

药效比较的抛物线检定

徐端正 (上海第一医学院基础医学部药理教研组, 上海 200032)

提要 在生物检定中遇到对数剂量-反应呈二次曲线时, 一般将反应进行函数转换成直线, 但如转换发生困难, 不如直接用抛物线检定。本文提出对称 $2k$ 点设计的抛物线检定法, 其中 $k=3, 4, 5$ 。用定型公式计算检品的相对效力、近似95%可信限以及抛物线检定的有效性检验。用 $k=5$ 的实例详述计算过程。对 $k>5$ 的任何整数, 本文方法仍适用。

关键词 抛物线检定; 相对效力; 有效性检验; 对称的 $2k$ 点设计; 正交系数; 加权平均

在生物检定中, 属于间接的稀释或比较检定, 大都基于标准品与检品的对数剂量与反应呈直线关系且平行。根据相对效力的定义是相同反应量的标准品与检品剂量之比, 因此检品的对数相对效力应是检品与标准品两平行对数剂量-反应直线在横轴上的距离。如果这个距离为 M , 则检品的相对效力 $R = \text{antilog } M$ 。有关这个基本原理的实验设计与统计分析不仅有大量实践且有很完备的理论以供生物检定工作者参考^(1,2)。

平行线检定的基本条件是对数剂量-反应呈直线关系, 但有时不一定能满足。例如对维生素 B_{12} 的检定, 对数剂量与反应的关系可表现为一条抛物线⁽³⁾; 在检定促性腺激素时也可发生类似情况⁽⁴⁾。Finney⁽¹⁾认为当曲度较小, 且所选择的两制备的剂量有很接近的反应量时, 用平行直线检定法不致对结果有较大影响; 如果曲度较大, 一般宜将曲线用一定函数形式转换为直线。但是当曲线的函数形式未知, 或者曲线不是单调的, 就会发生转换直线的困难, 一个合理的方法是直接用抛物线检定。Bliss⁽⁶⁾曾研究过抛物线检定, 但其方法过于复杂, 不易推广, 也不适宜于常规检定; Elston⁽⁴⁾虽简化了检定方法, 但仍需作4次方差分析, 其繁复程度仍难令人接受; Cox⁽⁶⁾进一步简化Elston方法, 使原来的4次方差分析简化为一次, 最终结果与Elston一致, 但Cox仅引用了一个

八点检定法的例子。本文拟提出一般的 $2k$ 点抛物线检定法, 其中 $k=3, 4, 5$ 。并以 $k=5$ 为实例, 具体分析相对效力计算法, 有效性检验及可信限估计。

方 法

一、相对效力 用对称的平行线检定设计, 令标准品与检品各用 k 个剂量, 两制备的剂量系可表示为:

$$S: ds_1, rds_1, \dots, r^{k-1}ds_1$$

$$U: du_1, rdu_1, \dots, r^{k-1}du_1$$

ds_1 与 du_1 分别为标准品 S 与检品 U 的最小剂量, 后一个剂量与前一个剂量比为 $r (>1)$, 每个剂量有相同的重复次数 m , 将剂量变换为 $x = \log_h d - \overline{\log_h d} = x' - \bar{x}'$ 其中当 k 为偶数时, $h = r^{1/2}$; k 为奇数, $h = r$; \bar{x}' 为 x' 的平均值。这样可使剂量变换有最简单的对称形式。例如当 $k=3$ 时, $x = -1, 0, 1$; $k=4$ 时, $x = -3, -1, 1, 3$ 等。如果已知对数剂量与反应呈抛物线, 则在剂量变换成 x 的条件下, 代表标准品与检品两平行抛物线可用以下方程式表示:

$$y_s = b_0 + b_1(x_s - M'/2) + b_2(x_s - M'/2)^2 \quad [1]$$

$$y_u = b_0 + b_1(x_u + M'/2) + b_2(x_u + M'/2)^2$$

根据相对效力的定义, 当 $y_s = y_u$ 时, 由[1]可得出 $x_s - x_u = M'$, 或者 $\log_h ds - \log_h du = \bar{x}'_s - \bar{x}'_u + M'$, 由于 $\bar{x}'_s - \bar{x}'_u = x'_{s1} - x'_{u1}$, 于是相对效力 R 的公式为:

$$R = ds/du = \text{anti } \log_h(x'_{s1} - x'_{u1} + M') \quad [2]$$

如果令 $M = x'_{s1} - x'_{u1} + M'$, 则 M 是在剂量变换为 x' 条件下的两平行抛物线的水平距离, 由此

$$R = \text{anti } \log_h M = \frac{ds_1}{du_1} \text{anti } \log(M' \log h) \quad [3]$$

