مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۹، دوره ۶۵، شماره ۳، ۱۹۱-۱۸۵

همسنگ زیستی دو نوع بلوس کلوزانتل تولید شده با مواد اولیه مختلف در گوسفند

حسینعلی عرب[1*] مریم جاهدی نیا[2] علی رسولی[1] غلامرضا شمس[1]

۱) بخش فارماکولوژی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران - ایران.

۲) دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران - ایران.

(دریافت مقاله: ۲۰ مرداد ۱۳۸۷ ، پذیرش نهایی: ۳ اسفند ۱۳۸۸)

چکیده

مطالعات همسنگ زیستی (بیواکووالانسی)، روش علمی مطمئن برای ارزیابی کیفیت داروهای ژنریک وبررسی خصوصیات فارماکوکینتیکی آنها در مقایسه با داروهای مرجع می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی همسنگ زیستی دو نوع بلوس کلوزانتل ساخته‌شده توسط یکی از شرکت‌های داخلی با مواد اولیه از دو منبع مختلف بوده است. تعداد ۳۰ رأس گوسفند به دوگروه ۱۵ تایی تقسیم‌شدند و به علت طولانی بودن نیمه عمر دارو، مطالعه به روش موازی انجام‌شد. درگروه اول (گروه آزمون) به هرگوسفند یک بلوس ۵۰۰ میلی‌گرمی کلوزانتل با مواد اولیه یک‌شرکت اسپانیایی ودرگروه دوم (گروه مرجع)، به همان میزان داروی گروه آزمون، داروی کلوزانتل با منشأ سازنده اصلی (یانسن بلژیک) به‌گوسفندان خورانده‌شد. از تمامی گوسفندان در زمان‌های ۰، ۴، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۰، ۲۴، ۳۲، ۴۸ و ۷۲ساعت پس از تجویز دارو خونگیری از ورید وداج به عمل‌آمد. میزان کلوزانتل موجود درسرم گوسفندان توسط‌سیستم HPLC اندازه‌گیری گردید. پس از تعیین نمودارهای غلظت خونی برای هر گوسفند، میانگین غلظت خونی هر مرحله خونگیری و شاخص‌های فارماکوکنیتیکی مختلف‌شامل C_{max} (حداکثر غلظت خونی)، T_{max} (زمان رسیدن به حداکثر غلظت خونی)، AUC (سطح زیر منحنی)، $t_{1/2}$ (نیمه عمر) و K_{el} (ثابت حذف) برای هر دارو محاسبه‌گردید. برای تعیین همسنگ زیستی دودارو، از مقایسه AUC، C_{max} و T_{max} وآزمون فاصله اطمینان استفاده‌شد. همچنین مقایسه این پارامترها باآزمون t-student نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین‌شاخص‌های فارماکوکینتیکی دودارو وجود ندارد و این‌شاخص‌ها در فاصله اطمینان ۱۲۰-۸۰ قرار داشتند. با توجه به این‌که بین پارامترهای فارماکوکینتیک گروه آزمون ومرجع از نظرآماری اختلاف معنی‌داری وجود نداشت وپارامترهای مورد نظر در فاصله اطمینان قابل قبول از نظر مراجع بین‌المللی قرار داشتند، می‌توان ادعا کرد که دوداروی کلوزانتل تهیه‌شده با مواد اولیه از دو منبع مختلف، با یکدیگر زیست همسنگ هستند.

واژه‌های کلیدی: همسنگ زیستی (بیواکووالانسی)، فارماکوکینتیک، کلوزانتل، گوسفند.

مقدمه

تعیین زیست فراهمی (Bioavailability) یک روش‌های علمی مطمئن برای ارزیابی کارآیی یک دارو است که با محاسبهٔ شاخص‌های فارماکوکینتیکی از جمله AUC, T_{max}, C_{max} و نیمه عمر دارو صورت می‌گیرد (۱۱). لیکن به روش علمی که در آن برای ارزیابی کیفی، زیست فراهمی یک دارو با داروی مرجع مقایسه می‌شود، همسنگی زیستی یا زیست هم ارزی (Bioequivalence) گفته می‌شود. اگر شاخص‌های مورد محاسبه فوق و در نتیجه فراهمی زیستی دو دارو، دارای اختلاف مختصر و قابل قبولی باشند، داروی آزمون با داروی مرجع دارای همسنگ زیستی بوده و در نتیجه کارایی درمانی یکسانی با آن خواهد داشت. براساس اعلام اداره نظارت بر مواد غذایی و داروی آمریکا (FDA) در اغلب موارد تفاوت‌های کمتر از ۲۰درصد فرآورده‌ها در فاکتورهایی مانند C_{max} (حداکثر غلظت پلاسمایی) و AUC (سطح زیر منحنی)، تفاوت بالینی قابل ملاحظه‌ای در بیماران ایجاد نمی‌کند و هنگامی‌که دو دارو کاملاً زیست هم ارز باشند، منحنی پلاسمایی غلظت- زمان ویا منحنی دفع ادراری آنها نیز همسان خواهد بود (۲،۴).

در انجام مطالعات همسنگی زیست، بررسی باید در یک جمعیت همگن صورت گیرد، به این مفهوم که همگی سالم بوده و از نظر سن، شرایط محیطی، جیره غذایی و میزان تولید در یک حد باشند. همچنین تعداد دام‌های مورد مطالعه باید به حدی باشد که برآورد آماری بر روی کل جمعیت قابل انجام و از نظر آماری قابل تعمیم به کل جمعیت دام‌ها باشد. نحوه انجام مطالعه می‌تواند معمولاً به دو صورت متقاطع و موازی باشد. لیکن در مواردی چون القاء آنزیمی یا تغییرات فیزیولوژیکی که توسط دارو در بدن ممکن است بوجود آید، نیمه عمر بسیار طولانی دارو و یا جذب تاخیری یا طولانی مدت دارو، به جای مطالعه متقاطع از مطالعه موازی استفاده می‌شود (۲،۴). تعداد کل نمونه‌های مورد نیاز برای بررسی سطح خونی دارو، بستگی به اهمیت متغیرهایی دارد که با داده‌های همسنگی زیستی در ارتباط هستند. از جمله این متغیرها می‌توان پارامترهای فارماکوکینتیک را نام برد. زمان‌های نمونه‌برداری نیز باید به گونه‌ای باشند که امکان تشخیص دقیق حداکثر غلظت پلاسمایی و زمان رسیدن به این حداکثر را فراهم آورند و مقدار محاسبه شده برای $AUC_{(0-T)}$ تا ۸۰ درصد میزان محاسبه شده برای $AUC_{(0-\omega)}$ را پوشش دهد (۷).

