

## 딜티아젠펙서방정을 이용한 *In vitro/In vivo* 상관성

최명신 · 강찬순<sup>1</sup> · 최보경<sup>1</sup> · 홍정희<sup>2</sup> · 김길수<sup>†</sup>

이화여자대학교, <sup>1</sup>식품의약품안전청 의약품평가부, <sup>2</sup>충남대학교

(2002년 10월 19일 접수 · 2002년 11월 18일 승인)

### *In vitro/In vivo* Correlation of Sustained Release Diltiazem

Myoengsin Choi, Chan Soon Kang<sup>1</sup>, Bo Kyung Choi<sup>1</sup>, Chong Hui Hong<sup>2</sup> and Kil Soo Kim<sup>†</sup>

Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

<sup>1</sup>Department of Drug Evaluation, Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-704, Korea

<sup>2</sup>Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

(Received October 19, 2002 · Accepted November 18, 2002)

**ABSTRACT**—IVIVC (*In vitro/in vivo* correlation) is useful for predicting *in vivo* results from *in vitro* data. The aim of this study was to develop IVIVC of sustained release diltiazem. For this purpose, three types of diltiazem tablets with different *in vitro* dissolution rates were prepared. An *in vitro* dissolution testing method comprising of paddle apparatus, 50 rpm, water as dissolution medium was developed. Under these condition, we demonstrated that AUC<sub>inf</sub> could be predicted by evaluating  $d_{70\%}$  (time dissolved 70%) *in vitro* since the *in vivo* AUC<sub>inf</sub> was correlated with the *in vitro*  $d_{70\%}$  ( $r=-0.9981$ ).

**Key words**—Diltiazem, Dissolution test, *In vivo-in vitro* correlation.

고형제제의 품질평가는 주로 제제에 포함되어 있는 유효 성분의 확인, 순도, 함량 등의 이화학적시험 및 경도, 중량 편차, 봉해시험 등 제제학적 시험을 주로 한 시험이 실시되어 왔다. 그러나 최근에는 기대한 유효성 및 안전성의 관점에서 품질의 적합성이 논의되어 생체이용률(bioavailability)을 예측하는 수단으로서의 용출시험이 중요시되고 있다.<sup>1-2)</sup> 특히 방출제어형 경구용 고형제제에 있어 *in vitro* 용출시험으로 생물학적이용율을 예측하고자 하는 요구가 계속되고 있다. 용출시험으로 생물학적이용율을 예측할 때 필수적인 것이 *in vitro*에서의 용출시험과 *in vivo*에서의 생체이용률의 상관성이 확보되어야 하는데 이에 따라 IVIVC (*in vivo-in vitro* correlation)에 대한 관심이 증가하고 있다.

IVIVC를 확립하면 제제개발과정이나 제제허가 후 조성을 변화시킬 때 생물학적동등성시험없이 용출시험으로 대신할 수 있고 용출기준을 타당화 할 수 있으며 생산과정중이나 제제 개발에 있어 간단하게 품질의 일관성을 확보할 수 있다는 장점이 있다.<sup>3-4)</sup>

본 실험에서는 딜티아젠펙을 이용한 용출을 제어시킨 서방정을 제조하고 *in vitro* 용출시험과 *in vivo* 흡수시험을 실시하여 *in vitro* 실험에서 얻을 수 있는 인자와 *in vivo* 실험

에서 얻을 수 있는 인자연구를 통해 상관성을 확립하고자 하였다.

### 시험방법

#### 시약

딜티아젠펙 및 히드록시프로필셀룰로오스, 스테아린산마그네슘, 유당등은 삼오파마켄에서 제공받았다. 기타 용출시험, 분석 및 *in vivo* 흡수시험에 필요한 시약들은 HPLC grade, 특급 또는 일급시약을 사용하였다.

#### 기기

정제 제조 장치는 타정기(ERWEKA AR 400, ERWEKA APPARATEBAU GMBH, Heusenstamm, Germany), 용출 시험장치는 용출시험기(SR-6, Hanson Research, USA), 용출액 및 혈장중의 딜티아젠펙 분석에는 HPLC 시스템(Waters 510 pump, Waters 717 autosampler, Water 996 PDA detector, Waters Millenium data module, Millipore Co., Milliford, MA., USA)과 자외부흡광광도계(Hewlett Packard 8452A, USA)를 사용하였다.

