

다이비스 정 (염산메트폴민 500 mg) 의 생물학적 동등성

최준식 · 박영진* · 박상목* · 범진필***

조선대학교 약학대학, *조선대학교 의과대학, **조선간호대학

(Received May 29, 2003; Revised August 18, 2003)

Bioequivalence of Dybis Tablet (Metformin Hydrochloride 500 mg)

Jun Shik Choi, Young Jin Park*, Sang Muk Park* and Jin Pil Burm***

College of Pharmacy, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea

*College of Medicine, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea

**Chosun Nursing College, Kwangju 501-140, Korea

Abstract — Metformin is an oral antihyperglycemic agent used in the therapy of noninsulin-dependent diabetes mellitus and does not cause hypoglycemia at the therapeutic dose. The purpose of the present study was to evaluate the bioequivalence of two metformin hydrochloride tablets, Glucophage tablet (DaeWoong Pharmaceutical Co., reference drug) and Dybis tablet (Shinpoong Pharmaceutical Co., test drug), according to the guidelines of Korea Food and Drug Administration (KFDA). Twenty-four normal volunteers, 26.6±4.01 years in age and 60.6±9.80 kg in body weight, were divided into two groups and a randomized 2×2 cross-over study was employed. After one tablet containing 500 mg of metformin hydrochloride was orally administered, blood was taken at predetermined time intervals and the concentrations of metformin hydrochloride in serum were determined using HPLC with UV detector. The pharmacokinetic parameters such as AUC_t, C_{max} and T_{max} were calculated and ANOVA test was utilized for the statistical analysis of the parameters. The results showed that the differences in AUC_t, C_{max} and T_{max} between two products were -1.05%, -6.76% and -4.51%, respectively, when calculated against the reference drug. The 90% confidence intervals using logarithmically transformed data were within the acceptance range of $\log 0.8 \leq \delta \leq \log 1.25$ (e.g., $\log 0.9082 \leq \delta \leq \log 1.0906$ and $\log 0.8188 \leq \delta \leq \log 1.0392$ for AUC_t and C_{max}, respectively). The 90% confidence intervals using untransformed data was within ±20% (e.g., -17.66% ≤ δ ≤ 8.63% for T_{max}). All parameters met the criteria of KFDA for bioequivalence, indicating that Dybis tablets (Shinpoong Pharmaceutical Co.) is bioequivalent to Glucophage tablets (DaeWoong Pharmaceutical Co.).

Keywords □ bioequivalence, dybis tablet, metformin hydrochloride tablet, cross-over study

염산메트폴민(metformin hydrochloride)은 인슐린 비의존성 당뇨병 치료제로서 장관내에서의 포도당 흡수억제, 간에서의 포도당 합성억제, 말초조직에서의 포도당 대사 촉진작용 등으로 직접적인 혈당강하 작용을 나타내는 제제이다. 염산메트폴민 500 mg 을 경구투여하였을 때 최고 혈중농도에 도달하는 시간은 약 2.40 ± 0.93시간이며, 반감기는 약 3.16 ± 0.47시간으로 보고되어 있다.¹⁾

신종제약의 다이비스 정이 대조약인 대웅제약의 글루코파지 정과 그 생체이용률에 있어서 통계학적으로 동등하다는 것을 입증하기 위해서 식품의약품안전청이 고시한 생물학적동등성시험기준²⁾에 따라 건강한 성인 남자(평균연령 26.6세) 24명을 대상

으로 라틴 방격법에 따라 시험하여 얻은 혈청 중 염산메트폴민 의 최고 혈중농도(C_{max}), 최고 혈중농도 도달시간(T_{max})과 혈중 약물농도-시간곡선하 면적(AUC_t)에 대하여 T_{max}를 제외한 대조약과 시험약의 비교평가항목인 AUC_t와 C_{max}의 로그변환치를 생물학적동등성시험 통계처리용 프로그램 Equiv. Test³⁾를 이용하여 δ(유의수준)=0.05에서 분산분석을 실시하였다.