کلوزانتل دارویی است ضد انگل و از مشتقات سالیسیلانیلیدها که دارای طیف وسیع اثر ضد انگلی بر علیه ترماتودها، برخی نماتودها و تعدادی از بند پایان است. این دارو با جلوگیری از عمل فسفریلاسیون

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۱۱۱۷۰۸۶-۰۲۱ نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ Email: harab@ut.ac.ir

اکسیداتیو درمیتوکندری، مانع سنتز آدنوزین تری فسفات (ATP) می‌شود که این عمل موجب اختلال در متابولیسم و در نهایت مرگ انگل می‌شود. این دارو دارای اتصال پروتئینی بالایی (حدود ۹۸درصد با آلبومین خون) است و در نتیجه به طور عمده در خون وجود دارد. از این رو، بیشتر بر انگل‌های خون خوار موثر است. حداکثر غلظت خونی دارو بین ۲۴ تا ۴۸ ساعت پس از تجویز مشاهده می‌شود و دارای نیمه عمری در حدود ۲ هفته است. دارو بیشتر به صورت متابولیزه نشده و از طریق صفرا دفع می‌شود. مهم‌ترین مسیر متابولیزم کلوزانتل، واکنش احیاء است. کلوزانتل تقریباً به طور انحصاری درخون توزیع می‌شود. و میزان آن در بافت‌ها، ۱۵ برابر کمتر از غلظت پلاسمایی دارو است (۱،۳). در مطالعه‌ای که توسط Michiels و همکاران در سال ۱۹۸۷ انجام شد، مشخص شده است که حدود ۹۰ درصد کلوزانتل بصورت تغییر نیافته دفع می‌شود و متابولیت‌های اصلی آن شامل دو نوع یدو کلوزانتل بوده است. لیکن، میزان متابولیت ۳ ـ مونویدوکلوزانتل بیشتر از ۵ ـ مونو یدوکلوزانتل در مدفوع بوده است و تنها ۰/۵درصد کلوزانتل تجویز شده از ادرار دفع شده بود (۵،۸).

در مطالعه‌ای دیگر که توسط Mohammed-Ali و Bogan در سال ۱۹۸۷ انجام شد، خصوصیات فارماکوکینتیک و کارایی سالیسیلانیلیدها (رافوکسانایدِ، کلوزانتل و اکسی کلوزانید) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که هر سه دارو تا ۹۹درصد به پروتئین‌های پلاسما متصل می‌شوند و میانگین نیمه عمر کلوزانتل نیز ۱۴/۵ روز برآورد شد (۹). مطالعات فارماکوکینتیکی همچنین نشان داده است که توزیع و حذف کلوزانتل در بدن دارای دو فاز آلفا و بتا است. نیمه عمر فاز آلفا کمتر از ۳۰ دقیقه، نیمه عمر بتا ۴-۱۷روز، حجم پخش کمتر از ۰/۱۵ لیتر بر کیلوگرم و پاکسازی به کمتر از ۰/۱۵ میلی لیتر در دقیقه بر کیلوگرم بوده است. در طول ۲۴ ساعت پس از تجویز دارو، میانگین غلظت کلوزانتل در بزاق ۰/۰۰۴/۰۰۵ میکروگرم بر میلی لیتر بدست آمد (۱۳). حضور کلوزانتل در شیر نیز ردیابی و میزان آن با کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی و ردیاب فلورسانس اندازه‌گیری شد (۱۰).

Maes و همکاران در سال ۱۹۸۸ تأثیر ضد انگلی کلوزانتل علیه فاسیولاهپاتیکای بالغ و نابالغ را در گوسفند و موش رت مورد بررسی قراردادند. در این مطالعه تأثیر غلظت حداکثر و غلظت‌های ثابت باقیمانده ثابت کلوزانتل در عملکرد ضد انگلی آن ارزیابی و مشخص شد که اثر ضدانگلی کلوزانتل علیه فاسیولا بیشتر به حداکثر غلظت پلاسمایی وابسته است و ارتباط کمتری به غلظت‌های باقیمانده دارو دارد و در ضمن با افزایش سن لاروهای کبدی اثر دارو نیز افزایش می‌یابد (۶).

در خصوص همسنگ زیستی فرمولاسیون‌های مختلف کلوزانتل مطالعات اندکی وجود دارد. از طرفی، تازگی، دو نوع بولوس کلوزانتل با ماده اولیه از دو منشاء متفاوت توسط یک شرکت داروسازی داخلی برای مصرف ضد انگلی درگوسفند، فرموله و به بازار عرضه شده است. لذا هدف از اجرای این مطالعه بررسی همسنگ زیستی و تعیین خصوصیات فارماکوکینتیک این دو دارو شامل کلوزانتل با مواد اولیه از شرکت منادیونا ـ اسپانیا به‌عنوان داروی آزمون و کلوزانتل با مواد اولیه از شرکت یانسن ـ بلژیک به‌عنوان داروی مرجع است.

مواد و روش کار

حیوانات و شرایط نگهداری آنها

تعداد۳۰ راس گوسفند ماده داشتی که دارای سن ۲-۴ سال، وزن ۴۰-۵۰ کیلوگرم و از نژاد شال بودند، از گله‌ای بزرگ انتخاب و برای مطالعه از بقیه جدا شدند. جیره غذایی گوسفندان که شامل علوفه و کنسانتره بوده است در طول طرح ثابت بود و تمامی گوسفندان از نظر شرایط نگهداری، نور، حرارت و بهداشتی در شرایط مشابه و استاندارد قرار داشتند.

گروه‌های آزمایشی

پس از انجام معاینات و تایید سلامتی حیوانات از نظر بالینی، گوسفندان به طور تصادفی به دو گروه ۱۵ تایی تقسیم شدند. در گروه اوّل (گروه آزمون)، به هر گوسفند یک بلوس ۵۰۰ میلی‌گرمی کلوزانتل (هپاتک) ساخت شرکت داروسازی رازک با ماده اوّلیه شرکت منادیونا اسپانیا خورانده شد. داروی استفاده شده در این گروه، داروی آزمون نامیده شد. در گروه دوّم (گروه مرجع)، به هر گوسفند یک بلوس ۵۰۰ میلی‌گرمی کلوزانتل (هپاتک) ساخت شرکت داروسازی رازک باماده اولیه شرکت داروسازی یانسن بلژیک، خورانده شد. چون فرآورده حاصل از ماده اولیه شرکت بلژیکی قبلا" با فرآورده اصلی شرکت یانسن بلژیک مورد مطالعه بیواکووالانسی قرار گرفته بود، ترکیب ساخته شده با ماده اولیه این شرکت بر اساس موافقت سازمان دامپزشکی کشور، به‌عنوان داروی مرجع بکار گرفته شد.

