NRID 主成分在山羊体内的释放规律

马保华[1a],杨亚提[1b],田秀娥[1a],王志东[1a],于志峰[1a],黄建锋[1a],
张 红[2],李 键[2],陈玉林[1a],王永军[1a]

(1 西北农林科技大学 a 动物科技学院 农业部家畜生殖内分泌与胚胎工程重点开放实验室,b 理学院,陕西 杨凌 712100;
2 四川省动物生物技术研究中心,四川 成都 610066)

[摘 要] 为了分析 NRID 主成分炔诺酮在山羊体内的释放规律,春季在甘肃天水用本地山羊、秋季在四川成都用关中奶山羊各 108 只进行体内试验。试验羊在同一天阴道放置羊用 NRID,以放置 NRID 当天为 0 d,从放置 NRID 的次日(1 d)起,每天分别随机取出 6 只羊的 NRID,直到 18 d 全部回收结束。在实验室用丙酮溶解,并用紫外线分光光度仪测定每枚 NRID 内炔诺酮剩余量,计算每枚 NRID 内炔诺酮释放量,模拟分析 NRID 主成分炔诺酮在山羊体内的释放规律。结果表明,在春季和秋季,山羊体内放置的 NRID 中,炔诺酮的总释放规律是前期释放速度较快,之后释放速度逐渐降低,并呈现缓慢持续释放的特点。由此可以估测山羊阴道内每天 NRID 中炔诺酮的释放量,并可为建立 NRID 的应用程序提供理论依据。

[关键词] 炔诺酮;体内释放;炔诺酮阴道缓慢释放装置;山羊

[中图分类号] S814.1 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2007)12-0053-04

Norgestrel release patterns of norgestrel releasing intra-vaginal device (NRID) in goats

MA Bao-hua[1a], YANG Ya-ti[1b], TIAN Xiu-e[1a], WANG Zhi-dong[1a], YU Zhi-feng[1a],
HUANG Jian-feng[1a], ZHANG Hong[2], LI Jian[2], CHEN Yu-lin[1a], WANG Yong-jun[1a]

(1 *a. Key Laboratory of Animal Reproductive Endocrinology and Embryo Biotechnology of Agriculturual Ministry, College of Animal Sciences and Technology, b. College of Sciences, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi* 712100, *China*;
2 *Sichuan Animal Biotechnology Research Center, Chengdu, Sichuan* 610066, *China*)

Abstract: One hundred and eight local goats selected in Tianshui city of Gansu Province in spring and 108 Guanzhong milk goats in autumn were used to investigate the norgestrel release patterns of norgestrel releasing intra-vaginal device (NRID) *in vivo*. The day the NRIDs were placed into vagina of the experimented goats was regarded as the 0 day of experimentation. From the 1th day to the 18th day, the NRID of 6 sheeps were removed at same time of every day, then further study was carried out *in vivo*. The release patterns of norgestrel in NRID *in vivo* were simulated after the norgestrel in NRID was dissolved by acetone and the rest of norgestre was determined by Ultraviolet Ray Spectrometer. The results showed that, the norgestrel release quantity in NRID was higher in the first stage, and then declined gradually, and it was a persistent releasing. The study investigated the norgestrel release patterns of NRID *in vivo*. Therefore the release quantity of norgestrel in NRID every day can be estimated, and the theoretical basis can be provided for establishing the application programme of NRID.

* [收稿日期] 2006-11-14
[基金项目] 农业部农业结构调整项目(05-07-03B);陕西省科学技术研究发展计划项目(2002K01-G5-4,2003K01-G7-04,2004K03-G9-02,2005K02-G4-1)
[作者简介] 马保华(1965—),男,陕西城固人,副教授,博士,硕士生导师,主要从事动物胚胎工程研究。

Key words: notgestrel; norgestrel releasing intra-vaginal device; release pattern *in vivo*; goats

