

모노콜정에 대한 콩커정의 생물학적 동등성 평가

고인자 · 지상철
성균관대학교 약학부

Bioequivalence of Bisoprolol Tablet (Bisoprolol hemifumarate 5 mg)

In-Ja Ko and Sang-Cheol Chi

College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746 Korea

Bisoprolol, one of the β_1 -adrenoceptor antagonist, has been used for the treatment of mild to moderate essential hypertension and stable angina pectoris. The oral bioavailability of bisoprolol is high (90%) and the drug has a long elimination half-life, 9~12 hr, which allows once-daily administration. The bioequivalence of two bisoprolol preparations was evaluated according to the guidelines of Korea Food & Drug Administration (KFDA). The test product was Concor tablet[®] made by Newgenpharm and the reference product was Monocor tablet[®] made by Wyeth Korea. Twenty healthy male subjects, 23.8 (21-30) years old and 63.8(52-92) kg, were randomly divided into two groups and a randomized 2x2 cross-over study was employed. After two tablets containing 10 mg bisoprolol hemifumarate were orally administered, blood was taken at predetermined time intervals and the concentration of bisoprolol in plasma was determined using an HPLC method with fluorescence detector. Two pharmacokinetic parameters, AUCt and C_{max} were calculated and analyzed statistically for the evaluation of bioequivalence of the two products. Analysis of variance was carried out using logarithmically transformed parameter values. The 90% confidence intervals of AUCt and C_{max} were log 0.95~log 1.04 and log 0.96~log 1.07, respectively. These values were within the acceptable bioequivalence intervals of log 0.8~log 1.25. Thus, the criteria of the KFDA guidelines for the bioequivalence was satisfied, indicating that Concor tablet is bioequivalent to Monocor tablet.

□ Keywords -- Bisoprolol, Bioequivalence, HPLC

헤미푸마르산비스프로롤을 [(±)1-(4-(2-isopropylethoxy)methylphenoxy)-3-isopropylamino-2-propanol hemifumarate]은 내인성 교감신경 활성화나 막 안정화 작용이 없이 β_1 -아드레날린성 수용체를 선택적으로 차단함으로써 고혈압 및 협심증 등의 치료에 사용된다.¹⁾ 이 약물은 초회 통과효과가 거의 없기 때문에 90%의 높은 생체이용율을 나타내며 소실 반감기가 9~12시간로서 비교적 길기 때문에 1일 1회 투약이 가능하며 이 약물 10 mg을 경구투여시 약 3시간 이내에 최고 혈중농도 36-78 $\mu\text{g/L}$ 에 도달된다고 보고되어 있다.¹⁾ 국내에서는 한국외어스가 “모노콜정”이라는 제품명으로 판매하고 있는데, 제제학적으로 대체가능한 제제의 시판을 위하거나 의

사 또는 치과의사가 처방전에 기재한 의약품을 성분, 함량 및 제형이 동일한 다른 의약품으로 대체하여 조제할 수 있게 하기 위해서는 식품의약품안전청이 고시한 생물학적동등성시험 기준에 따라 생체 시험을 통해 생체이용률에 있어서 통계학적으로 동등하다는 것을 입증하여야 한다.

따라서 본 연구에서는 (주)뉴젠팜에서 발매하고자 하는 비스프로롤 제제인 “콩커정”이 기존의 비스프로롤 제제인 한국외어스의 “모노콜정”과 그 생체이용률에 있어서 통계학적으로 동등하다는 것을 입증하기 위해서 생물학적 동등성 시험 기준에 따라 건강한 성인 남자 20명을 대상으로 라틴 방격법에 따라 생체 이용률 시험을 한 후, 얻어진 비스프로롤의 혈중 약물농도-시간곡선하 면적(AUC_t) 및 최고 혈중 농도(C_{max}) 등의 생체이용률 파라미터에 대해 통계학적으로 고찰하여 두 제제간의 생물학적동등성을 비교 판정하였다.

아울러 “콩커정”과 “모노콜정”에 대하여 대한약전

교신저자: 지상철
성균관대학교 약학부
경기도 수원시 장안구 천천동 300
Tel: 031)290-7709, Fax: 031)290-7729
E-mail: scchi@skku.ac.kr

제 8개정 용출시험법 중 제2법(패들법)에 따라 비교용출시험을 행하였다.