خون‌گیری

از تمامی گوسفندان دو گروه در زمان ۰، ۴، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۰، ۲۴، ۳۲، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تجویز دارو خون‌گیری انجام شد. خون‌گیری از سیاهرگ وداج و توسط سرنگ و نوجکت (ساخت شرکت پارس خاور) صورت گرفت و به لوله‌های آزمایش که حاوی محلول هپارین بودند، منتقل شدند. نمونه‌ها با دستگاه سانتریفوژ (Hettich mini centrifuge) با ۲۵۰۰ دور در دقیقه به مدت زمان ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس مایع رویی (پلاسما) جدا شده و نمونه‌ها تا زمان استخراج نهایی در فریزر ۷۰ـ درجه سانتیگراد قرار گرفتند.

سنجش غلظت دارو در نمونه‌های پلاسما

استخراج کلوزانتل از نمونه‌ها: ابتدا نمونه‌ها از فریزر ۸۰- خارج شدند و پس از هم دما شدن با محیط، مقدار ۱سی‌سی توسط سمپلر اتوماتیک (Eppendorf) در یک لوله آزمایش جدید تخلیه شد. سپس هم حجم پلاسما از محلول A که از محلول آب نمک اشباع و اسید استیک ۰/۲درصد تهیه شده بود، به لوله اضافه شد. پس از مخلوط کردن پلاسما و محلول A،

مقدار ۱۰ سی‌سی استونیتریل به لوله آزمایش افزوده شد و محلول حاصل به‌مدت ۵ دقیقه توسط ورتکس به خوبی مخلوط شد. برای اطمینان کامل از مخلوط شدن، لوله آزمایش به مدت ۱۰ دقیقه در معرض امواج فراصوت در دستگاه حمام اولتراسونیک (sonic 505Power) نیز قرار گرفت. مخلوط حاصل توسط سانتریفیوژ با دور ۲۵۰۰ در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس محلول شفاف رویی جدا و به لوله آزمایش دیگری منتقل شد. به رسوب باقیمانده دوباره، ۱۰ سی‌سی استونیتریل اضافه گردید و عملیات بالا که شامل ورتکس، سانتریفیوژ و تخلیهٔ مایع رویی بود تکرار شد. محلول‌های شفاف رویی با هم مخلوط شده و به کمک دستگاه تبخیرگر دوّار (Heidolf 2) در دمای ۴۰ درجهٔ سانتیگراد، با دور گردش ۱۵۰ دور در دقیقه و تحت خلأ که به وسیلهٔ پمپ خلأ (مدل Waters) ایجاد شده بود، به حجم ۲ سی‌سی رسانده شد. سپس نمونه‌ها در دمای ۴۰ درجهٔ سانتیگراد و با حضور جریان گاز نیتروژن خشک شدند. به لوله‌های حاوی نمونهٔ خشک شده، یک میلی‌لیتر استونیتریل اضافه شد و توسط دستگاه ورتکس میکسر و حمام اولتراسونیک هر کدام به مدت ۲ دقیقه مخلوط گردید. به‌منظور پاکسازی بیشتر نمونه، از سیستم کارتریج C18 با اندازه ۵۰۰ میلی‌گرمی (شرکت Resprep) استفاده شد. کارتریج با ۵ سی‌سی متانول و ۲ سی‌سی استونیتریل آماده شد و نمونه‌ها توسط پمپ خلأ (Fastvac) از کارتریج عبور داده شدند. برای شستشوی کامل بقایای ماده دارویی از کارتریج پس از عبور هر نمونه، کارتریج با ۵ میلی‌لیتر استونیتریل شستشو داده شد و با نمونه مخلوط شد. پس از رساندن حجم به میزان ۲ میلی‌لیتر توسط سیستم تبخیر گر دوار، نمونه مجدداً با گاز نیتروژن و در دمای ۴۰ درجهٔ سانتیگراد خشک شد و تا هنگام تزریق به سیستم HPLC در فریزر ۷۰- نگهداری شد.

اندازه‌گیری کلوزانتل توسط سیستم HPLC

برای اندازه‌گیری میزان کلوزانتل موجود در نمونه‌های پلاسما از سامانه HPLC و روش ارائه شده توسط Stove در سال ۱۹۹۸ استفاده گردید (۱۱). به‌طور خلاصه، نمونه‌ها با یک میلی‌لیتر استونیتریل مخلوط گردیدند. پس از عبور هر نمونه از صافی، میزان ۵۰ میکرولیتر از آنها توسط سمپلر اتوماتیک Triatlon (شرکت Spark هلند) به دستگاه HPLC تزریق شد. سامانه مورد استفاده در این مطالعه شامل فاز متحرک استونیتریل و بافر فسفات پتاسیم ۱۰mM (pH=۲/۵) به نسبت ۲۰ درصد - ۸۰ درصد با جریان 1.0 ml/min، ستون C18، پمپ HPLC و ردیاب فلورسانس با طول موج تحریک (Excitation) 335 nm و طول موج انتشار (Emission) 510 nm بوده است. غلظت‌های مختلف ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از رفرانس استاندارد (RS) کلوزانتل (تهیه شده از شرکت یانسن بلژیک) در نمونه پلاسمای فاقد کلوزانتل اضافه (Spiked) گردید و همزمان با نمونه‌های واقعی استخراج و به دستگاه HPLC تزریق شد. هر کدام از غلظت‌ها با سه بار تکرار مورد استفاده قرار گرفت و نتایج حاصل از کروماتوگرافی نمونه‌های رفرانس استاندارد در مقابل غلظت، جهت رسم منحنی استاندارد بکار رفت. با به دست آوردن مساحت زیر منحنی دارو از هر نمونه و مقایسه آن با سطح زیر منحنی غلظت‌های رفرانس استاندارد کلوزانتل (Calibration curve)، میزان کلوزانتل موجود در هر میلی‌لیتر پلاسما بر حسب میکروگرم در میلی‌لیتر نمونه‌های پلاسما مشخص گردید.

