

메바코 정 (로바스타틴 20 mg)에 대한 로바로드 정의 생물학적 동등성

송우현 · 김정민 · 조성완 · 김재현* · 임종래* · 신희종* · 최영욱†

중앙대학교 약학대학, *종근당 종합연구소

(1998년 10월 22일 접수)

Bioequivalence of Lovaload Tablet to Mevacor Tablet (Lovastatin 20 mg)

Woo Heon Song, Jung Min Kim, Seong Wan Cho, Jae Hyun Kim*,
Jong Lae Lim*, Hee Jong Shin* and Young Wook Choi†

College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

*Research Institute, Chong Kun Dang Corp., Chungnam 330-830, Korea

(Received October 22, 1998)

Lovastatin, one of the potent cholesterol-lowering agents, is an inactive lactone prodrug which is metabolized to its active open acid, lovastatin acid (LVA). Bioequivalence study of two lovastatin preparations, the test drug (Mevacor®: Chungwae Pharmaceutical Co., Ltd.) and the reference drug (Lovaload®: Chong Kun Dang Pharmaceutical Co., Ltd.), was conducted according to the guidelines of Korea Food and Drug Administration (KFDA). Fourteen healthy male volunteers, 23.9±3.9 years old and 67.6±8.0 kg of body weight in average, were divided randomly into two groups and administered the drug orally at the dose of 160 mg as lovastatin in a 2×2 crossover study. Plasma concentrations of lovastatin acid were analysed by HPLC method for 12 hr after administration. The extent of bioavailability was obtained from the plasma concentration-time profiles of total lovastatin acid after alkaline hydrolysis of the plasma samples. By alkaline hydrolysis, trace amounts of unmetabolized lovastatin were converted to lovastatin acid. The AUC_{0-12hr} was calculated by the linear trapezoidal rule method. The C_{max} and T_{max} were compiled directly from the plasma drug concentration-time data. Student's t-test indicated no significant differences between the formulations in these parameters. Analysis of variance (ANOVA) revealed that there were no differences in AUC, C_{max}, and T_{max} between the formulations. The apparent differences between the formulations were far less than 20% (e.g., 7.07, 5.77 and 1.18% for AUC, C_{max}, and T_{max}, respectively). Minimum detectable differences(%) between the formulations at $\alpha=0.05$ and $1-\beta=0.8$ were less than 20% (e.g., 17.2, 15.1, and 15.9% for AUC, C_{max}, and T_{max}, respectively). The 90% confidence intervals for these parameters were also within ±20% (e.g., -5.20~19.3, -5.00~16.5, and -10.2~12.5% for AUC, C_{max}, and T_{max}, respectively). These results satisfied the bioequivalence criteria of KFDA guidelines, indicating that the two formulations of lovastatin were bioequivalent.

Keywords—Bioequivalence, Lovastatin, Lovaload®, Mevacor®, Lovastatin acid, HPLC

로바스타틴(1', 2', 6', 7', 8a-hexahydro-3,5-dihydroxy-2', 6-dimethyl-8-(2-methyl-1''-oxobutoxy)-1-naphthalene heptanoic acid 5-lactone)은 경구용 고지혈증치료제로서 심바스타틴, 프라바스타틴, 및 메바스타틴 등과 함께 체내 콜레스테롤 합성의 초기 율속 단계과정을 촉매하는 3-hydroxy-3-methyl glutaryl

coenzyme A(HMG-CoA) reductase의 상경적 저해제이다.¹⁾ 로바스타틴은 불활성형 락톤 프로드럭으로서 경구투여후 간 마이크로솜 분획의 cytochrome-3A 효소군에 의해 가수분해되어 락톤환이 개환된 β -hydroxy acid 형태의 로바스타틴산이 형성되어 약리작용을 나타낸다.²⁻⁴⁾ 로바스타틴은 경구투여시 약 30%정도 흡수되며, 단백질합률은 95%이상이며, 간에서 대사되어 로바스타틴산이외의 다수의 대사물이 생성된다. 경구 투여