실험 방법

시약 및 기기

의약품임상시험관리기준의 규정에 따라 시험약인 신종제약의 다이비스 정(염산메트폴민 500 mg, 제조번호 : DYBIT-2006, 유통기한 : 2002. 06. 26)과 대조약인 대웅제약의 글루코파지 정(염산메트폴민 500 mg, 제조번호 : 023902, 유통기한 : 2004. 12.

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화: 062-231-7361 (팩스) 062-232-9072
(E-mail) jpburm@venus.cnc.ac.kr

11)이 제조허가되어 시판될 때와 동일한 원료, 동일한 처방, 동일한 조건으로 제조한 것으로 품질·함량 등이 자가시험 기준에 적합한 최종 완제품을 신폴제약으로부터 필요량을 공급받아 시험에 사용하였으며, 의약품임상시험관리기준의 규정에 따라 시험약 및 대조약의 표시 및 관리를 행하였다. 염산메트폴민 표준품과 내부표준물질인 염산펜폴민(phenformin hydrochloride)은 신폴제약으로부터 얻어 사용하였으며, HPLC용 메탄올과 아세트니트릴(J. T. Baker Co., USA), 생리식염수, 헤파린(중외제약, 한국)을 사용하였고, 황산아연, 에틸렌글리콜 및 기타 시약들은 특급 및 1급 시약들을 그대로 사용하였다. HPLC System은 Shimadzu (Kyoto, Japan)의 liquid chromatograph pump(LC-10AD), auto-injector(SIL-10A), UV-Vis detector(SPD-10A) 그리고 Communications Bus Module(CBM-10A)을 사용하였고, vortex mixer는 Scientific Industries(Bohemia, N.Y.) 그리고 원심분리기는 Abbot(TM, U.S.A) 기기를 사용하였다.

피험자 선정

생물학적동등성시험 지원자 모집공고를 통하여 조선대학교에 재학중인 22~39세의 건강한 성인으로서 과거에 소화기계, 간장, 신장, 심혈관계, 중추신경계, 내분비계 및 혈액질환의 병력이 없고 현재 타 약물을 복용하고 있지 않은 지원자를 26명을 모집하였다. 지원자에 대한 건강진단 조선대학교 부속병원에서 문진과 내과적인 진찰을 받고 임상병리검사를 실시하여 생물학적동등성 시험기준에 따라 선정기준에 모두 합당하고 제외기준에 해당되지 않는 자로서 생물학적동등성시험에 적합한 건강한 사람으로 판정된 24명을 피험자로 선정하였다. 피험자로 최종 선정된 사람은 평균체중 60.6 ± 9.80 kg, 평균연령 26.6 ± 4.01 세의 건강한 지원자였으며, 이들로부터 동의서를 받은 후 생물학적동등성 시험을 실시하였다. 투약 12시간 전부터 체혈종료시까지 피험자의 운동, 식사, 흡연, xanthine계 음료 및 음주 등을 제한관리하였다.

약물투여 및 혈액채취

24명의 피험자를 군당 12명씩 무작위로 2군으로 나누고 제I군에는 대조약인 대웅제약의 굴루코파지 정을, 제2군에는 시험약으로 신폴제약의 다이비스 정을 동일투약일에 투약하고, 제II군에는 그 반대로 투약하였으며, 투약량은 각 제제 모두 1정(염산메트폴민 500 mg)을 1회 경구투약하였다. 피험자들의 상완 정맥부위에 three-way cock을 설치하고 대조약과 시험약 각 1정(염산메트폴민 500 mg)을 물 240 ml와 함께 투약하였다. 체혈은 투약직전과 투약 후 0.5, 1, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 6, 9, 12 및 24 시간에서 약 5 ml의 혈액을 채취하여 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 혈청을 취하여 분석시까지 -70°C 에서 보관하였다. 시험 전과정을 통하여 피험자 개개인의 상태를 관찰하여 증례기

