

- [24] Scrucci M, Stivala L A, Maiani G, *et al.* Flavonoids uptake and their effect on cell cycle of human colon adenocarcinoma cells (Caco2) [J]. *Br J Cancer*, 2002, 86: 1645-1651.
- [25] Kandaswami C K, Perkins E, Soloniuk D S, *et al.* Antiproliferative effects of citrus flavonoids on a human squamous cell carcinoma *in vitro* [J]. *Cancer Lett*, 1991, 56: 147-152.
- [26] Awad H M, Boersma M G, Boeren S, *et al.* Identification of O-quinone/quinone methide metabolites of quercetin in a cellular *in vitro* system [J]. *FEBS Lett*, 2002, 520: 30-34.
- [27] Chen C, Kong A N. Dietary chemopreventive compounds and ARE/EpRE signaling [J]. *Free Radic Biol Med*, 2004, 36: 1505-1516.
- [28] Moon Y J, Wang X, Morris M E. Dietary flavonoids: effects of xenobiotic and carcinogen metabolism [J]. *Toxicol in Vitro*, 2006, 20: 187-210.
- [29] Yoshida M, Sakai T, Hosowa N, *et al.* The effect of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells [J]. *FEBS Lett*, 1990, 260: 10-13.
- [30] Fomica J V, Regelson W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids [J]. *Food Chem Toxicol*, 1995, 33: 1061-1080.
- [31] Manach C, Morand C, Texier O, *et al.* Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin [J]. *J Nutr*, 1995, 125: 1911-1922.
- [32] 罗欣, 姚开, 贾冬英, *et al.* 原花色素在生物体内的吸收和代谢与生物可利用性 [J]. *林产化学与工业*, 2006, 26(1): 109-115.

不确定度分析在药物研究中的应用

王丽楠, 杨美华*, 陈建民

(中国医学科学院北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100094)

摘要: 以国家《测定不确定度表达指南》和国家计量技术规范《JJF 1059—1999 测量不确定度评定与表示》为依据, 在简要介绍不确定度概念、分类、产生原因及评定流程等内容的基础上, 结合具体实例, 综述不确定度分析在实验室研究、化学检测、药物检验及临床检验等药物研究诸环节中的重要应用。

关键词: 不确定度; 药物研究; 化学检验; 药物检验; 临床检验

中图分类号: R28

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)03-0464-04

Application of uncertainty analysis in pharmaceutical research

WANG L i-nan, YANG M ei-hua, CHEN J ian-m in

(Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100094, China)

Key words: uncertainty; pharmaceutical research; chemical test; pharmaceutical test; clinical test

药物研究需进行大量的测量工作, 当使用这些分析结果作为决策依据时, 客观评价结果的可靠性是非常重要的, 为此, 引入了不确定度的概念。测量不确定度是目前国际社会普遍接受和推荐使用的定量说明测量结果质量的一个参数。1999年颁布实施的《测量不确定度评定与表示》(JJF 1059-1999)广泛适用于国家计量基准、标准物质、测量及测量方法、计量认证和实验室认可、测量仪器的校准和检定、生产过程的质量保证和产品的检验和测试、贸易结算以及资源测量等测量技术领域。随着药物研究、生产各环节标准的制定和建立, 实验室认可、认证制度的逐步推广, 相关科研人员、管理干部必须加强对“测量不确定度”这个概念的认识。本文简要介绍不确定度分析在药物研究各环节中的应用。

1 不确定度的概念分类及评定流程

1993年由国际计量局(BIPM)、国际标准化组织(ISO)、国际电工委员会(IEC)、国际法制计量组织(OIML)、国际理论与应用化学联合会(IUPAC)、国际理论与应用物理联合