在羊的繁殖生产中，采用诱导发情和同期发情技术可使大群母羊集中发情，有利于提高繁殖和生产管理效率，以及胚胎移植供、受体的发情同期化[1]。诱导发情和同期发情技术，也是现代肉羊生产中密集繁殖体系的重要基础[2]。在国外，将孕激素及其类似物用于诱导发情和同期发情的研究，已经有几十年的历史，先后进行了注射、口服、皮下埋植等给药方式的研究。1965 年，Robinson[3] 利用孕酮海绵栓阴道埋植法获得羊的同期发情成功后，促进了孕激素及其类似物诱导发情和同期发情技术在生产上的大规模应用。为了进一步提高孕激素及其类似物诱导发情和同期发情的效率，近年来主要集中进行了孕激素及其类似物种类[4-7]、处理时间[8] 和配合使用的促性腺激素种类及剂量[9-10] 对诱导发情和同期发情效果的研究。在国内，孕激素及其类似物诱导发情和同期发情的研究工作起步较晚，但发展较快，除借鉴国外的研究与应用经验外，主要在孕激素配合使用促性腺激素种类和剂量方面进行了大量研究[11-12]，取得了较好的应用效果。炔诺酮是人工合成的高效孕激素类似物，应用炔诺酮阴道缓慢释放装置预处理母羊而诱导母羊发情的方法，是一种安全、有效的诱导发情和同期发情技术。用炔诺酮阴道缓慢释放装置诱导发情的效果受很多因素的影响，其中装置内炔诺酮的剂量和在阴道内放置的时间，是较为重要的影响因素。有关这方面的研究工作，以往都是根据受试羊的诱导发情和同期发情效率进行判断的，并未从机理上进行深入研究。炔诺酮阴道缓慢释放装置置入母羊阴道后的炔诺酮释放情况可直接反映母羊体内的炔诺酮水平，但过去国内外并无这方面的研究。本研究分别在春季和秋季进行 NRID 主成分炔诺酮在山羊体内的释放试验，并通过测定 NRID 内炔诺酮的剩余量，计算 NRID 内炔诺酮的释放量，旨在分析 NRID 主成分炔诺酮在山羊体内的释放规律，为确定 NRID 中炔诺酮的适宜剂量和应用时的适宜处理时间提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验羊

参加春季体内试验的山羊为甘肃天水本地山羊 108 只，参加秋季体内试验的为四川键宇胚胎工程有限公司购买的关中奶山羊 108 只。试验羊年龄 1.5～6 岁，临床健康。

1.2 试验材料及仪器

羊炔诺酮阴道缓慢释放装置（Norgestrel Releasing Intra-vaginal Device，NRID），由西北农林科技大学农业部家畜生殖内分泌与胚胎工程重点开放实验室研制，每枚含国产 18-甲基-炔诺酮（炔诺酮）60 mg。NRID 防腐润滑膏，主要含抗菌剂、润滑剂和炔诺酮协同剂，由国产药品和试剂无菌配制，无菌分装，密封保存，与 NRID 配套使用。植入器，自制，将长度为 20 cm，内径与 NRID 外径配套的塑料管一端做成斜面，并将管的两端打磨光滑，作为植入器套筒；将长度为 40 cm、外径小于外套内径的尼龙棒两端打磨光滑，作为植入器的活塞。调速恒温振荡器，由常州金城教学仪器厂生产，型号为 HY-4。紫外可见分光光度仪，由德国耶拿分析仪器股份公司生产，型号 SPECORD50。

1.3 试验方法

1.3.1 *试验羊分组及炔诺酮体内释放试验* 在春季选择 108 只天水本地山羊，秋季选择 108 只关中奶山羊进行试验。体内试验开始时，试验羊在同一天阴道放置 NRID。以放置 NRID 当天为 0 d，从放置的次日（1 d）起每天随机取出 6 只羊的 NRID，密封保存，标明时间，到 18 d 体内试验结束时，将样品带回实验室进行体外研究。

1.3.2 *回收 NRID 中炔诺酮的溶解* 将上述体内放置不同时间的 NRID，分别放入 100 mL 洁净带塞的玻璃瓶内，加入 60 mL 丙酮，在恒温振荡器上于 20 ℃间歇振荡，振荡速度为 180 次/min，累计振荡 12 h，使炔诺酮溶解到液体中。用 6 枚未使用的 NRID 作基础对照。

1.3.3 *炔诺酮质量浓度的测定* 取 18-甲基-炔诺酮样品溶于丙酮中，制成 1.0，0.9，0.8，0.7，0.6，0.5，0.4，0.3，0.2 和 0.1 mg/mL 的炔诺酮标准溶液，以丙酮为参比溶液，用紫外线分光光度仪作全波段扫描，确定炔诺酮的最大吸收峰，并在最大吸收波长处测定标准溶液的吸光度，每个质量浓度自动重复测定 3 次，求平均值绘标准曲线。对体内试验回收的样品，取其在丙酮中溶解平衡后的溶液，分别测量其吸光度 A 值，每个样品测定 3 次，取平均值。根据标准曲线获得的炔诺酮质量浓度与吸光度的线性关系公式，求体内试验 NRID 样品中溶解出的炔诺酮质量浓度。以同样方法测定和计算出 6 枚未使