록서에 기록하였으며, 체혈이 끝난 후에는 담당의사에 의해 혈액, 맥박, 기타 이상 유무를 확인하였다. 염산메트폴민의 최종상 생물학적 반감기는 3.16 ± 0.47 시간으로 보고되어 있고 24시간 이후에는 혈장중에서 거의 검출되지 않아 AUC_{0-18} , AUC_{0-24} 및 AUC_{0-30} 이 동일하게 나타나며 $AUC_{0.8}$ 까지가 $AUC_{0-\infty}$ 까지의 78.8%를 차지하고 있다는 보고되어 있어¹⁾ 충분한 휴약기간을 두고자 1주일 후에 제II기 시험을 제I기 투약 및 시험과 동일하게 실시하였다.

혈청중 염산메트폴민 정량

검체처리와 분석은 Bonfigli 등⁴⁾과 Yuen 및 Huupponen 등의 방법^{5,6)}을 다소 수정한 Cho 등의 방법⁷⁾으로 정량하였다. UV 236 nm에서, 컬럼은 Nucleosil column(4.6 mm \times 125 mm, particle size 5 μm)을, 이동상으로는 Acetonitrile : Water : Methanol = 45 : 45 : 10(v/v/v%)을 함유한 용매 1 liter 중에 15 mmol KH_2PO_4 (pH 3.8)를 가하였으며, 유속은 1.5 ml/min로 하여 정량하였다. 염산메트폴민 표준품을 50% 메탄올 용액에 녹여 메트폴민으로서 농도가 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되도록 만든 후 냉장 보관시키고, 이 용액을 냉동 보관하였던 blank 혈청으로 희석하여 염산메트폴민의 농도가 각각 0, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 및 2000 ng/ml 농도가 되도록 표준시료를 만들었다. 각각의 표준혈청 200 μl 에 내부표준물질로 염산펜폴민(phenformin hydrochloride)을 사용하여 -20°C 에 냉동 보관하였던 내부표준물질 수용액(펜폴민으로서 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 50 μl 와 메탄올 100 ml에 0.5 g ZnSO_4 와 1 ml의 에틸렌글리콜(ethylene glycol)을 함유한 액 200 μl 를 가하고 30초간 vortexing하였다. 이것을 10,000 g에서 10분간 원심분리시킨 후 상층 300 μl 를 취하고 여기에 탈이온수 300 μl 를 혼합한 액 50 μl 를 Auto-injector를 이용하여 HPLC에 주입하였다. 이렇게 시행하여 얻은 검량선은 좋은 직선성($r=0.999$)을 나타내었다. 하루에 실험을 5번 시행하여 일내 재현성을 구하고 연속하여 4일간 실험을 행하여 일간 재현성을 구하였다. 혈청 시료를 실온에 방치하여 녹인 후 이 혈청 200 μl 를 취하여 시험관에 옮기고 검량선 작성 방법과 동일한 방법으로 전처리한 후 HPLC에 주입하여 얻어진 크로마토그램으로부터 내부표준물질의 피이크면적에 대한 염산메트폴민의 피이크면적비를 구하여 미리 작성한 검량선으로부터 혈청 중 염산메트폴민의 농도를 구하였다.

생물학적동등성 파라메타의 산출

각 피험자의 AUC_t 값은 약물 투여 후 24시간까지의 각 피험자의 혈청 중 약물농도-시간곡선들로부터 사다리꼴 공식에 의해 구하였다. C_{max} 는 각 피험자의 혈청 중 약물농도-시간곡선으로부터 가장 높은 혈청 중 농도를 읽은 값을 사용하였으며, T_{max} 는 각 피험자의 혈장 중 약물농도-시간 곡선으로부터 최고혈장 중 약물농도에 도달하는 시간을 읽은 값을 사용하여 Equiv. Test

Program³⁾을 이용하여 분석하였다.

