

닐바디핀 정제에 대한 생물학적 동등성 평가

김종국* · 이사원 · 최한곤 · 고종호 · 이미경 · 김인숙
서울대학교 약학대학

Bioequivalence of Two Nilvadipine Tablet

Chong-Kook KIM*, Sa-Won LEE, Han-Gon CHOI, Zhong-Gao GAO,
Mi-Kyung LEE and In-Sook KIM

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

(Received March 20, 1998; accepted May 6, 1998)

Abstract – The bioequivalence of two nilvadipine products was evaluated in 16 normal male volunteers (age 22-32 yr, body weight 57-80 kg) following single oral dose. Test product was Overcal[®] tablet (Choong-Wae Pharm. Corp., Korea) and reference product was Nivadil[®] tablet (Hyundai Pharm. Corp., Korea). Both products contain 4 mg of nilvadipine. One tablet of the test or the reference product was administered to the volunteers, respectively, by randomized two period cross-over study (2×2 Latin square method). The determination of nilvadipine was accomplished using a validated capillary column GC with electron-capture detection. As a result of the assay validation, the quantification of nilvadipine in human plasma by this technique was possible down to 0.5 ng/ml using 1 ml of plasma. Absolute overall recovery from five replicate analyses of nilvadipine-spiked sample were 88.4±10.24% (mean±S.D.) for human plasma of 10 ng/ml. The coefficients of variation (C.V.) were less than 20% and the actual concentration of nilvadipine measured by GC ranged from 80 to 99% in all plasma. Average drug concentrations at each sampling time and pharmacokinetic parameters calculated were not significantly different between two products (p>0.05); the area under the curve from time zero to 8 hr (AUC_{0-8 hr}) (22.8±5.90 vs 22.2±6.10 ng·hr/ml), maximum plasma concentration (C_{max}) (10.0±2.85 vs 9.3±3.28 ng/ml) and time to reach maximum plasma concentration (T_{max}) (1.2±0.31 vs 1.3±0.47 hr). The differences of mean AUC_{0-8 hr}, C_{max}, and T_{max} between the two products (2.25, 7.65, and 10.30%, respectively) were less than 20%. The power (1-β) and treatment difference (Δ) for AUC_{0-8 hr} and C_{max} were more than 0.8 and less than 0.2, respectively. Although the power for T_{max} was under 0.8, T_{max} of the two products was not significantly different from each other (p>0.05). These results suggest that the bioavailability of Overcal tablet is not significantly different from that of Nivadil tablet. Therefore, two products are bioequivalent based on the current results.

Keywords □ Bioavailability, Bioequivalence, Nilvadipine, Pharmacokinetics, Assay validation

닐바디핀이 함유된 두 제제간의 생물학적 동등성을 입증하고자 본 실험을 수행하였다. 닐바디핀 즉, 5-isopropyl 3-methyl 2-cyano-6-methyl-4-(3-nitrophenyl)-1,4-dihydro-3,5-pyridine dicarboxylate는 칼슘길항제로서 작용하는 새로운 dihydropyridine 유도체 (Fig. 1)로서 강력한 고혈압 치료제이다 (Katz, 1986; Matindale, 1993). 닐바디핀은 다른 dihydropyridine 유도체들과 마찬가지로 심근세포 및 관상동맥세포의 Ca²⁺ 통로를 차단함으로써 심근수축을 억제하고 관상동맥을 이완시켜 혈압강화작용을 나타낸다 (Katz, 1986). 본

실험에서는 (주)중외제약에서 제조한 오버칼[®] 정제의 생체이용률과 기존 시판 제제인 니바딜 정(현대약품)의 생체이용

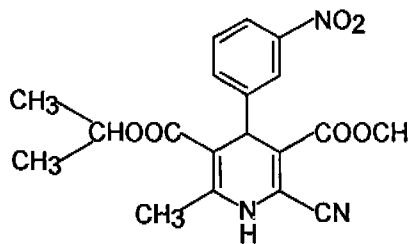


Fig. 1. Structure of nilvadipine.

* To whom correspondence should be addressed.

을 비교하기 위하여, 시험약으로 오버컬® 정과 대조약으로 니바딜® 정(현대약품)을 사용하였다.

닐바디핀은 상용량이 성인기준으로 1회 2-4 mg로서 아주 적은 용량을 투여하며 치료역이 작아서(Mattindale, 1993; Weir 등, 1990) 투여 용량의 가감이 어려움이 있다. 또한 경구투여 후 혈중농도분석을 할 경우에도 분석방법상의 어려움이 있다. 매우 낮은 혈중농도를 분석하기 위하여 GC-MS(Cheung 등, 1988; Tokuma 등, 1987)나 GC-ECD(Tokuma 등, 1987)와 같은 아주 고감도이며 선택성이 좋은 분석 기기가 필요하며 매우 숙련된 시험자만이 낮은 정량 한도까지 분석이 가능하다. 따라서 본 연구에서는 분석방법을 검증하고 두 제제 간의 생체이용율을 비교함으로써 생물학적 동등성 여부를 판정하고자 하였으며 이에 따른 지견을 얻었기에 보고하고자 한다.