用抛物线模型[1]推导的式[2]及[3]与平行直线检定公式一致,从式[3]可知,要求出相对效力 R ,问题归结为求 M' 。

二、有效性检验 表1列出对称的 $2k$ 点设计的正交系数,其中 $k=3,4,5$ 。 S_i 与 U_i ($i=1,2,\dots,k$)分别为标准品与检品在第 i 个剂量组的反应量合计,对于对称的 $2k$ 点设计,剂量间比较的平方和有 $2k-1$ 个自由度,它可分解为 $2k-1$ 个相互独立的正交比较,其平方和各具1个自由度。例如当 $k=3$ 时,两制备间的比较 $L_p = -S_1 - S_2 - S_3 + U_1 + U_2 + U_3$,这个比较的平方和 $SS(L_p) = (L_p)^2/6m$, $DF=1$;其余各个比较的平方和类推。

将 $2k$ 个剂量间平方和分解为 $2k-1$ 个相互独立且各具1个自由度的平方和还可用来核对计算是否有误。例如一个对称的6点法设计应满足以下等式:

$$\begin{aligned} \text{剂量间平方和} = & \frac{(L_p)^2}{6m} + \frac{(L_1)^2}{4m} + \frac{(L_1')^2}{4m} \\ & + \frac{(L_2)^2}{12m} + \frac{(L_2')^2}{12m} \end{aligned} \quad [4]$$

是否可应用抛物线模型[1]乃通过以下有效性检验:对 $SS(L_p)/s^2$, $SS(L_1)/s^2$ 及 $SS(L_1')/s^2$ 的要求与平行直线检定相同; $SS(L_2)/s^2$ 应在一定显著性水平($\alpha=0.05$)上显著,自 $SS(L_2')$ 起及以下各项比较的平方和由于在模型[1]条件下,其期望值皆为0,因此应皆不显著,否则说明检定无效。这里的 s^2 为有效性检验方差分析的剩余均方。

三、 M' 的估计 当二次曲线模型[1]的有效性检验通过后,按表1中 L_p 与 L_1 及 L_1' 与 L_2 的期望值之比,可分别得出 M' 的两个独立估计。例如对 $k=5$:

$$M_1' = 4L_p/L_1; \quad M_2' = 7L_1'/5L_2 \quad [5]$$

M_1' 与 M_2' 的方差 $V(M_1')$ 与 $V(M_2')$ 可利用比值的近似方差公式*,例如对公式[5]中的 M_1' 求方差: $V(M_1') = \left(\frac{4L_p}{L_1}\right)^2 \left[\frac{16V(L_p)}{16L_p^2} + \frac{V(L_1)}{L_1^2} \right]$,由于 $V(L_p) = s^2 \cdot L_p$ 的分母=50 s^2 ;

$V(L_1) = s^2 \cdot L_1$ 的分母=100 s^2 ,于是 $V(M_1') = \left(\frac{4L_p}{L_1}\right)^2 \left(\frac{50s^2}{L_p^2} + \frac{100s^2}{L_1^2} \right) = \frac{100s^2}{L_1^2} \left(8 + \frac{16L_p^2}{L_1^2} \right) = \frac{8 + M_1'^2}{SS(L_1)}$;用完全相同方法可得 $V(M_2') = (1.4 + M_2'^2)/SS(L_2)$ 。一个总的 M' 的估计是用 M_1' 与 M_2' 的加权平均,其中 M_1' 的权 $w_1 = 1/V(M_1')$; M_2' 的权 $w_2 = 1/V(M_2')$ 。于是根据 $k=5$,

$$\begin{aligned} w_1 &= SS(L_1)/(M_1'^2 + 8); \\ w_2 &= SS(L_2)/(M_2'^2 + 1.4) \end{aligned} \quad [6]$$

