

식품의약품안전처 공고 제2022 - 343호

「약사법」 제51조제1항에 따른 「대한민국약전」(식품의약품안전처 고시 제2022-36호, 2022. 5. 10.)을 일부 개정함에 있어 국민에게 미리 알려 의견을 수렴하고자 그 취지, 개정 이유 및 주요 내용을 「행정절차법」 제46조에 따라 다음과 같이 공고합니다.

2022년 7월 27일

식품의약품안전처장

대한민국약전 일부개정고시(안) 행정예고

1. 개정이유

「대한민국약전」 기준·규격을 국제조화하여 의약품의 적정한 품질관리를 합리적으로 지원하고, 제형 특성을 고려하여 최신 과학수준에 맞게 개선함으로써 기준·규격을 선진화하고 우수한 품질의 의약품이 유통될 수 있도록 함

2. 주요내용

- 가. 통칙, 제제총칙 및 일반시험법의 ‘수액용고무마개시험법’을 ‘주사제용고무마개시험법’으로 개정하고 적용대상을 확대함. 고무마개의 성능시험을 추가하고 동물시험을 대체하는 등 시험법을 국제조화
- 나. 제제총칙 중 점안제 항에 점안제는 원칙적으로 이물이 없음을 정의함

에 추가하고, 현탁점안제는 불용성이물시험 적용을 제외
다. 각조 제 2부 중 ‘가미소요산엑스 과립’ 등 9품목 시험법 개정
라. 일반정보 ‘의약품 시험방법 유효성 검증’ 중 5. 시험방법 베리피케이션 실
시 5.2 정량시험(낮은농도, 예: 순도시험의 정량시험 등) 항목에서 검출
한계 삭제, 5.4 한도시험(정량한계와 근접한 기준농도) 항목에서 시험과
라미터를 특이성, 정확성, 정밀성에서 특이성, 검출한계로 수정, 5.5. 한
도시험(정량한계보다 현저히 높은 기준농도) 항목을 삭제

3. 의견제출

「대한민국약전」 일부개정고시(안)에 대하여 의견이 있는 단체 또는
개인은 2022년 9월 25일까지 다음 사항을 기재한 의견서를 식품의약품
안전처장(주소: (우) 28159, 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로
187 식품의약품안전처, 전자메일: pharmpolicy@korea.kr)에게 제출하여
주시기 바랍니다.

가. 예고사항에 대한 의견(찬, 반 여부와 그 사유)

나. 성명(단체인 경우 단체명과 그 대표자 성명), 주소 및 전화번호

다. 기타 참고사항

식품의약품안전처 고시 제2022 - 호

「약사법」 제51조제1항에 따른 「대한민국약전」(식품의약품안전처 고시 제2022-36호, 2022. 5. 10.)을 다음과 같이 개정 고시합니다.

2022년 월 일

식품의약품안전처장

대한민국약전 일부개정고시(안)

대한민국약전 일부를 다음과 같이 개정한다.

별표 1 제5호 5.10. 중 “수액용고무마개시험법”을 “주사제용고무마개시험법.”으로 한다.

별표 2 II 제3호 3.1. 카목 중 “수액으로 쓰는 이 제제 중 100 mL 이상의 주사제의 유리용기에 쓰는 고무마개는 따로 규정이 없는 한 수액용고무마개시험법에 적합한 것을 쓴다.”를 “주사제에 쓰는 고무마개는 따로 규정이 없는 한 주사제용고무마개시험법에 적합한 것을 쓴다.”로 한다.

별표 2 II 제4호 4.1. 아목 중 “이 제제의 용기의 고무마개는 따로 규정이 없는 한 수액용고무마개시험법에 적합한 것을 쓴다.”를 “이 제제의 용기의 고무마개는 따로 규정이 없는 한 주사제용고무마개시험법에 적합한 것을 쓴다”로 한다.

별표 2 II 제6호 6.1. 가목 중 “점안제(點眼劑)는 결막낭 등의 눈 조직에

적용하는 액상의 무균제제 또는 쓸 때 녹이거나 현탁하여 쓰는 고형의 무균제제이다.”를 “점안제(點眼劑)는 결막낭 등의 눈 조직에 적용하는 액상의 무균제제 또는 쓸 때 녹이거나 현탁하여 쓰는 고형의 무균제제로, 이물은 없어야 한다.”로 한다.

별표 4 가미소요산엑스 과립의 확인시험 중 “5) 작약” 항과 “6) 감초” 항과 “7) 목단피” 항 및 “8) 치자” 항을 삭제하고, “9) 건강”을 “5) 건강”으로 하고, “10) 박하”를 “6) 박하”로 하며, “7) 작약, 감초, 목단피 및 치자 정량법에 따라 시험할 때 검액은 표준액과 같은 유지시간에서 피크를 나타낸다.”를 신설한다.