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

후 배설은 주로 담즙을 통해 이루어지며, 72시간 후 분변으로 83%, 그리고 뇨중으로 10%가 배설된다.¹⁾ 한편, 로바스타틴은 투여 후 순환혈액중에서 모약물 및 활성대사체인 로바스타틴산이 공존한다.^{5,7)} 혈장시료중 로바스타틴은 매우 불안정하여 시료보관중 또는 시료전처리과정에서 가수분해에 의해 로바스타틴산으로 변하여, 이로 인하여 정확한 로바스타틴 및 로바스타틴산의 혈장중 농도의 산출이 용이하지 않다. 따라서, 강알칼리를 가함으로써 혈장시료중의 로바스타틴을 전량 로바스타틴산으로 변환시킴으로써 로바스타틴산만을 정량하는 방법이 보고되어 있다.⁸⁾

본 연구에서는 시험 제제인 종근당에서 제조한 로바로드 정과 기존의 시판제제인 중외제약의 메바코 정 의 생물학적 동등성을 평가하고자 식품의약품안전청고시⁹⁾에 따라 로바로드 정과 메바코 정을 건강한 성인 14인에게 라틴방격법에 따라 경구투여한 후 활성대사체인 로바스타틴산의 혈장농도를 관찰하였는데, 이때 혈장중에 공존하는 로바스타틴을 강알칼리 가수분해반응에 의해 로바스타틴산으로 변환시켜서 총 로바스타틴산으로서 정량하였다. 이로부터 구한 최고 혈장중 농도(C_{max}), 최고 혈장중 농도 도달시간(T_{max}), 및 혈장중 약물 농도-시간 곡선하 면적 (AUC)에 대해 분산분석을 행하였다. 이 시험은 식품의약품안전청으로부터 시험계획서의 승인을 얻어 합법적으로 시행되었으며, 모든 피험자의 동의를 받아 이루어졌다.

실험방법

시약 및 기기

시험약으로는 조건부 생산허가를 받은 종근당의 로바로드 정(제조번호: QA001R, 제조일자: 1997. 6. 20)을, 대조약으로는 중외제약의 메바코 정(제조번호: AVG6CV, 제조일자: 1996. 11. 5)을 사용하였으며, 이들은 각각 1정 중에 로바스타틴 20 mg을 함유하는 것으로 표시되어 있다. 로바스타틴 및 로바스타틴산 압모늄염의 표준품은 종근당으로부터 공급받아 사용하였다. HPLC용 아세토니트릴과 메탄올(J.T. Baker Co., U.S.A), 그리고 헤파린(중외제약, 한국)을 사용하였으며, 인산나트륨, 인산, 염산, 및 수산화나트륨 등의 시약들은 특급 및 1급 시약들을 사용하였다.

기기로는 HPLC 시스템(TSP, USA, 펌프: P4000 Quat gradient pump, UV 검출기: UV1000, 적분기: PC1000 integrating system), 주입기(250 μ l,

Hamilton, USA), C_{18} -역상컬럼(5 μ m, 4.6 mm \times 25 cm, Capcell Pak, Shiseido, Japan), 고상추출기(SPE 12G, J.T. Baker, USA), C_{18} 고상추출 카트리 지(Sep-Pak plus, Waters, USA), 농축기(MSG 200E, EYELA, Japan), vortex mixer(G-560, Scientific Industries, INC, USA), 원심분리기(Union55R, Hanil Scientific Industrial, Korea), 미량원심분리기(5415C, Eppendorf, Germany), 냉동기(Model ULT 2586-5-D14, REVCO, USA), 및 pH 측정기(Model 620, Orion, Japan)를 사용하였다.