用 M_1' 与 M_2' 的加权平均得到的 M' 为:

$$M' = (w_1 M_1' + w_2 M_2') / (w_1 + w_2) \quad [7]$$

但公式[6]中的 M_1' 及 M_2' 应由较正确的 M' 代替,因此还需要通过几次叠代过程,直至由公式[7]得出一个稳定的 M' 为止。最后将 M' 代入公式[3]得出检品的相对效力 R 。

对于其他 k 值(3及4)已由表2列出相应的权,用相同于 $k=5$ 的方法计算相对效力 R 。

四、可信限估计 根据公式[7]可得出 M' 的方差

$$V(M') = s^2 / (w_1 + w_2) \quad [8]$$

一般可假定 M' 的分布是正态的,由此得出 M' 的95%可信限为 $M' \pm t\sqrt{V(M')}$,这里 $t = t(2k(m-1), 0.05)$,将 M' 的95%可信限代入公式[3]可得出相对效力 R 的95%可信限:

$$\begin{aligned} R_U, R_L = & \frac{ds_{1'}}{du_1} \text{anti log} \{ [M' \\ & \pm t\sqrt{V(M')}] \log h \} \end{aligned} \quad [9]$$

实 例

用药物对离体兔颈交感神经节突触动作电位抑制率为指标,以氯化筒箭毒碱为标准品,氯甲左箭毒为检品,比较检定氯甲左箭毒对于氯化筒箭毒碱的相对效力⁽⁷⁾。表3为实验结

* $V\left(\frac{a}{b}\right) = \left(\frac{a}{b}\right)^2 \left[\frac{V(a)}{a^2} + \frac{V(b)}{b^2} \right]$, 要求 a 与 b 相互独立。

表 1 应用于对称型设计的正交系数

2k 点设计	比较 (L)	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	U ₁	U ₂	U ₃	U ₄	U ₅	L 期望值	分母
k=3	制备间 L _p	-1	-1	-1			1	1	1			3M'b ₁	6m
	直线回归 L ₁	-1	0	1			-1	0	1			4b ₁	4m
	偏离平行 L' ₁	1	0	-1			-1	0	1			4M'b ₂	4m
	合并二次曲线 L ₂	1	-2	1			1	-2	1			4b ₂	12m
	对向二次曲线 L' ₂	-1	2	-1			1	-2	1			0	12m
k=4	制备间 L _p	-1	-1	-1	-1		1	1	1	1		4M'b ₁	8m
	直线回归 L ₁	-3	-1	1	3		-3	-1	1	3		40b ₁	40m
	偏离平行 L' ₁	3	1	-1	-3		-3	-1	1	3		40M'b ₂	40m
	合并二次曲线 L ₂	1	-1	-1	1		1	-1	-1	1		32b ₂	8m
	对向二次曲线 L' ₂	-1	1	1	-1		1	-1	-1	1		0	8m
	三次曲线 (S)L ₃	-1	3	-3	1		0	0	0	0		0	20m
	三次曲线 (U)L' ₃	0	0	0	0		-1	3	-3	1		0	20m
k=5	制备间 L _p	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	5M'b ₁	10m
	直线回归 L ₁	-2	-1	0	1	2	-2	-1	0	1	2	20b ₁	20m
	偏离平行 L' ₁	2	1	0	-1	-2	-2	-1	0	1	2	20M'b ₂	20m
	合并二次曲线 L ₂	2	-1	-2	-1	2	2	-1	-2	-1	2	28b ₂	28m
	对向二次曲线 L' ₂	-2	1	2	1	-2	2	-1	-2	-1	2	0	28m
	三次曲线 (S)L ₃	-1	2	0	-2	1	0	0	0	0	0	0	10m
	三次曲线 (U)L' ₃	0	0	0	0	0	-1	2	0	-2	1	0	10m
	四次曲线 (S)L ₄	1	-4	6	-4	1	0	0	0	0	0	0	70m
四次曲线 (U)L' ₄	0	0	0	0	0	1	-4	6	-4	1	0	70m	

