

## 多变量双交叉设计平行线测定胰岛素效价

林志共 周海钧 (中国药品生物制品检定所, 北京 100050, 中国)

### Multivariate twin crossover design parallel line assay for estimating potency of insulin

LIN Zhi-Gong, ZHOU Hai-Jun

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China)

**ABSTRACT** Based on twin crossover design, a multivariate assay design was used in parallel line analysis to estimate the potency of insulin. This paper describes how to make the experimental design. After the analysis of variance according to assay, the potency and fiducial limits were calculated by the method (2,2). It has been applied by multivariate assay to estimate 80, 100 and 120% standard preparation and the recovery rate were between 94 and 108%. We also tested various batches and agent products. The average fiducial limits rates were less than 20%. In comparison with twin crossover analysis as usual, multivariate assay appeared to provide a more efficient utilization of experimental data, to increase weight of every animal for a more accurate estimation of potencies and to save on animal numbers 30-40%.

**KEY WORDS** insulin: biological assay; blood glucose: research design

**摘要** 本文探讨了在双交叉设计基础上, 根据量时效多变量的小鼠血糖法平行线测定胰岛素效价。描述了实验设计, 按相应统计分析和(2, 2)法计算效价, 用上述方法测定 80, 100 和 120%, 回收率为 94-108%。同时, 和单变量双交叉设计比较测定不同剂型, 批号及失效检品。结果表明, 实验的准确性好, 精密度较高, 减少 30-40% 动物数, 实验的平均可信限率仍小

于 20%。说明多变量设计有助于改进胰岛素效价测定。

**关键词** 胰岛素; 生物测定; 血糖; 研究设计

在胰岛素生物测定中, 血糖法一般用双交叉设计<sup>(1,2)</sup>, 量-效关系只确定在某一时间上观察, 即二维平行线分析。小鼠血糖法测定胰岛素效价, 采用一般在给药后 30 或 40 min<sup>(3)</sup>, 如考虑时间因素就扩展为多变量测定(量时效三维分析)。Vϕlund<sup>(4)</sup>曾描述了多变量立体关系和平行线模型的统计分析, 测定了两剂量六点时间的兔血糖, 矩阵统计分析, 方法复杂, 工作量大, 时间长, 费动物, 难以被接受, 不便于常规的检定。美国药典收载的兔血糖法在设计上可认为是多变量测定, 但统计分析时, 把给药后 1 和 2.5 h 血糖值平均, 多变量转为平面关系, 按单变量分析<sup>(2)</sup>, 这样它丢失了已得数据的不少信息。根据小鼠血糖法特点和前人的经验, 可安排两点时间多变量双交叉设计测定反应, 从有限的动物数得到更多信息。

### MATERIALS AND METHODS

**药品** 胰岛素国家标准品, 批号 780307, 标示量 27 IU/mg, 本所制备, 用含 1% 苯酚 pH 2.5 NS 配制为 10 IU/ml 溶液, 分装安瓿备用, 实验时再用 pH 2.5 的 NS 稀释至所需实验的浓度; 国际标准品, 批号 83/515, 标示

Received 1988 Dec 28 Accepted 1989 Mar 18

量 26 IU/mg, 配制同上。胰岛素样品为原料粉剂及国内外胰岛素注射液(包括过期失效样品)等, 均用 pH 2.5 的 NS 配制所需浓度。

**动物** 昆明或 NIH 种小鼠, ♂♀均可, 每次实验用同一性别, 体重  $23 \pm 2$  g, 日龄差别不大, 由本所动物繁殖场提供, 正常供食饮水, 每次实验在给药后至采血时, 不供饲料和水, 或从实验开始禁食和水, 或完全正常供食供水皆可。

**血糖测定**<sup>(6)</sup> 从小鼠眼眶静脉丛取血样 0.06 ml, 经处理用葡萄糖氧化酶法测定吸收度, 经葡萄糖标准曲线回归计算血糖值, 以每 100 ml 血液中所含葡萄糖量 (mg) 表示反应量。

### EXPERIMENTAL DESIGN AND STATISTICAL ANALYSIS

**单变量双交叉设计** 按文献<sup>(4)</sup>方法操作实验, 每组动物 10 只, 并用相应的统计分析变异来源, 计算效价及可信限范围。

**多变量双交叉设计** 在双交叉设计基础上, 增加时间变量为双交叉量时 效平行线测定。即 SL, SH, TL, TH 在不同的时间, 对小鼠效应作为反应量, 剂距 1:0.5, 动物随机分为 4 组, 每组 6-10 只, 编号, 按双交叉设计顺序给药, 采血时间根据实际情况选择, 由于小鼠采血, 如次数过多, 工作量较大, 且会增加实验误差, 间隙也不宜过短, 给药后 2 h 低剂量组反应常恢复正常, 故选给药后 30 和 60 min 为时点, 双交叉处理间隔需在 3 h 以上, 实验设计见 Tab 1。可靠性测验方差分析和效价计算及误差估计按文献<sup>(6)</sup>。

### RESULTS

**回收率测定** 用胰岛素国家标准品既作为标准品, 又作为检品, 作检品时的投入量分别为标示量的 80, 100 和 120%, 多变量双交叉设计测定回收率 (RR), 结果见 Tab 2。回收率范围在 94-108%, 说明此种设计测定方法准确性可靠。

Tab 1. Multivariate twin crossover design.

