

附录XIV 生物检定统计法

一、总则

生物检定法是利用生物体包括整体动物、离体组织、器官、细胞和微生物等评估药物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或限值剂量引起的生物反应程度,从而测定供试品的效价、生物活性或杂质引起的毒性。

生物检定统计法主要叙述应用生物检定时必须注意的基本原则、一般要求、实验设计及统计方法。有关品种用生物检定的具体实验条件和要求,必须按照该品种生物检定法项下的规定。

生物检定标准品 凡中国药典规定用生物检定的品种都有它的生物检定标准品(S)。S都有标示效价,以效价单位(u)表示,其含义和相应的国际标准品的效价单位一致。

供试品 供试品(T)或(U)是供检定其效价的样品,它的活性组分应与标准品基本相同。

A_T 或 A_U 是T或U的标示量或估计效价。

等反应剂量对比 生物检定是将T和其S在相同的实验条件下同时对生物体或其离体器官组织等的作用进行比较,通过对比,计算出它们的等反应剂量比值(R),以测得T的效价 P_T 。

R是S和T等反应剂量(d_s 、 d_T)的比值,即 $R = d_s / d_T$ 。

M是S和T的对数等反应剂量(x_s 、 x_T)之差,即 $M = \lg d_s - \lg d_T = x_s - x_T$ 。 $R = \text{antilg} M$ 。

P_T 是通过检定测得T的效价含量,称T的测得效价,是将效比值(R)用T的标示量或估计效价 A_T 校正之后而得,即 $P_T = A_T \cdot R$ 或 $P_T = A_T \cdot \text{antilg} M$ 。

检定时,S按标示效价计算剂量,T按标示量或估计效价(A_T)计算剂量,注意调节T的剂量或调整其标示量或估计效价,使S和T的相应剂量组所致的反应程度相近。

生物变异的控制 生物检定具有一定的实验误差,其主要来源是生物变异性。

因此生物检定必须注意控制生物变异,或减少生物变异本身,或用适宜的实验设计来减小生物变异对实验结果的影响,以减小实验误差。控制生物变异必须注意以下几点。

(1)生物来源、饲养或培养条件必须均一。

(2)对影响实验误差的条件和因子,在实验设计时应尽可能作为因级限制,将选取的因级随机分配至各组。例如体重、性别、窝别、双碟和给药次序等都是因子,不同体重是体重因子的级,雌性雄性是性别因子的级,不同窝的动物是窝别因子的级,不同双碟是碟间因子的级,给药先后是次序因子的级等。按程度划分的级(如动物体重),在选级时,应选动物较多的邻近几级,不要间隔跳越选级。

(3)按实验设计类型的要求将限制的因级分组时,也必须严格遵守随机的原则。

误差项 指从实验结果的总变异中分去不同剂量及不同因级对变异的影响后,剩余的变异成分,用方差(s^2)表示。对于因实验设计类型的限制无法分离的变异成分,或估计某种因级对变异的影响小,可不予分离者,都并入 s^2 。但剂间变异必须分离。

误差项的大小影响标准误 S_M 和可信限 (F L)。

不同的检定方法和实验设计类型,分别按有关的公式计算 s^2 。

可靠性测验 平行线检定要求在实验所用的剂量范围内,对数剂量的反应(或反应的函数)呈直线关系,供试品和标准品的直线应平行。可靠性测验即验证供试品和标准品的对数剂量反应关系是否显著偏离平行偏离直线,对不是显著偏离平行偏离直线(在一定的概率水平下)的实验结果,认为可靠性成立,方可按有关公式计算供试品的效价和可信限。

可信限和可信限率 可信限 (F L) 标志检定结果的精密度。M的可信限是M的标准误 S_M 和 t 值的乘积 ($t \cdot S_M$),用 95% 的概率水平。 $M + t \cdot S_M$ 是可信限的高限; $M - t \cdot S_M$ 是可信限的低限。用其反对数计算得 R 和 P_T 的可信限低限及高限,是在 95% 的概率水平下从样品的检定结果估计其真实结果的所在范围。

R 或 P_T 的可信限率 (F L%) 是用 R 或 P_T 的可信限计算而得。效价的可信

限率为可信限的高限与低限之差除以 2 倍平均数（或效价）后的百分率。

$$FL\% = \frac{\text{可信限高限} - \text{可信限低限}}{2 \times \text{平均数（或效价）}} \times 100\%$$

计算可信限的 t 值是根据 s^2 的自由度（f）查 t 值表而得。

t 值与 f 的关系见表一。

表一 t 值表 (P=0.95)				
f		t		
3	3.18		14	2.15
4	2.78		16	2.12
5	2.57		18	2.10
6	2.45		20	2.09
7	2.37		25	2.06
8	2.31		30	2.04
9	2.26		40	2.02
10	2.23		60	2.00
11	2.20		120	1.98
12	2.18		∞	1.96