피험자 선정

소정 양식의 공고를 통하여 중앙대학교 약학대학에 재학중이거나 종근당에 근무중인 20-40세의 건강한 성인 남성 지원자로서 해당 연령의 평균체중과의 차이가 $\pm 10\%$ 이내인 사람 20명을 모집하였다. 모집한 지원자들은 식품의약품안전청 고시 96-16호 생물학적동등성 시험기준 제 9조 제 3항에 의하여 혈액병리검사(lymphocytes, monocytes, eosinophils, hemoglobin, hematocrit, WBC, 및 platelet), 혈액화학검사(fasting sugar, BUN, creatinine, total protein, albumin, sGOT, sGPT, alkaline phosphatase, bilirubin, 및 cholesterol), 요검사(specific gravity, color, pH, glucose, protein, bilirubin, RBC, WBC, ketone), 및 검진(선천성 또는 만성질환이 없고 내과적인 진찰결과 병적증상 또는 소견이 없을 것)과 같은 항목에 대해 성병병원(서울시 영등포구 신길동 소재)에서 전문의사의 건강진단을 실시하였다.

건강진단 결과 지원자중 정상값을 벗어나는 사람을 제외하고 건강인으로 판명된 자 14명을 피험자로 선정하였다. 피험자 14명은 연령 23.9 ± 3.9 세, 신장 173.5 ± 3.6 cm, 체중 67.6 ± 8.0 kg 이었으며, 피험자들에게 시험의 내용과 예측될 수 있는 부작용에 대하여 설명한 후 피험자 전원으로부터 생물학적동등성 시험 참가 동의를 받았다.

본 시험 개시 1개월전부터 지원자 14명에 대하여 바르비탈류 약물 등의 약물대사효소 유도 약물의 복용이나 과도한 음주를 하지않도록 주의시켰으며, 시험개시 1주일 전부터는 모든 약물과 알콜이나 커피의 복용을 금지시켰다. 시험전날에는 피험자 14명에 대하여 음식으로 인한 영향을 배제하기 위하여 동일한 저녁식사를 하였으며, 시험 시작시간인 오전 8시까지 공복 상태를 유지하도록 하였다.

약물 투여 및 혈액채취

라틴방격법에 따른 교차시험법으로 투약계획을 수립하고 투약할 피험자 14인을 군당 7인씩 임의로 나누었다. 제 1기 제 1군에는 대조약인 중의제약의 메바코 정을 제 2군에는 중근당에서 제조한 시험약인 로바로드 정을 투여하고 제 II 기에는 그 반대로 투여하였다. 피험자에 대한 투약은 오전 8시에 시험약과 대조약 각각 8정(로바스타틴 160 mg)을 제 1군 7명과 제 2군 7명의 피험자에게 물 200 ml와 함께 경구투여하였다. 한편, 로바스타틴의 반감기가 문헌⁵⁾에 의하면 3~6시간으로 나타나 생물학적동등성 시험기준⁹⁾ 휴약기간의 산정기준에 따라 반감기의 최소 3배 이상의 기간을 충분히 확보하여 본 시험에서는 1주일을 휴약기간으로 하였다.

시험 개시시간인 오전 8시까지 시험책임자, 시험담당자, 채혈관리 2인, 및 보조원 3인이 대기하여 투약 및 채혈 준비를 완료한 후, 피험자들 모두에게 three-way cock을 연결한 I.V. 카테터(D&B-Cath[®], 20 G, (주)신동방의료)를 팔 또는 손등의 정맥부위에 설치하였다. 각 피험자로부터 투약직전, 그리고 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8, 및 12시간의 11시점으로 하여 매 시점마다 5 ml씩 채혈하였다. 채취된 혈액은 혈액용 플라스틱 튜브에 약 5분간 방치한 다음 1000g에서 15분간 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 다음 혈장만을 플라스틱 튜브에 옮기고 이 튜브를 영하 20°C 이하의 deep freezer에 넣어 분석시까지 보관하였다. 채혈이 끝난 후에는 채혈시에 있을 수 있는 오염에 의한 위험을 방지하기 위하여 모든 피험자들에게 항생제(아목시실린 500 mg)를 투여하였다.