시험방법

시약 및 기기

헤파린은 중의 헤파린나트륨주(1,000 IU, 중외제약)를 사용하였으며 에탄올, n-헥산, 에틸아세테이트, 붕산나트륨 및 염화나트륨은 특급시약을 구입하여 사용하였다. 시험약으로는 (주)중외제약에서 제공한 오버컬® 정(닐바디핀으로서 4 mg을 함유하는 정제)을, 대조약으로는 현대약품에서 시판하고 있는 니바딜® 정(닐바디핀으로서 4 mg을 함유하는 정제)을 구입하여 사용하였다.

기구는 GC(Hewlett-Packard 5890), GC 칼럼(HP-17, 10 m × 0.530 mm × 0.2 μm), 원심분리기(비전과학: Model VS-802) 등을 사용하였다.

피험자의 선정

(주)중외제약에 재직중인 건강한 남성으로서 과거에 소화기계, 간장, 신장 및 혈액질환의 병력이 없고 현재 타 약물을 복용하고 있지 않은 지원자를 모집하였다. 본 시험에 관한 설명회를 개최하여 시험의 의의와 수반될 수 있는 모든 문제점들에 대하여 설명하고, 이들 중 전문의사의 건강진단을 실시하여 건강인으로 판정된 자 16명을 선정하였으며, 선정자들로부터 서면 동의서를 받았다. 시험에 앞서 서울대학교 약학대학 부속 종합약학연구소에 구성된 생물학적 동등성 심사위원회에서 시험계획서를 심의하여 승인을 받은 후 시험을 수행하였다. 본 시험에 지원한 피험자의 연령은 22-32세(평균 26.4세)였으며, 신장은 164-181 cm(평균 172.8 cm), 체중은 57-80 kg(평균 67.6 kg)이었다. 각 피험자의 신체사항 및 건강진단검사 결과는 Table I에 요약하였다.

투약 및 채혈

이 시험은 16명의 피험자를 대상으로 하여 라틴 방격법을 이용하여 2기 × 2제의 교차시험을 시행하였다. 지원자 16명을 무작위로 8명씩 2군으로 나누어 시험하였으며 휴약기간은 닐바디핀의 반감기를 고려하여 2주일로 하였다. 시험전날 동일한 저녁식사와 간식을 취하고, 오후 10시 이후(투약 전 11시간)로는 물 이외의 어떠한 종류의 음식도 금

Table I. Informations and the results of physical examinations of sixteen volunteers

Subject No.	Age	Height (cm)	Weight (kg)	HT* (%)	RBC* (g/dl)	GOT* (IU/l)	GPT* (IU/l)	Glucose (mg/dl)	CHOL* (mg/dl)	TP* (g%)	ALB* (g%)	BP* (mmHg)
NR***				41-53	13-18	8-40	5-35	70-105	130-230	6.8-8.0	3.3-5.2	≥140/90
1	22	170	63	46	15.1	13	14	101	130	7.6	3.9	100/60
2	22	175	63	49	15.9	16	14	75	172	7.4	4.0	110/80
3	28	179	75	47	15.6	20	19	92	168	7.2	3.8	110/70
4	22	166	62	46	15.4	18	20	76	178	7.8	4.0	130/90
5	29	164	57	45	15.0	12	14	96	171	7.7	3.9	130/90
6	30	170	63	46	15.2	14	10	76	263	7.5	3.7	140/90
7	32	168	67	45	15.0	20	19	74	146	7.2	3.6	110/70
8	24	178	75	44	14.6	13	17	99	147	7.6	4.0	120/80
9	27	170	64	51	16.5	20	32	82	184	7.6	4.1	130/90
10	30	167	67	46	15.3	18	15	79	163	7.6	4.0	120/80
11	27	168	61	49	16.5	18	15	80	189	8.1	4.4	110/60
12	27	181	80	48	16.0	20	19	75	167	7.8	4.1	120/80
13	26	178	75	46	15.5	18	15	84	181	7.5	4.0	100/60
14	25	176	72	48	16.0	13	14	88	189	8.0	4.0	110/80
15	27	183	73	47	15.9	14	12	96	154	7.7	3.8	130/100
16	25	172	64	44	14.7	32	14	98	162	7.8	4.0	130/80

*Abbreviations: HT (hematocrit), RBC (red blood cell), GOT (glutamic oxalacetic transaminase), GPT (glutamic pyruvic transaminase), CHOL (cholesterol), TP (total protein), ALB (albumin), NR (normal range), BP (blood pressure)

