

Sparfloxacin제제의 생체이용률 비교시험

계명대학교 의과대학 약리학교실

권지윤 · 김수경

Comparative Bioavailability Study of Sparfloxacin Formulation

Gee Youn Kwon, Ph.D., Soo Kyung Kim, M.D.

*Department of Pharmacology,
Keimyung University School of Medicine, Daegu, Korea*

Abstract : This study was conducted to evaluate the bioavailability of sparfloxacin formulation in healthy Korean volunteers. Furthermore, the bioequivalence of Spacin[®] tablet, a sparfloxacin preparation from Korea United Pharm, Inc., was determined in comparison with Spara[®] tablet, a sparfloxacin preparation of Sam-a Inc. The study employed a randomized, two-way crossover Latin square design with a 10 day washout period. The test product was Spacin[®] tablet (Korea United Pharm Inc, Republic of Korea) and the reference drug was Spara[®] tablet (Sam-a Inc, Republic of Korea). The two products were administered in 200 mg single oral doses into 26 healthy Korean volunteers. Serial blood samples were collected for a period of 60 hours. Plasma sparfloxacin concentrations were measured by HPLC using UV detector, and the pharmacokinetic parameters including AUC_t, C_{max}, T_{max}, and half-life (t_{1/2}) were determined from plasma. Both formulations were well tolerated in 26 volunteers. Mean ratio of AUC_t and C_{max} of Spacin[®] tablet were 0.956 (90% confidence interval: 0.8987 ≤ δ ≤ 1.0177) and 0.911 (90% confidence interval: 0.8309 ≤ δ ≤ 1.0007) compared to those of Spara[®] tablet. Mean t_{1/2} of Spacin[®] tablet was 18.43 ± 3.56 hr and that of Spara[®] tablet was 18.02 ± 2.55 hr. The power (1- β) for AUC_t was above 90% and that of C_{max} was 89.4%. The pharmacokinetic parameters (AUC_t, C_{max}, and T_{max}) were analyzed statistically (ANOVA and 90% confidence intervals) with K-BE test 2002 (KFDA). No significant differences between two formulations were observed in terms of AUC_t and C_{max}, the main pharmacokinetic parameters used for bioequivalence evaluation. The results satisfied the bioequivalence criteria of KFDA guidelines, and Spacin[®] tablet was

determined to be bioequivalent to Spara[®] tablet.

Key Words : Bioavailability, Bioequivalence, HPLC, Sparfloxacin

서 론

스파플록사신(sparfloxacin)은 최근에 개발된 fluoroquinolone 제제로써 16시간의 긴 반감기를 가진 광범위 항생제이다[1-5]. Quinolone계 약물들은 간에서 대사되어 신장을 통해서 배설되며 주로 혈장단백 albumin과 결합하며 결합력은 45-46%이다. 체내에서 acylglucuronide 형태의 비활성형 대사물이 생산된다[5]. 스파플록사신의 화학구조는 5-amino-1-cyclopropyl-7-(cis-3,5-dimethyl-piperazin-1-yl)-6,8-difluoro-1,4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic acid이다[6]. 체액에서 스파플록사신의 농도를 측정하는 방법에는 크게 두가지, 즉 *E. coli*를 표식자로 이용한 Molton assay agar well 방법과 HPLC(high performance liquid chromatography)를 이용하는 방법이 있다[7-9]. 그러나 이들 방법은 시료 처리과정이 복잡하거나 정밀성이 낮거나 경제적이지 못하다. 저자들은 Kamberi 등[10]의 방법을 변형하여 간단하면서도 정밀성과 정확성이 우수한 분석법을 확립하였다. 이 방법은 임상에서도 혈장 내 스파플록사신의 농도를 측정하기에 매우 용이한 방법이 될 것이다.