表 2 M'₁ 与 M'₂ 的权

2k 点设计	w ₁	w ₂
k=3	SS(L ₁)/(M' ₁ ² +2.67)	SS(L ₂)/(M' ₂ ² +0.33)
k=4	SS(L ₁)/(M' ₁ ² +20)	SS(L ₂)/(M' ₂ ² +3.2)
k=5	SS(L ₁)/(M' ₁ ² +8)	SS(L ₂)/(M' ₂ ² +1.4)

果, 这是 $k=5$, $m=5$ 及 $r=2$ 的对称型设计。根据表 1 中 $k=5$ 的正交系数, 将计算的 L 值在同表列出, 每剂量组的均方 s_i^2 可合并成一个剩余均方 s^2 , 即 $s^2 = \frac{\sum s_i^2}{10} = 196.49$ 。根据 $SS = L^2/\text{分母}$, 将各项正交比较的平方和与 s^2 相比, 可得出用于有效性检验的方差分析表 4, 从表 4 可知直线回归 L_1 非常显著 ($P < 0.001$), 合并二次曲线显著 ($P < 0.05$), 这说明本实例可应用抛物线模型[1]进行检定。

代表标准品 S 与检品 U 的两平行抛物线见图 1, 在剂量变换为 $x' = \log_2 d$ 条件下, 两抛物线的水平距离 M 为待估计的对数相对效力。

由公式[5]及[6]可分别得 M' 的两个独立

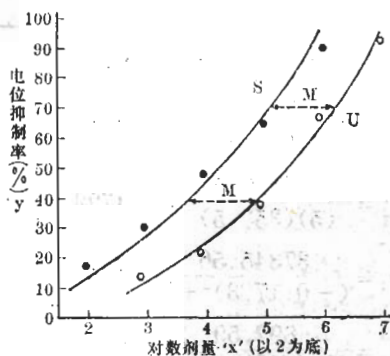


图 1 10 点法抛物线检定

(以兔交感神经节突触动作电位抑制率为指标的氯甲左箭毒的生物检定)

表 3 对称型10点法的抛物线检定举例

抑制率合计 (%) ($m=5$)	S_1	S_2	S_3	S_4	S_5	U_1	U_2	U_3	U_4	U_5	L 值	分母
	86.25*	155	244	328	453	70	112	194	336	471		
L_p	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	-83.25	50
L_1	-2	-1	0	1	2	-2	-1	0	1	2	1932.5	100
L'_1	2	1	0	-1	-2	-2	-1	0	1	2	119.5	100
L_2	2	-1	-2	-1	2	2	-1	-2	-1	2	353.5	140
L'_2	-2	1	2	1	-2	2	-1	-2	-1	2	138.5	140
L_3	-1	2	0	-2	1	0	0	0	0	0	20.75	50
L'_3	0	0	0	0	0	-1	2	0	-2	1	-47	50
L_4	1	-4	6	-4	1	0	0	0	0	0	71.25	350
L'_4	0	0	0	0	0	1	-4	6	-4	1	-87	350
平均抑制率 (%)	17.25	31	48.8	65.6	90.6	14	22.4	38.8	67.2	94.2	剩余均方	
剂量 (mg/L)	3.9	7.8	15.6	31.2	62.4	7.5	15	30	60	120	$\frac{\sum s_j^2}{10}$	
$\log_2 d$	1.963	2.963	3.963	4.963	5.963	2.906	3.906	4.906	5.906	6.906	= 196.49	
抑制率均方 (s_j^2)	120.69	221.00	349.20	190.30	165.80	160.00	218.30	193.20	178.20	168.20		