**Represents the normal range of each blood chemistry examination.

하였다. 시험당일에는 공복 시에 각각 닐바디핀 4 mg을 함유한 오버컬® 정 또는 니바딜® 정을 1인당 1정씩 약 200 ml의 물로 1회 경구투여하고, 예비시험 결과를 근거로 하여 채혈간격을 결정한 후 약물투여 직전 및 투여 후 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8, 12, 및 24시간에 헤파린으로 처리한 주사기로 좌 또는 우측 팔로부터 약 10 ml의 정맥혈을 채취하였다. 약물 투여 후 4시간까지는 일체의 음식과 음료를 금하고, 약물투여 4 시간째에 피험자 전원이 동일한 식사를 하도록 하였다.

경시적으로 채취된 10 ml의 혈액은 헤파린으로 처리된 시험관에 넣고 천천히 흔들어 준 후 약 1000 g에서 10분간 원심분리 한 후 혈장만 취하여 멸균된 2 ml E_p,

c에 옮기고 드라이아이스를 사용하여 냉동시켰다. 채혈이 모두 끝난 후에는 -80℃ 이하로 유지되는 냉동고에 넣어 분석 시까지 보관하였다.

혈장중 약물농도 측정

혈장중 닐바디핀의 정량은 Tokuma 등(1987)과 Cheung 등(1988)의 방법을 수정하여 다음과 같은 전처리 과정을 거쳐 GC로 분석하였다. 채취한 생체시료를 분석하기 전에 분석법 검증을 통해 본 분석의 신뢰성 여부²⁵ 검토하였다.

닐바디핀 표준품 일정량을 에탄올 20 ml에 용해시킨 후 희석하여 100 ml로 만들고 이것을 다시 농도별로 희석하였다. 바이알에 분주하여 분석할 때까지 4℃ 냉장 보관하였다가 혈장 중 약물농도 분석시 공혈장 1 ml에 적당량을 가하여 검량선 작성에 사용하였다.

냉동된 혈장을 실온에서 해동한 후, 혈장 1 ml을 원심분리용 시험관에 넣고 에탄올 200 μl와 붕산완충액(0.1M-borate-hydrochloric acid buffer, pH 9.0) 1 ml를 가한 후 15초 동안 진탕한 다음 염화나트륨 0.1 g을 가하고 전부 혼합하였다. 여기에 n-헥산-에틸아세테이트(70:30, V/V) 4 ml를 가한 다음 10분간 진탕 교반하고 약 1000 g에서 10분간 원심분리하였다. 상층 유기용매층을 3 ml 취하여 cornical tube에 옮기고 질소기류 하에서 용매를 모두 증발시킨 후 남은 잔사에 톨루엔 100 μl를 가하여 용해한 후 5 μl를 취하여 GC에 주입하였다.

검량선은 닐바디핀 에탄올 표준액 적당량을 혈장에 가한 후 시료와 동일한 전처리 과정을 거쳐 GC로 분석한 후 피크높이법으로 작성하였다. 칼럼과 검출기 교체시 분석방법을 검증하고 검량선을 각각 작성하였으며 이동상 기체를 교체할 때마다 재작성 하였다(Fig. 3).

처리된 시료는 Hewlett-Packard사의 GC system을 사용하여 분석하였다. 분석조건은 다음과 같다. GC는 Hewlett-Packard 5890II System을 사용하였으며 칼럼은 Crosslinked 50% phenyl methyl silicone-coated fused-silica capillary column(HP-17, 10 m×0.53 mm×2.0 μm), 검출기는 63Ni-electron capture detector를 사용하였다. 온도조건은 칼럼

250~280℃(Initial temp.; 250℃, Rate; 2℃/min, Final temp.; 270℃(5 min), Rate A; 0.4℃/min, Final temp. A; 280℃), 시료 주입구 온도는 290℃, 검출기 온도는 300℃에서 분석하였다. Carrier gas는 N₂ 가스(7 ml/min)를 Make-up gas도 N₂ 가스(40 ml/min)를 사용하였으며 Split ratio는 1.57:1이었다.

약물속도론적 분석

최고혈장농도(C_{max}) 및 최고혈장농도 도달시간(T_{max})은 혈장약물농도-시간 곡선으로부터 직접 읽었다. 혈장약물농도를 측정된 결과 8시간까지는 약물의 혈장농도가 정량범위 내에 있으나 12시간 이후의 혈장 중 농도는 대부분 정량범위 이하로 감소되어서 8시간까지의 혈장약물농도-시간 곡선하 면적(AUC_{0-8h})을 사다리꼴 공식(Gibaldi, 1991)으로 구하였으며 무한대까지의 AUC_{0-∞}는 식 (1)에 따라 AUC_{0-8h}, 8시간째의 혈장 중 닐바디핀의 농도(C₈) 및 겉보기 소실속도정수(k_e)로부터 구하였다.

$$AUC_{0-∞} = AUC_{0-8h} + C_8/k_e \tag{1}$$

여기서 k_e값은 분포후상의 직선부분을 직선 회귀한 기울기로부터 구하였다.