이 방법을 이용하여 한국유나이티드제약(주)에서 개발한 스파플록사신제제가 원개발 제품과 생체이용률에 있어서 동등한지를 알아보았다. 건강한 한국인을 조사대상으로 선정하여 원개발 제품인 삼아약품의 스파라정을 대조약으로 하고 한국유나이티드제약(주)에서 개발한 스파신정을 시험약으로 하여 생체이용률을 비교하는 생물학적동등성시험을 시행하였다. 이에 따른 임상시험은 생물학적동등성시험 기준[11]에 의거하여 건강한 성인 26명을 조사대상으로 선정하여 라틴방격법에 따라 시험하였으며 각 피험자의 스파플록사신의

혈장농도를 측정하여 산출한 약물농도-시간 곡선하면적(AUC), 최고 혈장중 농도(C_{max}) 및 최고 혈장농도에 도달하는 시간(T_{max})에 대하여 ANOVA 분석을 시행하여 두 제제간의 생체이용률을 비교하였다. 그 결과, 식품의약품안전청에서 규정하는 생물학적동등성 평가를 위한 전제조건을 만족시켰으며 그 동등성이 입증되어 한국유나이티드제약(주)에서 개발한 스파신정의 시판이 허가되었다. 이 시험은 식품의약품안전청으로부터 시험계획서의 승인을 받아 계명대학교 의과대학 약리학교실 및 동산의료원에서 모든 피험자의 서면동의를 얻어서 시행되었다.

재료 및 방법

1. 피험자 및 혈장시료채취

본 실험에 참가한 피험자로는 실험에 대한 목적, 내용 및 투약 후 부작용 등에 대하여 충분히 설명을 듣고 계명대학교 동산의료원에서 전문의사의 혈액병리검사, 혈액화학 검사, 뇨검사 및 내과적 검진을 포함하는 건강진단을 실시하여 건강인으로 판정된 성인을 기준으로 총 26명(남 20명, 여 6명)이 선정되었다. 이들 지원자의 평균연령은 22.4 ± 1.2 세 이었으며, 체중은 65.4 ± 11.1 kg이었다. 모든 피험자는 동의서에 서명한 후 본 연구에 참여하였다. 본 연구는 계명대학교 동산의료원의 생물학적동등성 심사위원회 및 식품의약품안전청의 승인을 받은 후에 진행되었다.

본 시험은 무작위로 2등분하여 각 13명씩 2시기 2제품 라틴방격법(Latin square method)에 따른 교차시험으로서 1회 200 mg의 스파플록사신을 240 mL의 물과 함께 경구투여하였다. 시험

약은 스파신정(한국유나이티드제약), 대조약은 스파라정(삼아약품)을 사용하였고 1차 투약이 끝난 후 10일의 휴약기간을 가진 후에 2차 투약을 실시하였다. 피험자는 시험시작 10일전부터 음주 및 타 약물의 복용을 일체 금하였으며 약물투여 12시간 전부터 약물 투여 후 4시간까지 절식하였다. 혈액은 약물투여 전과 약물투여 후 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48 및 60시간의 총 12시점에서 채혈하였으며 팔의 정맥부위에 heparin-locked(100 unit/mL) catheter를 삽입하여 매회 8 mL씩 채취하였다. 분리된 혈장시료는 분석 시까지 -70°C 에 냉동보관 하였다.

2. 시료 및 시약

본 시험에 사용된 대조약은 삼아약품의 스파라정(Lot No. 530201)이었으며 시험약은 한국유나이티드제약의 스파신정(Lot No. J4)이었다. 스파플록사신 표준품은 Shaanxi foreign economic & trade development Corp사의 원료를 사용하였고, 내부표준물질로는 ofloxacin(Sigma, USA)을 사용하였다. Methanol과 acetic acid(Merk, Germany, acetonitrile(Fisher Science, USA), perchloric acid(Junsei, Japan), triethylamine(Sigma, USA) 등 일반 시약은 모두 HPLC 등급을 사용하였다.

