法的需要。为了便于阐明某些论点，书中少量例题，已经作者修改，不能用作科学结论的依据。

本书由周海钧写一、二、三、四章和五章的一部分，申蕴如写八、十一章，朱承伟写五、六章和一章的一部分，李君实写七、九、十章，最后由周海钧统稿。由于我们的知识和经验有限，本书中肯定存在不少缺点和错误，望读者批评指正。

本书在编写过程中，得到朱斐斐、柯若伦、吕志筠等同志的协助，特此致谢。

作 者

再 版 前 言

本书初版发行以来，在广大药检系统组织了学习与使用，得到了广大读者的欢迎。鉴于中国药典1985年版的颁布与施行，原书部分内容已不能适应，为此，特组织编者对全书作了彻底修订。

再版的内容紧密结合中国药典1985版收载的生物检定统计方法。并重点对第二、三、四章进行了改写，增加了含量限度与实验误差关系的探讨、萤试验方法的设计和运算，另外，为配合全国开展计算机在生物统计方面的运用，由汤仲明同志撰写了“生物检定统计中常用的电子计算机程序”一章。

本书仍按第一版的分工进行改写和修正，在编写过程中，得到林志同志的协助，特此表示感谢。

由于我们水平有限，对本书存在的缺点和错误，欢迎读者进一步批评指正。

作 者

1986年5月

目 录

前言

再版前言

第一章 绪论	1
第一节 生物检定的由来和发展.....	1
第二节 生物检定的作用.....	2
第三节 效价单位与标准品.....	4
一、效价单位的含义.....	4
二、国际标准品和国家标准品.....	5
三、标准品原料选择的原则.....	5
四、标准品的种类.....	5
第四节 生物统计与生物检定的关系.....	6
一、生物统计的意义.....	6
二、生物统计在生物检定中的特殊地位.....	7
三、应用生物统计时在认识上应注意的问题.....	7
第五节 统计资料常见的谬误.....	7
一、缺乏对比的单纯发生率.....	8
二、被比较的资料内部构成不均衡.....	8
第六节 统计符号.....	9
第二章 概率及其应用实例	12
第一节 引言.....	12
第二节 事件的相互关系.....	12
第三节 概率的基本定理.....	13
第四节 概率基本定理的直接应用.....	15
一、抽样问题.....	15
二、实验设计.....	16
第三章 抽样和分布	21
第一节 样本与总体.....	21
第二节 随机化.....	21
第三节 抽样方法.....	22
第四节 样本大小.....	23
第五节 随机变量.....	24
第六节 二项分布.....	24
第七节 普哇松分布.....	26
第八节 正态分布.....	26
第四章 误差	30

第一节	正确性、精密度、偏倚·····	30
第二节	实验误差的来源和减少误差的基本法则·····	31
第三节	从样本均数估计总体均数·····	32
第四节	标准差、标准误和可信限的应用实例·····	34
第五节	可信限与含量限度规定的关系·····	37
第六节	各国药典制定含量限度的原则·····	39
一、	美国药典限度的规定方式·····	40
二、	英国药典限度的规定方式·····	41
三、	中国药典限度的规定方式·····	42
第五章	显著性测验·····	44
第一节	显著性测验的基本概念·····	44
一、	显著性测验的意义·····	44
二、	测验假设·····	44
三、	显著性水平·····	45
四、	双侧测验和单侧测验·····	45
五、	两类错误·····	46
六、	显著性测验的测验能力·····	46
第二节	t测验·····	50
一、	t测验的原理·····	50
二、	t测验的步骤·····	50
三、	成对数据的t测验·····	51
四、	成组数据的t测验·····	53
五、	两百分率间的比较·····	54
第三节	F测验(方差分析)·····	55
一、	F值的意义·····	55
二、	F分布·····	55
三、	F测验的原理·····	56
四、	F测验的步骤·····	56
五、	单因素的F测验·····	57
六、	双因素的F测验·····	63
七、	拉丁方的F测验·····	69
第四节	χ^2 测验·····	70
一、	χ^2 值的意义·····	70
二、	χ^2 分布·····	71
三、	χ^2 测验的原理·····	72
四、	χ^2 测验的步骤·····	73
五、	两样本频数的比较(四格表)·····	73
六、	χ^2 值的连续性校正·····	74
七、	χ^2 值的可加性·····	76