통계해석

모든 측정치와 계산치는 산술평균±표준편차(S.D.)로 표시하였으며, 각군 간의 차이에 관한 검정은 paired Student's t-test를 행하여 p<0.05인 경우 유의성 있다고 판정하였다. 두 제제의 생물학적 동등성은 식품의약품안전본부고시 제96-16호에 따라 통계적 검정을 행하였다. 즉 우선 분산분석을 행한 다음 검출력(1-β)과 최소검출차(Δ) 등에 의해 판정하였다

결 과

분석법 검증 및 검량선 작성

Fig. 2에 혈장 중 닐바디핀의 GC 크로마토그램을 나타내었다. GC 분석시 닐바디핀의 유지시간은 약 22분으로 내인성 물질의 다른 피크와의 분리 상태가 양호하였다. 혈장 중 닐바디핀의 정량한도는 0.5 ng/ml이었으며, 검량선은 Fig. 3에 보는 바와 같이 회귀분석을 하였을 때 0.5-20 ng/ml범위에서 양호한 직선성을 나타내었다(r²=0.9989). 회수율은 88.4±10.24%(mean±SD)였다. 검량선은 닐바디핀 에탄올 표준액 적당량을 혈장에 가하여 시료와 동일한 방법으로 처리한 후 GC로 측정하여 작성하였다. 본 분석방법의 정밀도 C.V %는 17.19%(5 ng/ml)이하였다(Table II). 또한 본 분석방법의 정확도는 평균 93%로 양호하였으며 정량성을 갖는 검출한계는 0.5 ng/ml이었다(Table III). 그 검량선과 반응계수를 Fig. 3에 나타내었다.

혈장중 약물농도

각 제제의 시간별 평균 혈장약물농도는 Table IV에, 평균 혈장약물농도-시간 곡선은 Fig. 4에 나타내었다. 닐바디핀

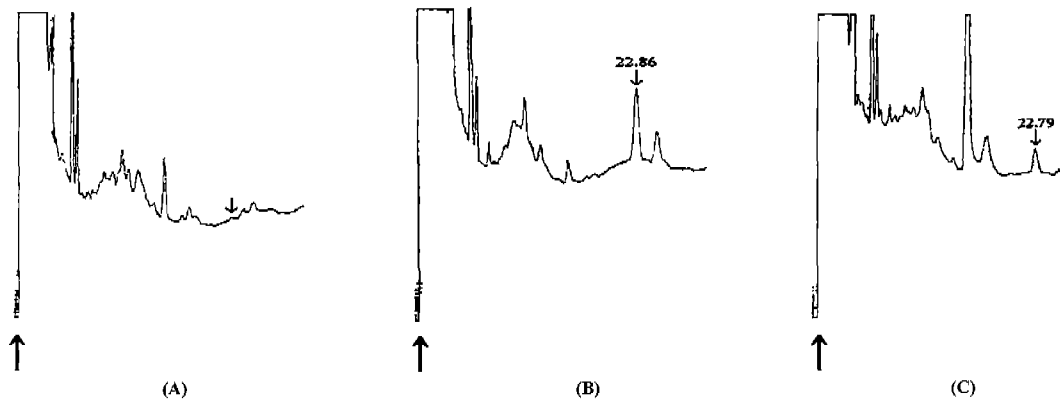


Fig. 2. Chromatograms of plasma nilvadipine. The retention time of nilvadipine was ranging from 21 min to 23 min (A) blank plasma, (B) plasma spiked with nilvadipine (5 ng/ml), (C) plasma obtained from a volunteer.