#### 실험동물

실험에 사용된 비글견은 국립독성연구원에서 분양 받았

<sup>†</sup>본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
Tel : 02)3277-3026, E-mail : kskim@mm.ewha.ac.kr

다. 성장한 암컷 3 마리와 수컷 1 마리를 실험에 이용하였다.

### 딜티아젠펙서방정의 제조

딜티아젠펙서방정은 아래와 같이 제조하였다. 100 mesh 체를 통과시킨 딜티아젠펙, 히드록시프로필셀룰로오스, 유당의 무게를 달아 섞고 스테아린산마그네슘을 첨가하여 잘 혼합하였다. 그 분말 혼합물을 지름 10 mm의 punch의 단발 타정기를 이용하여 타정하였다. 딜티아젠펙은 정당 100 mg으로 하고 용출을 조절하기 위하여 히드록시프로필셀룰로오스를 30, 50 및 70%로 변화시키고 각각 Tab F, Tab M 및 Tab S로 하였다.

### In vitro 용출시험

소화관 내의 생리학적 특성, 즉 pH 변동과 운동성을 고려하여 딜티아젠펙서방정의 용출에 대한 교반속도, 용출시험장치, 용출액의 영향을 평가하였다.<sup>5)</sup> 용출시험은 대한약전 7개정에 따라 실시하였고, 용출시험장치는 용출시험법 1법(Basket 법)과 2법(Paddle 법)을, 용매는 simulated gastric fluid TS(without pepsin), simulated intestinal fluid TS(without pancreatine) 및 water를 사용하였고 용출액은 흡광도측정법에 따라 UV 236 nm에서 딜티아젠펙의 농도를 분석하였다.

### In vivo 흡수 실험

경구 투여 전 18시간 전부터 투여 후 6시간이 지날 때까지 비굴견을 금식시키고 물은 자유롭게 섭취하도록 하고 딜티아젠펙서방정 1정을 물 20 ml와 같이 경구투여하였다. 혈액 채취는 비굴견을 고정대에 고정시키고 좌측 대퇴부 동맥에 heparinized saline(3 IU/ml)을 채운 캐놀라를 삽입하여 혈액을 채취한 후 다시 헤파린을 삽입하여 넣어 주었다. 채취한 혈액은 EDTA 튜브에 즉시 넣고 12000 rpm에서 10분간 원심분리하고 분리된 혈장을 분석시까지 -20°C에서 보관하였다. 혈장중 딜티아젠펙의 정량은 Robert E 등<sup>6)</sup>의 전처리방법을 준용하였다.

HPLC 분석조건으로는 칼럼은 Capcellpak C<sub>18</sub>(Shiseido, Japan)을 사용하였으며 이동상은 0.1 mol/l 인산암모늄액·아세트니트릴혼합액(59:41)(with 0.06% triethylamine)을 사용하였고 유속 1.0 ml/min로 UV 검출기(측정파장: 240 nm)를 사용하여 정량하였다. 이와 같은 조건으로 분석하였을 때 혈장중의 딜티아젠펙 농도에 대한 피크면적비율은 100 ng/ml과 1000 ng/ml의 사이의 농도에서 직선성이 성립하였고 그 검량선은  $Y=0.0017x-0.0548(r^2=0.9958)$ , X: 딜티아젠펙 농도 (ng/ml), Y: 내부표준물질(0.1 mol/L 인산염 완충액 (pH 7.4)

에 녹인 염산베라파밀 용액 (10 µg/mL)) 에 대한 딜티아젠펙 피크 면적비)이었다. 딜티아젠펙을 경구투여하고 얻은 딜티아젠펙의 혈중농도-시간 곡선으로부터 WinNolin을 사용하여 모텔비의존적방법으로 AUCinf, Cmax 및 Tmax를 구하였다.

### In vivo/In vitro correlation

In vitro 용출시험에서 얻은 파라미터(MDT, d)와 in vivo 흡수 실험에서 얻은 파라미터(AUCinf, Cmax 및 Tmax)와의 상관성을 선형회귀분석법을 이용하여 구하고 IVIVC를 평가하였다.