会(IUPAP)、国际临床化学联合会(IFCC)联合制定的《测量不确定度表示指南》^[1](GUM)中将测量不确定度定义为: “与测量结果相关联的一个参数, 用以表征合理地赋予被测量之值的分散性”。换言之, 不确定度是对测量结果而言, 用于表达这个结果的分散程度, 是一个定量概念, 可用数字来描述。不确定度越小, 测量的水平越高, 质量越高, 其实用价值也越高; 反之亦然。

在国际计量委员会(CIPM)建议下, 不确定度表示方法已经在世界各国的许多实验室和计量机构使用。如美国国家标准和技术研究院(NIST)^[2]和欧洲分析化学中心(EURACHEM)^[3]等国际组织纷纷以GUM为指导制定了自己的不确定度评估指南, 并在其组织成员中大力推广^[4]。

测定不确定度与测量误差既有联系, 又有区别。误差是客观存在的测量结果与真值之差。但由于真值往往不知道, 故误差无法准确得到。测量不确定度是说明测量分散性的参数, 由人们经过分析和评定得到, 因而与人们的认识程度有

* 收稿日期: 2007-09-14

* 通讯作者 杨美华 Tel: (010)62899730 E-mail: yangmeihua15@hotmail.com

关。测量结果可能非常接近真值(即误差很小),但由于认识不足,测定得到的不确定度可能较大。也可能测量误差实际上较大,但由于分析估计不足,给出的不确定度偏小。因此,在进行不确定度分析时,应充分考虑各种影响因素,并对不确定度的评定加以验证。

测量不确定度的来源可能有以下10个方面:(1)对被测量的定义不完善;(2)实现被测量的定义的方法不理想;(3)被测量的样本(抽样)不能代表所定义的被测量;(4)环境条件对测量程度的影响认识不周全,或对环境条件的测量不完善;(5)人员对模拟仪器的读数有偏差;(6)测量仪器的分辨率或鉴别能力不够;(7)赋予计量标准的值和标准物质的值不准;(8)从外部来源取得,并用于数据计算的常数和其他参数不准;(9)与测量方法和测量程度相关联的近似性和假定性;(10)在表面上完全相同的条件下,被测量重复观测值的变化。

用标准差表示的测量结果的不确定度,通常称为“标准不确定度”。主要分为两类:通过统计分析观测列的方法,对标准不确定度进行的评定称为标准不确定度的A类评定,相应的标准不确定度称为不确定度分量或A类不确定度分量;采用除观测列的统计分析以外的方法,对标准不确定度进行的评定称为标准不确定度的B类评定,相应的标准不确定度称为非统计不确定度分量或B类不确定度分量^[5]。二者都基于概率分布,并都用方差或标准差表征,与随机误差和系统误差的分类之间不存在简单的对应关系。“随机”与“系统”表示两种不同的性质,“A类”与“B类”表示两种不同的评定方法。分类的目的是表明不确定度评定的两种方法,仅为讨论方便,并不意味两类评定方法存在本质的区别。不确定度评定总流程见图1。

2 在药物研究各环节中的应用

药品研发过程中需进行多次检验测定,以确保药物具有预期的药性。在使用传统方法对误差结果进行评定时,首先因为测量误差是表明测量结果偏离真值的差值,而真值客观存在但人们无法准确得到,所以严格意义上的误差也无法得到。其次在不同国家、不同领域或不同人员对测量误差评定的方法往往各不相同。这些原因导致了不同的测量结果之间缺乏可比性,因此需要用测量不确定度来统一评价测量结果。

2.1 实验室研究

2.1.1 实验室认可制度:实验室认可可是国家权威机构对校准和检测实验室有能力进行指定类型的校准和检测所做的一种正式承认^[6,7]。测量不确定度对测量、试验结果的可信性、可比性和可接受性都有非常重要的意义。根据《检测和校准实验室能力的通用要求》(GB/T 15481-2000idt. ISO/IEC 17025-1999),国家实验室认可委员会强调检测实验室应制定与检测工作特点相适应的测量不确定度评定程序,能够将其应用于不同类型的检测工作,并在必要时给出测量不确定度。