八、两组以上频数的比较($2 \times k$ 表)·····	78
九、两事物间联系性的测验($m \times k$ 表)·····	79
十、配对计数资料的 χ^2 测验·····	79
第五节 显著性测验中应注意的问题·····	80
第六章 回归与相关 ·····	82
第一节 回归·····	82
一、回归的意义·····	82
二、回归与相关的区别·····	82
三、回归的用途·····	82
四、直线回归方程·····	82
五、回归系数的显著性测验·····	84
六、两个回归系数间的显著性测验·····	86
七、直线性测验·····	87
八、直线回归的可信限 ($P=0.95$)·····	91
第二节 相关·····	92
一、相关系数的意义及计算·····	92
二、相关系数的显著性测验·····	94
三、两个相关系数间的显著性测验·····	95
四、求几个相关系数的平均值·····	96
第七章 剂量与反应的关系 ·····	97
第一节 概述·····	97
第二节 质反应·····	98
一、概率单位(Probit)转换·····	100
二、Logit转换·····	101
三、角(Angle)转换·····	101
第三节 量反应·····	102
一、对数剂量与反应呈直线关系·····	102
二、对数剂量与对数反应呈直线关系·····	103
三、量反应坐标转换的其他方法·····	103
四、剂量本身与反应呈直线关系·····	103
第四节 剂量与反应的回归直线,斜率的意义与精密度指数·····	108
第八章 生物检定方法,实验设计与误差估计 ·····	111
第一节 对比检定·····	111
一、效价(或毒力)对比检定的基本概念·····	111
二、效价(或毒力)对比检定的误差估计·····	112
第二节 直接测定法·····	113
一、随机设计·····	114
二、配对交叉设计·····	124
三、直接测定法的评价·····	128

第三节 量反应的平行线测定	128
一、平行线关系	128
二、平行线测定法求等反应剂量的计算原理	129
三、直线的平行化	129
四、平行线测定的实验误差估计	130
五、平行线测定的可靠性测验	132
六、影响实验误差因素的探讨	133
第四节 量反应平行线测定简算法	139
一、平行线测定简算法对实验设计的基本要求	139
二、简算法公式	140
三、其他简算方式(各国药典简算法的介绍)	152
第五节 量反应平行线测定常用的几种实验设计类型	154
一、完全随机	155
二、随机区组	155
三、交叉设计	162
四、拉丁方设计	168
第六节 质反应的平行线测定	173
一、概率单位法及其应用	173
二、简化概率单位法	178
第七节 量反应的平行二次曲线测定	185
第八节 平行线测定和平行二次曲线测定的选择应用和剂量安排	191
第九节 斜度比例测定	198
一、斜度比例法的效价计算原理	198
二、斜度比例法效价计算的简算及其误差估计	199
第十节 其他量反应检定方法	200
第九章 实验结果的合并处理	205
第一节 加权平均的概念	205
第二节 标准品协作标定结果的合并计算	206
第三节 常规检定中的合并计算	209
第十章 半数反应量的意义及测定方法	211
第一节 基本概念	211
第二节 LD_{50} 的测定方法	211
一、第一种类型(改进寇氏法、移动平均法)	211
二、第二种类型(最大或似法、加权回归法、简化概率单位法)	214
三、第三种类型(阶梯法)	220
第三节 两 LD_{50} 间的比较	221
第四节 LD_{50} 与治疗指数	222
第五节 测定 LD_{50} 应注意的问题	223
第十一章 生物检定统计中常用的电子计算机程序	225