用 NRID 的吸光度和炔诺酮质量浓度，作为计算总释放量的基础质量浓度。

2 结果与分析

2.1 炔诺酮标准曲线

紫外可见分光光度仪全波段扫描的炔诺酮最大吸收峰在 320 nm 处。测定炔诺酮质量浓度为 0.1，0.2，0.3，0.4，0.5，0.6，0.7，0.8，0.9 和 1.0 mg/mL 时溶液的吸光度分别为 0.138，0.264，0.352，0.482，0.547，0.664，0.809，0.841，1.004 和 1.133，标准曲线见图 1。由图 1 曲线拟合炔诺酮质量浓度与吸光度的线性相关方程为 $y=0.928\ 2x-0.028\ 6$，决定系数 $R^2=0.994\ 5$，二者的线性相关性达显著水平，说明用紫外分光光度仪在 320 nm 处测定溶液中炔诺酮含量是可行的。

2.2 样品中炔诺酮质量浓度的变化

将春季和秋季体内试验回收的所有样品，在丙酮中溶解平衡，测量其丙酮溶解平衡液中的吸光度，计算其平均值；将平均吸光度代入线性相关方程 $y=0.928\ 2x-0.028\ 6$ 中，计算各时间从体内回收的 NRID 样品中炔诺酮质量浓度；以 6 枚未使用的 NRID 吸光度计算出其平均炔诺酮质量浓度为 0.883 mg/mL，以此为基础，计算各时间组炔诺酮质量浓度与基础质量浓度的差值（即释放量），并以此计算各时间组样品的日平均炔诺酮释放量为：（总释放量/放置时间）×60（mg）。各时间组样品吸光度、样品炔诺酮质量浓度及样品日平均炔诺酮释放量见表 1 和表 2。

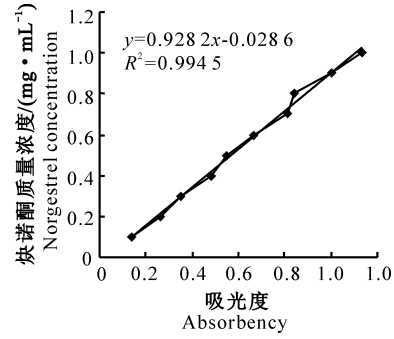

图 1 炔诺酮溶液的标准曲线

Fig. 1 Criterion curve of the norgestrel solution

表 1 春季试验不同时间样品炔诺酮质量浓度的测定结果

Table 1 Results of norgestrel concentration determination in spring experimentation

时间/d Time	吸光度 Absorbency	炔诺酮质量浓度/(mg·mL⁻¹) Norgestrel concentrations	日平均炔诺酮释放量/mg Average day release quantity of norgestrel	时间/d Time	吸光度 Absorbency	炔诺酮质量浓度/(mg·mL⁻¹) Norgestrel concentrations	日平均炔诺酮释放量/mg Average day release quantity of norgestrel
1	0.862	0.772	6.660	10	0.639	0.565	1.908
2	0.640	0.565	9.540	11	0.737	0.655	1.244
3	0.714	0.634	4.980	12	0.684	0.606	1.385
4	0.636	0.562	4.815	13	0.607	0.535	1.606
5	0.620	0.547	4.032	14	0.629	0.556	0.972
6	0.619	0.546	3.370	15	0.660	0.584	1.196
7	0.596	0.525	3.069	16	0.563	0.494	1.451
8	0.634	0.560	2.423	17	0.534	0.467	1.468
9	0.650	0.575	2.053	18	0.562	0.493	1.300

表 2 秋季试验不同时间样品炔诺酮质量浓度的测定结果

Table 2 Results of norgestrel concentration determination in autumn experimentation

时间/d Time	吸光度 Absorbency	炔诺酮质量浓度/(mg·mL⁻¹) Norgestrel concentrations	日平均炔诺酮释放量/mg Average day release quantity of norgestrel	时间/d Time	吸光度 Absorbency	炔诺酮质量浓度/(mg·mL⁻¹) Norgestrel concentrations	日平均炔诺酮释放量/mg Average day release quantity of norgestrel
1	0.890	0.797	5.160	10	0.673	0.596	1.722
2	0.826	0.738	4.350	11	0.720	0.640	1.325
3	0.859	0.769	2,280	12	0.688	0.610	1.365
4	0.844	0.755	2.070	13	0.620	0.547	1.551
5	0.786	0.701	2.184	14	0.640	0.565	1.363
6	0.662	0.586	2.970	15	0.542	0.474	1.636
7	0.767	0.683	1.714	16	0.602	0.530	1.324
8	0.711	0.631	1.890	17	0.661	0.585	1.052
9	0.734	0.653	1.533	18	0.671	0.594	0.963