혈장중 로바스타틴산의 정량

로바스타틴산 암모늄염을 pH 7.2 인산완충액에 녹여 표준용액을 제조한 다음, 혈장 0.9 ml에 제조한 표준용액 0.1 ml을 가하여 혈장중 최종농도가 3, 5, 10, 20, 50, 및 100 ng · ml⁻¹이 되도록 한 후, 3초간 vortexing하여 혼합하였다. 미리 메탄올 5 ml와 증류수 5 ml로 세척한 C₁₈-고상추출 카트리지에 혈장시료를 주입하고, pH 7.2 인산완충액 6 ml 및 아세트니트릴과 pH 7.2 인산완충액 혼합액(20:80 v/v) 3 ml로 세척한 후 메탄올과 아세트니트릴 혼합액(25:75 v/v) 2 ml로 혈장중의 로바스타틴산을 추출하였다. 추출한 시료를 40°C에서 질소가스로 증발농축시키고, 아세트니트릴-pH 3.0 인산완충액 혼합액(50:50 v/v) 1 ml로 재조제한 다음, 1N-NaOH 0.1 ml을 가해 50°C에서 1시간동안 보관하였다. 1N-HCl 0.1 ml을 가해 중성

으로 pH를 조정하고, 0.45 μm Millipore membrane filter로 여과한 후, 시료 100 μl를 HPLC에 주입하여 분석하여 얻은 크로마토그램의 피크면적으로부터 로바스타틴산의 농도를 횡축에 플로트하여 검량선을 작성하였다.

한편, 혈장 시료 분석은 시료 혈장 1 ml을 취하여 검량선 작성시와 동일하게 조작하였으며, 작성된 검량선에 의해 혈장 중 로바스타틴산의 농도를 산출하였다.

파라미터의 산출 및 생물학적동등성 평가

시험약 및 대조약의 약물속도론적 파라미터로서 AUC_{0-12hr}, C_{max}, 및 T_{max}를 구하였다. AUC_{0-12hr}는 각 피험자의 혈장 중 약물농도-시간곡선으로부터 사다리꼴 공식으로 구하였고, 최고혈중농도인 C_{max}와 최고혈중농도 도달시간인 T_{max}는 혈장중 약물농도-시간 곡선에서 직접 읽어 구하였다. 시험약과 대조약의 AUC_{0-12hr}, C_{max} 및 T_{max}에 대하여 Student's t-test를 이용하여 유의성 검정을 하였다.

또, 식품의약품안전청 고시 제 96-16호 생물학적동등성 시험기준에 따라 AUC_{0-12hr}, C_{max}, 와 T_{max}에 대하여 두 약물의 평균치의 차이를 대조약의 ±20% 이내로 하였으며, 투여시기별 차이와 시험 약물 및 시험군간의 차이를 ANOVA를 이용하여 분석하였고, 분산분석에 의한 유의성 검정의 기준은 α=0.05에서 1-β≥0.8 및 최소검출차가 ±20%이하로 하였으며 신뢰한계를 종합적으로 고찰함으로써 두 제제의 생물학적동등성 여부를 검정하였다.

결과 및 고찰

혈장중 로바스타틴산의 정량

건강한 성인의 대조 혈장, 대조혈장에 로바스타틴산을 가한 것을 HPLC로 분석하여 얻은 크로마토그램을 Figure 1에 나타내었다. 로바스타틴산의 피크는 약 12.9분에 나타났으며, HPLC의 정량한계는 3 ng · ml⁻¹이었으며, 3-100 ng · ml⁻¹에서 양호한 직선성을 나타내었다 (Y = 104.925X+6.648, r=0.9996). 또한 이 농도 범위에서 로바스타틴의 CV (coefficient of variance)와 %accuracy는 모두 ±10%이하로 나타났다. 이로부터 혈장 중 로바스타틴에 대한 추출방법 및 HPLC 분석법은 충분한 감도와 정확성 및 정밀성을 갖고 있음을 알 수 있었다.