3. 분석기기 및 조건

검체처리와 분석은 Kamberi 등[10]의 방법을 다소 변형한 방법으로 시행하였다. 스파플록사신 분석을 위해서 Gilson analysis system(321 pumps with 234 autoinjector)을 사용하였으며, 검출기로는 151 UV-VIS detector를, 컬럼은 reversed-phase C18 column인 YMC pak A-312(150×6 mm ID; particle size, 5 μm) (Yamamura Chemical Lab, Kyoto, Japan)과 precolumn(μ -Bondapak C18, Merck, Darmstadt, Germany)을, 데이터 처리장치로는 Gilson사(USA)의 UniPoint™ system software

를 사용하였다. 이동상으로는 5% acetic acid와 acetonitrile과 methanol의 혼합(76:12:12, v/v)을 사용하였고 유속은 1.2 mL/min이었으며 파장 297 nm 자외선에서 흡광도를 측정하였다.

4. 표준용액의 조제

스파플록사신 표준품을 methanol에 녹여서 1 mg/mL의 표준용액을 만들고 methanol로 희석하여 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 stock solution을 만들어 -20°C 에 보관하며 사용하였다. 내부표준물질로는 ofloxacin을 methanol에 녹여서 1 mg/mL의 stock용액을 만들고 4 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 희석하여 사용하였다.

5. 검량선 작성 및 분석법 검증

내부표준물질 ofloxacin의 피크면적에 대한 스파플록사신의 면적비를 구하여 검량선을 작성하였으며 하루에 5번 실험을 시행하여 일내 재현성을 구하였고 연속하여 5일간 실험을 행하여 일간 재현성을 구하였다.

6. 혈장시료의 처리

건강한 피험자로부터 시간별로 채취하여 -70°C 에 보관했던 혈장 시료를 실온에 방치하여 녹인 후 혈장 200 μL 를 취하여 40 μL 의 내부표준용액(ofloxacin, 4 $\mu\text{g/mL}$)을 넣고 20% perchloric acid 40 μL 를 넣어 제단백 시켰다. 실온에서 10분 동안 방치한 후 14,000 g에서 15분간 원심분리하였다. 얻어진 상층을 새 tube에 옮긴 후 triethylamine으로 pH를 4.0으로 맞추고 0.45 μm syringe filter로 여과하여 100 μL 를 취하여 autosampler vial에 옮긴 후 UV detector로 측정하였다.

7. 통계학적 분석

AUC, C_{max} 및 T_{max} 등은 생체이용률(bioavailability)

분석 프로그램인 'BA Calc 2002(식품의약품안전청)'를 사용하여 계산하였다[11]. 얻어진 생체이용률 값들을 토대로 생물학적동등성 판정 프로그램인 'K-BE test 2002(식품의약품안전청)'를 사용하여 시험약제와 대조약제간의 생물학적동등성 평가를 위한 검출력, 최소검출차 및 두 약제의 약동학적 지표의 차에 대한 신뢰구간을 산정 하였다. 또한 제제간의 각 약동학적 지표에 대한 분산분석(ANOVA)을 시행하여, 가능한 교란변수(confounding factor)인 그룹(group) 또는 순서(sequence) 효과, 그룹 내의 개체차에 의한 효과, 시기(period) 효과 및 약물(drug) 효과 등을 검정하여 두 약제간의 생물학적동등성을 판정하였다.

성 적

1. 혈장중 스파플록사신 정량

본 시험 방법에 의해 얻어진 내부표준물질이 첨가된 건강한 성인의 정상 및 스파플록사신 후 2시간째의 혈장 크로마토그램을 Fig. 1에 나타내었다. 스파플록사신 피이크의 유지시간은 약 8~9.5분, 내부표준물질 피이크의 유지시간은 약 4.5~5분이었고, 분석조건에서 스파플록사신 및 내부표준물질은 기타 혈장 성분들과 잘 분리되었다. 본 시험

에 사용된 분석방법의 일내 및 일간 변동계수(CV)는 20%이하였고, 정확성은 80~120%인 조건을 만족하였다(Table 1). 이 방법의 정량한계는 0.025 $\mu\text{g/mL}$ 이었으며, 혈장시료로부터 구한 스파플록사신의 검량선의 계산식은 $y = 0.00083x + 0.01059$ ($r^2 = 0.99958$)로 0.025~2 $\mu\text{g/mL}$ 범위에서 양호한 직선성을 나타내었다. 이로써 상기한 HPLC 분석방법은 인체의 생체이용률 시험에 이용될 수 있는 충분한 감도와 정확성 및 정밀성을 갖고 있는 것으로 판단되었다.