第一节 生物检定常用生物统计方法程序 (BIOASSAY).....	225
一、主要用途.....	225
二、计算原理、方法和步骤.....	226
三、程序使用说明、注意事项和计算实例.....	228
四、BIOASSAY 源程序和程序中变量的说明.....	238
第二节 质反应生物测定程序 (QUANTAL).....	252
一、主要用途.....	252
二、计算原理、公式和步骤.....	253
三、程序使用说明.....	255
四、源程序和程序中变量的说明.....	257
五、实例示范.....	266
第十二章 中国药典应用生物统计的回顾	272
一、中国药典为什么要应用生物统计.....	272
二、历版中国药典的概况.....	272
三、可靠性测验和误差估计在生物检定中的作用和重要性.....	273
主要参考书刊.....	275
附录	
I. 国际标准品与国家标准品一览表.....	277
II. 质反应的理论概率(按二项分布计算).....	284
III. 随机数字表.....	288
IV. 普哇松分布表.....	289
V. 正态分布表.....	291
VI. t 值表.....	293
VII. F 值表.....	294
VIII. Q 值表.....	295
IX. χ^2 值表.....	296
X. 相关系数 r 的显著性水平表.....	296
XI. 相关系数 r 转换成 Z 值表.....	297
XII. 百分率与概率单位转换.....	297
XIII. 概率单位的权重系数.....	297
XIV. 0% 或 100% 反应率的概率单位近似值和权重.....	298
XV. 作业概率单位的极大值、极小值、全距与权重系数.....	298
XVI. 百分率与角转换.....	299
XVII. 作业角度的极大值、极小值与全距.....	300
XVIII. 百分率与 logit 转换.....	301
XIX. 作业 logit 的极大值、极小值、全距与权重系数.....	302

第一章 绪 论

第一节 生物检定的由来和发展

生物检定 (Biological assay) 是利用生物体 (整体动物、离体组织、微生物和细胞等) 来测定药物的生物活性的一种方法。它以药物的药理作用为基础, 以生物统计为工具, 运用特定的实验设计, 在一定条件下比较供试品和相当的标准品或对照品所产生的特定反应, 通过等反应剂量间比例的运算, 从而测得供试品的效价 (Potency)。

生物检定是一门较老的学科, 是药理学的一个分支, 也可被认为归之于定量药理学的范畴。很早以前, 药理学家为了弄清某药的作用强度, 就设法以药物对生物体所产生的反应强度来表示其效价, 例如洋地黄对治疗心力衰竭有很好的疗效, 但却由于各批洋地黄的作用强度很不一致, 同样的用量, 有时显得效力不足, 疗效不佳, 有时却又作用过强, 出现中毒。临床上很难确定各批洋地黄的适宜剂量。为了能预先确知各批洋地黄的效价, 有人就利用洋地黄能使青蛙死于心室收缩期停止这样一个生物反应, 建立了早期的洋地黄蛙法生物检定, 即以能使青蛙死于心室收缩期停止的按每克体重所需的洋地黄用量, 称为洋地黄的一个蛙单位。也有人建立了早期的胰岛素兔法生物检定, 以能使家兔每100ml血液中血糖下降至45mg所需胰岛素最低用量称为胰岛素的一个兔单位, 这就是以“动物单位”来表达药物效价的早期的生物检定。

“动物单位”虽然初步解决了药物效价的表示方法, 但由于一个药物往往可用几种动物来检定, 各地的生物检定方法也不统一, 以致一个药物定了若干个“动物单位”, 如洋地黄有蛙单位和猫单位, 胰岛素有兔单位和鼠单位等。一个洋地黄猫单位和一个洋地黄蛙单位相比, 效价相差多少? 如何换算? 这种用不同的“动物单位”表示效价的方法, 造成概念上的紊乱, 使临床医师无所适从。在不同的“动物单位”之间没有固定的换算方法, 即使是用一种“动物单位”表示的效价, 也往往由于检验的时间、地点、条件、动物来源等因素不同, 测得的结果相差悬殊。某批洋地黄国际标准品, 曾经在两年的时间内共测定过20次, 各次结果差异很大, 最低结果每克含1310个蛙单位, 而最高结果每克含3300个蛙单位, 相差竟达两倍以上。但事实上该标准品保存了多年也没有变质, 显然, 这种用“动物单位”来表达药物效价的方法, 存在着很大的缺陷。