로바스타틴산의 혈장 농도추이

시험약 로바로드 정과 대조약 메바코 정을 14명의

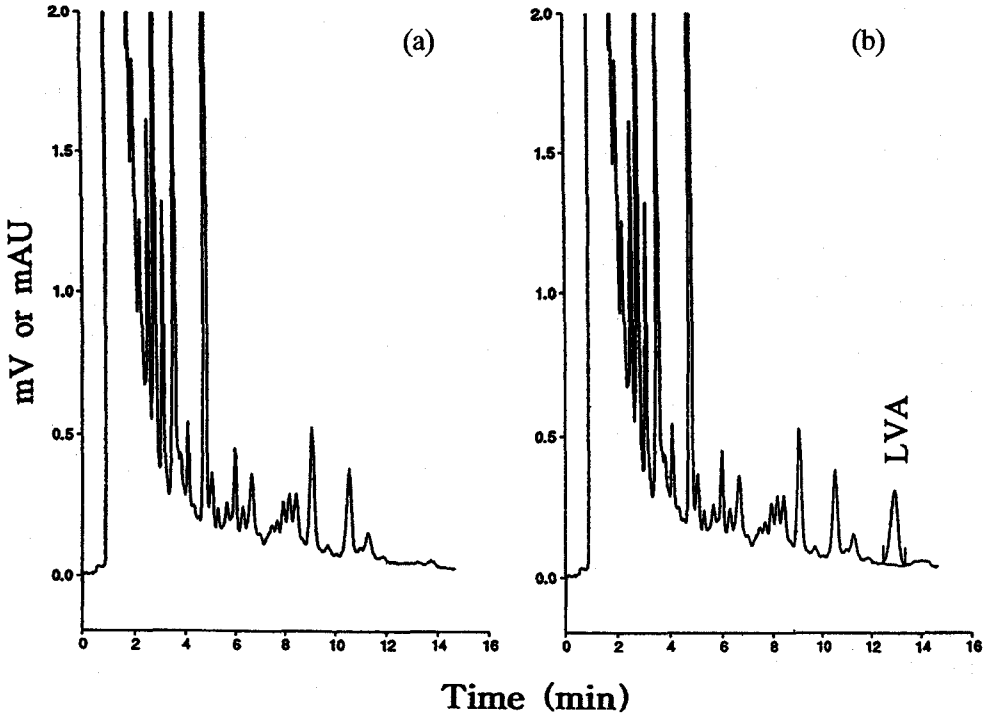


Figure 1—HPLC chromatograms of plasma sample. (a) blank plasma and (b) plasma spiked with lovastatin acid(LVA).

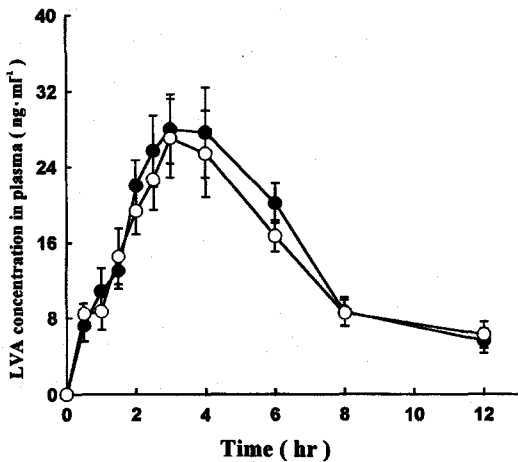


Figure 2—Mean plasma concentration-time profiles of lovastatin acid(LVA) after oral administration of reference tablet (○) and test tablet (●). Data are expressed as the mean±S.E. (n=14).

지원자에게 경구투여한 후 일정 시간마다 채혈하여 얻은 각 제제의 전체 피험자에 대한 평균 혈장중 로바스타틴산의 농도-시간 곡선을 Figure 2에 나타내었다. 또한, 각 피험자들의 약물 농도-시간 곡선에서 산출한 약물속도론적 파라미터(AUC_{0-12hr}, C_{max}, 및 T_{max})를 Table I에 나타내었다. 시험약의 평균 AUC_{0-12hr}는

179.2 ng·hr·ml⁻¹, C_{max}는 35.55 ng·ml⁻¹, 그리고 T_{max}는 3.04 hr, 대조약의 AUC_{0-12hr}는 166.5 ng·hr·ml⁻¹, C_{max}는 33.50 ng·ml⁻¹, 그리고 T_{max}는 3.0 hr의 값이 얻어졌고, Student's t-test 결과(p<0.05), 시험약과 대조약의 AUC_{0-12hr}, C_{max}, 및 T_{max}는 유의성있는 차이가 없는 것으로 나타났다.