2. 혈장 중 스파플록사신 농도 추이

각 피험자에서 측정된 시험약 스파신정과 대조약 스파라정의 시간에 따른 평균혈장 농도의 추이를 Fig. 2에 나타내었고, 각 제제의 평균혈장 농도로부터 산출한 생체이용률 값(AUC_t , $C_{\max}$, $T_{\max}$, half-life)을 Table 2에 나타내었다.

3. 약동학적 지표에 대한 생물학적동등성 평가

한국유나이티드제약(주)의 스파신정은 삼아약품의 스파라정에 비하여 AUC_t 의 평균값의 비가 0.956이었으며(25562.7 vs. 26440.3 $\text{ng} \times \text{hr/mL}$), $C_{\max}$ 의 평균값의 비는 0.911이었다(1021.5 vs. 1096.0 ng/mL). $T_{\max}$ 의 경우 두 약

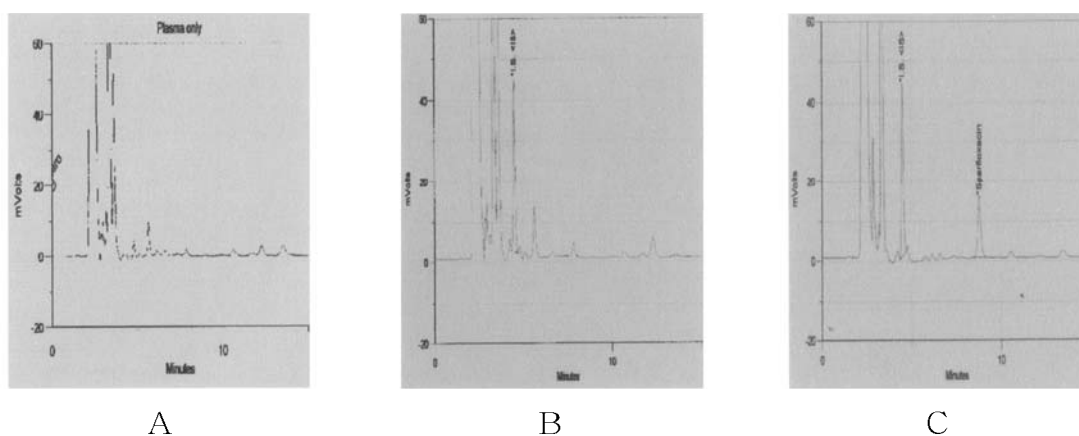


Fig. 1. HPLC chromatograms of plasma samples. (A) blank plasma, (B) plasma spiked with internal standard, and (C) plasma at 2 hr after 200 mg oral administration of Spara[®] tablets.

Table 1. Within-day and between-day precision and accuracy in analysis of plasma sparfloxacin concentrations (n=5)

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Precision (CV%)		Accuracy (%)
	Within-day	Between-day	
0.025	4.78	7.99	115.6
0.1	2.93	3.78	95.7
0.5	2.61	3.17	100.2
1	1.14	1.20	100.5
1.5	1.06	1.56	99.2
2	0.75	1.67	100.3

제 간의 평균치 비율의 90% 신뢰구간이 19.8899-70.6364로써 80~120% 이내에 들어야 한다는 기준을 만족시키지 못하였다. 하지만 생물학적동등성 판정의 주요 파라메타인 AUC_t , C_{max} 에 대한 두 제제 간에는 유의한 차이가 없었다. 즉 AUC_t 의 비율에 대한 90% 신뢰구간이 0.8987-1.0177, C_{max} 의 비율에 대한 90% 신뢰구간이 0.8309-1.0007로써 생물학적동등성 판정 기준인 $\log 0.8 \sim \log 1.25$ 에 포함되므로 두 약제는 생물학적으로 동등하다고 판단되었다(Table 3).