1897年Ehrlich氏提出了将供试品与标准品对比的效价表示方法, 即在相同的实验条件下, 测得标准品与供试品产生相同生物反应时的剂量比值, 作为供试品相当于标准品的效价倍数。他于1914年第一次制出白喉抗毒素的对照标准品, 并将供试品与标准品在同一实验条件下比较其产生相同反应的剂量, 从而计算出供试品相当于标准品的效价。这种方法明显地缩小了由于生物差异性 (Variability) 所产生的误差, 它不同于“动物单位”这种绝对的效价单位表示法, 而是以与标准品对比的相对效价表示, 这样, 同一药物在不同实验室检验时, 即使实验条件和其他因素对生物反应产生影响, 但对标准品和供试品起着同样的作用, 在对比检定时可使这些影响因素彼此抵销, 使它们之间的强度比值保持不变, 这就大大提高了生物检定的可靠性 (Reliability) 和重现性 (Re-

producibility)。从此，人们彻底改变了过去以“动物单位”来表示效价的概念，而以对比检定和标准品的概念奠定了现代生物检定的基础。

第二节 生物检定的作用

人们对生物检定往往有这样的看法，它精密度（Precision）差，操作繁琐，不易掌握，又费动物，在科学技术飞速发展的今天，似乎有被淘汰的趋势，实际上这种看法是片面的。生物检定是人们认识事物本质的方法之一，它帮助我们从小生物反应这个侧面来了解某些事物的质和量，所谓精密度和操作繁琐是相对的，且在生物检定的方法中也有些是精密度好，操作简便，灵敏度（Sensitivity）高而为人们所乐于采用的。即使某些精密度差或操作繁琐的方法，它之所以能存在，也都有它的客观原因，往往是由于目前尚无代替它的理化检验方法或其他原因而必需采用生物检定。就整个检定方法来说，生物检定客观上起着理化检验的补充作用。一些原有品种的生物检定方法可能被理化检验所置换，但一些新的品种的生物检定方法又在不断建立中，随着科学技术的发展，生物检定也正在不断吸收新的内容、新的技术和发挥新的作用。

近年来，生物检定在医药学方面的作用大致可归纳成以下几个方面：

1. 药物的效价测定 这是生物检定的基本用途。对一些理化方法不能测定含量的药物可应用生物检定的方法，即通过供试品和相当的标准品在一定的条件下进行比较，以定出供试品的效价。中国药典（1985版）规定了洋地黄、胰岛素、肝素、绒促性素、缩宫素等生物检定法，还规定了各种抗生素的微生物效价测定法。卫生部颁布的生物制品规程（1979年）收录了菌苗、疫苗、抗毒素、类毒素等效力测定法。

除了上述药典和规程收录的品种外，有些新药经系统的理化特性和药理学、毒理学研究后，被推荐到临床试用，但由于结构复杂，一时难以找到合适的理化检验方法来控制质量，也可按生物检定的原理，从系统的药理作用中选择一种能代表临床疗效或毒性反应的指标，建立一个控制质量的生物检定方法。

一些天然药物、血清、疫苗和血液制品等往往由于结构复杂或其中包含着不定比例的多种成分，难以应用理化检验测定其单一成份，只能应用生物检定。即使是理化性质清楚，结构已知的药物，也会由于结构构型不同而对药理活性的影响，不得不采用生物检定来控制质量。一些合成的激素更是如此，如合成的催产素和加压素都是八肽，要控制其内在质量就不是理化检验所能胜任的。

2. 检验方法的核对 某些药品虽然理化性质已比较清楚，也已建立了较为灵敏的理化检验方法，但这些方法是否可靠却常常要用生物检定来核对。这是因为生物检定反映了药品的生物活性，在很大程度上是与临床的疗效相一致的，而某些理化检验方法却只反映出药品的某一方面理化性质，它并不一定与临床的疗效相平行。如肝素的测定可利用肝素使天青A变色的反应来进行比色法测定，方法灵敏，快速而稳定，但不能反映其抗凝血的活性，一些抗凝血作用已失活的肝素却保留了使天青A变色的反应，因此天青A比色法只能用作参考，正规的检定方法仍要采用生物检定。又如激肽释放酶（血管舒缓素）的效力测定可采用以苯甲酰-L精氨酸乙酯（BAEE）为底物的分光光度法，灵敏度和稳定性都很好，但在考验其与药理性质是否一致时，仍需用狗或猫血压下降为指标的生物检定来核对。

