

비페닐디메틸디카르복실레이트 제제의 생물학적 동등성 시험

한상수 · 함성호 · 손동환[†] · 김재백
원광대학교 약학대학

(1994년 2월 8일 접수)

Bioequivalence Test of Biphenyl Dimethyl Dicarboxylate Products

Sang Soo Han, Seong Ho Ham, Dong Hwan Sohn[†] and Jae Baek Kim
College of Pharmacy, Wonkwang University, Iri 570-749, Korea
(Received February 8, 1994)

Bioequivalence (BE) test of biphenyl dimethyl dicarboxylate (DDB) tablets was performed. Normal healthy male volunteers (n=20) were randomly divided into 2 groups, and reference (Nissel[®]) and test (Livital[®]) tablets of DDB (25mg × 8 Tab. = 200 mg) were given orally by balanced two-period cross-over design. The serum concentration was determined by high performance liquid chromatography. The pharmacokinetic parameters, AUC, C_{max}, and T_{max} obtained after drug administration were statistically analyzed. Statistical evaluation of the data involved an analysis of variance (ANOVA) for cross-over design. The results were within 20% differences of mean value in AUC, C_{max} and T_{max} between reference and test tablets. The results of ANOVA showed no significant differences for "between group or subject" and "period". The test tablet was bioequivalent with the reference tablet in the AUC, C_{max} and T_{max}.

Keywords—Bioequivalence, DDB, Pharmacokinetics, ANOVA

DDB (Dimethyl-4, 4'-dimethoxy-5, 6, 5', 6'-dimethylenedioxy-biphenyl-2, 2'-dicarboxylate)는 한방에서 오랫동안 강장제 등으로 사용되어온 오미자 (Schizandrae Fructus)에서 단리된 유효성분의 하나인 Schizandrin C의 합성 동족체로서 물에는 난용성인 화합물이다.^{1)(Fig.1)}

DDB는 동물실험에서 사염화탄소, thioacetamide 및 D-galactosamine 등에 의한 간손상의 치료 및 예방에 효과가 있다고 보고 되었으며,^{2,3)} 임상적으로도 바이러스성 및 화학물질에 의한 간염의 치료 특히, 혈청 transaminase 값을 하강시키는 효과가 있어 국내에서도 간염치료제로 시판되고 있다.⁴⁻⁹⁾

한편 동일 유효성분을 동량 함유하는 제제라 하

더라도 인체에 투여시 흡수의 차이때문에 임상효과에 차이가 있을 수 있고 심지어는 예기치 못한 부작용을 초래할 수도 있기 때문에 이미 개발된 제품과 동일한 유효성분을 동량 포함한 다른 제품을 평가하는데 있어서 화학적 동등성 개념보다는 생물학적 동등성 개념이 중요하다.¹⁰⁾

이에 본연구에서는 대조약 (닛셀정[®], 태림제약)과 시험약 (리비탈정[®], 태평양제약)을 건강한 남자 지원자 20명에게 2시기 2제품의 Latin 방격법에 따른 교차시험법에 따라 경구투여하여 얻어진 생체이용률 파라메타들 즉, AUC, C_{max} 및 T_{max}에 대해 분산 분석을 시행하여 두 제품의 생물학적 동등성을 비교 평가하고자 하였다.

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

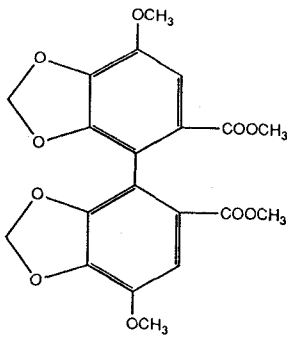


Figure 1—Structure of DDB.

실험 방법

시약 및 기기

대조약으로는 닛셀정®(DDB 25 mg, 태림제약, Lot No. 207735)을, 시험약으로는 리비탈정®(DDB 25 mg, 태평양제약, Lot No. 001)을 사용하였다.