## 결과 및 고찰

### In vitro 용출시험 및 in vivo 흡수 실험

용출양상의 변화를 구분해 낼 수 있고 in vivo 양상을 예측가능한 용출조건을 확립하면 용출상태를 관찰함으로써 유효성분의 생체이용률에 영향을 주는 처방 및 제조공정의 여러가지 변동성을 관리할 수 있다.<sup>7-9)</sup>

IVIVC에서 in vitro 용출 특성을 나타내는 것은 용출율과 용출량으로<sup>10-14)</sup> MDT와 d 등이 사용되고 있고,<sup>15)</sup> in vivo 파라미터는 AUCinf, Cmax 및 Tmax 등이 사용되고 있다.

MDT(mean dissolution time)는 용출시험시 시간별 용출면적의 합을 초기 투여량으로 나눈 값을 말하는 것으로 아래와 같이 구한다.

$$MDT = \sum_{i=1}^n \frac{\Lambda}{t_i} \frac{M_i}{M_{\infty}}$$

$M_i$  = 각 시간에서 용출된 %

$M_{\infty}$  = 총 용출률(100 %)

$$\frac{\Lambda}{t_i} = (t_i + t_{i-1})/2$$

d 값은  $d_{50\%}$ ,  $d_{70\%}$  등을 많이 사용하는데 각 용출곡선에서 각 목적 약물이 각각 50%와 70% 용출될 때까지의 시간을 그래프에서 직접 구하였다. 용출양상의 유사도는 USP에서 권고하는 similarity factor ( $f_2$ )를 사용하였는데  $f_2$ 가 50~100이면 두 용출양상은 차이가 없다고 말할 수 있다.<sup>16)</sup>

In vitro 시험에서 IVIVC에 적합한 용출시험조건 및 파라미터를 찾고자 교반속도에 따른 효과, 용출기구에 따른 효과 및 용출액에 대한 효과를 실험하고 그 결과를 Table I-IV로 나타내었다. Tab F, Tab M 및 Tab S로 갈수록 용출이 느려졌다.

교반속도 및 용출기구에 따른 영향은 각각의 정제에서  $f_2$

**Table I**—Comparison of dissolution parameters as a function of stirring rates

	Tab F		Tab M		Tab S	
	50 rpm	100 rpm	50 rpm	100 rpm	50 rpm	100 rpm
MDT <sub>50%</sub>	2.0 ± 0.0	1.7 ± 0.6	3.5 ± 0.0	2.0 ± 0.2	5.5 ± 0.1	4.6 ± 1.4
<i>d</i> <sub>50%</sub>	2.3 ± 0.1	2.0 ± 0.1	3.3 ± 0.2	3.0 ± 0.2	4.4 ± 0.3	4.0 ± 0.4
MDT <sub>70%</sub>	5.9 ± 0.1	5.5 ± 0.5	10.9 ± 0.0	10.0 ± 1.1	21.4 ± 2.7	16.2 ± 1.9
<i>d</i> <sub>70%</sub>	3.6 ± 0.1	3.2 ± 0.2	5.6 ± 0.2	5.1 ± 0.3	8.1 ± 0.6	7.1 ± 0.2
<i>f</i> <sub>2</sub>	66.6		73.9		72.7	

Mean ± S.D.(n=6)

**Table II**—Comparison of dissolution parameters as a function of apparatus

	Tab F		Tab M		Tab S	
	App. I <sup>a</sup>	App. II <sup>b</sup>	App. I	App. II	App. I	App. II
MDT <sub>50%</sub>	2.0 ± 0.0	2.3 ± 0.5	3.5 ± 0.0	4.1 ± 0.8	5.5 ± 0.1	6.6 ± 1.3
<i>d</i> <sub>50%</sub>	2.3 ± 0.1	3.1 ± 0.4	3.3 ± 0.2	4.0 ± 0.6	4.4 ± 0.3	5.3 ± 0.3
MDT <sub>70%</sub>	5.9 ± 0.1	8.7 ± 1.6	10.9 ± 0.0	16.5 ± 2.0	21.4 ± 2.7	24.0 ± 2.3
<i>d</i> <sub>70%</sub>	3.6 ± 0.1	4.7 ± 0.7	5.6 ± 0.2	7.1 ± 0.9	8.1 ± 0.6	8.8 ± 0.5
<i>f</i> <sub>2</sub>	52.5		56.9		69.1	