3. 新药的寻找及其活性研究 当前寻找新药的一个重要途径是利用动植物为原料,在提取天然活性物质的基础上,用人工方法合成一系列的类似物,然后比较各种类似物的生物活性,以决定各种类似物的取舍及进一步合成的方向,通过进一步研究以阐明其构效关系。这些工作不但需要比较并确定它们的主要药理作用的强弱,还常要比较其毒副作用的大小。如在合成抗胆碱药时,以其周围抗胆碱作用为治疗目的,而不需要它的中枢作用,就可用生物检定方法来对比一系列类似物的周围作用和中枢作用。又如蛋白同化激素是从雄激素的结构中分化出来的,临床上要求分化得越专一越好,这就要求运用生物检定的方法从一系列的合成衍生物中来测定哪些是蛋白同化作用最强而雄激素作用最弱的化合物。

多肽激素是一类具有很强生理活性的重要药物,目前除了从天然物中提取分离外,已能利用生化方法合成多种多肽激素,但这些多肽中氨基酸的组成及其排列顺序对生理活性影响很大。例如精氨酸加压素(AVP)的抗利尿作用和升压作用比较接近,一般为0.9:1。但如将其一位氨基酸去氨基,八位精氨酸的L构型改为D型使成1-deamino-[8-D-Arginine]-Vasopressin (dDAVP),则抗利尿作用增加约三倍,而升压作用大为减弱,使抗利尿作用与升压作用之比为2000:1;如将其一位氨基酸去氨基。四位谷氨酸改为缬氨酸、八位精氨酸的L构型改为D型使成1-deamino-[4-Valine, 8-D-Arginine]-Vasopressin (dVDAVP),则抗利尿作用增加约四倍,而升压作用几乎难于测出,使抗利尿作用与升压作用之比约为125000:1。AVP在临床上主要用作抗利尿药,升压作用是它的副作用,由于结构改变,大大增加了临床的疗效,减低了副作用。

又如LHRH类似物的合成,稍加改变一、二个氨基酸,可使释放LH的活性增加150~1000倍。

这些工作在研究过程中很难用理化方法来确定,只能借助于生物检定。

4. 神经介质、激素及其他微量生理活性物质的测定 在活体组织中测定某些神经介质、激素或其他微量生理活性物质的浓度是研究中常用的手段。对于这些微量活性物质的测定,近年来虽然也发展了很多理化检验方法,但由于这些物质具有很强的生理活性,生物检定方法具有较高的灵敏度,有些还超过目前的理化检验方法。另外,生物检定一般对试样的纯化要求不高,在样品的处理上较理化检验的要求低,甚至一些组织液亦可直接测定而不受干扰,还可用专一的拮抗剂来阻断其他类似物的作用,使测定更具有专一性(Specificity),因此在一些作用机制研究中往往采用生物检定的方法。

Vane (1957)用在位大鼠胃的制备,可测出神经组织释放的5-HT,灵敏度达0.05 ng,还可用麦角酸类似物作为拮抗剂来检验测定的专一性。

乙酰胆碱是胆碱能神经冲动时释放的介质,具有十分重要的生理意义,微量乙酰胆碱的测定可研究许多生理活动的机制。Gaddum (1964)设计了一个改良的微型浴槽,用水蛭背肌可定量地测出神经冲动时所释放的微量乙酰胆碱,并可用箭毒予以拮抗,以验证乙酰胆碱测定的专一性。

测定尿中胃泌素(Gastrin)和尿胃素(Urogastrone)的含量是研究胃功能的重要方法,前者促进胃液分泌,后者抑制胃液分泌。Smith和Lawrence (1970)利用大鼠在体胃回流循环装置,以胃液的pH改变为指标,可测出人尿50~100ml内10~20ng的胃泌素和尿胃素。

另外,用大鼠离体子宫测定缓激肽可达 0.2ng/ml ,测定前列腺素 $\text{F}_2\alpha$ 可达 5ng/ml 。用豚鼠离体回肠测定慢反应物质可测出 1ng ,测定脑啡肽、组织胺等灵敏度亦很高。