محاسبه پارامترهای فارماکوکینتیکی و آنالیز آماری

با مقایسه سطح زیر منحنی بدست آمده از آنالیز HPLC از نمونه‌های حاوی کلوزانتل استاندارد، میزان کلوزانتل موجود در نمونه‌های خونی بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید. پس از به‌دست آمدن غلظت خونی کلوزانتل در نمونه‌های مربوط به هر گوسفند، نمودار غلظت-زمان برای هر گوسفند به طور جداگانه و همچنین به‌صورت میانگین داده‌ها برای داروی آزمون (کلوزانتل با مواد اولیه شرکت منادیونا اسپانیا) و داروی مرجع (کلوزانتل با مواد اولیه شرکت یانسن بلژیک) رسم شد. سپس سطح زیر منحنی (AUC) در فاصله زمان‌های صفر تا ۷۲ ساعت و صفر تا بی نهایت به‌دست تعیین شد و پس از آن، نسبت داده‌های سطح زیر منحنی گروه آزمون به مرجع (F Relative) محاسبه گردید. برای مجموعه داده‌ها، میانگین و انحراف معیار نیز محاسبه شد. در نهایت برای تعیین همسنگ زیستی دو دارو آنالیز داده‌های فارماکوکینتیک توسط روش‌های آماری انجام شد. با محاسبه میانگین و انحراف معیار فراهمی زیستی (F) و تبدیل آن به درصد، وضعیت کلی داده‌های گروه آزمون نسبت به مرجع تعیین گردید و میزان P.Value نیز برای پارامترهای فارماکوکینتیکی محاسبه گردید. با توجه به نمودارهای بدست آمده و استفاده از برنامه نرم افزار کامپیوتری kinetics Drug (۱۲)، شاخص‌های فارماکوکینتیکی شامل C_{max}، T_{max}، Kel و (T½) برای هر دارو محاسبه شد. مقدار C_{max} و T_{max} کلوزانتل پلاسمای هر گوسفند از منحنی غلظت پلاسمایی تعیین گردید. محاسبه $AUC_{(0\ 72)}$ به روش ذوزنقه (rule Trapezoidal) که بر اساس آن با محاسبه مساحت‌های ذوزنقه‌های حاصل از طول زمان (قاعده) و غلظت پلاسمایی دارو (ارتفاع) سطح زیر منحنی ۰-۷۲ ساعت، با استفاده از رابطه زیر بدست آمد.

رابطه (۱):

$$AUC_{(0-t)} = \sum_{i=0}^{n-1} \frac{t_{i+1} - t_i}{2}(C_i + C_{i+1})$$

سپس مقدار سطح زیر منحنی صفر تا بی نهایت ($AUC_{(0-\omega)}$) نیز با استفاده از رابطه (۲) محاسبه گردید.

رابطه (۲): $AUC_{(0-\omega)} = AUC_{(0-72)} + C_{72} / Ke$

مقدار K_{el} یا ثابت حذف دارو نیز با استفاده از شیب منحنی در مرحله حذف تعیین شد. در محاسبه نیمه عمر یا ($t_{1/2}$) از رابطه (۳) استفاده شد.

رابطه (۳): $T½ = 0.693/ K_{el}$

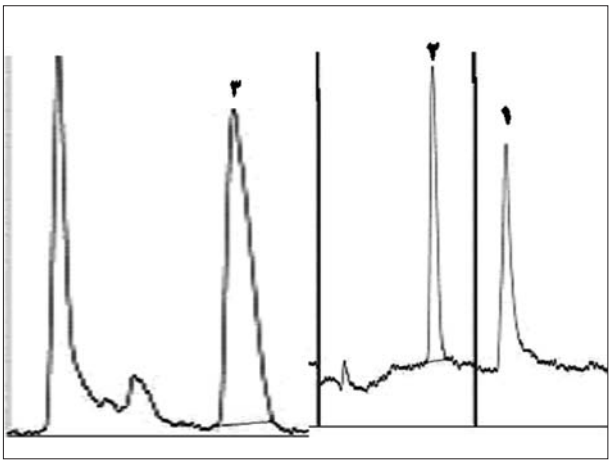
پس از محاسبه پارامترهای مذکور، و استفاده از نرم افزار 2003 Excell و توسط آزمون t و فاصله اطمینان، تجزیه و تحلیل آماری و مقایسه

جدول۱ـ مقادیر مربوط به سه پارامتر اصلی فارماکوکینتیکی شامل AUC(0-72) ، Cmax و Tmax که برای هر حیوان بطور جداگانه به همراه میانگین و انحراف معیار آنها در گروه آزمون و مرجع و نسبت آزمون به مرجع (F) محاسبه شده است.