Group	Dose on occasions			
	Response on times after administration			
	AM		PM	
	30	60 min	30	60 min
1	SL Yj(1,1)	Yj(1,2)	TH Yj(1,3)	Yj(1,4)
2	SH Yj(2,1)	Yj(2,2)	TL Yj(2,3)	Yj(2,4)
3	TL Yj(3,1)	Yj(3,2)	SH Yj(3,3)	Yj(3,4)
4	TH Yj(4,1)	Yj(4,2)	SL Yj(4,3)	Yj(4,4)

SL; Standard preparation low dose, SH; Standard preparation high dose, TL; Test preparation low dose, TH; Test preparation high dose.

Tab 2. Recovery rate for multivariate assay.

Content (%)	Assay (%)	Recovery rate (%)	Fiducial limit rate (%)
80	75.68	94.6	15.8
	82.09	102.6	15.3
	81.86	102.3	13.3
100	100.35	100.4	10.2
	95.24	95.2	10.0
	101.68	101.7	13.6
120	122.05	101.7	17.7
	113.52	94.6	15.8

**检品测定** 按前述实验设计和统计分析, 选用国内外不同剂型和批号样品测定效价, 同时和单变量双交叉设计测定结果比较 (Tab 3)。结果单变量和多变量测定的实验误差相近, 后者可节省 30-40% 动物数。

**超过失效期检品测定** 选几批国内外样品, 用多变量和单变量双交叉设计测定结果比较 (Tab 4)。能正确地反映失效检品的活性。此外, 在多变量测定中, 对 30 min 及 60 min 的反应分别按单变量双交叉计算, 结果 60 min 测定效价比 30 min 低, 对于失效检品从时间角度来说, 将是很有意义。所以, 失效检品用多变量测定更合宜 (Tab 5)。

**误差分析** 单变量和多变量设计实验误差用平均可信限率 (FL%) 表示, 实验次数为频数, 两种设计的实验误差分布皆呈正态分布趋势, 大部分实验误差相近, FL% 小于 25%, 但多变量测定动物数比单变量测定少些 (Fig 1)。

Tab 3. Estimated potencies by multivariate and univariate assay twin crossover design.

Batch	AT (IU/ml)	Standard	Multivariate assay			Univariate assay		
			R	SEM	FL%	R	SEM	FL%
S7	27.8 (IU/mg)	IS	0.9769	0.0298	13.7	0.9863	0.0494	23.2
		IS	1.0540	0.0239	11.0	0.9845	0.0329	15.4
		NS	0.9734	0.0313	14.4			
		NS	1.0703	0.0338	15.6			
861001	40	NS	1.0574	0.0432	20.1	0.9416	0.0318	14.8
50286	40	IS	1.0490	0.0445	20.6			
		NS	0.9850	0.0354	16.3	1.0278	0.0317	14.8
		NS				1.0918	0.0371	17.3
3160905	40	IS	0.9148	0.0283	13.0			
		NS	1.2473	0.0283	18.1	1.3083	0.0468	21.8
21405	100	NS	1.0136	0.0262	12.1	0.9334	0.0364	17.0
		IS	1.0130	0.0244	11.2			

AT, Assumed potency, IS, International standard, NS, National standard, R, Relative potency, SEM, Standard error of mean.

Tab 4. Estimated potencies which exceed expiry product by multivariate and univariate assay (AT = 40 µg/ml).

Batch	Standard	Multivariate assay		Univariate assay	
		R	FL%	R	FL%
771206	NS	0.8121	16.6	0.8789	22.6
770623	NS	0.6672	20.1	0.8287	18.7
	IS	0.6282	18.2		
770915	NS	0.7298	12.8	0.7337	22.0
	IS	0.8094	14.1		
770904	NS	0.8865	13.3	0.8542	15.3
	IS	0.8724	16.1		
A-54/1	NS	0.6717	21.2	0.7872	22.1
	IS	0.8302	22.9		
A-60/1	NS	0.8332	14.2		
	IS	0.7250	16.4		

Tab 5. Comparison of relative potencies and errors which exceed expiry at different times by twin crossover design in multivariate assay (AT = 40 µg/ml).