생물학적동등성 검정

시험약 로바로드 정과 대조약 메바코 정의 AUC_{0-12hr}, C_{max}, 그리고 T_{max}에 대한 생물학적 동등성 시험 결과 산출된 통계학적 파라메타를 Table II에 나타내었다. AUC_{0-12hr}, C_{max}, 및 T_{max}에 대하여 유의수준 (α)=0.05에서 평균값의 차이가 각각 7.07%, 5.77%, 및 1.18%로 모두 판정기준인 20% 범위 이내로 나타났으며, 유의수준 (α)=0.05, 자유도(ν)=12, 검출해야할 평균치의 차이를 0.2로 고정시켜 산출한 비심도(λ)는 각각 3.55, 4.05, 및 3.83이었다. 유의수준 (α)=0.05에서 시험약의 대조약에 대한 최소검출차(Δ)가 AUC_{0-12hr}, C_{max}, 및 T_{max} 항목에 대해 각각 17.19%, 15.09%, 및 15.93%로 모두 판정기준인 20% 범위 이내로 나타났고, 검출력 (1-β)은 각각 90.18%, 95.61%, 및 93.68%로 모두 80% 이상이어야 한다는 생물학적 동등성 판정기준을 만족시켰다. 또한 AUC_{0-12hr}, C_{max}, 및 T_{max} 각 비교항목에 있어

Table I—Physical Data and Bioavailability Parameters of Lovastatin Acid in the Individual Volunteers

Volunteer	Age (yr)	Weight (kg)	AUC _{0-12hr} (ng · hr · ml ⁻¹)		C _{max} (ng · l ⁻¹)		T _{max} (hr)	
			R ¹⁾	T ²⁾	R	T	R	T
A1	22	61	105.56	173.28	21.06	30.15	2.5	2.5
A2	21	56	215.60	310.02	70.55	76.43	4.0	4.0
A3	21	57	228.78	308.03	49.18	52.10	3.0	3.0
A4	22	78	69.91	99.91	22.97	24.09	2.0	2.0
A5	25	63	182.08	179.66	36.62	26.56	3.0	2.5
A6	27	66	68.08	101.23	13.92	15.81	4.0	4.0
A7	31	75	150.79	148.79	28.41	24.23	3.0	4.0
B1	23	59	154.73	166.78	34.69	31.23	2.5	3.0
B2	22	77	113.60	95.38	20.63	24.17	1.5	2.0
B3	22	71	158.89	97.87	26.64	19.35	2.5	3.0
B4	21	71	147.64	191.78	24.38	37.10	4.0	4.0
B5	24	77	292.62	249.18	43.78	50.84	4.0	2.5
B6	26	61	214.97	167.86	29.28	36.37	3.0	3.0
B7	32	74	228.29	219.04	46.93	49.32	3.0	3.0

¹⁾R: Reference drug (Mevacor)

²⁾T: Test drug (Lovalord)

Table II—Summary of Bioequivalence Test According to KFDA Criteria

	Parameter		
	AUC _{0-12hr}	C _{max}	T _{max}
Difference	7.07%	5.77%	1.18%
F value ^a	1.57	1.36	0.05
Noncentrality(λ) ^b	3.55	4.05	3.83
Power(1-β) ^c	90.18%	95.61%	93.68%
Detectable difference(Δ) ^d	17.19%	15.09%	15.93%
Confidence interval(δ) ^e	-5.20 ~19.34	-5.00 ~16.54	-10.19 ~12.54

^aα=0.05, F(1,12)=4.747, ^bα=0.05, v=12, λ=Mean×2, ^cα=0.05, ^dα=0.05, 1-β=0.8, ^eα=0.05

서 대조약에 대한 생체이용률 차이의 신뢰한계(δ)가 각각 -5.20~19.34, -5.00~16.54, 그리고 -10.19~12.54로 모두 ±20% 이내이어야 한다는 생물학적 동등성 판정 기준을 모두 만족시켰다.