생물학적동등성 통계처리

식품의약품안전청 생물학적동등성시험기준에 따라 시험약과 대조약간의 생물학적동등성 평가를 위한 비교항목은 AUC_t와 C_{max}로 하였으며 T_{max}은 참고값으로 하였다. T_{max}를 제외한 대조약과 시험약의 비교평가항목의 로그변환치를 생물학적동등성 시험 통계처리용 프로그램을 이용하여 α(유의수준)=0.05에서 분산분석을 실시하였다.

실험결과 및 고찰

혈청중 염산메트포르민 정량

주체를 처리하여 HPLC로 분석하였을 때 얻어진 크로마토그램은 Fig. 1과 같았으며, 염산메트포르민 피이크의 유지시간은 약 13분, 내부표준물질 피이크의 유지시간은 약 10분이었고, 분석조건에서 염산메트포르민 및 내부표준물질은 기타 혈청성분들과 잘 분리되었다. 혈청시료로부터 구한 염산메트포르민의 검량선의 계산식은 피이크면적비=0.00141×메트포르민농도+0.0068(r=0.999)로 10-2000 ng/ml 범위에서 양호한 직선성을 나타내었다. 이 농도범위에서 염산메트포르민의 일내 및 일간 변동계수(CV)는 12.14% 이하로 모두 20% 이하로 나타났다. 이로부터 혈청중 염산메트포르민에 대한 본 HPLC 분석법은 인체에 대한 생체이용률 시험에 이용될 수 있는 충분한 감도, 직선성, 정확성 및 정밀성을 갖고 있음을 알 수 있었다.

혈청중 염산메트포르민의 농도추이

각 피험자에게 대조약 및 시험약을 투여한 후 구한 시간별 혈

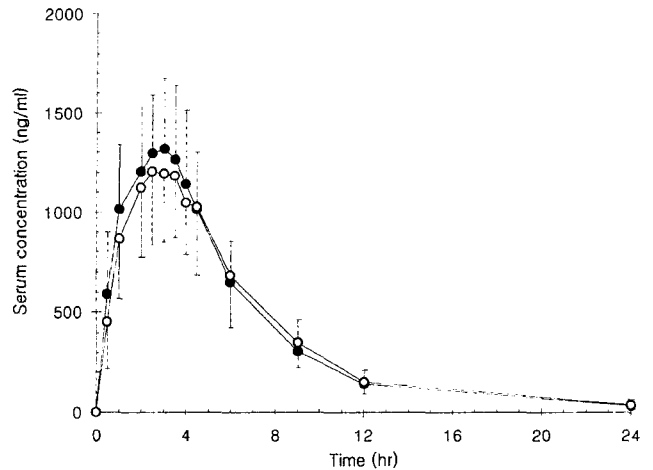


Fig. 2 – Serum concentration-time curves of metformin following oral administration of reference (●) and test drug (○) at the metformin hydrochloride dose of 500 mg. Data are expressed as mean±S.D. (n=24).

청중 평균 농도를 Fig. 2에 나타내었으며 또한 각 피험자에게 대조약 및 시험약을 투여하여 얻은 혈청중 약물농도-시간곡선으로부터 산출한 AUC_t, C_{max} 및 T_{max}를 Table I에 나타내었다. 대조약의 평균 AUC_t는 9104.5±2290.9 ng·hr/ml, 시험약은 9009.0±1982.5 ng·hr/ml으로 대조약에 대한 평균치 차가 -1.05%이었고, C_{max}는 1441.5±325.0 ng/ml, 시험약은 1344.1±351.9 ng/ml으로 -6.76%의 차이를 보였으며, T_{max}는 2.77±0.75 hr, 시험약은 2.65±0.80 hr으로 -4.51%의 차이를 나타내었다. 이는 대조약에 대한 시험약의 평균치의 차이가 대조약의 ±20% 이내에 들어야 한다는 식품의약품안전청이 고시한 생물학적 동등성 판정기준의 전제조건을 만족시키는 값이므로 이하 분산분석을 행하였다.