4. 임상조건

시험약과 대조약을 복용한 모든 피험자에게서 시험기간 및 시험이 완료된 시점까지 수축기 및 이완기 혈압은 정상범위에 있었으며 과민반응을 포함한 약물로 인한 이상반응은 나타나지 않았다.

고 찰

본 연구에서 스파라[®]정 200 mg을 복용한 건강한 지원자 26명에서 나타난 C_{max} 는 $1096.0 \pm 277.4 \text{ ng/mL}$ 이었으며 T_{max} 는 3.65 ± 1.6 시간이었다. Mody 등[12] 및 Shimada 등[13]은 건강한 성인에게 스파플록사신 200 mg을 경구 투여하였을 때 C_{max} 는 400-750 ng/mL, T_{max} 는 2-6

시간이고 반감기는 12-20시간이라고 보고하였다. 한국인의 스파플록사신의 약물동태에 대하여는 아직까지 보고된 바가 없지만 이 연구에서 나타난 결과로 보면 한국인이 서양인과 T_{max} 에는 별 차이가 없었지만 C_{max} 는 좀 더 높게 나타났다. 이 결과로 미루어볼 때 인종간의 sparfloxacin의 약동학적 차이는 약물용량 결정에 영향을 줄 수 있음을 시사하고 있다. 또한 Fillastre 등[8]은 신장기능에 따라 스파플록사신의 배설이 현저하게 지연된다고 보고하였다. 한편 Kamberi 등[14]은 정상인에서 체액의 pH 변화에 따라서 신장을 통한 스파플록사신의 배설은 별 영향이 없지만 스파플록사신의 흡수에는 큰 영향을 주며 따라서 생체이용률이 영향을 받는다고 보고하였다.

본 연구에서는 식품의약품안전청이 고시한 생물학적동등성 시험기준에 따라 건강한 성인 26명을 대상으로 2시기 2제품의 라틴방격법에 따라 2정(sparfloxacin, 100 mg/정)씩 경구 투여한 후 60시간까지 채혈하여 한국유나이티드제약(주)의 시험약인 스파신정이 삼아약품의 원제품인 스파라정과 생체이용률에 있어서 차이가 있는지를 통계학적으로 조사하였다. 각 피험자의 혈장 중 스파플록사신의 농도를 측정하고 AUC_t , C_{max} 및 T_{max} 를 산출하였다. 그 결과, 대조약인 스파라정의 평균 AUC 는 26440.3, 시험약인 스파신정은 25562.7로 대조약에 대한 시험약의 평균치의 비가 0.956(90% 신뢰구간: $0.8987 \leq \delta \leq 1.0177$)이