各品种的检定方法项下都有其可信限率的规定,如果检定结果不符合规定,可缩小动物体重范围或年龄范围，或调整对供试品的估计效价或调节剂量，重复实验以减小可信限率。

对同批供试品重复试验所得 n 次实验结果(包括 F L %超过规定的结果)，可按实验结果的合并计算法算得 P_T 的均值及其 F L %作为检定结果。

二、直接测定法（略）

三、量反应平行线测定法（略）

四、实验结果的合并计算

同一批供试品重复 n 次测定, 所得 n 个测定结果, 可用合并计算的方法求其效价 P_T 的均值及其 $F L$ 。

参加合并计算的 n 个结果应该是:

(1) 各个实验结果是独立的, 完整的, 是在动物来源、实验条件相同的情况下, 与标准品同时比较所得的检定结果 (P_T)。

(2) 各次检定结果, 经用标示量或估计效价 (A_T) 校正后, 取其对数值 ($\lg P_T$) 参加合并计算。

计算时, 令 $\lg P_T = M$

n 次实验结果共 n 个 M 值, 按 (35) 式进行 χ^2 测验

$$\chi^2 = \sum W M^2 - \frac{(\sum WM)^2}{\sum W} \quad (35)$$

$$f = n - 1$$

式中 W 为各次实验结果的权重, 相当于各次实验 S_M 平方的倒数, 即

$$W = \frac{1}{S_M^2} \quad (36)$$

按 (35) 式的自由度 (f) 查 χ^2 值表 (表十二), 得 $\chi_{(f)0.05}^2$ 查表值; 当 χ^2 计算值小于 $\chi_{(f)0.05}^2$ 查表值时, 认为 n 个实验结果均一, 可按 (37) 式、(38) 式、(39) 式计算 n 个 M 的加权均值 $\bar{M}$ 、 $S_{\bar{M}}$ 及其 $F L$ 。

$$\bar{M} = \frac{\sum WM}{\sum W} \quad (37)$$

$$S_{\bar{M}} = \sqrt{\frac{1}{\sum W}} \quad (38)$$

合并计算的自由度(f)是n个实验结果的 s^2 自由度之和。 $f = \sum f_i$, 按此f查t值表(表一)得t值。

$$\overline{M} \text{ 的 F L} = \overline{M} \pm t \cdot S_{\overline{M}} \quad (39)$$

$\overline{P}_T$ 及其可信限按(40)式、(41)式计算:

$$\overline{P}_T = \text{antilg } \overline{M} \quad (40)$$

$$\overline{P}_T \text{ 的 F L} = \text{antilg } \overline{M} \pm t \cdot S_{\overline{M}} \quad (41)$$

FL%按(8)式计算。

当 χ^2 计算值大于 $\chi^2_{(f)0.05}$ 查表值时, 则n个实验结果不均一, 可用以下方法进行合并计算。

(1) 如为个别实验结果影响n次实验结果的均一性, 可以剔除个别结果, 将其余均一的结果按以上公式进行合并计算, 但删除个别结果应符合“特异反应剔除”的要求。

(2) 如果n次实验结果的不均一性并非个别实验结果的影响, 则按(42)式、(43)式计算校正权重 W' , 如经公式(43)计算结果为负值, 可以删除减号后面一项, 计算近似的 S_m^2 和各次实验的 W' 。用 W' 和 $\sum W'$ 代替公式(37)(38)中 W 和 $\sum W$ 计算 $\overline{M}$ 、 $S_{\overline{M}}$, 再按(39)式、(40)式、(41)式计算 $\overline{M}$ 的FL、 $\overline{P}_T$ 及其FL。

$$w' = \frac{1}{S_M^2 + S_m^2} \quad (42)$$

$$S_m^2 = \frac{\sum M^2 - (\sum M)^2 / n}{n-1} - \frac{\sum (S_M^2)}{n} \quad (43)$$

$$f = n - 1$$

表十二(略)

例6(略)

例 7 胰岛素六次效价测定结果的合并计算

测定结果见表 7-1。

表 7-1 胰岛素效价测定结果

$P_T(u/mg)$	$M(\log P_T)$	M^2	S_M	$W(1/S_M^2)$	WM	WM^2
25.91	1.4135	1.9980	0.096 03	108.44	153.28	216.66
23.15	1.3646	1.8621	0.006 202	25 997.79	35 476.59	48 411.35
27.48	1.4390	2.0707	0.026 09	1469.10	2114.04	3042.10
28.39	1.4532	2.1118	0.031 77	990.75	1439.76	2092.26
27.56	1.4403	2.0745	0.035 60	789.04	1136.46	1636.84
25.79	1.4115	1.9923	0.031 81	988.26	1394.93	1968.95
Σ	8.5221	12.1094		30 343.38	41 715.06	57 368.16