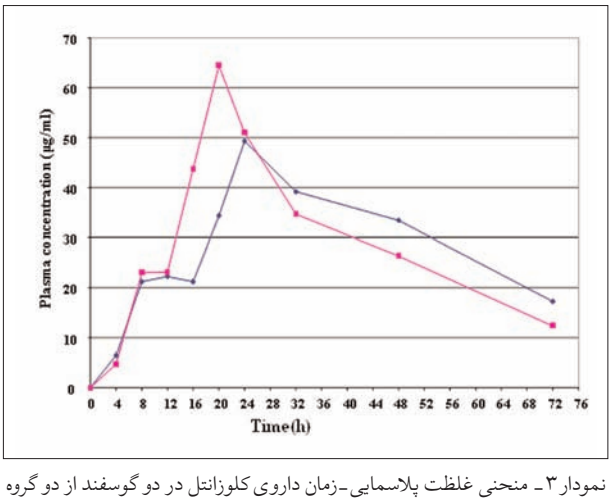
پارامترهای فارماکوکینتیک		$AUC_{(0-72)}$			C_{max}			T_{max}		
		مرجع	آزمون	نسبت	مرجع	آزمون	نسبت	مرجع	آزمون	نسبت
شماره گوسفندان	۱	۱۷۹۷.۷	۱۴۷۴.۵	۰.۸۲	۴۶.۷۰	۵۴.۳۳	۱.۱۶	۲۰.۰۰	۲۴.۰۰	۱.۲۰
	۲	۲۰۳۲.۳	۲۰۶۴.۵	۱.۰۲	۶۴.۳۹	۴۹.۳۲	۰.۷۷	۲۰.۰۰	۲۴.۰۰	۱.۲۰
	۳	۱۵۹۹.۴	۱۴۳۴.۹	۰.۹	۴۳.۸۸	۴۷.۳۳	۱.۰۸	۲۴.۰۰	۲۴.۰۰	۱.۰۰
	۴	۱۶۸۳.۵	۱۳۵۰.۹	۰.۸	۵۱.۲۵	۸۰.۵۸	۱.۵۷	۲۴.۰۰	۲۰.۰۰	۰.۸۳
	۵	۱۳۷۴.۳	۱۶۹۷.۹	۱.۲۴	۳۵.۵۴	۴۸.۷۳	۱.۳۷	۲۴.۰۰	۲۰.۰۰	۰.۸۳
	۶	۲۰۴۴.۲	۲۱۶۸.۹	۱.۰۶	۷۰.۲۶	۴۵.۰۰	۰.۶۴	۲۴.۰۰	۲۴.۰۰	۱.۰۰
	۷	۲۸۶۹.۱	۱۹۳۲.۹	۰.۶۷	۸۱.۳۵	۴۳.۴۹	۰.۵۳	۲۰.۰۰	۲۴.۰۰	۱.۲۰
	۸	۲۱۱۹.۱	۲۰۳۸.۹	۰.۹۶	۵۲.۵۴	۶۱.۶۰	۱.۱۷	۲۴.۰۰	۲۴.۰۰	۱.۰۰
	۹	۲۲۰۳.۴	۲۹۵۳.۹	۱.۳۴	۴۹.۰۳	۳۷.۳۹	۰.۷۶	۲۴.۰۰	۲۴.۰۰	۱.۰۰
	۱۰	۲۲۷۲.۵	۱۶۶۹.۹	۰.۷۴	۵۶.۷۷	۴۷.۳۳	۰.۸۳	۲۴.۰۰	۳۲.۰۰	۱.۳۳
	۱۱	۲۹۲۹.۱	۱۷۸۱.۹	۰.۶۱	۸۱.۸۶	۵۹.۳۶	۰.۷۳	۲۴.۰۰	۲۴.۰۰	۱.۰۰
	۱۲	۲۱۲۸.۴	۱۴۲۱.۵	۰.۶۷	۷۲.۰۴	۵۴.۳۳	۰.۷۵	۲۴.۰۰	۲۰.۰۰	۰.۸۳
	۱۳	۱۹۳۲.۱	۱۶۲۵.۷	۰.۸۴	۵۰.۰۲	۵۰.۰۲	۱.۰۰	۲۴.۰۰	۲۴.۰۰	۱.۰۰
	۱۴	۱۹۸۴.۵	۱۹۶۷.۸	۰.۹۹	۴۵.۸۱	۵۴.۳۳	۱.۱۹	۲۴.۰۰	۲۴.۰۰	۱.۰۰
	۱۵	۱۷۶۶.۲	۱۳۵۱.۴	۰.۷۷	۴۴.۲۸	۳۸.۴۳	۰.۸۷	۲۰.۰۰	۲۴.۰۰	۱.۲۰
میانگین		۲۰۴۹.۱	۱۷۹۵.۱	۰.۹	۵۶.۳۸	۵۱.۴۴	۰.۹۶	۲۲.۹۳	۲۳.۷۳	۱.۰۳
انحراف معیار		۴۲۱.۲	۴۲۱.۲	۰.۲۱	۱۴.۲۸	۱۰.۵۵	۰.۲۹	۱.۸۳	۲.۸۱	۰.۱۵

جدول ۲ـ مقادیر مربوط به سه پارامتر دیگر فارماکوکینتیکی شامل AUC،0–∞، Kel و t1/2 که برای هر حیوان به طور جداگانه همراه میانگین و انحراف معیار آنها در گروه آزمون و مرجع و نسبت آزمون به مرجع (F) محاسبه شده است.

پارامترهای فارماکوکینتیک		$AUC_{(0-\omega)}$			K_{el}			$t_{1/2}$		
		مرجع	آزمون	نسبت	مرجع	آزمون	نسبت	مرجع	آزمون	نسبت
شماره گوسفندان	۱	۲۴۷۴.۶	۱۵۰۵.۷	۰.۶۱	۰.۰۲۱۸	۰.۰۷	۳.۲۱	۳۱.۸	۹.۸۹	۰.۳۱
	۲	۲۴۷۱.۶	۲۸۸۸.۹	۱.۲۰	۰.۰۲۸	۰.۰۲۰۹	۰.۷۵	۲۴.۶۹	۳۳.۰۴	۱.۳۴
	۳	۱۶۴۲.۵	۱۵۵۰.۱	۰.۹۴	۰.۰۶۳۵	۰.۰۴۳۴	۰.۶۸	۱۰.۹۱	۱۵.۹۷	۱.۴۶
	۴	۱۷۷۲.۶	۱۵۱۰.۶	۰.۸۵	۰.۰۵۳۷	۰.۰۳۳۲	۰.۶۲	۱۲.۹	۲۰.۸۲	۱.۶۱
	۵	۱۴۳۵	۱۷۹۱.۵	۱.۲۵	۰.۰۵۵۵	۰.۰۳۵۸	۰.۶۵	۱۲.۴۸	۱۹.۳۵	۱.۵۵
	۶	۲۶۲۰.۳	۲۶۴۸.۲	۱.۰۱	۰.۰۲۳۵	۰.۰۲۷۶	۱.۱۷	۲۹.۳۹	۲۵.۰۸	۰.۸۵
	۷	۳۸۸۱.۹	۲۱۳۰.۲	۰.۵۵	۰.۰۲۳۷	۰.۰۳۹۹	۱.۶۹	۲۹.۱۵	۱۷.۳۶	۰.۶
	۸	۲۳۷۸.۸	۲۴۸۲.۹	۱.۰۴	۰.۰۳۸۱	۰.۰۲۹۳	۰.۷۷	۱۸.۱۹	۲۳.۶۱	۱.۳
	۹	۲۸۸۵.۵	۴۶۲۹.۷	۱.۶۰	۰.۰۲۵۴	۰.۰۱۶۱	۰.۶۳	۲۷.۲۵	۴۲.۹۳	۱.۵۸
	۱۰	۲۷۵۹.۲	۱۹۳۹.۴	۰.۷۰	۰.۰۲۹۴	۰.۰۴۲۷	۱.۴۵	۲۳.۵	۱۶.۲۳	۰.۶۹
	۱۱	۳۳۴۹.۲	۱۹۱۲.۲	۰.۵۷	۰.۰۳۶۵	۰.۰۴۴۷	۱.۲۲	۱۸.۹۸	۱۵.۵	۰.۸۲
	۱۲	۲۷۶۴.۴	۱۶۷۴.۷	۰.۶۱	۰.۰۲۳۴	۰.۰۲۵۸	۱.۱	۲۹.۵۲	۲۶.۸۵	۰.۹
	۱۳	۲۷۴۵.۲	۱۸۰۱.۱	۰.۶۶	۰.۰۲۰۱	۰.۰۳۶۳	۱.۸۱	۳۴.۳۴	۱۹.۰۹	۰.۵۶
	۱۴	۲۷۲۱.۸	۲۴۶۱.۴	۰.۹	۰.۰۱۹۸	۰.۰۲۸۸	۱.۴۵	۳۴.۹۹	۲۴.۰۵	۰.۶۹
	۱۵	۲۴۵۶.۴	۱۶۳۹.۳	۰.۶۷	۰.۰۲	۰.۰۲۸۲	۱.۴۱	۳۴.۶۴	۲۴.۵۴	۰.۷۱
میانگین		۲۵۵۷.۳	۲۱۷۱.۱	۰.۸۸	۰.۰۳۲۱	۰.۰۳۴۸	۱.۲۴	۲۴.۸۵	۲۲.۲۹	۱
انحراف معیار		۶۲۱.۵	۸۰۹.۲	۰.۳	۰.۰۱۴۴	۰.۰۱۲۸	۰.۶۸	۸.۳۴	۸.۰۳	۰.۴۳