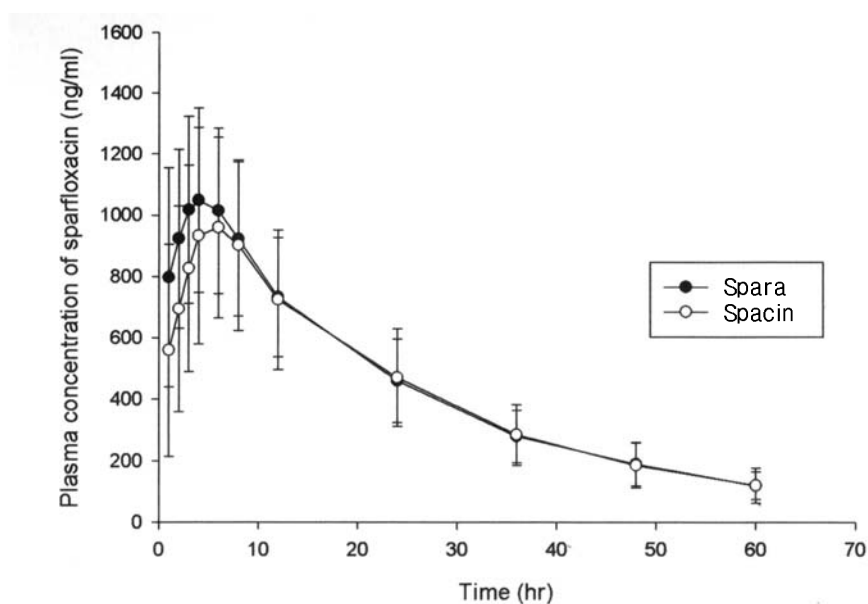


Fig. 2. Mean plasma concentration-time profiles of sparfloxacin in 26 healthy Korean volunteers after single oral administration of 200 mg of two sparfloxacin formulations. Data represented Mean $\pm$ SD.

Table 2. Comparison of sparfloxacin pharmacokinetic parameters after single oral administration of 200 mg of Spacin[®] or Spara[®] tablets

Pharmacokinetic parameters	Spacin [®]	Spara [®]
AUC _t (ng $\times$ hr/mL)	25562.7 $\pm$ 8323.8	26440.3 $\pm$ 7444.7
C _{max} (ng/mL)	1021.5 $\pm$ 338.5	1096.0 $\pm$ 277.4
T _{max} (hr)	5.31 $\pm$ 1.98	3.65 $\pm$ 1.6
Half-life (hr)	18.43 $\pm$ 3.56	18.02 $\pm$ 2.55
(Mean $\pm$ SD, n=26)		

Table 3. The mean and confidence intervals of the mean pharmacokinetic parameters of the test (Spacin[®] tablet) and the reference preparation (Spara[®] tablet)

	Pharmacokinetic parameters		
	AUC	C _{max}	T _{max}
Test/Reference	0.956	0.911	BA Diff(%) 45.263
Detectable difference (%)	11.196	17.197	43.305
1- β	>0.9	0.894	<0.6
90% CI	0.8987 $\leq \delta \leq$ 1.0177	0.8309 $\leq \delta \leq$ 1.0007	19.8899 $\leq \delta \leq$ 70.6364

었으며 C_{max}는 각각 1096과 1021.5로 대조약에 대한 시험약의 평균치 비가 0.911 (90% 신뢰구간:

0.8309 $\leq \delta \leq$ 1.0007)로 나타났고 대조약에 대한 시험약의 평균치 차이는 대조약의 log 0.8에서 log

1.25이내에 들어야 한다는 생물학적동등성 평가를 위한 전제조건을 만족시켰다. 또한 얻어진 생체이용률 변수에 대해 분산분석을 실시한 결과 (Table 3) 교차시험이 적절히 수행되었음을 확인하였으며 두 약제간에 주요 약동학적 변수인 AUC,와 C_{max} 의 유의한 차이를 볼 수 없었다. 따라서 본 연구는 건강한 한국인에서 스파플록사신의 약동학적 변수를 측정하여 보고하는 매우 의미 있는 연구결과를 제시하고 있으며 또한 한국유나이티드제약(주)의 스파신정(대조약인 원 개발제품인 삼아약품의 스파라정과 생물학적으로 동등하다는 사실을 입증하였다.