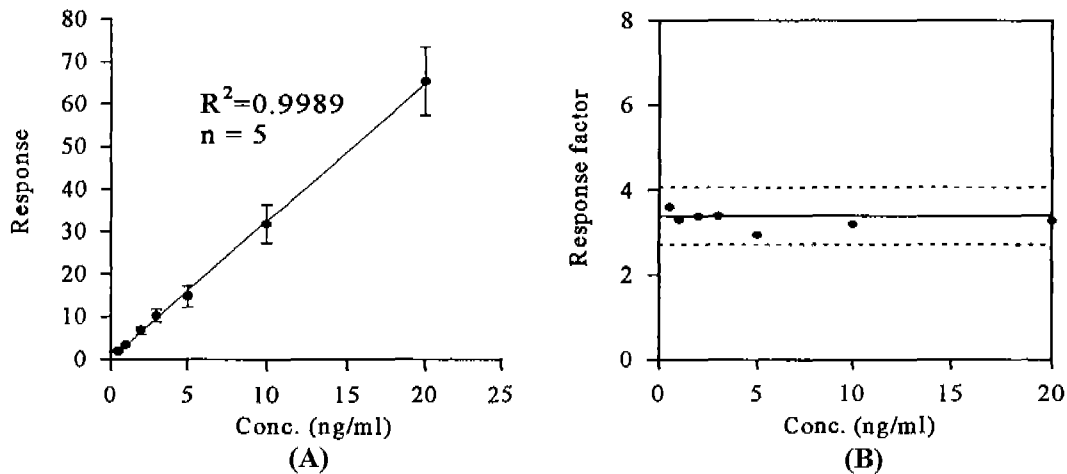


Fig. 3. Standard curve (A) and response factors (B) for nilvadipine. Key: (----), mean response factor $\pm 20\%$.

Table II. Precision for the determination of nilvadipine concentration in human plasma

Concentration in plasma (ng/ml)	Coefficient of Variation (%) (n=5)
0.5	12.22
1.0	12.12
2.0	12.28
3.0	14.72
5.0	17.19
10.0	14.51
20.0	12.31

Table III. Accuracy in the determination of nilvadipine concentration in human plasma

Theoretical Concentration (ng/ml)	Response factor ^a	Deviation (%)
0.5	3.60 \pm 0.44	6.19
1.0	3.30 \pm 0.40	2.65
2.0	3.38 \pm 0.42	0.29
3.0	4.06 \pm 0.50	19.76
5.0	2.94 \pm 0.51	13.27
10.0	3.18 \pm 0.46	6.19
20.0	3.27 \pm 0.40	3.54
Mean \pm S.D. ^b	3.39 \pm 0.36	7.41

의 흡수양상은 피험자에 따라 개체차가 매우 컸으나, 모든 채혈 시점에서 두 제제간에 평균 혈중농도에는 유의성 있는 차이가 없었다($p > 0.05$). 혈중농도로부터 계산한 약물속도론적 매개변수들($AUC_{0-8 \text{ hr}}$, $AUC_{0-\infty}$, T_{max}) 역시 두 제제간에 유의성 있는 차이가 없었다(Table V).

생물학적 동등성 평가

^aDrug peak height (nm); mean \pm S.D.

^bAverage for response factors of each theoretical concentration.

식품의약품안전본부고시에 의한 생물학적 동등성 평가로는 다음의 4개 항목을 규정하고 있다.

1. 비교항목은 원칙적으로 생체이용을 시험에 의하여 산

Table IV. Plasma concentration of nilvadipine (ng/ml) after oral administration of two nilvadipine products (nilvadipine 4 mg/human) at each sampling time

Time (hr)	Plasma concentration (ng/ml)	
	Reference drug	Testing drug
0.5	4.44±2.94	3.24±3.38
1.0	8.70±3.46	6.76±4.16
1.5	7.74±2.74	6.46±3.31
2.0	4.79±1.52	5.96±2.31
2.5	3.59±1.17	4.15±1.52
3.0	2.82±0.81	3.42±1.14
4.0	2.19±0.69	2.25±0.73
6.0	1.17±0.39	1.26±0.38
8.0	0.73±0.17	0.83±0.21

출한 혈장농도-시간곡선 하 면적(AUC), 최고 혈중농도 (C_{max}) 및 최고 혈중농도 도달시간(T_{max})으로 한다.

2. 대조약과 시험약의 비교항목 평균치의 차는 대조약의 20% 이내이어야 한다.

3. 분산분석에 의한 검정은 원칙적으로 α (유의수준)=0.05-0.1로 하고, 그 때의 정도는 $1-\beta$ (검출력) ≥ 0.8 및 Δ (최소검출차) ≤ 0.2 로 함이 바람직하고, 의약품의 종류에 따라 최소검출차의 의미를 고찰할 필요가 있다.

4. 또한 두 제제의 생체이용률 차의 신뢰 한계를 구하여 제3호의 결과와 합쳐 평가한다.