본 시험은 식품의약품안전청으로부터 시험계획서의 승인을 얻은 후 시험계획서에 따라 수행되었으며 모든 피험자의 동의를 받아서 이루어졌다.

실험재료 및 방법

시약 및 기기

시험에 사용된 시험약은 식품의약품안전청의 의약품 임상시험관리기준 제36조 및 제37조에 따라 (주)뉴젠팜에서 자가 제조한 '콩커정'(제조번호: 2001, 제조일자: 2002. 11. 9), 대조약은 한국와이어스(주)에서 기존에 판매하고 있는 '모노콜정'(제조번호: 2003, 유효기간: 2005. 5. 20)으로서 두 제제 모두 헤미푸마르산비소프롤올을 5 mg 함유하는 제제이다. 헤미푸마르산비소프롤올은 (주)뉴젠팜으로부터 표준품을 얻어 사용하였으며 주석산메토프롤올은 미국 Sigma Chemical 사로부터, HPLC급 아세트니트릴은 미국 Fisher Scientific 사로부터 구입하여 사용하였다. 기타 시약은 모두 특급 시약을 사용하였으며 물은 실험실에서 역삼투수를 정제하여 제조하였다.

용출시험용 기기로는 용출기(Labfine, Model DST-810), 자외부 흡광광도계(Shimadzu, Model UV Mini 1240)를 사용하였으며 혈장중 약물의 분석에는 등속펌프(Hitachi, Model L-7100), 자동주입기(Hitachi, Model 7200), 형광검출기(Hitachi, Model L-7480) 및 시스템 매니저(Hitachi, Model D-7000)로 이루어진 HPLC 시스템을 사용하였다. 그 외 Deep freezer (IlShin Lab, Model DF-8517), 원심분리기(비전과학, Model VS-5000), Vortex 혼합기(Thermolyne, Model MaxMix II), 시험관농축장치(Eyela, Model MG-2100), pH 측정기(Orion, Model 420A) 등을 사용하였다.

비교용출시험

시험약의 용출 정도는 의약품동등성시험관리규정(식품의약품안전청 고시 제2001-13호, 2001. 3. 9)에 따라 평가하였다. 즉 시험약 또는 대조약 6정을 취하여 대한약전 일반시험법 용출시험법중 제2법(패들법)에 따라 50 rpm으로 시험하였다. 용출액으로 pH 1.2 완충액, pH 4.0 완충액, pH6.8 완충액 및 물의 4가지를 사용하였다. 규정된 시간에 따라 용출액을 채취하고 여과한 다음 파장 223 nm에서 흡광도를 측정하여 용출율을 계산하였다.

피험자 선정

피험자는 만 19~55세의 건강한 성인 남성 지원자를

공고를 통하여 모집하였다. 30명의 지원자가 이 시험에 대한 설명회에 참석하였으며 모두 시험 참여에 서면으로 동의하였다. 이들 지원자는 삼성서울병원에서 건강진단을 실시하여 모두 건강인으로 판정되었으며 이 중에서 20명을 선정하였다. 피험자로 선정된 사람들은 평균체중 63.8 kg(52~92 kg), 평균연령 만 23.8세(21~30세)의 건강한 남성이었다.

피험자 관리

모든 지원자는 시험 전 10일 이내 및 시험기간 중에는 음주나 다른 일체의 약물 복용을 금하였다. 시험 전날 오후 6시경에 피험자 전원에게 동일한 저녁 식사를 제공한 후 식사종료 시점인 오후 6시 30분 이후부터 익일 12시까지는 물 이외의 어떠한 종류의 음식도 금하여 시험 당일에 모두 공복상태로 시험에 임하도록 하였다. 저녁식사 후 지정된 숙소로 이동하고 운동, 식사, 흡연, xanthine계 음료 및 음주 등을 제한 관리하며 휴식을 취하고 22시에 취침시켰다. 시험 당일 채혈장소에 오전 7시경에 도착하여 시험 준비에 착수하였다. 약물투약 후 정해진 시간에 따라 채혈하였으며 4시간 및 10시간째 채혈이 끝난 직후 모든 피험자에게 각각 점심식사 및 저녁식사를 제공하였다. 12시간째 채혈이 끝난 후 피험자들에게 본 시험에 관한 주의사항을 교육시킨 후 임상시험센터의 피험자 대기실에서 휴식을 취한 후 22시에 취침하도록 하였다. 시험 2일째 각각 24 및 36시간째 채혈이 끝난 후 피험자들에게 위의 주의사항을 교육시킨 후 귀가시켰다. 마지막 채혈인 36시간째 채혈이 끝난 후 담당의사에 의해 혈압, 맥박, 기타 이상 유무를 확인하고, 피험자들에게 제II기 시험을 완료할 때까지 음주나 약물 복용을 일체 금지한다는 주의사항을 다시 한번 교육시킨 후 귀가시켰다. 시험 전과정을 통하여 피험자 개인의 상태를 관찰하여 증례기록서에 기록하였다. 투약 및 채혈은 모두 삼성서울병원 임상시험센터에서 시험담당자인 전문의의 감독하에 실시하였다.