DDB표준품은 태평양제약으로부터 공급받아 사용하였고, HPLC용 메탄올(Merck, German)을 사용하였으며, 분석기기로서 HPLC system (Waters

6000 A pump, Waters 440 UV detector, Waters M 730 data module, Waters, Miliford, USA) 등을 사용하였다.

피험자 선정과 관리

지원자 모집공고를 통해서 본 실험에 참여한 지원자는 내과 의사 검진 및 Table I에 표기한 혈액 임상화학 검사를 실시하여 건강하다고 인정되는 20명의 남자 지원자(연령 20~25세, 평균 23세, 체중 53~75 kg, 평균 65 kg, 신장 165~180 cm, 평균 173 cm)를 대상으로 하였으며, 이들 지원자에게는 생물학적 동등성 시험의 개요와 투여하는 약물의 효능효과, 부작용 및 금기사항에 대해 설명자료를 통해 설명회를 가진 후 동의서를 받았다. 또한 이들 지원자들에게는 실험 시작 24시간전부터 타약물의 복용을 금지시켰으며 실험기간중에는 책임자의 지시에 따라 동일식단의 식사 및 활동을 하게 하였고 각 실험시기 당일 아침에는 절식케하였다.

약물투여 및 혈액 채취

2시기 2제품의 Latin방격법에 따른 교차시험법으로 투약계획을 세우고 20명의 피험자를 10명씩 무작위로 2군으로 나눈 다음, 1군에는 시기 I에 대조약을 투여하고 일주일의 휴약기간을 둔 후 시기 II에 시험약물을 투여하였다. 2군에는 1군의 역순으로 약물을 투여하였다.(Table II)

투여량은 시험약, 대조약 모두 8정(DDB로서 200 mg)을 시험당일 아침 공복시에 식수 200 ml로 복용케 하였다.

주사기를 이용하여 상완정맥으로부터 약물복용 직전 및 복용후 1, 2, 3, 4, 6 및 8시간째에 채혈하여 원심분리하였으며 채취한 혈청은 분석전까지 냉동

Table I—Test Items for the Volunteers

Hematology :	Hemoglobin, Hematocrit, WBC, platelet, Differential counting of WBC
Blood Chemistry :	BUN, Creatinine, Total protein, Albumin, SGOT, SGPT, Total Bilirubin, Cholesterol, Glucose fasting, Alkaline phosphatase

Table II—Latin Square Cross Over Designs for Bioequivalence studies of DDB.

Group	Subjects	Drugs*	
		Period I	Period II
1	1) J.H. Choi, 2) S.J. Jeong, 3) K.Y. Kim, 4) C.Y. Jeong, 5) C.H. Jeon, 6) Y.J. Kim 7) Y.S. Jeong, 8) S.J. Choi, 9) D.I. Wi, 10) B.H. Nam	A	B
2	11) Y.D. Choi, 12) Y.C. Choi, 13) H.W. Nam, 14) S.H. Park, 15) J.H. Han, 16) H.S. Jin, 17) C.L. Kim, 18) J.H. Cho, 19) W.Kim, 20) S.S.Han	A	B

*A : Reference drug, B : Test drug

보관하였다.

혈청중의 DDB분석

혈청 1 ml에 내부표준물질용액(cortisol in methanol, 0.05 mg/ml) 1 ml를 넣고 잘 섞은 다음 에테르-클로르포름(3:7 v/v%) 혼합액 5ml를 넣고 vortex상에서 2분간 격렬하게 진탕시켜 원심분리한 후경계면의 찌꺼기와 상층액을 제거하고 유기용매층을 취한 다음 무수황산나트륨 200 mg을 가하여 다시 3000 rpm으로 5분간 원심분리한 다음 유기용매층을 취하여 60°C 수욕조에 방치하여 완전히 증발 건조시킨 뒤, 남은 잔사를 메탄올 200 μ l에 용해시킨 후 50 μ l를 칼럼에 주입하였다. 이때 HPLC의 분석 조건은 다음과 같다.

즉, 칼럼은 μ -Bondapack C₁₈을 이동상은 65% 메탄올을, 검출파장은 UV 254 nm에서, 그리고 유속 및 분석감도는 각각 1.2 ml/min 및 0.005 au로 하였다.