5. 中药的质量控制 中药的成分复杂,其有效成分很多尚未阐明,难以用理化的方法检验,但可以选择一些与其疗效相平行的药理指标为基础,研究建立生物检定的方法,控制其质量。这方面工作虽然难度较大,但已引起国内外研究中药的学者普遍重视。我国楼之岑(1951)就利用小鼠服植物性泻剂后排出湿粪这一原理,建立了植物性泻剂的生物检定方法。其原理是利用小鼠服药后所排出的湿粪数与其对数剂量呈直线关系,用2·2法(对照品与供试品各二个剂量)或3·3法(对照品与供试品各三个剂量)来比较大黄、番泻叶等植物性泻药的泻下作用强度。

6. 农药残留量测定 由于农药应用量日益增大,造成环境污染,因此对食品、农产品及药材中农药残留量的问题,已引起各界的注意。如何合理的控制农药残留量的限度,是贯彻预防为主,保证人民身体健康的重要措施。当前虽已研究出测定农药残留量的各种理化方法,但对样品处理和仪器精度的要求都较高。Steurbant等(1978)利用农药对昆虫的特异毒性,以蟑螂心脏跳动的频率变化为指标测定试样中的农药残留量,灵敏度很高。

第三节 效价单位与标准品

一、效价单位的含义

效价单位是生物检定中表达药物效力强弱的一种公认的计量单位,每种对比用的标准品都有它法定的效价单位含义,以资统一。

有些标准品效价单位的定义仍沿用过去“动物单位”的原有含义,如一个胰岛素国际单位(International unit, IU)为能使一定条件的实验家兔血糖下降到 $45\text{mg}/100\text{ml}$ 血(通常为惊厥阈)所需胰岛素的最小量。有些则经专家协议规定一定重量作为一个效价单位,如链霉素是属于重量单位,规定每 μg 相当于1个IU,如折合成纯硫酸盐,则 $1\mu\text{g}$ 链霉素硫酸盐应相当于 0.7981IU 。又如脑垂体后叶缩宫素的效价定为每 0.5mg 相当于一个IU。

上述这些效价单位的定义,无论是用何种方法来确定的,凡一经确定,以后就不再变更,且原来确定单位的定义亦不再起作用了,这时所谓一个IU仅有生物效价上的相对意义,即供试品与标准品对于某些生物体产生相同反应时,供试品的用量就可以用相应标准品的效价单位数来标示。 1IU 的供试品有产生 1IU 标准品相同的特定生物反应的含义。

随着科学技术的发展,制品的纯度越来越高,但重量单位的含义依然不变,只是将单位重量内所含的效价单位数不断提高。如1980年发布的第三次链霉素硫酸盐国际标准品为每 mg 相当于 785IU ,折合成链霉素则为 $0.983\mu\text{g}$ 相当于1个IU,超出了原来以重量表示的单位定义($1\mu\text{g}$ 相当于1个IU),这时一个国际单位已经失去了重量的含义,而只表示其抑菌效力与原来标准品 $1\mu\text{g}$ 相等而已。由于第三次链霉素硫酸盐的国际标准品的IU是根据前一次国际标准品的标示效价标化出来的,故每一个单位的抑菌效力前后都是一致的。供试品不论与那一次国际标准品对比,都可得出相同的标示效价,以保持IU生物效价的连续性。

二、国际标准品和国家标准品

第一次世界大战后,随着标准化科学的发展,各国对统一制备激素、抗生素、血清、疫苗和血液制品等标准品的呼声愈来愈高,国际联盟首先承担了这项任务。具体工作由丹麦哥本哈根血清研究所及英国伦敦国立医学研究院(现已从该院分出成立英国生物标准检定所)负责。国际联盟撤销后,由世界卫生组织(World Health Organization, WHO)设置了生物标准化专家委员会,继续负责此项工作,具体工作仍由原指定的丹麦和英国两个单位承担。国际标准品单位的确定是由世界卫生组织邀请有条件的国家检定机构或药厂参加协作标定后,最后由生物检定专家委员会通过决定的。我国从1975年起被邀参加生物检定专家委员会会议,参予研究国际标准品单位的确定,1976年起承担部分品种的国际协作标定。