약물투약 및 혈액 채취

약물투약은 2시기 2제품의 라틴 방격법에 따른 교차시험법으로 투약계획을 세우고 20명의 피험자를 군당 10명씩 임의로 2군으로 나누고 제I기, 제I군에는 대조약인 '모노콜정'을, 제2군에는 시험약인 '콩커정'을 투여하였고 제II기에는 그 반대로 투여하였으며 투여량은 2정(헤미푸마르산비소프롤올로서 10 mg)으로 하였다. 휴약기간은 생체이용률 시험에서 헤미푸마르산비소프롤올의 반감기가 9~12시간으로 보고되어 있어¹⁾ 충분한 시간을 두고자 본 시험에서는 7일로 하였다. 피험자들 모두에게 IV 카테타를 팔 정맥부위에 설치

하고 PRN 어댑터를 연결하고 대조약과 시험약을 240 ml의 물로 복용시켰다. 다음 각 피험자로부터 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 24 및 36시간째에 10 ml의 혈액을 채취하여 헤파린 처리를 한 혈액용 플라스틱 튜브에 넣고 천천히 흔들어서 쉬고 잠시 방치한 후 3000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 혈장만을 취하여 에펜도프 튜브에 옮기고 이 튜브를 영하 70°C 도에서 분석시까지 보관하였다.

혈장중 비소프롤올의 정량

혈장중의 비소프롤올의 함량 분석은 이미 그 분석 방법의 유효성이 평가되어 보고된 HPLC 법^{2,3)}을 사용하여 정량하였다.

혈장 500 µl에 내부표준물질 표준용액(주석산메토프롤올 125 ng/ml) 50 µl를 가한 후 흔들어서 섞은 후 100 µl의 1 N 수산화나트륨 용액과 5 ml의 헥산과 이소프로판올의 혼합액(97:3)을 가하고 3분동안 Vortex mixer로 진탕하여 추출하고 2,000 rpm으로 5분 동안 원심분리시켰다. 다음 유기 용매층을 일회용 피펫으로 취하여 깨끗한 유리관으로 옮기고 질소기류하 40°C에서 증발시킨 후 HPLC 이동상 300 µl로 reconstitution시키고 1분간 Vortex 혼합기로 혼합한 후, 이 최종 시료 용액 중 200 µl를 칼럼에 주입하였다.

분석에 사용한 HPLC 조건으로 이동상은 아세트니트릴과 초산염완충액(pH 3.0)의 혼합액(20:80 V/V)을 사용하였으며 그 유속은 1.2 ml/min이었다. 칼럼은 Luna C₁₈ 칼럼(5 µm, 4.6 mm×250 mm, Phenomenex, U.S.A.)을 사용하였으며 검출파장은 여기파장 232 nm, 형광파장 300 nm이었다.

공 혈장에 비소프롤올 표준용액을 가하여 각각 1, 3, 10, 30, 100 ng/ml의 농도가 되도록 혈장시료를 만든 후 상기의 시료 추출법 및 분석조건에 따라 추출하고 분석하여 얻은 내부표준물질의 피이크 높이에 대한 비소프롤올의 피이크 높이비를 가지고 비소프롤올 농도에 대한 검량선을 작성하고 이 검량선으로부터 혈장 시료 중 비소프롤올의 농도를 산출하였다.