2.3 样品中炔诺酮质量浓度变化的拟合结果

对春季和秋季各时间组样品炔诺酮质量浓度值进行拟合，得到各时间样品炔诺酮质量浓度变化的拟合曲线，见图 2 和图 3。

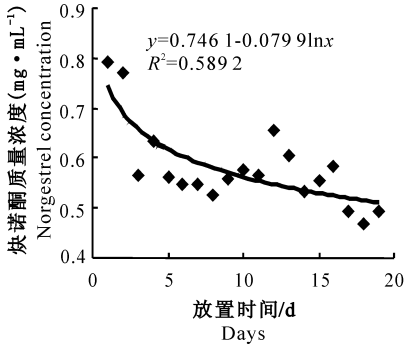

图 2 春季试验炔诺酮质量浓度拟合曲线

Fig. 2 Norgestrel concentration fitting curve in spring experimentation

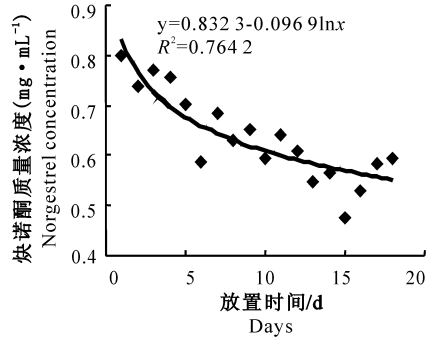

图 3 秋季试验炔诺酮质量浓度拟合曲线

Fig. 3 Norgestrel concentration fitting curve in autumn experimentation

春季和秋季试验中不同时间回收的样品炔诺酮质量浓度与时间拟合曲线，以及日平均炔诺酮释放量数据均显示，在 NRID 置入山羊阴道后的最初阶段，炔诺酮的释放量相对较大，之后释放量逐渐减小，而且直到试验结束时仍在持续释放。

3 讨 论

3.1 NRID 中炔诺酮在羊体内释放规律模拟的可行性

关于孕激素及其类似物制备的阴道缓慢释放装置的主成分释放规律研究，仅见何晓红等[13]采用体外模拟方法，分析醋酸氟孕酮制剂“羊乐”中醋酸氟孕酮的体外释放规律。本研究中羊的诱导发情与同期发情产品 NRID 的主成分为炔诺酮，研究采用体内试验和体外试验相结合的方法，测定 NRID 产品的主成分炔诺酮在母羊体内的释放规律。在体内试验中，每只受试羊阴道置入的 NRID 内炔诺酮含量相同，在置入母羊阴道后，NRID 内炔诺酮会通过阴道黏膜逐渐被羊体吸收，NRID 内炔诺酮含量会逐渐下降。在体外试验中，溶解回收样品中炔诺酮的溶剂量(60 mL)远远大于溶解每枚 NRID 中炔诺酮所需要的溶剂量(4 mL)，溶解过程中还辅以恒温振荡等措施，目的在于使 NRID 内剩余的炔诺酮能够尽可能地分配到液相。通过未使用的 NRID 作基础对照，测知其液体中(液相)炔诺酮分配量(0.883 mg/mL，共 52.98 mg)远高于 NRID 载体中(固相)的分配量。说明通过测定体内回收的 NRID 中分配到液相中的炔诺酮含量，来模拟分析体内释放规律的技术方法是可行的，能够保证体外试验测得的回收样品中炔诺酮的质量浓度，可正确反映 NRID 在体内的释放情况。

3.2 NRID 中炔诺酮释放规律与羊同期发情效果的关系

本研究结果表明，随着 NRID 置入母羊阴道时间的增加，虽然有些时间组的数据出现了一定程度的波动，但通过计算各时间组回收样品的日平均释放量，以及对各时间组样品炔诺酮质量浓度进行拟合而得到的拟合曲线，都证明在 NRID 置入后的最初阶段炔诺酮释放量较大，随着置入时间延长释放量逐渐减小，总的趋势是随着体内放置时间的延长，样品中炔诺酮质量浓度呈一定梯度逐渐下降。同时表明，直到体内试验结束时炔诺酮仍在释放，即表现出持续释放的特点。这些特点在利用 NRID 诱导母羊发情中是非常重要的，因为在实践中，进行羊的诱导发情和同期发情时，处理时间一般不会超过 18 d，而在本研究体内试验于 18 d 结束时，装置中的炔诺酮仍在持续释放。无论是春季还是秋季试验，各时间样品日平均释放量均远远大于山羊正常发情周期黄体期孕酮的生理浓度[14]，加之炔诺酮的生物学半衰期较动物分泌的天然孕酮长，说明 NRID 能够以缓慢释放的特点维持羊体内孕激素药物浓度，从而保证了 NRID 诱导母羊同期发情的效果。

[参考文献]

[1] Hafez B, Hafez E S E. Reproduction in farm animals[M]. 7th edition. Maryland, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

[2] 冯维祺，马月辉，陆 离. 肉羊高效益饲养技术[M]. 北京：金盾出版社，1995：104-107.

(下转第 62 页)