별표 4 단삼의 정량법 중 “희석시킨 메탄올(75→100)을 넣어 정확하게 50mL로 하여”를 “희석시킨 메탄올(75→100)을 넣어 정확하게 5mL로 하여”로 하고, “살비아놀산B ($C_{36}H_{30}O_{16}$)의 양 (mg) = 살비아놀산B표준품의 양 (mg) $\times \frac{A_T}{A_S}$ ”를 “살비아놀산B ($C_{36}H_{30}O_{16}$)의 양 (mg) = 살비아놀산B표준품의 양 (mg) $\times \frac{A_T}{A_S} \times 10$ ”으로 한다.

별표 4 마황의 정량법 중 칼럼의 길이 “15 ~ 20 cm”를 “15 ~ 25 cm”으로 한다.

별표 4 산사의 확인시험 2) 중 “아세트산에틸·헥산·메탄올·포름산혼합액(10 : 4 : 4 : 0.5)”을 “헥산·아세트산에틸·포름산혼합액(20 : 10 : 1)”로 하고, “물은 황산시액”을 “분무용 황산시액”으로 한다.

별표 4 센나엽의 정량법 중 칼럼의 길이 “15 ~ 20 cm”를 “15 ~ 25 cm”으

로 한다.

별표 4 쌍화탕 액의 확인시험 중 “1) 작약” 항목을 삭제하고, “2) 당귀”를 “1) 당귀”로 하고, “3) 숙지황”을 “2) 숙지황”으로 하며, “4) 천궁”을 “3) 천궁”으로 하고, “5) 황기”를 “4) 황기”로 하며, “6) 감초” 항목을 삭제하고, “7) 육계”를 “5) 육계”로 하고, “8) 대추”를 “6) 대추”로 하며, “9) 생강”을 “7) 생강”으로 하고, “8) 작약, 감초 정량법에 따라 시험할 때 검액은 표준액과 같은 유지시간에서 피크를 나타낸다.”를 신설한다.

별표 4 쌍화탕엑스 과립의 확인시험 중 “1) 작약” 항목을 삭제하고, “2) 당귀”를 “1) 당귀”로 하고, “3) 숙지황”을 “2) 숙지황”으로 하며, “4) 천궁”을 “3) 천궁”으로 하고, “5) 황기”를 “4) 황기”로 하며, “6) 감초” 항목을 삭제하고, “7) 육계”를 “5) 육계”로 하고, “8) 대추”를 “6) 대추”로 하며, “9) 생강”을 “7) 생강”으로 하고, “8) 작약, 감초 정량법에 따라 시험할 때 검액은 표준액과 같은 유지시간에서 피크를 나타낸다.”를 신설한다.

별표 4 육미지황탕엑스 과립의 확인시험 중 “2) 목단피” 항목을 삭제하고, “3) 복령”을 “2) 복령”으로 하고, “4) 산수유”를 “3) 산수유”로 하며, “5) 산약”을 “4) 산약”으로 하고, “6) 택사”를 “5) 택사”로 하며, “6) 목단피 정량법에 따라 시험할 때 검액은 표준액과 같은 유지시간에서 피크를 나타낸다.”를 신설한다.

별표 4 형개연교탕엑스 과립의 확인시험 중 “4) 감초” 항목을 삭제하고, “5) 당귀”를 “4) 당귀”로 하고, “6) 방풍”을 “5) 방풍”으로 하며, “7) 연교”를 “6) 연교”로 하고, “8) 작약” 항목을 삭제하며, “9) 지실”을 “7) 지실”로 하

고, “10) 천궁”을 “8) 천궁”으로 하며, “11) 치자” 항을 삭제하고, “12) 형개”를 “9) 형개”로 하며, “13) 황금” 항을 삭제하고, “10) 감초, 작약, 치자 및 황금 정량법에 따라 시험할 때 검액은 표준액과 같은 유지시간에서 피크를 나타낸다.”를 신설한다.

별표 5 중 “34. 수액용고무마개시험법”을 “34. 주사제용고무마개시험법”으로 하고, 34. 주사제용고무마개시험법(현행 34. 수액용고무마개시험법)을 다음과 같이 한다.

34. 주사제용고무마개시험법

주사제용고무마개는 주사제용 용기를 막는 데 쓰는 고무마개(플라스틱 등의 재료로 코팅 또는 라미네이트한 것 포함)를 말한다. 고무마개는 내용 의약품과 물리적 또는 화학적으로 작용하여 그 성상 및 품질에 영향을 미치지 않고 미생물의 침입을 방지하며 주사제를 쓰는 데에 기능성 등 지장을 주지 않는 것으로 한다.