피험자 혈장시료중 비소프롤올의 농도를 측정하기 전에 상기의 분석방법에 대하여 그 농도를 정확하게 측정할 수 있는 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성 및 감도 등을 확인하는 유효성 평가를 하였다.

약물속도론적 파라미터의 분석 및 생물학적 동등성 평가

“콩커정”과 “모노콜징”을 각각 2정씩 20명의 피험자에게 라틴 방격법에 따른 교차시험법에 따라 경구 투여하여 얻은 각 제품의 혈장 중 약물농도시간 곡선으로부터 약물속도론적 파라미터인 AUC_t, C_{max} 및 T_{max}를 구하였다. C_{max}와 T_{max}는 실측치를, AUC_t는 사다리

꼴 면적 계산 공식을 이용하여 최종 채혈시점까지의 값을 통상의 방법에 따라 구하였다. 이들 두 제품에서 각각 얻은 값에 대해 T_{max}를 제외한 AUC_t와 C_{max}의 로그변환치를 생물학적 동등성 시험 통계처리용 프로그램(K-BE test[®])을 이용하여 유의수준(α)=0.05에서 분산 분석을 실시하여 순서효과를 검증한 후, 각 변동요인간의 유의성 여부를 검토하였고 90% 신뢰한계를 구하였다.

“모노콜징”에 대한 “콩커정”의 생물학적 동등성 여부는 식품의약품안전청의 생물학적동등성시험기준⁴⁾에 따라 C_{max}와 AUC_t를 평가항목으로, T_{max}를 참고 파라미터로 하였다.

실험결과 및 고찰

비교용출시험

제제로부터 약물의 용출은 생체이용률과 깊은 상관관계가 있으므로 용출시험을 하여 시험약 및 대조약이 생물학적으로 동등한지를 추정하고자 하였다. 즉, 같은 약물을 동일량 함유하는 제제라 할지라도 원료, 부형제의 구입처 및 제조공정 등에 따라 용출율이 다르게 나타나 이것으로 인하여 생체이용률이 다르게 나타날 수 있으므로 대조약의 용출율을 시험약의 용출율과 비교하기 위하여 용출시험을 행하였으며 그 결과는 Fig. 1과 같다.

두 제제의 pH 1.2, pH 4.0, pH 6.8의 용출액 및 물에서의 평균용출율을 의약품동등성시험관리규정의 판단 기준에 따라 판정한 결과, 모두 용출 양상이 동등한 것으로 나타나 종합적으로 판단할 때 시험약은 대조약에 대하여 용출이 동등하다고 판정되었다.

혈장중 비소프롤올의 정량

본 시험방법과 같이 검체를 처리하여 HPLC로 분석하였을 때 얻어진 대표적인 크로마토그램은 Fig. 2와 같았으며, 이 크로마토그램에서 알 수 있듯이 비소프롤올과 내부표준물질은 혈장 성분들과 약물 대사산물들의 피이크로부터 잘 분리되었고 비소프롤올과 내부표준물질의 유지시간은 각각 약 11분과 약 5분이었다. 신호대잡음 비(signal-to-noise ratio) 3을 기준으로 한 비소프롤올 농도의 검출한계(limit of detection)는 0.5 ng/ml이었으며, 각 표준농도에서 얻은 비소프롤올과 내부표준물질의 피이크 높이를 이에 상응하는 농도로 이동상에 직접 용해시켜 얻은 비소프롤올과 내부표준물질의 피이크 높이에 비교하여 산출한 비소프롤올과 내부표준물질의 평균회수율은 각각 99.2%와 99.3%이었다. 혈장중 비소프롤올의 농도가 1, 3, 10, 30, 100 ng/ml이 되도록 제조한 비소프롤올 표준용액