요 약

본 연구에서는 계명대학교 동산의료원에서 전문의사의 혈액병리검사, 혈액화학 검사, 뇨검사 및 내과적 검진을 포함하는 건강진단을 실시하여 건강인으로 판정된 성인 26명을 대상으로 스파플록사신 제제에 대한 생체이용률시험을 실시하였다. 본 시험은 무작위로 2등분하여 각 13명씩 2시기 2제품 라틴방격법(Latin square method)에 따른 교차시험으로서 1회 200 mg의 스파플록사신을 240 mL의 물과 함께 경구 투여하였다. 시험약은 스파신정(한국유나이티드제약), 대조약은 스파라정(삼아약품)을 사용하였고 1차 투약이 끝난 후 10일의 휴약기간을 가진 후에 2차 투약을 실시하였다. 본 연구는 계명대학교 동산의료원의 생물학적동등성 심사위원회 및 식품의약품안전청의 승인을 받았으며 피험자는 서면으로 동의하였다. 각 피험자의 스파플록사신의 혈장농도를 측정하여 산출한 약물농도-시간 곡선하면적(AUC), 최고 혈장중 농도(C_{max}) 및 최고 혈장중 농도 도달시간(T_{max})을 측정하여 건강한 한국인의 sparfloxacin의 약동학적 변수를 산출한 매우 의미 있는 연구결과를 제시하고 있으며 ANOVA분석으로 두 제제간의 약동학적 변수를 비교한 결과 식품의약품안전청에서 규정하는 생물학적동등성 평가를 위한 전제조건을 만족시켰다.

참 고 문 헌

1. Kojima T, Inoue M, Mitsunashi S. In vitro activity of AT-4140 against clinical bacterial isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;**33**:1980-8.
2. Nakamura S, Minami A, Nakata K, Kurobe N, Kouno K, Sakaguchi Y, *et al.* In vitro and in vivo antibacterial activities of AT-4140, a new broad-spectrum quinolone. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;**33**(8):1167-73.
3. Kojima T, Inoue M, Mitsunashi S. In vitro activity of AT-4140 against quinolone- and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;**34**(6):1123-7.
4. Barry AL, Fuchs PC. In vitro activities of sparfloxacin, tosufloxacin, ciprofloxacin, and fleroxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;**35**(5):955-60.
5. Nakamura S, Kurobe N, Ohue T, Hashimoto M, Shimizu M. Pharmacokinetics of a novel quinolone, AT-4140, in animals. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;**34**(1):89-93.
6. Miyamoto T, Matsumoto J, Chiba K, Egawa H, Shibamori K, Minamida A, *et al.* Synthesis and structure-activity relationships of 5-substituted 6,8-difluoroquinolones, including sparfloxacin, a new quinolone antibacterial agent with improved potency. *J Med Chem* 1990;**33**(6):1645-56.
7. Montay G, Bruno R, Vergniol JC, Ebmeier M, Le Roux Y, Guimart C, *et al.* Pharmacokinetics of sparfloxacin in humans after single oral administration at doses of 200, 400, 600, and 800 mg. *J Clin Pharmacol* 1994;**34**(11):1071-6.
8. Fillastre JP, Montay G, Bruno R, Etienne I, Dhib M, Vivier N, *et al.* Pharmacokinetics of sparfloxacin in patients with renal impairment. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;**38**(4):733-7.
9. Lyon DJ, Cheung SW, Chan CY, Cheng AF. Rapid HPLC assay of clinafloxacin, fleroxacin, levofloxacin, sparfloxacin and tosufloxacin.

- J Antimicrob Chemother* 1994;**34**(3):446-8.
10. Kamberi M, Kamberi P, Hajime N, Uemura N, Nakamura K, Nakano S. Determination of sparfloxacin in plasma and urine by a simple and rapid liquid chromatographic method. *Ther Drug Monit* 1999;**21**:411-5.
 11. 생물학적동등성 시험기준. 식품의약품안전청 고시 제 2002-60호, 2002. 11. 22.
 12. Mody VD, Pandya KK, Satia MC, Modi IA, Modi RI, Gandhi TP. High performance thin-layer chromatographic method for the determination of sparfloxacin in human plasma and its use in pharmacokinetic studies. *J Pharm Biomed Anal* 1998;**16**:1289-94.
 13. Shimada J, Nogita T, Ishibashi Y. Clinical pharmacokinetics of sparfloxacin. *Clin Pharmacokinet* 1993;**25**:358-69.
 14. Kamberi M, Kotegawa T, Tsutsumi K, Nakamura K, Nakano S. Sparfloxacin pharmacokinetics in healthy volunteers: the influence of acidification and alkalinization. *Eur J Clin Pharmacol* 1998;**54**: 633-7.