对于检测实验室,可以按照以下规定进行简化^[8]:(1)可以不给出自由度;(2)合成时可以不考虑相关性;(3) k 可以

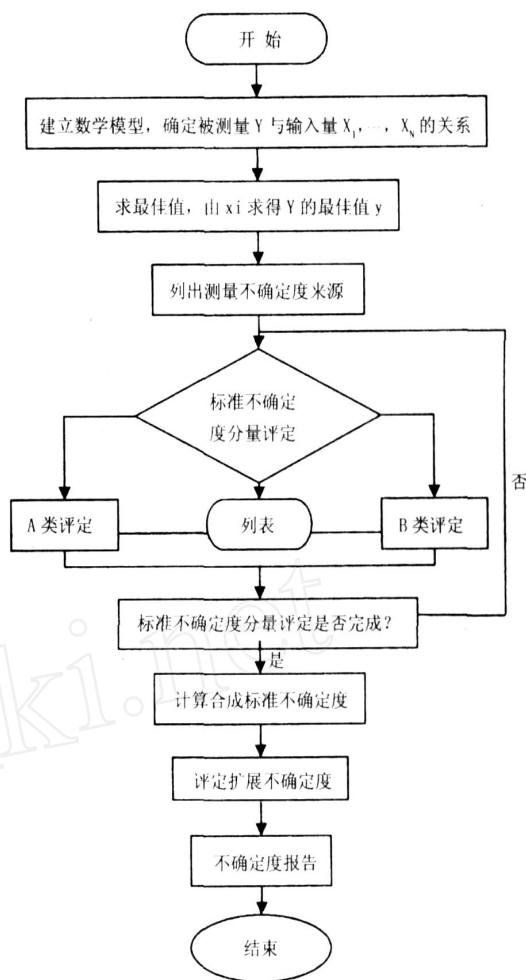


图1 不确定评定流程表

Fig. 1 Flow chart of evaluation for uncertainty

统一取2;(4)对于某些广泛公认的检测方法,如果该方法规定了测量不确定度主要来源的极限和计算结果的表示形式,此时,在实验室遵守该检测方法和测量结果报告要求的情况下,即被认为符合要求;(5)由于某些检测方法的性质决定了无法从计量学和统计学角度对测量不确定度进行有效而严格的评定,这时至少应通过分析方法列出各主要的不确定度分量,并作出合理的评定,同时应确保测量结果的报告形式不会使用户造成对所给出测量不确定度的误解。

如在ISO/IEC 导则25《校准与检测实验室能力的通用要求》中指明,实验室的每个证书或报告,均必须包含有关评定校准或测定结果不确定度的说明。在质量管理与质量保证中,对不确定度极为重视,ISO 9001规定,使用时应保证所用设备的测量不确定度已知^[51]。李箐等^[8]根据JJF 1059-1999分析了各不确定度分量,建立了评定灵敏度、检测限测量结果不确定度的数学模型,并计算了其测量结果的扩展不确定度,评定了气相色谱仪检测器的主要技术指标灵敏度和检测限测量结果的不确定度。

2.1.2 实验室内部质量控制^[9]:实验室内部质量控制是分析人员对测验质量进行自我控制的过程。在一个分析方法被采用之前,需检验实验室对测试方法的适应情况和操作人员

的技能水平,实验室可以通过分析控制样或标样来控制本实验室分析测试人员的分析质量。要使实验室能提供高质量的数据,就必须在使用方法前进行误差预测,以及评估测定方法的检出限,并对分析方法做一个全面评价。这项工作也需要通过“不确定度实验”来完成。