1) **용출물시험** 고무마개를 물로 씻어 실온에서 말린다. 표면적이 약 $100 \pm 10 \text{ cm}^2$ 가 되도록 검체를 취하여(필요한 경우 표면적이 100 cm^2 에 근접하도록 여러 개의 검체를 취한다) 경질 유리 용기에 통째로 넣고 검체 1 cm^2 당 2 mL 가 되도록 정제수 또는 주사용수를 넣어 무게를 단다. 경질 유리 또는 이와 유사한 비반응성 용기를 마개로 한 다음 고압증기멸균기를

써서 20 ~ 30분에 121 ± 2 °C에 도달하도록 가열하고, 30 분간 이 온도를 유지한다. 이때 물과 온도 프로브를 넣은 용기를 검체와 함께 고압증기멸균기에 넣어 온도를 제어한다. 검체 용기를 꺼내어 약 30분에 걸쳐 실온이 될 때까지 방치하고 정제수 또는 주사용수를 넣어 원래의 질량이 되도록 한 다음

즉시 흔들고 기울여 취한 액을 검액으로 한다. 따로 정제수 또는 주사용수 200 mL를 가지고 같은 방법으로 공시험액을 만든다. 검액 및 공시험액을 가지고 다음 시험을 한다. 다만, 사) 휘발성황화물의 시험용 검체 및 비교액은 따로 조제한다.

가) 탁도 탁도시험법에 따라 육안법 또는 광전광도법으로 비교하여 시험한다.

제 1 법 육안법 탁도시험법의 육안법에 따라 시험할 때 검액은 탁도비교액 II보다 진하지 않다. 단, 다회 사용 목적의 고무마개로 시험할 때 검액은 탁도비교액 III보다 진하지 않다.

제 2 법 광전광도법 탁도시험법의 광전광도법에 따라 적절히 교정된 탁도계를 써서 탁도비교액들의 탁도를 측정한다. 공시험액을 같은 방법으로 측정하여 보정할 때 탁도비교액 I, 탁도비교액 II, 탁도비교액 III 및 탁도비교액 IV는 각각 3, 6, 18 및 30 NTU를 나타낸다. 교정된 탁도계를 써서 공시험액의 탁도로 보정한 검액의 탁도는 6 NTU 이하이다. 단, 다회 사용 목적의 고무마개로 시험할 때 공시험액의 탁도로 보정한 검액의 탁도는 18 NTU 이하이다.

나) **색상** 색의 비교액 0.3 mL에 묽은염산 97 mL를 넣어 표준액으로 한다. 바닥이 편평하고 안지름이 15 ~ 25 mm인 무색투명한 비반응성 재질의 동일한 시험관을 써서, 한쪽에는 검액을 40 mm 깊이로 넣고, 다른 한쪽에는 색 표준액을 같은 깊이로 넣어 흰색 배경을 써서 직사광선을 피하여 밝은 빛 아래에서 수직으로 관찰하여 비교할 때 검액의 색은 표준액보다 진하지 않다.

다) **산 또는 알칼리** 검액 20 mL에 브로모티몰블루용액 0.1 mL를 넣을 때 노란색일 경우 파란색이 나타날 때까지 0.01 mol/L 수산화나트륨액으로 적정한다. 파란색이 나타나면 다시 노란색이 나타날 때까지 0.01 mol/L 염산으로 적정한다. 다만 용액이 초록색일 때는 중성이며 적정을 할 필요는 없다. 공시험액을 가지고 같은 방법으로 적정하여 보정한다. 파란색이 나타나는 데 소비된 0.01 mol/L 수산화나트륨액의 소비량이 0.3 mL 이하이거나, 노란색이 나타나는 데 소비된 0.01 mol/L 염산의 소비량이 0.8 mL이거나 또는 적정을 할 필요가 없을 때 적합하다.

○ 브로모티몰블루용액: 브로모티몰블루 50 mg을 0.02 mol/L 수산화나트륨액 4 mL 및 에탄올(96) 20 mL의 혼합액에 녹이고 물을 넣어 100 mL로 한다.