상기의 항목을 검토하기 위하여 두 제제의 약물 속도론적 매개변수들을 분산 분석한 결과는 Table VI에 기재한 것과 같다. 이를 바탕으로 $\alpha=0.05$ 에서 분산을 검정하면 모

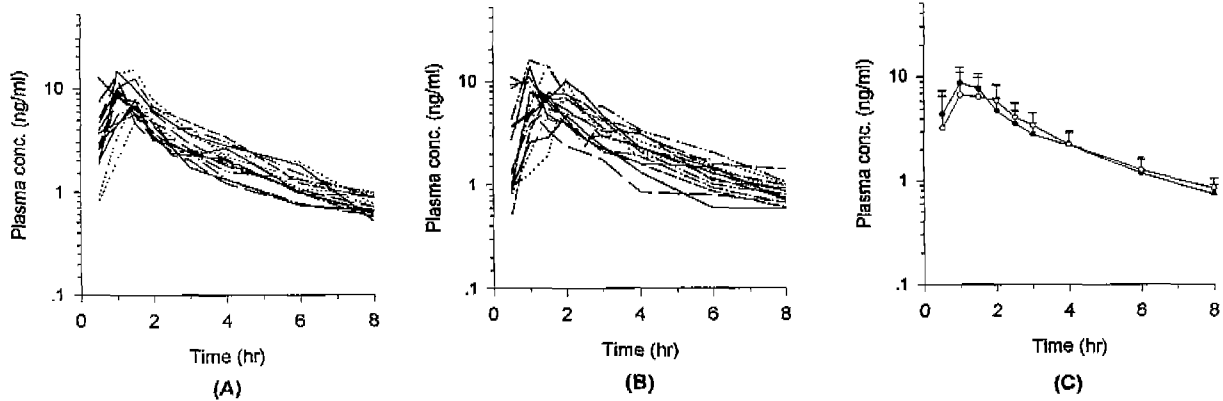


Fig. 4. Nilvadipine concentration in human plasma-time curves of sixteen volunteers after oral administration of two nilvadipine products. Curves represent the concentration of each volunteers for (A) reference drug, (B) test drug, and (C) mean concentration (\pm S.D.) of sixteen normal volunteers. Key: ●, Reference drug; ○, Test drug.

Table V. Statistical analysis of pharmacokinetic parameters of two nilvadipine products

	AUC _{0-8hr} (ng · hr/ml)	AUC _{0-∞} (ng · hr/ml)	C _{max} (ng/ml)	T _{max} (hr)
Reference Drug	22.8±5.90	25.6±6.10	10.0±2.85	1.2±0.31
Testing Drug	22.2±6.10	25.5±6.69	9.3±3.28	1.3±0.47
t-value	0.3378	0.0704	1.3242	-1.4639

Note: All pharmacokinetic parameters were not significantly different ($p>0.05$).

Table VI. ANOVA table of the pharmacokinetic parameters obtained from two nilvadipine products (2×2 Latin square method)

Variation Sources	df	AUC		C _{max}		T _{max}	
		MS	(F)	MS	(F)	MS	(F)
Between Subjects	15	57.2581	3.28	16.2072	6.71	0.2646	4.23
Between Groups	1	51.7500	0.90	3.3408	0.20	0.0313	0.11
Subject/Group	14	57.6515	3.30	17.1262	7.90	0.2813	4.50
Intra Subject Variation							
Period	1	31.7578	1.82	6.5161	3.70	0.0000	0.00
Drug	1	2.1614	0.12	4.7122	1.95	0.1250	2.00
Residual	14	17.4708		2.4141		0.0625	0.02

Note: $F_{group} (1,14)=4.3$, $F_{subject/group} (14,14)=2.35$, $F_{period} (1,14)=4.3$ and $F_{drug} (1,14)=4.3$ at $\alpha=0.05$ $p>0.05$.

Table VII. Results of the bioequivalence test from two nilvadipine products (2×2 Latin square method)

	AUC _{0-8hr}	C _{max}	T _{max}
BA difference of test product from reference product	2.25%	7.65%	10.30%
Minimum detectable difference	19.3%	16.5%	21.9%
Noncentrality	3.12	3.65	2.76
Minimum subject number	8	8	9
Confidence limits of BA difference	-11.47% ≤ ≤ 15.98%	-4.10% ≤ ≤ 19.40%	-5.30% ≤ ≤ 25.81%
Bioequivalence ?	Yes	Yes	.

든 비교항목의 F_{group} 값이 F분포표의 값($F(1,14)=4.3$)보다 작아서 교차시험이 성립하였다. 생물학적 동등성 평가 결과는 Table VII과 같다. 결과를 종합적으로 판정해 보면, 식품의약품안전본부 고시에 의한 비교항목(AUC, C_{max}, T_{max})의 평균치의 차이는 각각 2.25, 7.65 및 10.30%로서 모두 20% 이내에 들어 생물학적 동등성 기준의 제2항을 모두 만족시켰다. 또한 AUC와 C_{max}는 모두 검출력($1-\beta$) ≥ 0.8 , 최소 검출차(Δ) ≤ 0.2 의 범위를 만족시켜(각각 19.28, 16.50%), 분산분석을 행한 결과 생물학적으로 동등한 것으로 판정되었다. 다만 T_{max}는 신뢰한계가 -5.30-25.81%로서 $\pm 20\%$ 의 범위를 약간 벗어났으나 통계적으로 동등한 것으로 판정되었다.