نمودار ۱ـ دو نمونه‌از کروماتوگرام‌های کلوزانتل که در آن، ۱= بلانک ،۲= استاندارد و ۳= سرم استخراج شده از خون یکی از گوسفندان تحت مطالعه را نشان می‌دهد.

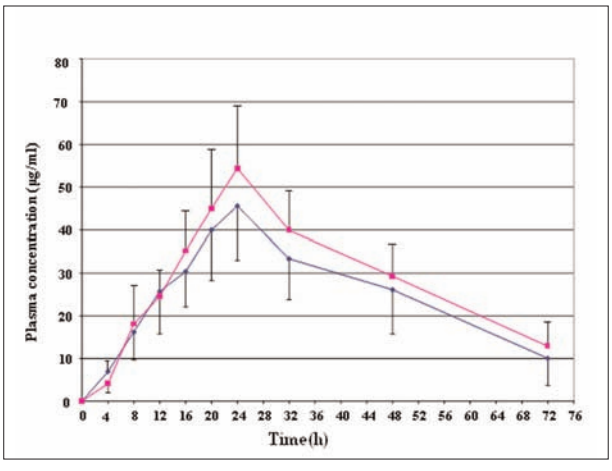


نمودار ۳ـ منحنی غلظت پلاسمایی ـ زمان داروی کلوزانتل در دو گوسفند از دو گروه آزمون و مرجع.

دو دارو با یکدیگرانجام شد. P.Value کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد و با اطمینان ۹۰درصد (α=۰/۰۵) حد بالایی و پایینی بدست آمد و در دامنه ۸۰ تا۱۲۰درصد، فاصله اختلاف دو دارو قابل قبول شناخته شد (۱۲).

نتایج

قبل از اندازه‌گیری غلظت کلوزانتل نمونه‌های پلاسما، آزمایشات مربوط به معتبرسازی روش اندازه‌گیری انجام شد. طبق نتایج بدست آمده حد تشخیص (LOD) و حد سنجش (LOQ) به ترتیب ۳ و۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد. همچنین پس از تزریق غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از کلوزانتل استاندارد به سیستم HPLC و رسم منحنی کالیبراسیون، میزان خطی بودن منحنی در حد قابل قبول (۰/۹۹۶) بود. تکرارپذیری و بازیافت روش آزمایش نیز در محدوده قابل قبول (۱۶± ۸۲ درصد) قرار داشت. در نمودار ۱ کروماتوگرام مربوط به نمونه‌های شاهد، استاندارد و استخراج شده از سرم گوسفند آورده شده



نمودار ۲ـ مقایسه منحنی غلظت پلاسمایی ـ زمان داروی کلوزانتل یک گوسفند گروه آزمون با یک گوسفند مرجع.

است. در جدول ۱ و ۲ داده‌های مربوط به شاخص‌های فارماکوکینتیکی محاسبه شده برای هر حیوان و همچنین میانگین و انحراف معیار آنها در گروه آزمون و مرجع و نسبت آنها (F) ارائه شده است. نتایج نهایی آنالیز پارامترهای فارماکوکینتیکی نیز در جدول ۳ آمده است. در نمودار ۲، منحنی غلظت پلاسمایی ـ زمان یکی از گوسفندان گروه آزمون با یکی از گوسفندان گروه مرجع مقایسه شده است. لیکن در نمودار ۳ منحنی میانگین غلظت پلاسمایی زمان تمامی گوسفندان گروه آزمون با تمامی گوسفندان گروه مرجع در زمان‌های مختلف خونگیری، مقایسه شده است. همان‌طوری‌که در این نمودار ملاحظه می‌شود، سطح زیر منحنی در دو گروه، تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهد، هم‌چنان‌که در مقایسه آماری، تفاوت معنی‌داری بین پارامترهای فارماکوکینتیکی کلوزانتل در دو گروه مشاهده نشد.

بحث

هدف اصلی این مطالعه تعیین همسنگ زیستی بلوس کلوزانتل (هپاتک) با مواد اولیهٔ شرکت منادیونای اسپانیا به‌عنوان داروی آزمون در مقایسه با بلوس کلوزانتل (هپاتک) با ماده اولیه شرکت یانسن بلژیک به‌عنوان داروی مرجع بود و هر دو داروی آزمون و مرجع از محصولات شرکت دارویی رازک هستند.

برای تعیین همسنگ زیستی، سه شاخص فارماکوکینتکی مختلف شامل سطح زیر منحنی $AUC_{(0-72)}$، غلظت حداکثر C_{max} و زمان رسیدن به غلظت حداکثر (T_{max}) برای هر دو داروی آزمون و مرجع اندازه‌گیری و نسبت بین آنها محاسبه شد. همچنین دو داروی تحت مطالعه توسط دو آزمون t و فاصله اطمینان مقایسه شدند.

طبق نتایج جدول ۱ میانگین C_{max} در گروه مرجع ۱۴/۲۸ ۵۶/۳۸ و در گروه آزمون ۱۰/۵۵ ۵۱/۴۴ میکروگرم در میلی‌لیتر بود که نشان می‌دهد غلظت حداکثر داروی آزمون و مرجع دارای اختلاف بسیار کمی است. این

جدول ۳ ـ نتایج نهایی حاصل از آنالیز پارامترهای فارماکوکینتیکی و مقایسه آنها در دو گروه آزمون و مرجع.