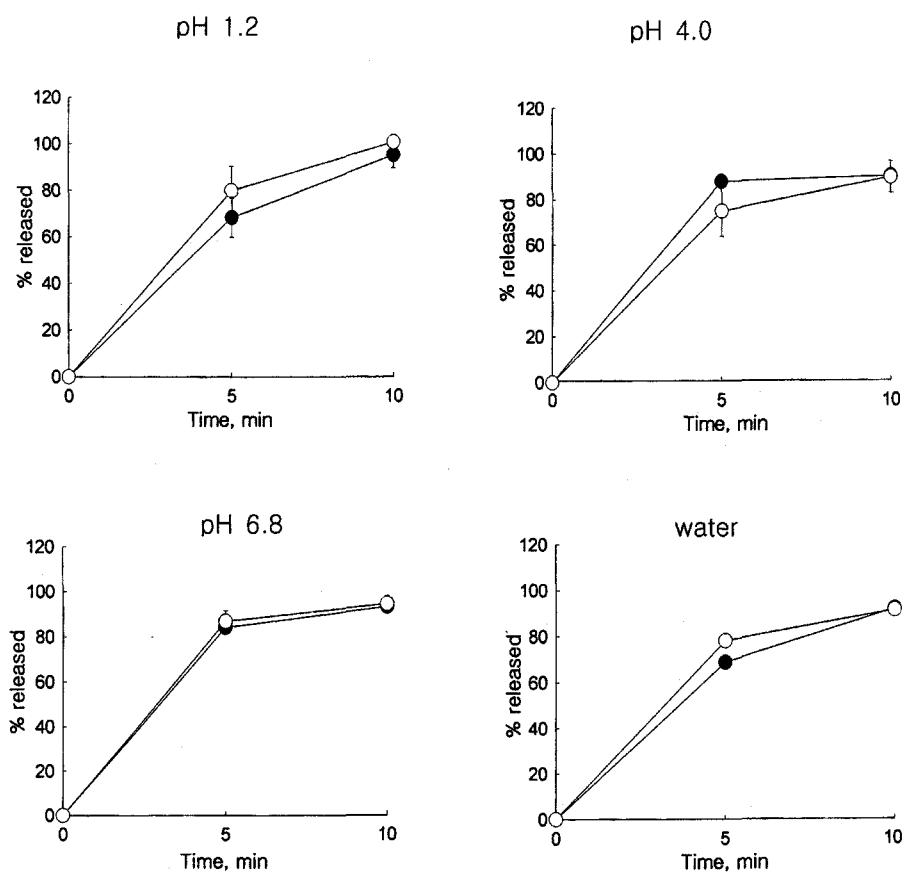


Fig. 1. Dissolution profiles of bisoprolol hemifumarate from Monacor tablet (●) and Concor tablet (○) in various dissolution media (mean \pm S.D., n=20).

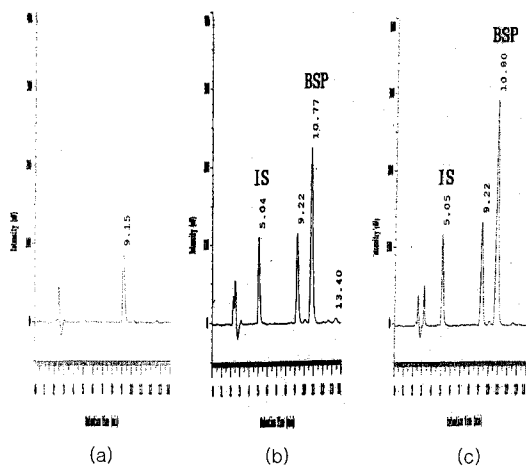


Fig. 2. Chromatograms of (A) blank human plasma, (B) blank human plasma spiked with bisoprolol (30 ng/ml) and the internal standard, and (C) plasma sample after oral administration of two bisoprolol hemifumarate tablets to a subject. Key; BSP: bisoprolol, IS: internal standard.

을 분석하여 검량선들을 산출하였으며, 검량선의 상관관계(r) 값이 모두 0.994 이상으로 양호한 직선성을 나타내었다. 혈장중 비스프로롤의 HPLC 분석법에 대한 정확성은 1% deviation으로서, 정밀성은 %CV로서 Table 1에 나타낸 바와 같다. 각 표준농도에서의 일내 정확성과 정밀성의 평균치는 각각 4.88%와 3.55%이었으며 최대치는 각각 5.61%와 6.24%를 나타내었다. 또한 각

Table 1. Precision and accuracy for the HPLC analysis of bisoprolol in human plasma (n=3)

Standard Conc. (ng/ml)	%CV		1%Deviationl	
	Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day
1	2.53%	6.24%	5.49%	5.61%
3	2.08%	0.45%	6.06%	5.39%
10	0.68%	2.61%	1.04%	1.78%
30	2.39%	6.04%	0.56%	0.79%
100	0.68%	2.44%	0.47%	1.71%
Mean	1.67%	3.55%	4.71%	4.88%