라) **환원성물질** 검액을 만든 다음 4 시간 이내에 시험한다. 검액 20.0 mL에 묽은 황산 1 mL 및 0.002 mol/L 과망간산칼륨용액 20.0 mL를 넣고 3 분 동안 끓인다. 식힌 다음 요오드화칼륨 1 g을 넣고 즉시

전분시액 0.25 mL를 지시약으로 넣고 0.01 mol/L 티오황산나트륨액으로 적정한다. 같은 방법으로 공시험액을 가지고 적정한다. 0.01 mol/L 티오황산나트륨액의 소비량의 차이를 구할 때 3.0 mL 이하이다. 단, 다회 사용 목적의 고무마개로 시험할 때 0.01 mol/L 티오황산나트륨액의 소비량의 차이는 7.0 mL 이하이다.

마) 자외부흡수스펙트럼 검액을 만든 다음 5 시간 이내에 시험한다. 검액을 공경 0.45 μm 의 불활성 필터로 여과하여 처음 몇 mL는 버리고 다음 여액을 쓴다. 여액을 가지고 공시험을 대조로 하여 1 cm 셀을 써서 자외가시부흡광도측정법에 따라 시험할 때 파장 220 ~ 360 nm에서의 흡광도는 0.2 이하이다. 다만, 다회 사용 목적의 고무마개로 시험할 때 흡광도는 4.0 이하이다. 여액을 희석하여 측정한 경우는 희석배수로 보정한다.

바) 암모늄 검액 5 mL에 물을 넣어 14 mL로 한다. 필요하면 1 mol/L 수산화나트륨시액을 넣어 알칼리성으로 하고 물을 넣어 15 mL로 한다. 여기에 알칼리성 사요오드화수은칼륨용액 0.3 mL를 넣고 용기를 막아 시험액으로 한다. 따로 염화암모늄용액[1 ppm의 암모늄(NH_4^+)] 10 mL에 물 5 mL를 넣고 알칼리성 사요오드화수은칼륨용액 0.3 mL를 넣고 용기를 막아 비교액으로 한다. 시험액 및 비교액을 5 분간 방치할 때 시험액이 나타내는 노란색은 비교액이 나타내는 색보다 진하지 않다(시험액 중 암모늄(NH_4^+) 2 ppm).

○ 알칼리성 사요오드화수은칼륨용액: 요오드화칼륨 11 g 및 요오드

화수은(II) 15 g을 물에 녹여 100 mL로 한다. 쓰기 직전에 이 용액과 25 % 수산화나트륨용액을 같은 부피로 섞는다.

사) **휘발성 황화물** 고무마개를 필요하면 자르고 총 표면적이 20 ± 2 cm²가 되도록 하여 100 mL 플라스크에 넣고 2 w/v% 시트르산용액 50 mL를 넣어 시험용 검체로 한다. 동시에 같은 방법으로 2 w/v% 시트르산용액 50 mL에 황화나트륨 0.154 mg을 녹여 비교액으로 한다. 시험용 검체 및 비교액의 각 플라스크 입구에 아세트산납지 조각을 올려놓고 그 위에 칭량병을 거꾸로 놓아 아세트산납지를 고정한다. 따로 시험용 검체에 사용된 것과 비슷한 플라스크에 물 50 mL를 넣고 고압증기멸균기의 프로그램 제어용 온도 프로브를 담근다. 고압증기멸균기로 가열하여 20 ~ 30 분 이내에 121 ± 2 °C에 도달하도록 하고, 30 분간 이 온도를 유지한다. 약 30 분에 걸쳐 실온이 될 때까지 냉각할 때 시험용 검체가 나타내는 아세트산납지의 검은 얼룩은 비교액이 나타내는 것보다 진하지 않다.

2) **생물학적반응시험** 이 시험은 검체의 독성을 평가하는 시험으로 시험관 내 시험(in-vitro)과 생체 내 시험(in-vivo)을 포함한다. 검체는 시험관 내 시험에 적합하여야 하며 이에 적합하지 않을 때는 생체 내 시험을 실시하여 최종 판정한다.

가) 시험관 내 시험 (*in-vitro*)

이 시험은 규정된 표면적에 대해 실시하는 것이 필수이나, 검체의 표면적을 측정할 수 없을 때는 1 mL 당 0.1 g을 쓴다. 검체의 특성 등

을 고려하여 다음 방법 중 적절한 방법에 따라 시험한다.