2.2 化学检测:化学分析常涉及多种方法和多个步骤,故其检测结果在多个实验室间达到准确一致比较困难,也因此其结果的可靠性一直备受重视。测量不确定度评定是评价测量水平的指标,是判定测量结果可信度的依据。化学检测工作中检测方法、检测过程和被测样品的特殊性和多样性给检测结果的准确程度带来许多不确定的因素。其中,测试过程所引入的不确定度对于不同的测试过程是不同的,对这种不确定度的评定应考虑具体的测试过程,既要注意所有的测试步骤都存在引入不确定度的可能,也要注意不能重复计算。

化学检测的类型按检测方法实施的分析技术可简单分为化学分析法和仪器分析法。化学分析中不确定度的主要来源有:质量、体积、外部数据、测试过程、随机效应、取制样等^[10]。考虑仪器分析法不确定度来源时,应注意仪器的测量性能。根据检测方法的原理不同,不确定度评定数学模型的类型主要可分为绝对测量法和相对测量法。绝对测量法是通过测量一个或几个基本量值直接得出或根据公式计算出被测样品的量值,如化学分析法中的重量法和容量法。而大多数的化学检测方法是相对测量法,通过与已知量值标准物质的比较,获得被测物质的量值。因此,在化学检测结果不确定度评价时,数学模型的建立、不确定度来源的分析和不确定度分量的确定都将与检测方法、检测仪器的测量性能设置和检测过程特点的影响因素有关^[11]。

胡震等^[12]采用HPLC方法同时测定栀子苷、绿原酸和藏红花素I的量,通过对测试方法流程进行分析,确定不确定度来源,结合定量方法验证数据。据HPLC方法测定栀子药材中3种成分的量的操作流程建立数学模型。

$$W = \frac{C_0 \times V \times D \times F(h)}{M} \times 100\%$$

式中 W 为样品中目标成分的质量分数(%), C_0 为供试品溶液中目标成分的质量浓度(g/mL), V 为供试品溶液的定容体积(mL), D 是稀释因子(若供试品溶液中某成分浓度超过标准曲线范围,溶液需要稀释的倍数), $F(h)$ 是均匀性因子(由药材样品不均匀性引起对实际测量造成影响的校正因子), M 是药材的取样质量(g)

在95%置信水平下,取扩展因子 $k=2$,根据相应公式计算出3种成分不确定度分量。结果表明,用HPLC定量分析栀子药材中栀子苷、绿原酸和藏红花素I的方法满足现代药物分析方法学的要求。

耿庆安等^[13]也报道了HPLC法测定野葛中葛根素的不确定度分析。通过各个不确定度分量的具体计算,得出测量结果的置信置率与置信区间。另外,李慎安等^[14]在《测量不确定度的简化评定》著作中介绍了化学分析中许多具体实例,可供参考。

化学检测结果不确定度评定的合理与否,关键在于化学工作者对所评定检测项目方法原理的理解、检测技术的掌握

以及经验的积累和运用;其次是对不确定度评定方法的熟练掌握。只有进行了实际有效和规范的评定,这样的评定结果才是合理的。

2.3 药品检验:药品检验结果的质量往往会直接影响病人生命安全。有时,测量结果和由测量结果得出的结论还可能成为执法和决策的重要依据。因此,当报告测量结果时,必须对其质量给出定量的说明,以确定测量结果的可信程度。

在药品检验过程中,通常需要对检验结果是否符合相应标准规定做出判断。当检测结果向上(或向下)扩展不确定度半宽度($1/2U$)后,其结果仍在规定的限度之内,则符合规定要求(图2a, f);当向上(或向下)扩展不确定度半宽度后,其结果超出上限(下限),则不符合规定要求(图2e, j);但当检验结果恰好是标准要求的极限值(图2b, g),或者将检验结果向上(或向下)扩展不确定度半宽度,跨越了标准的极限值时(图2c, d或h, i),严格来说,应进行重试,且在做出是否符合标准规定时应充分考虑测量不确定度。