고 찰

생체내이용율이란 치료상의 동등성을 보장하기 위해 흡수속도와 양의 두 가지 측면에서 흡수의 효율성을 정량적으로 평가하고자 하는 것이다(식품의약품안전본부고시, 제96-16호; 佐久間昭, 1991). 생체시료에서 약물 및 그 대사체를 정량하기 위해서 도입되는 분석법들은 이런 생체이용율, 생물학적 동등성 및 체내속도론적인 매개변수를 평가하고 해석하는데 중요한 역할을 한다. 따라서 완벽하게 검증된 분석법들을 도입하여 만족스럽게 해석할 수 있는 신뢰할만한 결과들을 얻는 것이 필수적이다. 특히 생물학적 동등성시험은 제제학적으로 동등한 두 제제가 생체이용율에 있어서 통계학적으로 동등하다는 것을 입증하기 위해 실시하는 생체내 시험(식품의약품안전본부고시, 제96-16호)으로 검증된 분석법을 이용한 신뢰할 만한 분석 자료의 확보가 전제가 되어야 한다.

분석법검증 시 사용되는 필수적인 매개변수들에는 보관조건에서 매질중의 약물의 안정성(stability), 정확도(accuracy), 정밀도(precision), 감도(sensitivity), 특이성(specificity), 선택성(selectivity), 반응함수(response function), 및 재현성(reproducibility) 등이 있다. 이러한 매개변수들은 새로운 분석법을 개발할 경우에도 반드시 연구 검토되어야 하며 기존의 분석법을 약간 수정한다거나 변경할 경우에도 검토하여 문서화해야 한다(식품의약품안전본부고시, 제96-16호).

그러나 이러한 분석법 검증 매개변수들은 그 추천사항이라든지 기준이 마련되어 있지 않기 때문에 자의적으로 그 한계를 정할 수밖에 없다. 특히 널바디핀과 같이 저용량 투여 약물의 분석법이나 생물학적(면역학적, 미생물학적) 분석법에 의존할 수밖에 없는 약물의 분석인 경우와 같은 때 분석 시마다 편차가 큰 분석법들은 검증시 그 기준을 어느 정도로 할 것인지가 문제가 될 수 있다. 따라서 각 약물들의 기존 분석법들을 바탕으로 약물 또는 분석방법에 따른 분석법검증의 가이드라인이 절실히 요구되고 있다. 이미 선진국들에서는 1990년 12월 분석법검증에 대한 회의를 통해 사람과 동물에서 생체이용율, 생물학적 동등성 및 체내속도론 연구에 도입되는 분석법검증에 대한 의견을 제시한 바 있다(Shah 등, 1992).

생물학적 동등성 시험 대상 약물의 경우 시판 제제가 이미 임상적으로 사용되고 있기 때문에 대부분 검증된 분석법이 확립되어 있다. 그럼에도 불구하고 생물학적 동등성 시험을 시행하는 연구소에 따라 분석환경(분석기기의 조건, 연구자의 수준 및 실험환경 등)이 다르고 기존의 분석조건을 약간씩 또는 완전히 변경하는 경우가 있을 수 있기 때문에 해당연구소에서 다시 분석을 수행할 경우에도 반드시 분석법이 검증되어야 한다.

본 시험에서 사용된 분석법의 검증을 위해 위에서 언급한 검증 매개변수들을 검토하였다. 분석법검증시 검토된 매개변수들의 검증기준을 자의적이긴 하나 본 분석법의 감도 및 편차들을 고려하여 정확도, 정밀도 및 재현성 등의 CV%를 20%이내로 정하였다. 혈장중의 널바디핀의 안정성은 매우 안정한 것으로 보고된 바(Tokuma 등, 1987) 있으므로 검토에서 제외하였다. 본 분석법의 정확도는 약 89%로 양호하였으며 정밀도는 검량선 상의 모든 농도에서 그 편차가 20%이하(12%와 17%사이)로 각각의 분석 시마다 약간의 편차를 보였다. 감도는 정량한계로서 0.5 ng/ml까지 직선성을 나타냈다.