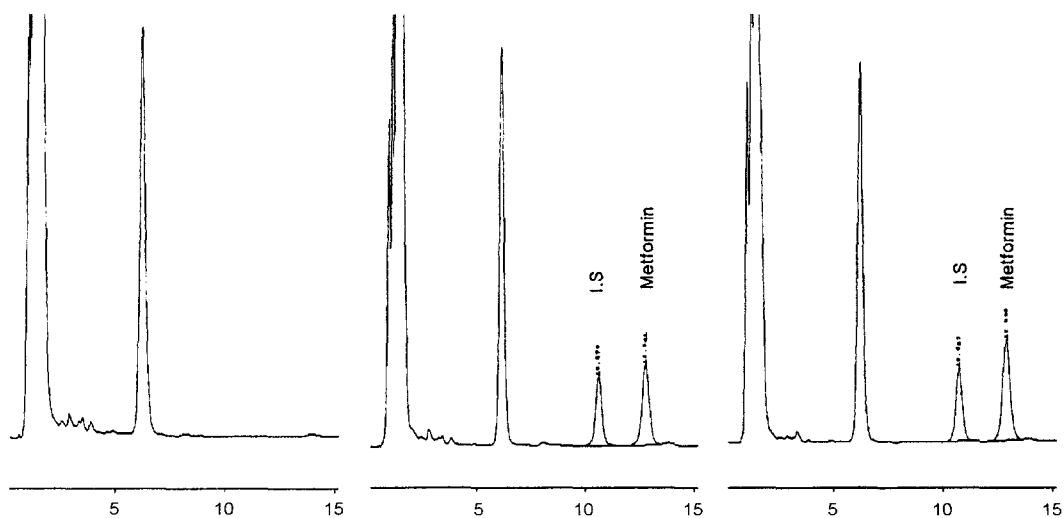


Fig. 1 – Chromatogram of (Left) blank human serum, (Middle) blank human serum spiked with metformin (1000 ng/ml) and internal standard (IS, 2 µg/ml) and (Right) serum sample at 2 hr after oral administration of 500 mg metformin hydrochloride tablet.