약물속도론 분석 및 통계 처리

시간 0부터 8시간까지의 혈청중 DDB 농도-시간 곡선하면적(AUC)은 사다리꼴 공식에 따라 구하였으며 최고 혈청중 농도(C_{max})와 최고 혈청중 농도

도달시간(T_{max})은 실제 측정치를 사용하였다.

한편, 두제제간의 생체이용률 파라메타들(AUC, C_{max}, T_{max})의 평균치의 유의성에 대한 통계학적 검정을 위해 분산분석을 하였다. 분산분석의 주된 목표는 제제간의 차이지만 제제간의 차이를 바르게 검출하기 위해서는 군(순서 또는 교차시험), 시기의 효과가 없는 것을 확인할 필요가 있다. 분산분석에서는 같은 제제를 같은 피험자에게 투여했을 경우 있을 수 있는 오차(피험자내 오차)를 구하여 제제간의 차이 또는 기타의 효과에 의해서 생기는 차이와 각각 비교함으로써 이로 얻은 값(F 값)을 미리 정해 놓은 유의수준에서의 F값과 비교해서 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

혈청중 약물농도 추이

Fig. 2에 혈청중 DDB의 HPLC 크로마토그램을 나타내었다. HPLC분석시 DDB의 유지시간은 약 11분, 내부표준물질은 약 9분으로서 각 물질의 분리상태가 양호하였다. 한편, 시험약과 대조약 각각 8정을 지원자 20명에게 2시기 2제품 교차시험법에 따라 경구투여한 다음 일정시간마다 채혈하여 얻어진 혈청중 DDB의 평균농도는 Fig. 3과 같다.

DDB의 흡수양상은 지원자에 따라 개체차가 컸

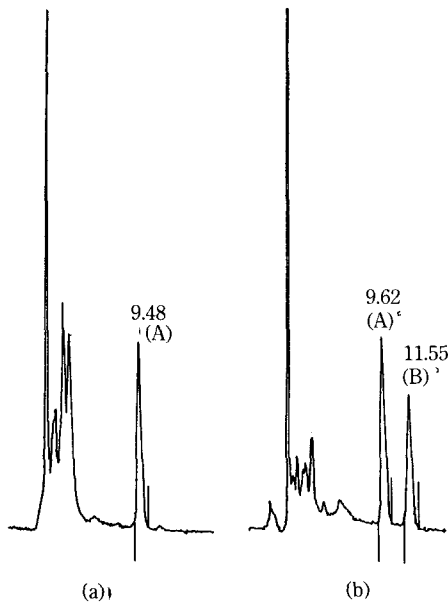


Figure 2—The chromatogram of DDB in human serum. Key : (A) internal standard, (B) DDB, (a) blank spiked with internal standard (b) serum obtained from a volunteer spiked with internal standard

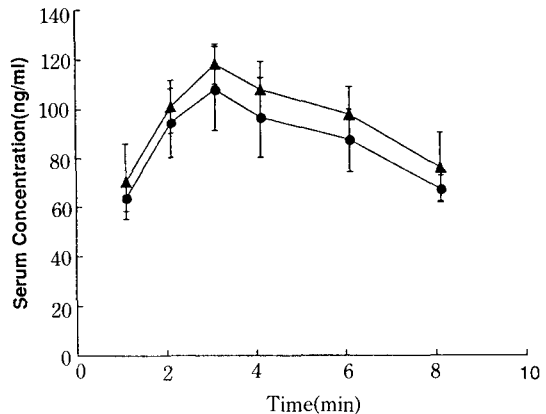


Figure 3—DDB concentration in human serum-time curves of volunteers after oral administration of two DDB products. Each point represents the mean concentration(\pm S.E.) of 20 normal volunteers.

Key : ● ; Reference drug, ▲ ; Test drug

으나 모든 채혈시간에 있어서 두 제제사이에는 유의성있는 농도의 차이는 없었다.