国际标准品制备量有限,主要是供各国在标定国家标准品时作对照使用,不宜用在常规检验和具体科研工作中。我国从1952年开始逐步建立药品和生物制品国家标准品,由中华人民共和国卫生部审定,具体工作由中国药品生物制品检定所统一负责,会同全国有关单位共同选样、分装、协作标定和确定效价单位等,并统一向全国检定、科研、教育和生产单位分发。凡国际上已建立国际标准品的品种,在制备国家标准品时,均与国际标准品比较而定出效价,对于我国特有的品种则根据一定的原则自定效价单位。新标准品开始生效后,上一批标准品即停止使用。

标准品制备中必须严格考核其稳定性(Stability)和均一性(Homogeneity),一般制成干燥粉末,熔封于装有惰性气体或真空安瓿里,或准确定量分装后冷冻干燥。标准品宜置于 -20°C 避光保存。

三、标准品原料选择的原则

选用标准品的原料的质量,应考虑国内生产的该品种的具体情况,如提供作原料的动物种属、制品纯度等。要尽可能选用在性质上与供试品相对一致的标准品原料,以提高实验的正确性(Validity)。衡量大部分生物检定标准品的质量,不应以纯度的高低和单位重量内效价的高低为指标,而主要应视所定效价单位的正确性和在性质上与供试品的相对一致性的程度作为评价准则。这一点与我们经常使用的化学对照品和基准物的概念是不同的。这是由于标准品与供试品性质不同时,对于微生物、动物或器官组织在不同时间和不同实验条件下所产生反应的程度不尽相同。换句话说,微生物、动物或器官组织对于内在质量不同的标准品与供试品,产生斜率不同的量效关系,因而得出不真实的检定结果。

四、标准品的种类

国际上分为国际标准品(International Standards, IS)、国际参考品(International Reference Preparations, IRP)和国际参考试剂(International Reference Reagents, IRR)。国家标准品基本上亦按以上分类。具体品种详见附录 I,各种标准品名称及含义如下:

1. 国际标准品 其国际单位是在广泛的国际协作标定的基础上定出来的。它以原有

国际标准品的效价单位为基准,通过一定的生物试验,测得的效价以iu表示。第一个国际标准品建立时,其效价单位的含义由专家委员会协商决定(如定 $1\mu\text{g}$ 为一个单位等)。标准品原料由各国药厂或科研单位免费提供,通过不同的检定方法,在若干实验室进行考核后,以决定它是否适宜作为国际标准品的原料。

2. 国际参考品 建立的目的是使用的范围与国际标准品相似。但它没有象建立国际标准品那样事先进行过充分的国际研究,有时通过国际协作标定的实验结果还不足以证明它是否适合作为国际标准品时,称国际参考品。

有些国际参考品亦用于其他目的,如白喉抗毒素国际参考品用以测定絮状反应,苄星青霉素国际参考品用以测定人体血液中的青霉素浓度,霍乱抗原国际参考品用以制备霍乱特异血清。

3. 国际参考试剂 系供特定实验室作微生物鉴定或疾病诊断用。有些试剂对有关微生物有高度特异性,如钩端螺旋体抗血清。有些试剂对有关病毒有高度特异性,如鉴别病毒用的特异抗血清等。由于这些试剂不能用于制品的效价标定,故不用iu表示。

第四节 生物统计与生物检定的关系

一、生物统计的意义

在客观世界里普遍存在着一些人们尚无法利用“因果关系”加以严格控制或准确预测的现象,这种现象是属于偶然性质的,我们虽不能用简单的定律来加以概括,但可从大量的观察中运用数理统计这一工具,归纳出一些规律性的认识来。因此数理统计已被广泛地应用于生产、科研和文教卫生等各个方面,几乎遍及各个学科分支和各个部门,数理统计已逐渐作为一门基础学科而受到重视。

由于医药学研究的对象是生物,生物体在地球上的进化至少已有36亿年的历史,它的结构单位 and 功能单位是细胞的染色体上分布的遗传基因的基本单位。生物在进化和适应各种不同环境过程中,由于突变,出现了基因的多样性,出现了变异,才有形形色色的结构和特性,从遗传学和分子生物学角度来看,变异是绝对的,生物的同种是相对的,即使是纯种,个体与个体间亦存在着差异性。这就更需要借助数理统计的知识予以综合和分析。因此,逐步形成了专门以生物为对象的数理统计分支,称为生物统计。