* 该组有一缺失数据, 用已有数据的平均值补上后合计。

表 4 有效性检验的方差分析

方差来源	DF	SS	SM	F	P
L_p	1	138.61		0.71	
L_1	1	37345.56		190.06	<0.001
L'_1	1	142.80		0.73	
L_2	1	892.59		4.54	<0.05
L'_2	1	137.02		0.70	
L_3	1	8.61		0.04	
L'_3	1	44.18		0.22	
L_4	1	14.50		0.07	
L'_4	1	21.63		0.11	
剂量间	9	38745.50			
剩余	40	7859.55	196.49 (s^2)		

估计 M'_1 与 M'_2 以及 M'_1 与 M'_2 的权:

$$M'_1 = \frac{(4)(-83.25)}{1932.5} = -0.1723;$$

$$M'_2 = \frac{(7)(119.5)}{(5)(353.5)} = 0.4733$$

$$w_1 = \frac{37345.56}{(-0.1723)^2 + 8} = 4651;$$

$$w_2 = \frac{892.59}{(0.4733)^2 + 1.4} = 549.6$$

代入公式[7], 并通过两次叠代, 得出 $M' = -0.0952$, 代入公式[3]得相对效力:

$$R = \frac{62.4}{120} \text{anti log}(-0.0952 \log 2) = 0.487^{**}$$

在表 4 中, 最后 5 个正交比较的平方和与剩余均方相比的 F 值皆不显著, 因此将它们合并至剩余均方是合理的, 于是

$$s^2 = (7859.55 + 21.63 + 14.50 + 44.18 + 8.61 + 137.02)/45 = 179.68$$

再由公式[8]可得出 M' 的方差估计

$$V(M') = \frac{179.68}{4650.94 + 549.62} = 0.03455,$$

$$DF = 45,$$

应用 $t(45; 0.05) = 2.0141$, M' 的 95% 可信限为 $-0.0952 \pm 2.0141 \sqrt{0.03455} = -0.0952 \pm 0.3744$, 代入公式[9]可得出相对效力 R 的 95% 可信限:

$$R_L = \frac{62.4}{120} \text{anti log} \times \{(-0.0952 - 0.3744) \log 2\} = 0.376$$

$$R_U = \frac{62.4}{120} \text{anti log} \times \{(-0.0952 + 0.3744) \log 2\} = 0.631$$

** 这里用 ds_5/du_5 代替 ds_1/du_1 对计算结果不变, 但可使用有效数字 3 位

讨 论

当检品与标准品两对数剂量与反应呈平行的二次曲线时, 要直接求出两曲线间的水平距离将是非常复杂的。因为这不仅要由模型[1]估计4个参数 b_0, b_1, b_2 与 M' , 还需要由这些参数的误差来估计相对效力的误差, 这是一个很繁复的计算过程, 一般较难实行。Finney 建议当曲度较小时可应用直线变换或者不管其二次曲线显著与否只要平行, 可仍作为两平行直线处理, 但是当检品与标准品两组对应剂量的反应量有较大差别时, 将导致检定无效或得出一个错误的相对效力。Finney 曾利用简单的图解说明其中道理(见文献(1) pp110-2)。本文的抛物线检定是在模型[1]的条件下求出表1中各项比较的期望值。由于在剂量变换为 x 时, $x_{s_i} = x_{u_i} = x_i$, 根据模型[1]: $y_{u_i} - y_{s_i} = b_1 M' + 2b_2 M' x_i$; $y_{u_i} + y_{s_i} = 2b_0 + 2b_1 x_i + 2b_2 x_i^2 + b_2 M'^2/2$, 由此得出 $L_p = \sum_{i=1}^k (y_{u_i} - y_{s_i}) = \sum_{i=1}^k \times b_1 M' + 2b_2 M' \sum_{i=1}^k x_i = kb_1 M'$; $L_1 = \sum_{i=1}^k x_i (y_{u_i} + y_{s_i}) = 2b_0 \sum_{i=1}^k x_i + 2b_1 \sum_{i=1}^k x_i^2 + 2b_2 \sum_{i=1}^k x_i^3 + (b_2 \cdot M'^2/2) \sum_{i=1}^k x_i = 2b_1 \sum_{i=1}^k x_i^2$ 。例如当 $k=5$ 时, $\sum x_i^2 = 10$, 于是 $L_p = 5M' b_1$; $L_1 = 20b_1$ 。其它各项比较的期望值用相同方法得出。这些期望值提供两个 M' 的独立估计。由于这两个估计值仅在对称设计的剂量变换 x 及模型[1]条件进行, 因此它是一个在对称设计中普遍适用的方法。利用表1及表2更可使计算定型化。