결 론

주식회사 종근당으로부터 공급받은 시험약인 로바로드 정과 증외제약의 시판제품인 메바코 정을 생물학적 동등성 시험기준에 따라 14명의 건강한 남성 성인 지원자에게 2×2 라틴방격법에 따라 8정(로바스타틴 160 mg)씩 경구 투여한 후, 12시간까지 채혈하여 각 피험자들의 혈장 중 농도 데이터로부터 AUC_{0-12hr}, C_{max}, 및 T_{max}를 구하였으며, 이들 생체이용률 파라미

터에 대해서 분산분석(ANOVA) 및 식품의약품안전청 의 고시기준에 따라 두 제제의 생물학적동등성을 평가 하였다.

분산분석 결과 교차시험이 적절히 수행되었음을 확인하였으며 두 제제의 AUC_{0-12hr}, C_{max}, 및 T_{max}간에는 유의성 있는 차이가 없었다. 식품의약품안전청 기준에 따라 각 파라미터의 동등성 여부를 검정한 결과 두 제제의 AUC_{0-12hr}, C_{max}, 및 T_{max}가 동등함이 입증되었다. 따라서 로바로드 정은 메바코 정과 생물학적으로 동등 하다고 판단되었다.

감사의 말씀

본 연구는 주식회사 종근당의 지원에 의하여 중앙대 학교 약학연구소에서 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) J.M. Henwood and R.C. Heel, Lovastatin : a preliminary review of its pharmacodynamic properties and therapeutic use in hyperlipidemia, *Drugs*, **36**, 429-454 (1988).
- 2) K.P. Vyas, P.H. Kari, S.M. Pitzemberger, R. A. Halpin, H.G. Ramjit, B. Arison, J.S. Murphy, W.F. Hoffman, M.S. Schwartz, E.H. Ulm, and D.E. Duggan, Biotransformation of lovastatin. I: structure elucidation of *in vitro* and *in vivo* metabolites in rat and mouse,

- Drug Metab. Dispos.*, **18**, 203-211 (1990).
- 3) K.P. Vyas, P.H. Kari, R.S. Prakash, and D.E. Duggan, Biotransformation of lovastatin. II: *in vitro* metabolism by rat and mouse liver microsomes and involvement of cytochrome P450 in dehydrogenation of lovastatin, *Drug Metab. Dispos.*, **18**, 218-222 (1990).
 - 4) R.W. Wang, P.H. Kari, R.S. Prakash, and D. E. Duggan, Biotransformation of lovastatin. VI: identification of cytochrome P450 3A proteins as the major enzymes responsible for the oxidative metabolism of lovastatin in rat and human liver microsomes, *Arch. Biochem. Biophys.*, **290**, 355-361 (1991).
 - 5) P.J. Neuvonen, and K. Jalava, Itraconazole drastically increases plasma concentration of lovastatin and lovastatin acid, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **60**, 54-60 (1996).
 - 6) H.Y. Pan, J. Triscari, A.R. Devault, S.A. Smith, D.W. Iverson, B.N. Swanson, and D.A. Willard, Pharmacokinetic interaction between propranolol and the HMG-CoA reductase inhibitors, pravastatin and lovastatin, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **31**, 665-670 (1991).
 - 7) R.J. Stubbs, M. Schwartz, and W.F. Bayne, Determination of mevinolin and mevinolinic acid in plasma and bile by reversed-phase high-performance chromatography, *J. Chromatography*, **383**, 438-443 (1986).
 - 8) L.X. Zhou, D.K. Finley, A.E. Hassell, and J. L. Holtzman, Pharmacokinetic interaction between isradipine and lovastatin in normal, female and volunteers, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **273**, 121-127 (1995).
 - 9) 식품의약품안전청고시 제 96-16호 생물학적동등성 시험기준, 식품의약품안전청(1996. 10. 31 개정).