Table I – Pharmacokinetic parameters of metformin tablets for each volunteers

Volunteers	AUC _t (ng · hr/ml)				C _{max} (ng/ml)				T _{max} (hr)	
	Reference drug		Test drug		Reference drug		Test drug		Reference drug	Test drug
	AUC _t	logAUC _t	AUC _t	logAUC _t	C _{max}	logC _{max}	C _{max}	logC _{max}	T _{max}	T _{max}
A1	7600.6	8.936	8340.7	9.029	1249.4	7.130	1194.8	7.086	3.0	3.5
A2	9908.9	9.201	7894.5	8.974	1585.1	7.368	919.9	6.824	2.5	3.0
A3	14314.6	9.569	13027.8	9.475	2096.8	7.648	2056.5	7.629	3.0	3.0
A4	9801.9	9.190	12110.2	9.402	1408.5	7.250	1879.9	7.539	4.0	2.0
A5	6344.3	8.755	10295.2	9.239	1169.3	7.064	1963.6	7.583	1.0	2.5
A6	10766.5	9.284	6100.0	8.716	1504.8	7.316	641.3	6.463	2.5	1.0
A7	7768.7	8.958	7916.2	8.977	1156.4	7.053	1527.8	7.332	3.0	3.5
A8	13735.6	9.528	8381.9	9.034	2094.6	7.647	1256.5	7.136	3.0	3.5
A9	8556.7	9.054	8576.2	9.057	1340.5	7.201	1327.0	7.191	2.5	2.0
A10	5376.8	8.590	6180.9	8.729	851.4	6.747	1048.3	6.955	3.0	2.0
A11	13830.2	9.535	8712.5	9.073	2015.6	7.609	1096.6	7.000	3.0	4.5
A12	8498.7	9.048	12921.6	9.467	1211.3	7.099	1772.0	7.480	3.5	3.5
B1	6968.7	8.849	7367.4	8.905	1378.5	7.229	1415.9	7.256	2.5	3.0
B2	10390.9	9.249	10736.3	9.281	1754.0	7.470	1648.4	7.408	2.0	2.5
B3	7167.1	8.877	7006.9	8.855	1136.5	7.036	1173.0	7.067	2.0	1.0
B4	8241.8	9.017	7743.5	8.955	1423.7	7.261	1013.8	6.921	3.5	2.0
B5	8291.5	9.023	7824.7	8.965	1216.0	7.103	897.2	6.799	3.0	2.5
B6	7881.8	8.972	7030.8	8.858	1140.1	7.039	1164.5	7.060	4.0	3.0
B7	9989.9	9.209	8298.5	9.024	1700.0	7.438	1153.7	7.051	3.0	3.0
B8	10363.6	9.246	11455.9	9.346	1742.2	7.463	1605.9	7.381	3.5	2.0
B9	8145.6	9.005	8272.3	9.021	1580.5	7.365	1446.4	7.277	1.0	3.0
B10	7735.9	8.954	10426.8	9.252	1159.8	7.056	1429.2	7.265	2.5	2.5
B11	8994.6	9.104	10412.9	9.251	1370.3	7.223	1374.4	7.226	3.0	2.5
B12	7834.3	8.966	9182.5	9.125	1309.9	7.178	1250.6	7.131	2.5	2.5
Mean	9104.5	9.088	9009.0	9.084	1441.5	7.250	1344.1	7.169	2.77	2.65
S.D	2290.9	0.239	1982.5	0.214	325.03	0.221	351.90	0.273	0.75	0.80

평가항목에 대한 통계학적 고찰

분산분석의 결과(Table II 및 III)는 로그변환한 AUC_t 및 C_{max} 각 비교항목에 있어서 유의수준 $\alpha=0.05$ 에서 군/순서효과는 나

타나지 않았으며, F검정결과 교차시험이 제대로 이루어졌음을 확인할 수 있었다.

통계처리결과(Table IV) 로그변환한 AUC_t 평균치 차의 90%

Table II – ANOVA analysis of AUC_t

	Df	SS	MS	F	P-value
Inter-Subjects					
Carry-over	1	0.0474	0.0474	0.6688	0.4222
Residuals	22	1.5608	0.0709	2.0823	0.0462
Intra-Subjects					
Drug	1	0.0002	0.0002	0.0077	0.9306
Period	1	0.0147	0.0147	0.4342	0.5167
Residuals	22	0.7495	0.0340		
Total	47	2.3729			

$\alpha=0.05$, F(1, 22)=4.301.

Table III – ANOVA analysis of C_{max}

	Df	SS	MS	F	P-value
Inter-Subjects					
Carry-over	1	0.0087	0.0087	0.1234	0.7286
Residuals	22	1.5581	0.0708	1.2253	0.3188
Intra-Subjects					
Drug	1	0.0780	0.0780	1.3500	0.2577
Period	1	0.0002	0.0002	0.0037	0.9519
Residuals	22	1.2715	0.0577		
Total	47	2.9167			

$\alpha=0.05$, F(1, 22)=4.301.

Table IV – Statistical results of bioequivalence test between two metformin tablet^a

	Parameters		
	AUC _t	C _{max}	T _{max}
Difference	-1.05%	-6.76%	-4.51%
Test/Reference point estimate	-0.0149	-0.0170	0.0577
Confidence interval ^b	log0.9082≤δ≤log1.0906	log0.8188≤δ≤log1.0392	-17.66%≤δ≤8.63%

^aThe AUC_t and C_{max} values were calculated on the basis of log-transformed data, and T_{max} values on the basis of untransformed data.