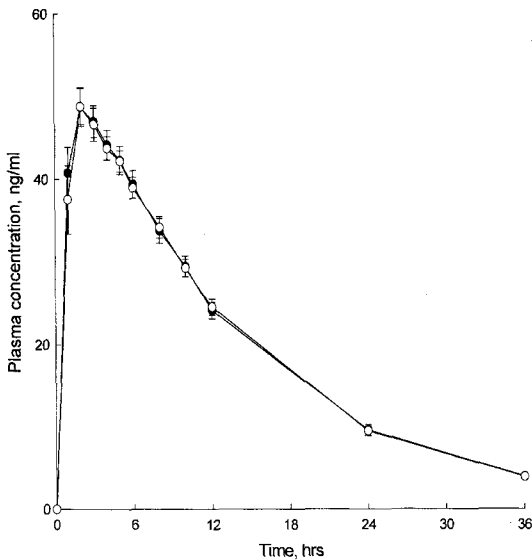


Fig. 3. Plasma concentration - time profiles of bisoprolol following oral administration of Monacor tablet (●) and Concor tablet (○) at the bisoprolol hemifumarate dose of 10 mg (mean±S.E., n=20).

표준농도에서의 일간 정확성과 정밀성의 평균치는 각각 4.71%와 1.67%이었으며 최대치는 각각 12.68%와 2.53%를 나타내었다. 이로부터 본 HPLC 분석법은 인체에 대한 생체이용률 시험에 이용될 수 있는 충분한 감도와, 우수한 정확성과 정밀성을 가지고 있음을 알 수 있었다.

혈장중 비소프롤롤 농도 추이

시험약과 대조약을 피험자 20명에게 경구투여한 후 정해진 시간에 따라 채혈하여 얻어진 평균 혈장중 비소프롤롤의 농도-시간 양상은 Fig. 3과 같다. 또한 각 피험자에 있어서 시험약과 대조약을 투여하여 얻은 이들 혈장중 약물농도-시간 곡선으로부터 산출한 AUC_t, C_{max}, T_{max} 등의 생물학적 동등성 평가 파라미터들의 값은 Table 2와 같다. 즉, 대조약과 시험약의 AUC_t는 각각 716.02와 713.19 ng·hr/ml으로 대조약에 대한 평균치 차가 0.13%이었고, C_{max}는 각각 51.88와 52.68 ng/ml로 2.76%의 차이를 보였으며, T_{max}는 두 제제 모두 2.4시간으로 동일하였다.

평가항목에 대한 통계학적 고찰

Table 2에 나타난 각 피험자의 로그변환한 AUC_t 값

Table 2. Bioavailability parameters for each volunteer obtained after the oral administration of Monacor tablet and Concor tablet at the bisoprolol hemifumarate dose of 10 mg

Volunteer	Monacor tablet			Concor tablet		
	AUC _t (ng·hr/ml)	C _{max} (ng/ml)	T _{max} (hr)	AUC _t (ng·hr/ml)	C _{max} (ng/ml)	T _{max} (hr)
A-1	596.68	50.28	2.00	548.46	42.28	4.00
A-2	599.47	44.05	2.00	604.78	43.17	5.00
A-3	818.84	58.39	2.00	946.02	62.58	3.00
A-4	769.36	51.88	3.00	796.53	59.22	2.00
A-5	558.92	41.20	2.00	593.44	47.74	2.00
A-6	620.74	40.73	3.00	678.36	43.27	2.00
A-7	531.95	35.42	4.00	607.86	42.72	2.00
A-8	888.28	64.69	2.00	685.86	60.42	1.00
A-9	614.43	52.20	2.00	574.76	59.34	2.00
A-10	824.66	45.16	4.00	745.46	41.55	3.00
B-1	642.13	58.78	2.00	800.05	51.12	4.00
B-2	872.88	61.85	3.00	750.99	58.21	2.00
B-3	795.15	63.39	2.00	750.03	64.46	3.00
B-4	698.76	69.60	1.00	711.69	63.92	1.00
B-5	956.94	60.93	3.00	941.25	72.69	1.00
B-6	497.39	30.96	3.00	502.29	33.44	2.00
B-7	710.02	43.61	5.00	740.08	45.26	2.00
B-8	857.06	54.13	1.00	914.94	68.52	1.00
B-9	665.21	53.83	1.00	676.57	48.89	4.00
B-10	801.58	56.48	1.00	694.36	44.79	2.00
Mean	716.02	51.88	2.40	713.19	52.68	2.40
S.D.	132.38	10.35	1.10	125.15	10.84	1.14