Table III—AUC of Each Volunteer in Each Period

Group	Subject	Period I	Period II	Sum
1	1	652.37	677.17	1329.54
	2	540.52	828.18	1368.70
	3	637.57	646.10	1283.67
	4	552.34	716.46	1268.80
	5	538.75	637.60	1176.35
	6	662.13	725.52	1387.65
	7	623.15	706.64	1329.79
	8	695.90	728.13	1424.03
	10	681.66	771.06	1452.72
	Total		6316.05	7112.63
2	1	652.37	667.05	1319.42
	2	734.09	606.72	1340.81
	3	668.38	620.34	1288.72
	4	779.71	586.84	1366.55
	5	595.70	557.94	1153.64
	6	652.53	647.43	1299.96
	7	738.44	611.62	1350.06
	8	664.17	730.96	1395.13
	9	710.19	692.47	1402.66
	10	834.33	715.42	1549.75
Total		7029.91	6436.79	13466.70
Sum	Period	13345.96	13549.42	13466.70
	Drug	12752.84	14142.54	

혈청중 DDB 농도-시간 곡선하면적 (AUC)에 대한 통계학적 고찰

혈청중 DDB 농도-시간 데이터로부터 사다리꼴 공식을 써서 채혈시간까지의 혈청중 농도-시간 곡선하면적 (AUC)을 계산하였다. 그결과 대조약과 시험약과의 평균 AUC는 각각 637.64, 707.12 ng·hr/ml였고, 시험약의 평균 AUC는 대조약의 110.9%로서 두 제제의 AUC차는 20%를 넘지 않았으므로 생물학적 동등성 판정기준의 전제조건을 만족시켰다. Table III은 사다리꼴 공식으로 계산한 AUC를 Latin 2시기 2제품 교차실험의 데이터 구성에 따라 정리한 표이며, Table IV는 AUC, C_{max}, T_{max}에 대한 ANOVA표이다. 이결과를 바탕으로 유의수준 α=0.05에서 다음과 같이 분산을 결정하였다. ANOVA표에서 군간의 분산비 F₀(1,18)는 0.008로서 이값은 F분포표의 값 4.41보다 작아서 유의성이 없는것으로 나타났다. 따라서 교차실험이 성립되었음을 알았다.

다음의 식 1)을 써서 비심도를 계산하였더니 λ=6.536 이었으며,

$$\lambda(\alpha, 1-\beta, 2(n-1)) = \frac{\sqrt{n} \cdot \delta}{s} \tag{식 1)}$$

α, 1-β 및 자유도 r=2(n-1)과 비심도 λ와의 관계로부터 α=0.05, r=18, λ=6.536일때의 검출력 1-β는 0.99보다 크음을 알 수 있고, 따라서 1-β가 0.8보다 커야한다는 조건을 만족시켰다. 따라서 이제 식 2)를 써서 다음과 같이 최소 검출자 Δ를 계산하였다.

Table IV—ANOVA Table of the Pharmacokinetic Parameters Obtained from Two DDB Products (2×2 Latin Square Method)

Variance sources	dF	AUC			C _{max}			T _{max}		
		SS	MS	F	SS	MS	F	SS	MS	F
Between Subjects	19	76672.000	4035.369	1.060	2596.7810	136.6727	1.2359	2.0000	0.1053	0.9972
Between Groups	1	34.000	34.000	0.008	14063	14063	0.0098	0.1000	0.1000	0.9474
Subject/Group	18	76638.000	4257.667	1.1284	2595.3750	144.1875	1.3039	1.9000	0.1056	1.0000
Intra Subject Variation										
Period	1	1036.000	1036.000	0.2721	170.5625	170.5625	1.5424	0.0000	0.0000	0.0000
Drug	1	48280.000	48280.000	12.6823	529.5938	529.5838	4.7892	0.1000	0.1000	0.9474
Residual	18	68524.000	3806.889		1990.4690	110.5816		1.9000	0.1056	
Total Variation	39	194512.000			5287.4070			4.0000		

dF : degree of freedom, SS : sum of squares, MS : mean squares, F : F ratio.

$$\Delta = \left(\frac{s \cdot \lambda(\alpha, 1-\beta, r)}{\sqrt{n}} / \mu_s \right) \times 100 \quad \text{식 2)}$$