이와 같은 분석법검증을 바탕으로 두 회사의 널바디핀 제제의 생물학적 동등성을 평가하기 위하여 각 제제의 체내속도론적 매개변수를 측정할 결과 Table V에 나타낸 바와 같이 대조약과 시험약이 각각 AUC_{0-8h}는 22.8 \pm 5.90과

22.2±6.10 ng · hr/ml이었고 C_{max}는 10.0±2.85와 9.3±3.28 ng/ml이었으며 T_{max}는 1.2±0.31과 1.3±0.47 hr였다. 식품의약품안전본부고시에 의한 이들 비교항목(AUC_{0-8h}, C_{max}, T_{max})의 평균치의 차이는 각각 2.25, 7.65 및 10.30%로서 모두 20% 이내에 들어 생물학적 동등성 기준의 제2항을 모두 만족시켰다. 또한 AUC_{0-8h}와 C_{max}는 모두 검출력(1-β)≥0.8, 최소검출차(Δ)≤0.2의 범위를 만족시켜(각각 19.3, 16.5%), 분산분석을 행한 결과 생물학적으로 동등한 것으로 판정되었다. 다만 T_{max}는 최소검출차가 20%이상으로서 피험자수를 늘여 실험해야만 통계적으로 유의성 있는 판정이 가능할 것으로 나타났고 신뢰한계도 -5.30-25.81%로서 ±20%의 범위를 벗어났으나, T_{max}에 대한 동등성 여부는 피험자 수를 증가시키면 통계적으로 유의성 있는 결론을 얻을 수 있다. 그러나 장기적으로 반복 투여하는 약물이므로 T_{max}는 생물학적 동등성 평가 항목으로 합당하지 않으므로 T_{max}를 비교할 필요가 없다. 결론적으로 1일 1회 장기간 복용하는 닐바디핀은 생물학적 동등성 평가 항목으로 T_{max}는 의미가 없기 때문에 주 판정 항목인 C_{max} 및 AUC가 생물학적 동등성 판정 기준을 만족하므로 두 제제는 생물학적으로 동등하다고 판정할 수 있다.

감사의 말씀

이 연구는 서울대학교 약학대학 부속 종합약학연구소의 연구지원으로 수행되었으며 이에 감사드린다. 또한 본 시험에 협조해 주신 피험자, 간호사 및 물리약학 연구실 대학원생들에게 감사드린다.

참고문헌

Cheung, W. K. Woodward, D. L., Shin, K., Hibberd, M., Pearse, S., Desjardins, R. E., Yacobi, A. and Silber, B. M. (1988). Pharmacokinetics of nilvadipine after single oral doses in healthy volunteers. *Int. J. Clin. Pharm. Res.* VIII(5), 299-305.

Gibaldi, M. (1991). *Biopharmaceutics and Clinical Pharmacokinetics*, 4th Ed., Lea & Febiger, Philadelphia, USA, pp. 146-175.

Katz, A. M. (1986). Mechanisms of action and differences in calcium channel blockers, *Am. J. Cardiol.*, 58, 20D.

Martindale The Extra Pharmacopoeia, by the Royal Pharmaceutical Society of Great Britain. 30th Edition p. 380 (1993).

Shah, V. P., Midha K. K., Dighe, S., McGilveray, I. J., Skelly, J. P., Yacobi, A., Layoff, T., Viswanathan, C. T., Cook, C. E., McDowall, R. D., Piffman, K. A. and Spector, S. (1992). Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies, *Pharm. Res.*, 9(4), 588-592.

Tokuma, Y., Fujiwara, T. and Noguchi, H. (1987). Absorption, distribution and excretion of nilvadipin, a new dihydropyridine calcium antagonist, in rats and dogs, *Xenobiotica*, 17(11), 1341-1349.

Tokuma, Y., Fujiwara, T. and Noguchi, H. (1987). Determination of (+)- and (-)-nilvadipine in human plasma using chiral stationary-phase liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry, and a preliminary pharmacokinetic study in humans, *J. Pharm. Sci.*, 76(4), 310-313.

Tokuma, Y., Fujiwara, T., Sekiguchi, M. and Noguchi, H. (1987). Determination of nilvadipine in plasma and urine by capillary column gas chromatography with electron-capture detector. *Journal of Chromatography*, 415, 156-162.

Tokuma, Y., Sekiguchi, M., Niwa, T. and Noguchi, H. (1988). Pharmacokinetics of nilvadipine, a new dihydropyridine calcium antagonists, in mice, rats, rabbits and dogs, *Xenobiotica*, 18(1), 21-28.

Weir, M. R., Vlachkis, N. D., DeQuattro, V., Douglas, J., Svetkey, L. P., Singh, S., Wiedl, S. C., Chen, C. F., Woodward, D. L. and Saunders, E. (1990). Evaluation of the clinical pharmacology of nilvadipine in patients with mild to moderate essential hypertension, *J. Clin. Pharmacol.*, 30, 425-37.

식품의약품안전본부고시 제96-16호 생물학적동등성시험기준, 식품의약품안전본부(1996. 10. 31 개정).

佐久間昭, (1991). 일본의 생물학적 동등성 시험방법에 대한 해설, 생물약제학과 약물속도론, 이민화, 구영순 편역, 신광출판사, 서울, pp 470-491.