Batch	Twin crossover				Multivariate assay	
	30		60 min		R	FL%
	R	FL%	R	FL%	R	FL%
771206	0.9339	20.0	0.7560	22.9	0.8121	16.6
770623	0.7742	33.1	0.6382	43.1	0.6672	20.1
	0.6648	42.4	0.6109	22.0	0.6282	18.2
770915	0.7970	20.1	0.6806	23.0	0.7298	12.8
	0.9561	17.0	0.7100	23.9	0.8094	14.1
770904	0.9101	13.5	0.8796	23.7	0.8865	13.3
	0.8770	29.6	0.8685	30.4	0.8724	16.1
A-54/1	0.7872	22.1	0.6060	39.7	0.6717	21.2
	1.0453	37.8	0.6989	33.1	0.8302	22.9
A-60/1	0.7640	31.9	0.6987	29.5	0.7250	13.4

## DISCUSSION

胰岛素作用于小鼠时间短, 采用两时间(30, 60 min)多变量分析即可, 取血次数合并不必要, 且会增加工作量, 实验误差及计算复杂。在可靠性测验方面, 多变量仅增加一时间点, 方差分析等基本同单变量双交叉设计, 也用正交多项系数表简化计算统计分析中各种变异来源及相互影响的差方和, 计算较简单, 也

能用于 USP (1985)<sup>(1)</sup> 兔血糖法胰岛素效价测定。多变量测定理应按三维立体平行线分析, 但 Finney<sup>(2)</sup> 认为在平行线分析中, 多变量测定转化为平面分析, 影响不大, 故本文仍采用简化(2, 2)法平行线原理双交叉设计运算<sup>(7)</sup>在实验精密度方面, 相同动物数的条件下, 由于用了两时间点的反应, 增加了血糖样本数(m), 信息量增加, SM 减小, FL%降低或节省动物数(30-40%)。提高实验精密度。多变

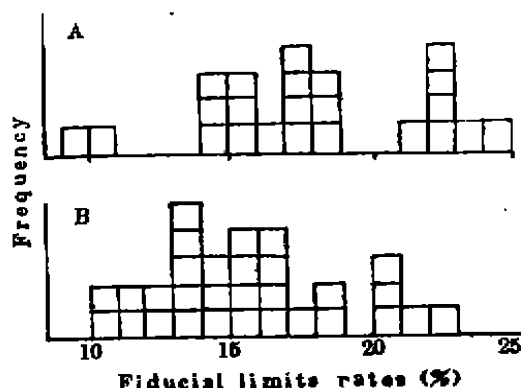


Fig 1 Distribution of average fiducial limits rates (FL%) for univariate (A) and multivariate (B) assay in twin crossover design.

量测定也可用于其他实验设计, 如完全随机, 随机区组和拉丁方设计等, 在观察反应上, 可用于测定筒箭毒兔垂头法和整体心血管药物量时效指标等。

多变量测定设计中, 特异质反应删除和增补可按完全随机设计方法处理。在合并计算方面, Vølund<sup>(8)</sup>已描述了多变量测定结果的合并计算, 也可按中国药典(1985版)<sup>(9)</sup>统计法

合并计算实验结果。

#### REFERENCES

- 1 *British Pharmacopoeia*. 1980. Vol II. London: Her Majesty's Stationery Office, 1980 : A174
- 2 *United States Pharmacopoeia (XXI)*. Rockville USP Convention Inc, 1985 : 1180
- 3 Finney DJ. *Statistical method in biological assay*. 3rd ed. London: Charles Griffin, 1978 : 227-8
- 4 Vølund A. Multivariate bioassay. *Biometrics* 1980, 36 : 225
- 5 Lin ZG, Liu QL, Guo H, Ke RL. Bioassay of insulin by the estimation of blood sugar in mice: Determination of blood sugar by GOD method estimation. *Chin J Pharm Anal* 1985; 5 : 333
- 6 Lin ZG, Zhou HJ. Multivariate parallel-line statistical analysis for estimating potency of insulin. *J Biomath* 1989, 4 : 47
- 7 周海钧, 申蕴如, 主编. 生物检定统计方法. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 1988: 162
- 8 Vølund A. Combination of multivariate bioassay results. *Biometrics* 1982, 38 : 181
- 9 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典(二部). 1985年版. 北京: 化学工业出版社, 人民卫生出版社, 1985 : 附录 83

\* \* \* \* \*

中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1989 Nov, 10 (6) : 568-571

## 估计竞争性拮抗剂 $pA_2$ 的改良方法——等浓度效应法

徐端正 (上海医科大学基础医学部药理学教研室, 上海 200032, 中国)

### A modified procedure for estimating $pA_2$ — equi-concentration effect method

XU Duan-Zheng (Department of Pharmacology, Faculty of Basic Medical Sciences, Shanghai Medical University, Shanghai 200032, China)

**ABSTRACT** This new procedure was proposed under the necessity of a fixed concentration of an agonist in the absence/

presence of an antagonist. As the odds ratio (OR) of the effects in the absence/presence of the antagonist under a fixed concentration is equal to the equi-effective dose ratio (DR) under a fixed effect, it

Received 1988 Nov 14 Accepted 1989 Apr 3