그결과 $\Delta = 0.09067$ 로서 생물학적 동등성 판정 기준인 $\Delta \leq 0.2$ 라는 조건을 만족시켰다.

$$\text{또한 } \delta - t(\alpha, r) \times \frac{s}{\sqrt{n}} \leq \text{BA의 차}$$

$$\delta + t(\alpha, r) \times \frac{s}{\sqrt{n}}$$

이고 t분포표에서 $\alpha = 0.05$, $r = 18$ 일때 t 는 2.101 이므로

$$69.485 - 2.101 \times \frac{\sqrt{3806.8890}}{\sqrt{10}} \leq \delta$$

$$\leq 69.485 - 2.101 \times \frac{\sqrt{3806.8890}}{\sqrt{10}}$$

$$28.492 \leq \delta \leq 110.478$$

이를 대조약에 대한 %로 나타내면 $4.47\% \leq \delta\% \leq 17.33\%$ 이었다. 신뢰한계는 $\pm 20\%$ 이내에 들어 바람직한 것으로 나타났다. 이상의 검증을 통해서 두제제는 생물학적 동등성 판정기준에 적합하였으므로 두제제는 AUC 즉, 양적인 면에서 동등한 것으로 판명되었다.

최고 혈청중 농도 (C_{max}) 및 최고 혈청중 농도 도달시간 (T_{max})에 대한 통계학적 고찰

최고 혈청중 농도 (C_{max})에 있어서 시험약은 116.13 ng/ml로 시험약은 대조약의 106.7%로서 시험기준의 20%이내를 만족시키고 있다. 또한 분산분석의 결과 군간의 분산비는 0.00975로서 유의차를 보이지 않고 있어, 본실험의 교차시험을 만족시키고 있음을 나타내고 있다. 다음 식 1)을 써서 비심도를 계산하였더니 $\lambda = 6.547$ 이었으며 α , $1-\beta$ 및 자유도 $r = 2(n-1)$ 와 비심도 λ 와의 관계로부터 $\alpha = 0.05$, $r = 18$, $\lambda = 6.547$ 일때의 검출력 $1-\beta$ 는 0.99보다 컸다. 따라서 $1-\beta$ 가 0.8보다 커야한다는 전제조건을 만족시켰다. 식 2)를 써서 최소검출자 Δ 를 계산하였더니 $\Delta = 0.0905$ 로써 생물학적 동등성 판정기준을 만족시켰다. 또한 대조약에 대한 $\delta\%$ 를 구하였을때 $0.2668066\% \leq \delta\% \leq 13.10363\%$ 였다. 따라서 두

제제는 최고 혈중농도에 대해서는 생물학적 동등성 시험기준에 모두 적합하여 동등하다고 판정할 수 있었다. 한편 흡수속도의 측면에서 생체이용율을 나타내는 파라메타인 T_{max} 에 대하여서도 생물학적 동등성을 통계 검정하였다. 이때 T_{max} 를 curve fitting에 의해 구하는 것은 실험자의 주관이 개입될 여지가 크기 때문에 각 시료 채취점에서 최고농도를 나타내는 시간을 T_{max} 로 하였다.

시험약과 대조약의 T_{max} 평균치는 각각 3.05 및 2.95 hr로서 시험약의 T_{max} 평균치는 대조약의 103.39%로서 그 차이가 20%를 넘지 않아서 BE 판정기준의 전제조건을 만족시켰다. 또 군간의 분산비는 0.9474로서 유의성이 없어 교차시험이 잘 성립하는 것으로 나타났다. 다음 식 1)을 써서 비심도를 계산하였더니 $\lambda = 5.741$ 이었으며 α , $1-\beta$ 및 자유도 $r = 2(n-1)$ 와 비심도 λ 와의 관계로 부터 $\alpha = 0.05$, $r = 18$, $\lambda = 5.741$ 일때의 검출력 $1-\beta$ 는 0.99보다 컸다. 따라서 $1-\beta$ 가 0.8보다 커야한다는 전제조건을 만족시켰다. 식 2)를 써서 최소검출자 Δ 를 계산하였더니 $\Delta = 0.103$ 으로써 생물학적 동등성 판정기준을 만족시켰다. 또한 대조약에 대한 $\delta\%$ 를 구하였을때 $-3.927352\% \leq \delta\% \leq 10.70701\%$ 였다. 따라서 두제제는 최고혈청중 농도 도달시간 T_{max} 에 대해서도 동등하다고 판정할 수 있었다.