^b $\alpha=0.05$.

신뢰구간이 $\log 0.9082 \leq \delta \leq \log 1.0906$ 로서 $\log 0.8$ 에서 $\log 1.25$ 이 내에 들어야 한다는 기준을 만족시켰으며, 로그변환한 C_{\max} 평균치 차의 90% 신뢰구간이 $\log 0.8188 \leq \delta \leq \log 1.0392$ 로서 $\log 0.8$ 에서 $\log 1.25$ 이내에 들어야 한다는 기준을 만족시켰다. T_{\max} 평균치 차의 90% 신뢰구간이 $-17.66\% \leq \delta \leq 8.63\%$ 로서 $-20\% \leq \delta \leq 20\%$ 이어야 한다는 기준을 만족시켰다. 따라서 두 제제는 평가항목 AUC_t 및 C_{\max} 와 참고값인 T_{\max} 모두 식품의약품안전청이 고시한 생물학적으로 동등하다고 판단되었다.

결 론

AUC_t , C_{\max} 및 T_{\max} 각 비교항목에 있어서 그 평균값의 차이가 각각 -1.05%, -6.76% 및 -4.51%로 모두 $\pm 20\%$ 이내에 들어 생물학적 동등성 판정기준의 전제조건을 만족하였다.

분산분석의 결과는 로그변환한 AUC_t 및 C_{\max} 각 비교항목에 있어서 유의수준 $\alpha=0.05$ 에서 군/순서효과는 나타나지 않았으며, F검정결과 교차시험이 제대로 이루어졌음을 확인할 수 있었다.

로그변환한 AUC_t 및 C_{\max} 평균치 차의 90% 신뢰구간이 $\log 0.9082 \leq \delta \leq \log 1.0906$ 및 $\log 0.8188 \leq \delta \leq \log 1.0392$ 으로 $\log 0.8$ 에서 $\log 1.25$ 이내에 들어야 한다는 조건을 만족하였으며, 참고값인 T_{\max} 평균치 차의 90% 신뢰구간도 $-17.66\% \leq \delta \leq 8.63\%$ 로 $\pm 20\%$ 이내에 들어 조건을 만족하였다.

따라서 두 제제는 평가항목 AUC_t 및 C_{\max} 와 참고값인 T_{\max} 모두 식품의약품안전청이 고시한 생물학적으로 동등하다고 판단되었다.

감사의 말씀

본 연구는 신풍제약 주식회사의 지원을 받아 조선대학교 약학연구소에서 수행하였으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Caille, G., Lacasse, Y., Raymond, M., Landriault, H., Perrotta, M., Picirilli, G., Thiffault, J. and Spenard, J. : Bioavailability of metformin in tablet form using a new high pressure liquid chromatography assay method. *Biopharm. Drug Disposit.* **14**, 257 (1993).
- 2) 식품의약품안전청 고시 제2002-60호, 생물학적동등성시험기준, 식품의약품안전청 (2002. 11. 22).
- 3) Statistical solutions Ltd., Equiv. Test[®] 1.0, U.K. (1998).
- 4) Bonfigli, A. R., Manfrini, S., Gregorio, F., Testa, R., Testa, I., Sio, G. D. and Coppa, G. : Determination of plasma metformin by a new cation-exchange HPLC technique. *Ther. Drug Monit.* **21**, 330 (1999).
- 5) Yuen, K. H. and Peh, K. K. : Simple high-performance liquid chromatographic method for the determination of metformin in human plasma. *J. Chromatography* **710**, 243 (1998).
- 6) Huupponen, R., Ojala-Karlsson, P., Rouru, J. and Koula, M. : Determination of metformin in plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography* **583**, 270 (1992).
- 7) Cho, H. Y., Moon, J. D. and Lee, Y. B. : Bioequivalence of Glycomin tablet to Glucophage tablet (Metformin HCl 500 mg). *J. Kor. Pharm. Sci.* **32**, 223 (2002).