本文用非去极化型肌松药氯化筒箭毒碱及氯甲左箭毒对家兔颈交感神经节突触动作电位抑制率为指标, 检定氯甲左箭毒对氯化筒箭毒碱的相对效力。用本文方法求得的氯甲左箭毒的相对效力为 0.487; 其 95% 可信限为 0.376—

0.631。从本文图1及表3可以看到两组对应剂量的反应量比较接近, 如果用平行直线检定可得出相对效力为 0.462, 95% 可信限为 0.344—0.616, 与本文的结果比较略为偏低。如果以可信限长度作为精密度的比较, 用本文方法为 0.255; 用平行直线检定 0.272, 前者精密度稍高于后者。可以想像, 随着二次曲线曲度的增加, 用平行直线检定, 由于偏离直线程度随之增加, 其精密度与用二次曲线的差距也会相应增加。

除氯甲左箭毒外, 本实验室曾用相同方法对环轮宁作生物检定, 其对数剂量与抑制百分率同样呈二次曲线, 对这类生物检定除应用抛物线检定外, 也可将反应作平方根转换使之直线化后, 再利用平行直线检定。本文所提的抛物线检定可作为另一种定型的检定方法供生物检定工作者参考使用。但是当转换后仍不能得出满意的直线时, 用本文的模型[1]进行检定将会是有效的。

本文提出 $k=3, 4, 5$ 的对称 $2k$ 点设计所需要的正交系数表, 并用定型方法作有效性检验及 M' 估计。对于 k 大于 5 的情况, 正交系数表可查阅 Fisher 和 Yates 的表 XXIII⁽⁶⁾, 相应的 M' 估计可根据 $k \leq 5$ 的方法。当然, 这个方法可推广到 k 大于 5 的任何正整数。

参 考 文 献

- 1 Finney DJ. *Statistical method in biological assay*. 2nd ed. London: Griffin, 1964
- 2 Bliss CI. *The statistics of bioassay*. 1st ed. New York: Academic Press, 1952
- 3 Bliss CI. *J Assoc Off Agr Chem* 1956 Oct; 39: 816
- 4 Elston RC. *Biometrics* 1965 Mar; 21(1):140
- 5 Bliss CI. *Biometrics* 1957 Mar; 13(1):35
- 6 Cox CP. *Biometrics* 1972 Sep; 28(3):875
- 7 杨藻宸、徐端正、茅玉康、鲁映青. 待发表。
- 8 Fisher RA, Yates F. *Statistical tables for biological, agricultural and medical research*. 6th ed. London: Oliver & Boyd, 1963:98—108

PARABOLA BIOASSAYS IN THE COMPARISON OF DRUG EFFECTS

XU Duan-zheng (Department of Pharmacology, Faculty of Basic Medical Sciences, Shanghai First Medical College, Shanghai 200032)

ABSTRACT Canonical analysis procedures for the estimation of relative potencies when the log dose-response relationship is linear are available in standard texts, but cases where curved relationships are obtained can arise in vitamin B₁₂ and gonadotrophin assays. The response curve of these assays can often be well represented by parabolas over a limited range of doses. So it is desirable to have a simple method for estimating the potency of an unknown, relative to a standard preparation from two parabolic response curves.

Symmetrical 2k-point designs with $k = 3$,

4 and 5 for obtaining a point estimate and an approximate interval estimate of the relative potency of two parallel parabolas are described here. The method of validity tests is also included. A numerical example of bioassay of dimethylcurine methylchloride is given with calculation procedure fully illustrated. The methods remain applicable even when the integer $k (>5)$ is arbitrary.

KEY WORDS parabola assay; relative potency; validity test; symmetrical 2k-point design; orthogonal coefficient; weighted mean