Mean ± S.D.(n=6), <sup>a</sup>Basket method, <sup>b</sup>Paddle method

**Table III**—Comparison of dissolution parameters as a function of dissolution mediums

	Tab F			Tab M			Tab S		
	I <sup>a</sup>	II <sup>b</sup>	III <sup>c</sup>	I	II	III	I	II	III
MDT <sub>50%</sub>	3.1 ± 0.3	3.1 ± 0.3	2.0 ± 0.0	6.8 ± 0.8	4.7 ± 0.7	3.5 ± 0.0	17.0 ± 0.9	13.0 ± 1.9	5.5 ± 0.1
<i>d</i> <sub>50%</sub>	3.6 ± 0.1	3.2 ± 0.1	2.3 ± 0.1	5.8 ± 0.3	4.8 ± 0.1	3.3 ± 0.2	22.7 ± 0.2	8.0 ± 0.8	4.4 ± 0.3
MDT <sub>70%</sub>	13.8 ± 3.0	10.4 ± 1.8	5.9 ± 0.1	31.6 ± 11.2	22.8 ± 2.8	10.9 ± 0.0	46.3 ± 2.6	23.4 ± 2.1	21.4 ± 2.7
<i>d</i> <sub>70%</sub>	6.3 ± 0.3	5.1 ± 0.2	3.6 ± 0.1	20.0 ± 9.7	9.2 ± 0.3	5.6 ± 0.2	26.9 ± 0.3	14.1 ± 6.2	8.1 ± 0.6

Mean ± S.D.(n=6), <sup>a</sup>Simulated gastric fluid TS, <sup>b</sup>Simulated intestinal fluid TS, <sup>c</sup>Water

**Table IV**—Similarity factor(*f*<sub>2</sub>) evaluated by dissolution medium

	Tab F	Tab M	Tab S
I <sup>a</sup> / II <sup>b</sup>	51.4	54.7	46.1
II / III <sup>c</sup>	46.5	44.7	45.8
I / III	35.6	36.5	31.9

<sup>a</sup>Simulated gastric fluid TS, <sup>b</sup>Simulated intestinal fluid TS, <sup>c</sup>Water

가 50 이상으로 교반속도 및 용출기구에 따른 차이는 없음을 알 수 있었다. 용출액에 대한 영향은 simulated gastric fluid TS와 simulated intestinal fluid TS에서 Tab F와 Tab M에서의 용출양상을 구분할 수 없었으므로 세 종류의 정제에서 모두 차이를 구분할 수 있는 물이 적당하다고 생각되었다.

딜티아젠펙서방정을 비글전에 경구투여 한 후 혈중농도-시간 곡선으로부터 AUCinf, Cmax 및 Tmax를 구한 결과를 Table V에 나타내었다.

**Table V**—The pharmacokinetic parameters of diltiazem following oral administration(100 mg) of sustained release tablets in dogs

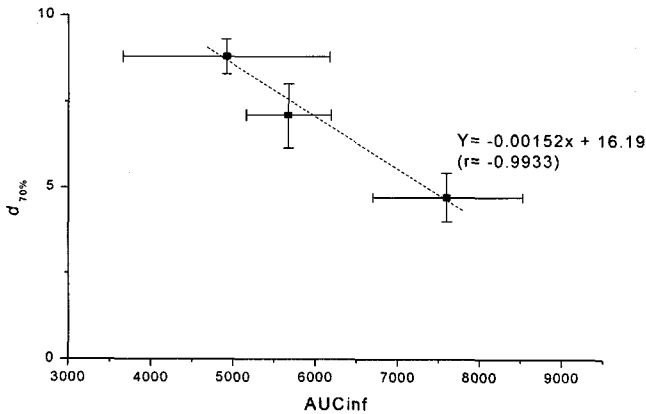
	Tab F	Tab M	Tab S
C <sub>max</sub> (ng/mL)	718.7 ± 225.6	383.4 ± 138.2*	371.7 ± 159.9
T <sub>max</sub> (hr)	4 ± 1	4 ± 3	3.13 ± 1.75
AUCinf (ng · hr/mL)	7591.6 ± 924.7	5668.5 ± 518.4**	4916.9 ± 1256.4

Mean ± S.E.(n=4)

\*p < 0.05 between Tab F and Tab M

\*\*p < 0.01 between Tab F and Tab M

용출 양상이 점점 느려지는 Tab F, Tab M 및 Tab S를 경구투여시 AUCinf는 각각 7591, 5668 및 4916 ng · hr/mL로 유의적으로 줄어들었고, Cmax도 718, 383 및 371 ng/mL로 유의적으로 줄어들었다. 딜티아젠펙을 정맥주사로 투여하고 정맥주사에 대한 각 정제의 상대생체이용율을 구했을 시 19.2, 13.3 및 11.6으로 마찬가지로 줄어드는 것을



**Figure 1**—The correlation between *in vitro* parameter and *in vivo* parameters.  $d_{70\%}$  was obtained under the dissolution condition, water as medium, 50 rpm as stirring rate and apparatus II method.