按 (35) 式

$$\chi^2 = 57 \cdot 368.16 - \frac{41715.06^2}{30343.38} = 19.70$$

$$f = 6 - 1 = 5 \text{ 查表十二, } \chi_{(5)0.05}^2 = 11.1$$

χ^2 计算值 $19.70 > \chi_{(5)0.05}^2$ 查表值, 六次结果不均一, 经特异反应剔除计算 (公式 10), 无个别删除结果。

按 (42) 式、(43) 式计算

$$S_m^2 = \frac{12.1094 - 8.5221^2 / 6}{6 - 1} - \frac{0.01327206}{6} = 0.001007 - 0.002212 = -0.001205$$

计算结果为负数, 可删除减号后面项, $S_m^2 = 0.001007$ 。

计算各次实验结果的方差 S_M^2 、差方和 ($S_M^2 + S_m^2$)、校正权重 W' 、 $\sum W'M$ ，见表 7-2

表 7-2 胰岛素测定结果不均一时计算表

PT (u/mg)	M (lgPT)	M ²	S_M^2	$S_M^2 + S_m^2$	W'	$\sum W'M$
25.91	1.4135	1.9980	0.009222	0.01023	97.75	138.17
23.15	1.3646	1.8621	0.00003846	0.001045	956.94	1305.84
27.48	1.4390	2.0707	0.0007236	0.001731	577.70	831.31
28.39	1.4532	2.1118	0.001009	0.002016	496.03	720.83
27.56	1.4403	2.0745	0.001267	0.002274	439.75	633.37
25.79	1.4115	1.9923	0.001012	0.002019	495.29	699.10
Σ	8.5221	12.1094	0.01327206		3063.46	4328.62

$$\bar{M} = 4328.62 / 3063.46 = 1.4130$$

$$S_{\bar{M}} = \sqrt{\frac{1}{3063.46}} = 0.01807 \quad f=5, t=2.57$$

$$PT = \text{antilg } 1.4130 = 25.88 \text{ (u/mg)}$$

$$PT \text{ 的 FL} = \text{antilg } (1.4130 \pm 2.57 \times 0.01807) = 23.26 \sim 28.80 \text{ (u/mg)}$$

$$FL\% = \frac{28.80 - 23.26}{2 \times 25.88} \times 100\% = 10.70\%$$

五、符号

- A S_M 计算公式中的数值
- A_T 供试品的标示量或估计效价
- B S_M 计算公式中的数值
- C 缺项所在列各反应值之和
- C_i 可靠性测验用正交多项系数
- D 效价计算用数值
- $d_{s_1}, d_{s_2} \cdots$ 标准品的各剂量

$d_{T_1}, d_{T_2} \cdots$	供试品的各剂量
F	两方差值之比, 用于方差分析等
F L	可信限
F L %	可信限率
f	自由度
G	缺项补足式中除缺项外各反应值之和
g	回归的显著性系数
I	相邻高低剂量比值的对数, $I = \lg r$
$J_1, J_2 \cdots$	特异反应剔除用的 J 值
K	S 和 T 的剂量组数和
$k \cdot k'$	S 或 T 的剂量组数
M	S 和 T 的对数等反应剂量之差, 即效价比值 (R) 的对数, $M = \lg R$ 。 合并计算中 $M = \lg P T$
m	平行线测定法各剂量组内反应的个数或动物数
n	S 和 T 反应个数之和
n_s	最小效量法 S 反应的个数
n_T	最小效量法 T 反应的个数
P	概率
P_T, P_U	供试品 (T)、(U) 的测得效价
R	S 和 T 的等反应剂量比值
R	缺项所在行反应值之和
r	S 和 T 相邻高低剂量的比值
S	标准品
$S_1, S_2 \cdots$	平行线测定标准品 (S) 各剂量组反应值之和, 等于 S 各剂量组的
$\Sigma y(k)$	
S_M	M 的标准误
s^2	实验的误差项
S_m^2	合并计算中各次实验间的方差
T	供试品

$T_1, T_2 \cdots$ 平行线测定供试品 (T) 各剂量组反应值之和, 相当于 T 各剂量组的 $\Sigma y(k)$

t 可信限计算用 t 值, 见表一

U 供试品的另一符号

$U_1, U_2 \cdots$ 平行线测定供试品 (U) 各剂量组反应值之和, 相当于 U 各剂量组的 $\Sigma y(k)$

u 供试品的效价单位

V 平行线测定效价计算用数值, 见表七

W 同 V

W 合并计算中为各次实验结果的权重

W' 合并计算中各次实验结果的校正权重

W_c 权重系数

$n W_c$ 权重

x 对数剂量, $x = \lg d$

x_s S 的对数剂量或 S 的对数最小效量

x_T T 的对数剂量或 T 的对数最小效量

$\overline{x_s}$ 直线测定法中, S 组对数最小效量的均值

$\overline{x_T}$ 直接测定法中, T 组对数最小效量的均值

y 反应或其规定的函数

y_a, y_m 特异反应所在组的两极端值

Σ 总和

$\Sigma y(k)$ S 和 T 各剂量组反应值之和

$\Sigma y(m)$ S 和 T 各剂量组内各区组反应值之和

χ^2 卡方