Table 3. Statistical results of bioequivalence evaluation between two bisoprolol formulations at $\alpha=0.05^*$

	Parameters		
	AUC _t	C _{max}	T _{max}
Difference	0.40%	1.54%	0.00%
F _α ^a	1.614	1.391	1.440
Test/Reference point estimate	0.998	1.015	-
Confidence interval(δ)	log 0.95 ≤ δ ≤ log 1.04	log 0.96 ≤ δ ≤ log 1.07	-27.46 < δ < 27.46

*AUC_t and C_{max} values were calculated on the basis of ln-transformed data, and T_{max} values on the base of untransformed data.

^aF_{0.05(1,18)}=4.414

및 C_{max} 값, 또한 비변환 T_{max} 값에 대하여 유의수준 (α)=0.05에서 분산분석을 하여 얻은 통계검정결과를 Table 3에 나타내었다. 이 통계처리 결과에서 알 수 있듯이 3가지 파라미터의 구간 순서 효과 검정에서 F값이 F분석표의 한계값보다 작아 교차시험이 제대로 이루어졌음을 확인할 수 있었다. 이중 평가파라미터인 AUC_t와 C_{max}의 분산 분석 결과를 보면 로그변환한 평균치 차의 AUC_t 및 C_{max}에 대한 90% 신뢰한계는 log 0.95~log 1.04 및 log 0.96~log 1.07로 나타나 log 0.8~log 1.25 이어야 한다는 생물학적 동등성 시험기준을 만족하였다.

이상의 시험결과에서와 같이 시험약인 “콩키정”은 대조약인 “모노콜정”에 대하여 생물학적 동등성 시험의 판단 기준인 2항목(AUC_t, C_{max})에서 동등한 것으로 나타나 종합적으로 판단할 때 시험약인 “콩키정”은 대조약인 “모노콜정”에 대하여 생물학적으로 동등하다고 사료되었다.

결 론

식품의약품안전청 고시 생물학적동등성시험기준에 따라 (주)뉴젠팜의 “콩키정”을 시험약으로 하고 한국와이어스(주)의 “모노콜정”을 대조약으로 하여 2x2 교차 시험법에 따라 건강한 성인 남성 지원자 20명에게 헤미푸마르산비소프롤을 2정씩을 경구 투여한 후, 각 피험자들의 혈중 약물농도-시간 양상으로부터 산출한 AUC_t와 C_{max}의 생체이용률 파라미터에 대해 통계학적으로 고찰하여 두 제제간의 생물학적 동등성을 평가하였다.

그 결과 AUC_t의 경우 대조약과 시험약의 로그변환한 평균치 차의 90% 신뢰구간이 log 0.95~log 1.04이었고 C_{max}의 경우 대조약과 시험약의 로그변환한 평균치 차의 90% 신뢰구간이 log 0.96~log 1.07로서 두 항목 모두 log 0.8~log 1.25 이어야 한다는 등의 생물학적 동등성 시험 기준을 만족하여 시험약인 “콩키정”은 대조약인 “모노콜정”에 대하여 생물학적으로 동등하다고 사료되었다.

감사의 말씀

본 연구는 (주)뉴젠팜의 지원을 받아 성균관대학교 약학연구소에서 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Lancaster SG, Sorkin EM. Bisoprolol - A preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in hypertension and angina pectoris. *Drugs* 1988; 36: 256-85.
2. Poirier JM, Perez M, Cheymol G. Rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic determination of bisoprolol in plasma and urine. *J Chromatogr* 1988; 426: 431-7.
3. Suzuki T, Horikiri Y, Mizobe M, et al. Sensitive determination of bisoprolol enantiomers in plasma and urine by high-performance liquid chromatography using fluorescence detection, and application to preliminary study in humans. *J Chromatogr* 1993; 619: 267-73.
4. 식품의약품안전청 고시 제 2002-60호 생물학적동등성 시험기준, 2002. 11. 22.