알 수 있었다. 위의 결과로 용출을 변화시킨 제제에 있어 용출이 느려짐에 따라 *in vivo* 파라미터인 AUCinf, Cmax가 유의성있게 줄어드는 것을 알 수 있었고 그 편차는 컸다. G. Bianchetti<sup>17)</sup>의 보고에 따르면 20명에게 딜티아젯 동일 용량을 투여하였을 때 혈중농도에 있어서는 10~15배의 차이를 보였다고 보고하였다. 이는 딜티아젯은 위장관으로부터 완전히 흡수되지만 개인간 간대사효능의 차이가 커 결과적으로 초회통과 효과에 차이가 나타났기 때문이다.<sup>18-19)</sup>

용출이 느려졌을 때 AUCinf가 유의성있게 줄어드는 것은 용출되어지는 약물의 양과 속도에 있어 차이가 있기 때문에 결과적으로 흡수되어진 약물의 양에 있어서 차이가 있을 수 있다고 생각된다. 빠르게 방출되는 제제의 경우는 초회통과의 포화로 인하여 약물의 제거가 적은 반면 느리게 방출되는 제제는 초회통과 효과가 커져 약물의 제거가 많아져서 AUCinf가 줄어들게 된다.

#### **In vivo/in vitro correlation**

*In vitro* 용출시험에서 얻은 파라미터인 MDT와 d 및 *in vivo* 흡수 실험에서 얻은 파라미터 중 유의성 있는 파라미터인 AUCinf와 Cmax를 가지고 상관성을 구하였을 때 용출액으로는 물, 용출시험기구는 II법, 교반속도는 50 rpm 일 때  $d_{70\%}$ 과 AUCinf에서 상관관계를 보임을 알 수 있었다 ( $r=-0.9933$ ). 위의 결과를 통하여 이 조건하에서 딜티아젯서 방정은 용출시험을 통하여 생체내 동태를 예측하는 것이 가능함을 알 수 있었다.

#### **결 론**

3가지의 용출양상이 다른 딜티아젯서방정을 가지고 *in*

*vitro* 용출시험과 *in vivo* 흡수시험을 실시하고 *in vitro* 실험에서 얻을 수 있는 인자와 *in vivo* 실험에서 얻을 수 있는 인자연구를 통하여 IVIVC을 시도하고자 하였다. *in vitro* 용출시험을 통하여 MDT와 d를 구하고 교반속도, 용출시험기구, 용출액에 따른 효과를 구하였을 때 교반속도 및 용출시험기구에 따른 효과는 볼 수 있었고 용출액은 물이 타당함을 알 수 있었다. 비글견을 대상으로 한 *in vivo* 흡수시험을 통하여 AUCinf 및 Cmax가 유의성 있게 달라짐을 알 수 있었다. *in vitro* 용출시험에서 얻은 파라미터인 MDT와 d 및 *in vivo* 실험에서 얻은 파라미터 AUCinf와 Cmax를 가지고 상관관계를 구하였을 때 용출조건으로는 물을 사용하고, 용출시험기구로는 II법, 교반속도가 50 rpm일 때  $d_{70\%}$ 과 AUCinf 사이에서 상관관계가 있음을 알 수 있었다( $r=-0.9933$ ). 위의 결과를 통하여 딜티아젯서방정은 위 조건하에서 용출시험을 통하여 생체이용률을 나타내는 AUCinf를 예측가능함을 알 수 있었다. 이러한 IVIVC 연구를 통하여 허가과정 뿐만 아니라 scale-up과 허가 후 변화에 요구되고 있는 생물학적동등성 시험을 대체가능한 수단으로 이용될 수 있을 것이라고 사료되었다.