한편, 우리나라에서는 생물학적 동등성 시험의 평가를 위한 비교항목으로 생체이용율 파라메타인 혈중농도-시간 곡선하면적 (AUC), 최고 혈중농도 (C_{max}) 및 최고 혈중농도 도달시간 (t_{max})으로 하고 있다.¹⁰⁾ 이상의 결과에서 전신순환혈로 이행된 약물량의 기준이 되는 혈중농도-시간 곡선하면적 (AUC), 전신순환혈로의 이행속도의 기준이 되는 최고혈중농도 (C_{max}), 최고혈중농도 도달시간 (T_{max}) 모두가 생물학적 동등성 기준을 만족시킴으로써 두 제품은 생물학적으로 동등함을 알 수 있었다.

결 론

건강한 남자 지원자 20명을 무작위로 2군으로 분류하여 2시기 2제품 교차시험법에 따라 두회사 DDB제제의 생물학적 동등성을 평가한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 혈청중 농도-시간곡선하면적 (AUC)이 생물학적 동등성 기준에 적합하였다.

2. 최고 혈청농도 (C_{max}) 및 최고 혈청농도 도달 시간 (T_{max})도 생물학적 동등성 기준에 적합하였다.

이상의 결과로 시험약인 리비탈정[®]은 대조약인 닛셀정[®]과 생물학적으로 동등함을 알 수 있었다.

문 헌

- 1) J.X. Xie, J. Zhou, J.H. Yang, J.X. Chen and H.Q. Jin, Synthesis of scizandrin C analogs, *Acta Pharm Sinica*, **16**, 306-309 (1981).
- 2) S.J. Gu, X.L. Wang, W.W. Gao, P.X. Qiao, A. G. Wang, Z.Y. Qiang and Z.Y. Song, Bioavailability studies on the preparation of biphenyl dimethyl dicarboxylate, *Acta Pharm Sinica*, **25**, 215-219 (1990).
- 3) H.Q. Yu, X.Y. Zhang and J.Z. Shi, Diphenyl-dimethyl-dicarboxylate in treating and preventing hepatitis due to drug poisoning, *Chinese Medical J.*, **100**, 122-126 (1987).
- 4) K.T. Liu, From the study of Fructus schizandrae to the discovery of biphenyl dimethyl dicarboxylate, *Acta Pharm Sinica*, **18**, 714-720 (1983).
- 5) X.Y. Chang, H.G. Yu and J.Z. Shi, Observations on the effects of biphenyl dimethyl dicarboxylate and honey-pilula of silybum marianum(L), gaertn on chronic vital hepatitis, *Clin. J. Modern Dev. Traditional Med.*, **1**, 24-26 (1981).
- 6) Y.X. Chang, H.G. Yu, J.Z. Shi and A.L. Yong, Therapeutic effects of DDB and traditional chinese medicine and alpha-feroprotein elevation of chronic viral hepatitis B and cirrhosis, *Beijing Med. J.*, **4**, 255-256 (1982).
- 7) C.F. Wang, Clinical effects of DDB pillues on 209 cases of viral hepatitis and cirrhosis, *Beijing Med. J.*, **6**, 350-356 (1984).
- 8) 王彩福, 聯茶雙脂治療病毒性肝炎 382例 臨床療效觀察, *天津醫學* 2期, 93-96 (1982).
- 9) 이효석, 김용태, 정현채, 윤용범, 송인성, 김정룡, 만성활동성 간질환 환자에서 biphenyl dimethyl dicarboxylate의 혈청 alanine aminotransferase치 저하효과에 관한 전향적 무작위 선정 대조연구, *대한내과학잡지*, **40**, 172-178 (1991).
- 10) 국립보건 안전 연구원 고시 제 90-2호: 의약품등 생물학적 동등성 시험기준, 국립보건 안전 연구원 (1990).