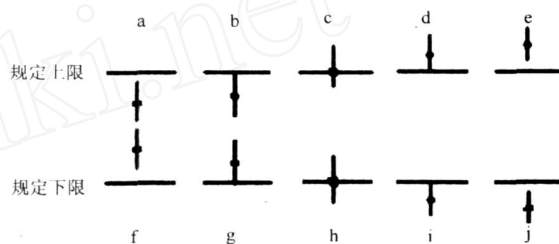


图2 测量不确定度与测量结果的关系

Fig. 2 Relationship between uncertainty and results

药品检验中测量不确定度的评定,重点在于对检测方法、原理的理解、检测技术的掌握,找到产生不确定度的影响因素,掌握不确定度评估的基本原则和评估方法,从简单的案例开始,逐渐过渡到复杂的计算,达到对药品检验工作中的测量不确定度能全面评估,在理解的基础上正确利用测量不确定度对检验结果进行适当的解释^[15]。

余伟鸣^[16]对尼群地平干燥失重的测量不确定度进行了分析。按照《中国药典》2000版(附录VIII)中关于干燥失重法的规定进行试验,分别计算电子天平的不确定度、称量供试品所需天平的不确定度、合成不确定度、扩展不确定度,说明了不确定度在药品检验中的具体应用。

2.4 临床检验^[17]:临床检验的主要任务就是对人体标本的各种特性进行赋值。所赋的值,其准确性、可靠性以及分散性都会直接影响到疾病的诊断、治疗方案确定以及疗效的观察。因此,ISO 15189《医学实验室质量和能力的专用要求》中明确要求:“必要且可能时,实验室应确定检验结果的不确定度”。ISO 15193《体外诊断医疗器械生物源性样品中量的测量参考测量程度的说明》中也明确规定:“应该注明所有分析性能特征的值及其测量不确定度”。ISO 15194《体外诊断医疗器械生物源性样品中量的测量参考物质的说明》中也要求在参考物质的特定特征中应该对测量不确定度进行表述。IFCC公布的酶的参考方法中也采用了不确定度。

临床检验是药物研究应用中较为复杂的一个环节,是分

析领域中复杂程度最高、影响因素最多的一种测量。估计测定的总不确定度时,需考虑分析过程和各种影响因素对总不确定度的贡献。包括分析前因素、采样和运输、加入保护剂、离心、基质效应和样本的稀释等。多数情况下,通过适当的措施,可将分析前的复杂因素对总不确定度的影响降到最大分量的三分之一。

在临床检验中开展的实验室室内质控工作要达到的目的是使整个临床标本的测量工作处于统计控制的状态下,因而所得出的分散性就可以代表临床标本在统计控制状态下的分散性。由于室内质控品的测量工作可以得到大量数据,计算标准差(s)和变异系数(CV),从而可以真实反映测量数据的分散性。评估不确定度具体方法如下:标准不确定度即为室内质控品测量所得出的 s ,即 $\mu_A = s$;相对标准不确定度即为室内质控品测量所得出的变异系数(CV),即 $\mu_{Arel} = CV\%$;扩展不确定度,当包含因子 k 取2时, $U = 2s$;相对扩展不确定度,当包含因子 k 取2时, $\mu_{Arel} = 2CV\%$ 。