生物差异性是由许许多多内外因素偶然性的配合而引起的,不论这些因素多么错综复杂,我们还是能从许多偶然配合的因素中运用生物统计找出规律性的东西来。规律是客观存在的,偶然性的背后潜伏着必然的联系,只有对这种偶然性本身加以认识并掌握,才能从偶然出现的表面现象中揭示出其中必然性的规律来。例如各个家兔之间血糖值的差异,是由于对家兔起作用的各种内外因素影响的综合结果。经过实验研究和统计分析,已证明胰岛素的分泌量及其调节机制对家兔个体血糖值起着决定性的影响,于是“家兔血液中胰岛素的浓度”就是造成家兔血糖变异的规律性因素之一。由此可见,统计方法是认识各种现象的数量特征的重要工具,正确地运用统计分析,能够帮助我们正确认识事物客观存在的规律性。

二、生物统计在生物检定中的特殊地位

生物检定是利用活性物质对生物所致的各种反应,从定量的角度研究剂量和反应间的关系。由于生物差异性的普遍存在,因此在生物检定中,实验设计、操作程序、结果计算和结论推导等,无不贯穿着数理统计的一般原理及其应用,如差异规律及其分布、概率、显著性水平、线性关系和方差分析等,此外由于在很多情况下采用了对比设计,因此还包括了对比试验中所特有的一些试验设计和计算方法,如平行线原理,误差的一些特殊估计方法等。统计学家 Finney 氏认为,由于生物检定贯穿了各种重要的统计原理及其应用,它是在应用统计学领域中对生物最具有教育意义的一门学科。只有正确地应用统计的原理进行实验设计、数据处理和统计分析,才能用最少量的动物,最经济的时间和办法,得到相对可靠的结果。本书的重点是结合各种类型的生物检定来阐述生物统计在各环节的具体应用。

三、应用生物统计时在认识上应注意的问题

生物统计的基础是以辩证唯物主义为指南的概率论,因此要求读者理解一些有关概率的基本概念和由此导出的计算公式的原理,如果单纯追求计算方法和演算技术,不正确掌握其概念和原理,机械地乱套统计公式,将会导致错误的结论。因为所有生物统计的应用公式都是有一定条件的,如果实验的情况不符合这些条件,则套用公式计算所得的结果是毫无价值的。

对生物统计作用的认识,既要防止统计万能论,又要防止统计无用论。如果不顾条件和具体情况,一切依赖于生物统计,认为只要它点了头,便深信不疑,这是有弊无益的。生物统计只能帮助我们分析认识问题,而表现问题本质的还是科学实验所得数据本身的可靠性,所以良好的实验和设计是正确运用统计的先决条件。如果实验数据不可靠,也想借助统计分析来显示实验结果是通过数据论证的,会反而弄巧成拙。相反,认为一切科学实验都要通过大量地重复,用一大堆实验数据来代替统计推理,对于即便可从少量实验数据的内部分析得出较确切结论时,也不相信,这也是劳民伤财,不注意经济效益,并且由于季节、温度的影响,药品来源或批号的变动,实验人员调动的频繁等,不断地重复实验反而使结果掺杂更多不易控制的因素,即使积累了大量数据,也难于得出可靠的结论。以上两种倾向都是应该防止的。

还必须注意的是统计分析的推论都是有一定概率条件的,因此,所作的结论或推论的可靠性都是相对的。当测验两药疗效有无差别,而计算所得的概率等于0.05时,表示根据该实验结果推断,有95%的把握估计两药疗效有差别,但同时也还存在5%估计错误的可能性,因此,在下结论时,应该根据具体情况,结合专业知识慎重斟酌。

第五节 统计资料常见的谬误

一个完整的科学研究工作,一般要经历实验设计、资料收集整理、统计分析和应用专业知识提出结论或推论等步骤。实验设计是科研工作成败的关键,实验者要运用专业知识和生物统计的基本原理根据研究的目的、内容以及数据处理的预测进行周密的设计,以使用较少的人力物力得出可靠的科学结论。资料收集和整理,是根据设计要求对实验