پارامترهای فارماکوکینتیک	P value	نسبت سطح زیر منحنی (F)	فاصله اطمینان 90%
AUC (0-72h)	۰.۱۱	۰.۹	۸۰-۱۰۰
C_{max}	۰.۲۹	۸۲-۱۱۰	۰.۹۶
T_{max}	۰.۳۶	۱.۰۳	۹۵-۱۱۱
AUC(0-ω)	۰.۱۵	۰.۸۸	۷۵-۱۰۱
K_{el}	۰.۱۵	۱.۲۴	۹۵-۱۵۳
$t_{1/2}$	۰.۴	۱	۸۲-۱۱۸

موضوع در نمودار ۲ و ۳ که مقایسه منحنی غلظت ـ پلاسما را در یک گوسفند از هر گروه و همچنین میانگین تمامی گوسفندان دو گروه را نشان می‌دهد. به وضوح به نمایش گذاشته شده است. در ضمن مقادیر C_{max} بدست آمده در این مطالعه با نتایج دیگر محققان از جمله Michiels و همکاران در سال ۱۹۷۷ (۸) نیز هم‌خوانی دارد. در مطالعه‌ای که به تازگی به‌منظور تعیین زیست همسنگی سوسپانسیون کلوزانتل در گوسفند انجام شد، میانگین C_{max} در گروه مرجع که سوسپانسیون ساخت شرکت یانسن را دریافت کرده بودند به میزان ۱۳/۰۲ / ۷۱/۷۰ میکرو گرم در میلی‌لیتر و در گروه آزمون که سوسپانسیون ساخت شرکت رازک (با ماده اولیه از یک شرکت اسپانیایی) را دریافت نمودند، ۶۲/۲۱۷/۷۴ گزارش شده است (۱۲). هر چند بین نتایج بدست آمده در مطالعه سوسپانسیون با نتایج مطالعه حاضر اختلاف فاحشی مشاهده نمی‌شود، لیکن میزان ارقام بدست آمده در سوسپانسیون بیشتر از بلوس می‌باشد. این موضوع می‌تواند احتمالاً به‌علت اختلاف در فرمولاسیون دو دارو و جذب بالاتر سوسپانسیون نسبت به بلوس باشد.

میانگین T_{max} در گروه مرجع ۲/۸ / ۲۲/۹۳ و در گروه آزمون ۱/۸۳ ۲۳/۷۳ ساعت بود. همان‌طور که مشاهده می‌شود در مورد این فاکتور هم داروی آزمون و مرجع زیست همسنگ هستند. مقادیری که برای T_{max} بدست آمد با مقادیر ذکر شده در مطالعات قبلی توسط Michiels و همکاران در سال ۱۹۸۷ هم‌خوانی دارد (۸). در مورد سومین فاکتور اندازه‌گیری شده در این مطالعه یعنی $AUC_{(0-72)}$، میانگین در گروه مرجع ۲۰۴۹/۱۴۲۱/۲ و در گروه آزمون، ۱۷۹۵/۱۴۲۱/۲ بدست آمد که از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با هم ندارند و رفتار فارماکوکینتیکی دو دارو از این نظر نیز مشابه است.

پس از بررسی مقادیر C_{max}، T_{max} و $AUC_{(0-72)}$ در داروی آزمون و مرجع توسط آزمون t-student تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. مقادیر P.value و حدود بالایی و پایینی با فاصله اطمینان ۹۰درصد در جدول ۳ حاکی از مشابهت نتایج گروه آزمون و مرجع می‌باشد.

با توجه به جدول ۲، میانگین K_{el} در گروه مرجع ۰/۰۳۲۱۰/۰۱۴۴ و در گروه آزمون ۰/۰۳۴۸ ۰/۰۱۲۸ بدست آمد که پس از مقایسه آماری دارای اختلاف معنی‌دار بودند ($p<0/05$). در مطالعه Ghezelloo در سال ۱۳۸۵ این مقدار در گروه مرجع ۰/۰۱۶۵ ۰/۰۰۷۹۵ و در گروه آزمون، ۰/۰۰۳۴۱ ۰/۰۰۶۷۶ بوده است (۱). مقدار K_{el} در این مطالعه تفاوت زیادی با مقدار K_{el} بدست آمده Ghezelloo به خصوص در گروه آزمون، دارد. این تفاوت نشان دهنده حذف سریع‌تر دارو از گردش خون در این مطالعه نسبت به مطالعه فوق می‌باشد که از سوسپانسیون کلوزانتل استفاده شده است. همچنین میانگین نیمه عمر حذفی دارو در گروه مرجع ۲۴/۸۵ ۸/۳ و در گروه آزمون ۲۲/۲۹ ۸/۰۳ ساعت بود که اختلاف معنی‌داری ندارند و با توجه به آنالیزهای آماری، داروی آزمون و مرجع از نظر نیمه عمر مشابه هستند. در مطالعه انجام شده توسط Ghezelloo در سال ۱۳۸۵ این مقدار در گروه مرجع ۵۵/۴۳ ۳۴/۷ و در گروه آزمون ۱۲۶/۴۳ ۵۴/۵۱ بود که تفاوت زیادی با نیمه عمر دارو در این مطالعه دارد (۱). این اختلاف می‌تواند احیاناً به دلیل اختلاف شکل دارویی مورد استفاده در دو مطالعه باشد. در مطالعات انجام شده توسط Michiels و همکاران در سال ۱۹۸۷، Bogan and Mohammed Ali در سال ۱۹۸۷ و Swan و همکاران در سال ۱۹۹۹ میزان نیمه عمر به ترتیب ۱۵ روز، ۳-۲ هفته، ۲۶/۷ روز، ۱۴/۵ روز، ۱۴ روز و ۴۱۷ روز گزارش شده است (۸،۹،۱۳). در نتیجه مقدار نیمه عمر بدست آمده در مطالعه حاضر تفاوت زیادی با نتایج سایر مطالعات دارد. نمی‌توان علت این تفاوت را به طور دقیق مشخص کرد، ولی این احتمال وجود دارد که تفاوت در فرمولاسیون دارو و یا پایین بودن اتصال پروتئینی (Binding protein) در گوسفندان مورد آزمایش و تفاوت‌های نژادی گوسفندان، دلیل پایین بودن نیمه عمر دارو شده باشد. بر اساس مطالعه‌ای که Maes و همکاران در سال ۱۹۸۸ انجام دادند، نشان داده شد که عملکرد درمانی کلوزانتل بیشتر تحت تأثیر غلظت حداکثر دارو است (۶). بدین معنی که نیمه عمر طولانی کلوزانتل و دوام غلظت پلاسمایی آن موجب پیشگیری از آلودگی با همونکوس کنتورتوس تا ۶۰ روز پس از درمان و مقابله با کرم‌های کبدی تازه بالغ شده، در مجرای صفراوی می‌شود (۱). اما با توجه به نیمه عمر پایین بلوس کلوزانتل نسبت به شربت (براساس نتایج این مطالعه)، ممکن است این فرم از دارو در گوسفند کارایی لازم را جهت پیشگیری از این بیماری‌های انگلی نداشته باشد. با این حال به مطالعات عمیق‌تری در این زمینه نیاز است. همان‌طوری‌که جدول ۲ نشان می‌دهد، میانگین شاخص $AUC_{(0-\omega)}$ در گروه مرجع به میزان ۲۵۵۷/۶۲۱۳/۵ و در گروه آزمون ۲۱۷۱/۸۰۹۱/۲ بوده است. در مقایسه این دو، میزان F که بیانگر فراهمی زیستی نسبی به میزان ۰/۸۸ (۸۸ درصد) می‌باشد که در حد قابل قبول

است. اما آنالیز داده‌ها توسط آزمون فاصله اطمینان حاکی از تفاوت بین $AUC_{(0-\infty)}$ گروه آزمون و مرجع است.