此法只适用于能开展室内质控的定量测定方法,不适于手工的形态学以及定性检验的方法。

其他一些重要信息如实验数据、文献和厂家的信息、国际或国家参考物质、室间质量评价计划以及有经验分析人员的判断有助于定量地确定不确定度分量^[18]。

3 结语

测量不确定度是现代误差理论的重要内容,经过多年的发展,测量不确定度方法已日臻完善,其应用前景非常广阔,在各个研究领域都将显现出存在的必要性。

参考文献

- [1] 国家质量技术监督局计量司. 测量不确定度评定与表示指南[S]. 2001.
- [2] *Guidelines for Evaluating and Expressing the Uncertainty of NIST Measurement results* [S]. 1993.
- [3] Eurachem/Cital Guide, *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement* [S]. 2000.
- [4] 尚得军, 王军. 测量不确定度的研究和应用进展[J]. 理化检验-化学分册, 2004, 40(10): 623-627.
- [5] 中国实验室国家认可委员会. 中国实验室注册评审员培训课程[M]. 中国计量出版社, 1999.
- [6] 中国实验室国家认可委员会编. 实验室认可与管理基础知识[M]. 北京: 中国计量出版社, 2003.
- [7] 孙世武. 测量不确定度的评定与检测实验室认可的有关要求[J]. 化工标准·计量·质量, 2005(12): 18-20.
- [8] 郑江, 曹志军. 化学分析中测量不确定度的一般评定方法[J]. 现代测量与实验室管理, 2002(6): 33-39.
- [9] 李箐. 气相色谱仪检测器的灵敏度和检测限测量结果不确定度的评定[J]. 化学分析测量, 2004, 13(6): 26-28.
- [10] 马琳, 石新生. 实验室内部质量控制方法的探析[J]. 河南师范大学学报, 2002, 8(30): 65-67.
- [11] 王洁, 葛燕. 对化学检测实验室测量结果不确定的探讨[J]. 现代测量与实验室管理, 2003(3): 26-28.
- [12] 胡震, 王义明, 罗国安, 等. 栀子药材中三种有效成分HPLC定量分析结果不确定度的评定[J]. 中药材, 2005, 11(28): 991-993.
- [13] 耿庆光, 宇建华, 林英旭, 等. HPLC法测定野葛中葛根素含量的不确定度分析[J]. 西北药学杂志, 2004, 2(19): 9-11.
- [14] 李慎安. 测量不确定度的简化评定[M]. 北京: 中国计量出版社, 2004.
- [15] 张河战. 测量不确定度及其在药品检验中的应用简介[J]. 中国药师, 2004, 7(12): 969-971.
- [16] 余伟鸣. 药品检验中测量不确定度的评定[J]. 中国新药杂志, 2003, 12(9): 775.
- [17] 张雯艳, 孙庆霞, 丁家华. 测量不确定度及其在临床检验中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 7(29): 590-592.
- [18] 王治国, 王薇, 李小鹏. 测量不确定度及其在临床检验中应用[J]. 中国卫生统计, 2005, 4(22): 85-86.

牛蒡子苷及牛蒡子苷元的药理作用研究进展

王 璐^{1,2}, 赵 烽^{1*}, 刘 珂^{1,2}

(1. 烟台大学药学院, 山东 烟台 264005; 2. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 沈阳 110032)

摘 要: 牛蒡子苷及牛蒡子苷元是从牛蒡子中提取的主要活性成分, 具有广泛的药理作用。牛蒡子苷及其苷元具有抗肿瘤和神经保护等活性; 牛蒡子苷元还具有较强的抗炎及免疫调节活性、抗病毒活性以及对热休克反应的抑制活性。综述近10年来国内外学者对牛蒡子苷及其苷元药理活性的研究概况。

关键词: 牛蒡子苷; 牛蒡子苷元; 抗炎及免疫调节活性

中图分类号: R 282.71

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)03-0467-04

Advances in studies on pharmacological effect of arctiin and arctigenin

WANG Lu^{1,2}, ZHAO Feng¹, LIU Ke^{1,2}

(1. School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005, China; 2. School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China)

Key words: arctiin; arctigenin; anti-inflammation and immunomodulation activity

* 收稿日期: 2007-08-07

作者简介: 王 璐(1982—), 女, 山东省泰安市人, 在读硕士研究生, 主要专业方向为分子药理学。E-mail: lulucc@163.com
Tel: 13964571792

* 通讯作者 赵 烽 Tel: (0535)6706921 Fax: (0535)6706066 E-mail: zhaofeng@ytu.edu.cn