#### **문 헌**

- 1) M. Zahirul I. Khan, Dissolution testing for sustained or controlled release oral dosage forms and correlation with *in vivo* data : challenges and opportunities, *Int. J. Pharm.*, **140**, 131-143 (1996).
- 2) Venkata ramana S. Uppoor M. Pharm., Ph. D., R. Ph., Regularoty perspectives on *in vitro* (dissolution)/*in vivo* (bioavailability) correlations, *J. Controlled release*, **72**, 127-132 (2001).
- 3) B. Sreenivasa Rao, A. seshasayana, S. V. Pardha saradhi, N. Ravi Kumar, Cheruvu P. S. narayan, K. V. Ramana Murthy, Correlation of *in vitro* release and *in vivo* absorption characteristics of rifampicin from ethylcellulose coated nonpareil beads, *Int. J. Pharma.*, **230**, 1-9 (2001).
- 4) Skelley, J. P., Amidon, G. L., Barr, W. J., Benet, L. Z., Carter, J. E., Robinson, J. R., Shah, V. P., Yacobi, A., Report of the workshop on *in-vitro in-vivo* testing and correlation for oral controlled modified-release dosage forms. *J. Pharm. Sci.*, **79**, 849-854 (1990).
- 5) Aristides Dokoumetzidis and Panos Macheras, A population growth models of dissolution, *Pharm. Res.*, **14**(9), 1122-1126 (1997).
- 6) Robert E. Wiens, Dennis J. Runser, Joseph P. Lacz, and Dan C. Dimmitt, Quantitation of diltiazem and desacetyldiltiazem in dog plasma by high-performance liquid chromatography, *J. Pharm. Sci.*, **73**(5), 688-689 (1984).
- 7) Nattee Sirisuth and Natalie D. Eddington, *In-vitro-in vivo*

- correlation definitions and regulatory guidance, *Int. J. Generic drugs*, ISSN 0793 758X US/canada
- 8) Nattee sirisuth and Natalie D. Eddington, *Vitro-in vivo* correlations, *Int. J. Generic drugs*, 250-258, ISSN 0793 694X-US/Canada
  - 9) Gordon L. Amidon, Hans Lennernas, Vinod P. Shah, and John R. Crison, A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: The correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability, *Pharm. Res.*, **12**(3), 413-420 (1995).
  - 10) FDA Guidance for industry: Immediate release solid dosage forms; scale-up and post approval changes (SUPAC-IR); chemistry, manufacturing and controls, *in vitro* dissolution testing and *in vivo* bioequivalence documentation, November, 1995.
  - 11) FDA Guidance for industry: modified release solid oral dosage forms; scale-up and post approval changes (SUPAC-MR); chemistry, manufacturing and controls; *in vitro* dissolution testing and *in vivo* bioequivalence documentation, september, 1997a.
  - 12) FDA Guidance for industry: Extended release oral dosage forms; development, evaluation and application of *in vitro*/*in vivo* correlation, september, 1997b.
  - 13) FDA Guidance for industry: Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms, August, 1997c.
  - 14) Vinod P. Shah, Yi Tsong, Pradeep Sathe, and Jea-Pei Liu, *in vitro* dissolution profile comparison-statistics and analysis of the similarity factor,  $f_2$ , *Pharm. Res.*, **15**(6), 1998.
  - 15) Bee-Hwan Chung and Chang-Koo Shim, Dissolution of theophylline from sustained-release dosage forms and correlation with saliva bioavailability parameters, *J. Pharm. Sci.*, **76**(10), 784-787 (1987).
  - 16) P. Costa, An alternative method to the evaluation of similarity factor in dissolution testing, *Int. J. Pharm.*, **220**, 77-83 (2001).
  - 17) G. Bianchetti, M. Regazzi, M. Rondanelli, V. Ascalone, M. Morselli, Bioavailability of diltiazem as a function of the administered dose., *Biopharm. Drug Disp.*, **12**, 391-401 (1991).
  - 18) E. U. Kolle, H. R. Ochs, K. O. Vollmer, Pharmacokinetic model of diltiazem. *Arzneim. Forsch./Drug Res.*, **33**, 972-977 (1983).
  - 19) Ph. Herman, S. D. Rodger, G. Remones, J. P. Thenot, D. R. London, P. L. Morselli, Pharmacokinetics of diltiazem after intravenous and oral administration. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **24**, 349-352 (1983).