براساس دستورالعمل های اداره نظارت بر مواد غذایی و داروی آمریکا (FDA) و سازمان بهداشت جهانی (WHO) در خصوص زیست همسنگی و با توجه به تعاریفی که از سوی منابع معتبر ارائه شده است، زمانی که چهره غلظت خونی دو دارو مشابه باشد، غلظت این دو دارو در بافت هدف نیز با هم مشابه است و در واقع، دو دارو اثر درمانی مشابه یکدیگر خواهند داشت (۱۳). بنابراین با توجه به نتایج بدست آمده می توان به این نتیجه رسید که به‌طور کلی، بین فاکتورهای فارماکوکینتیک هپاتک با مواد اولیه تهیه شده از شرکت منادیونا (اسپانیا) با هپاتک ساخته شده با ماده اولیه شرکت یانسن (بلژیک) مشابهت کافی و قابل قبولی وجود دارد و می توان گفت که این دو دارو بر اساس استانداردهای جهانی زیست همسنگ هستند.

References

1. Adams, H. R. (2001) Veterinary Pharmacology and Therapeutics. (8th ed.) Iowa State University Press, Iowa, USA.
2. Aulton, M. E. (1990) Biopharmaceutics, the science of dosage form design, (2nd ed.) Churchill Livingstone, Edinburgh. Uk.
3. Benchaoui, H. A., Mc Kellar, Q. A. (1993) Determination of rafoxanide and closantel in ovine plasma by high performance liquid chromatography. J. Bio. Med. Chromat. 44: 229-32.
4. Food and drug administration. (2002) Guidance for industry, Bioequivalence guidance, FDA. Rockville, MD, USA.
5. Hennesy, D. R., Ali, D. N. (1997) The effect of feed intake level on the pharmacokinetics disposition of closantel in sheep. Int. J. Parasitol. 27:1081-6.
6. Maes, L., Lauwers, H., Deckers, W., Vanparijs, O. (1988) Flukicidal action of closantel against immature and mature *Fassciola hepatica* experimentally infected rats and sheep. J. Res. Vet. Sci. 44:229-32.
7. Martinez, M., Langston, C., Martin, T., Conner, D. (2002) Challenges associated with the evaluation of veterinary product bioequivalence: an AAVPT perspective. J. Vet. Pharmacol. Therap. 25:201-20.
8. Michiels, M., Meulderman, W., Heykants, J. (1987) The metabolism and fate of closantel (Flukiver) in sheep and cattle. J. Drug Met. Rev. 18:235-51.
9. Mohammed, A. N. A., Bogan, J. A. (1987) The pharmacodynamics of the flukicidal salicyl anilides, rafoxanide, closantel and oxyclosanide. J. Vet. Pharmacol. Therap. 10:127-133.
10. Stove, G., Dakova, T., Michailova, A. (1999) Quantitative determination of closantel residues in milk by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. J. Chromatogr. A. 84:383-6.
11. Stove, G. (1998) Determination of closantel residues in plasma and tissues by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. J. Chrom. B. 710: 234-238.
12. Martinez, M., Langston, C., Martin, T., Corner, D. (2002) Challenges associated with the evaluation of Veterinary product bioequivalence: an AAVPT perspective. J. Vet. Pharmacol. Therap. 25:201-220.
13. Swan, G. E., Koeleman, H. A., Steyn, H. S., Meulders, M. S. (1999) Intravascular plasma disposition and salivary secretion of closantel and rafoxanide in sheep. J. South Afr. Vet. Assoc. 70: 75-90.

J. Vet. Res. 65, 3:185-191, 2010

BIOEQUIVALENCE STUDY OF TWO CLOSANTEL FORMULATIONS IN SHEEP

Arab, H.A.[1*], Jahedinia, M.[2], Rassouli, A.[1], Shams, G.R.[1]

[1]*Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran.*

[2]*Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran.*

(Received 2008 August 10 , Accepted 2010 February 22)

Abstract:

Bioequivalence study is a scientific and practical method used to compare the quality of a generic drug with a reference product. This study aimed to examine the bioequivalence of two closantel formulations produced with different sources of raw material by a domestic pharmaceutical Company. Due to long half- life of closantel, the study carried out by a parallel method. Thirty sheep were divided into 2 groups of 15 each. In the first group (test group) each sheep received 500 mg bolus of closantel and in the second group (reference group), each sheep received a 500 mg bolus of closantel produced with a raw material from a Belgium Company. Blood samples were collected at 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 32, 48 and 72 hours after drug administration. An HPLC system was used to determine the amount of closantel in plasma. Pharmacokinetic parameters including area under curve (AUC), C_{max}, T_{max}, Kel and $t_{1/2}$ of closantel were determined in each sheep. A t-student test was used to analyze and compare the results. The mean ± SD of C_{max} in reference and test groups were 56.38±14.28 µg/ml, 51.44±10.55, respectively. T_{max} in reference and test groups were 22.93± 2.81, 23.72± 1.83 h, respectively . AUC (0-72) in reference and test drugs were 2049.1±421.2 and, 1795.1± 421.2, respectively. AUC (0-∞) in reference and test were 2557.3±621.5 and 2171.1± 80. K_{el} in reference group was 0.0321± 0.0144 while in test it was 0.0348± 0.0128. $t_{1/2}$ in reference and test groups were 24.85± 8.34 h and, 22.29± 8.03 h, respectively. In conclusion, the results of this study showed that there was not significant difference between reference and test group, suggesting that two products were bioequivalent.

Key words: bioequivalence, pharmacokinetics, closantel, sheep.

***Corresponding author's email: harab@ut. ac. ir, Tel: 021-61117086, Fax: 021-66933222**