시험법

시험대조재료 (1) 음성대조재료 고밀도 폴리에틸렌표준품

(2) 양성대조재료 0.1 % 디에틸디티오카르밤산아연 또는 0.25 % 디부틸디티오카르밤산아연을 함유하는 폴리우레탄 필름

세포배양액의 조제 세포주는 L-929 (ATCC 세포주 CCL1, NCTC 클론 929; 표준 저장소로부터 얻은 다른 세포주도 적절한 밸리데이션을 하여 쓸 수 있다) 포유동물 섬유아세포를 쓴다. 배지는 플라스틱제의약품용기시험법의 세포독성시험에 쓰는 소혈청 첨가(10 vol%) 이글최소필수배지를 쓴다. 이 배지 mL 당 세포주를 약 105 개의 밀도로 심어 계대 배양한다. 80 % 이상 분화될 때까지 이산화탄소 농도가 4 ~ 6 %, 온도가 36 ~ 37 °C인 습윤 배양기를 써서 24 시간 이상 배양한다. 배양된 세포를 현미경으로 관찰하여 세포 단층이 균일하고 거의 전체 면을 덮고 있는지를 확인한다.[주: 세포시험의 재현성은 세포배양액의 균일한 밀도에 달려 있다.]

추출용매 염화나트륨 주사액 (0.9 % 염화나트륨을 함유하는 각조의 염화나트륨 주사액)을 쓴다. 대신 무혈청 포유동물 세포배양 배지 또는 혈청 첨가 포유동물 세포배양 배지를 쓸 수 있다. 혈청은 37 °C에서 24 시간 추출하는 경우에 첨가한다.

장치

고압증기멸균기 고압증기멸균기는 온도계, 압력계, 배출 콕이 붙어

있고 시험 용기를 수면 위로 올려놓을 수 있는 선반과 시험용기를 약 20 °C로 냉각할 수 있는 것으로 121 ± 2 °C의 온도를 유지할 수 있는 것을 쓴다. 다만, 멸균 후 냉각할 때는 약 20 °C 아래로 내려가지 않도록 주의한다.

향온기 작동 온도 50 ~ 70 °C 범위에서 ± 2 °C의 정밀도를 가진 기계적인 순환식 향온기를 쓴다.

배양기 온도 37 ± 1 °C 및 5 ± 1 % 이산화탄소를 유지할 수 있는 습윤 배양기를 쓴다.

추출용기 앰플이나 나사식 마개가 달린 배양 시험관 또는 경질 유리로 된 동등한 시험관과 같은 용기만을 쓴다. 배양 시험관이나 동등한 것을 쓰는 경우는 적합한 탄성 고분자 라이너가 있는 나사식 마개로 닫는다. 탄성 고분자 라이너의 노출 표면은 두께 50 ~ 75 μm의 불활성 고체 디스크로 완전히 덮는다. 적당한 디스크로는 폴리테프 (polytef)로 만든 것을 쓸 수 있다.

장치의 준비 모든 유리 기구를 크롬산 세척 혼합액으로 철저히 씻고 필요하면 가열한 질산, 그 다음 멸균주사용수로 장시간 씻어낸다. 시험 재료의 추출, 이동 또는 투여에 쓰는 용기와 기구는 적당한 공정으로 멸균하고 말린다. 멸균 약제로 산화에틸렌을 쓰는 경우는 48 시간 이상에 걸쳐 완전히 탈기한다.

조작법

추출용 검체의 조제 나) 생체 내 시험의 조작법에 따른다.

추출액의 조제 생체 내 시험의 조작법의 추출액의 조제에 따라 추출 용매로 염화나트륨 주사액 (0.9 % 염화나트륨) 또는 무혈청 포유동물 세포배양 배지를 써서 만든다. [주: 배양기를 써서 37 °C에서 24 시간 추출하는 경우는 혈청이 첨가된 세포배양 배지를 쓴다. 추출 조건은 어떤 조건에서도 재료 조각이 약간 흡착되는 것을 제외하고는 용해나 용해와 같은 물리적 변화를 일으켜서는 안 된다.]

제 1 법 한천확산법 이 시험은 한천 층을 사용하여 고분자 검체로부터 침출 가능한 화학물질의 확산을 허용하는 동안 세포를 기계적인 손상으로부터 보호하기에 적절한 방법이다.

검체 조제 규정한 대로 조제한 추출액을 쓰거나 표면적이 100 mm² 이상의 편평한 표면을 가진 검체 부위를 쓴다.

양성대조 조제 검체 조제에 따라 조작한다.

음성대조 조제 검체 조제에 따라 조작한다.

조작법 세포배양액의 조제에 따라 만든 세포 부유액 7 mL를 취하여 지름 60 mm의 플레이트에 단층으로 만든다. 배양을 하고 단층으로부터 배지를 제거하고 2 % 이하의 한천을 함유하는 혈청 첨가 배지를 넣는다. [주: 한천의 양은 세포 성장을 조장하는 데에 적절해야 한다. 한천 층은 유출된 화학물질이 확산할 수 있을 정도로 얇아야 한다.] 검체, 음성대조 및 양성대조의 편평한 표면 또는 이들을 적절한 추출용매로 추출한 추출액을 고화시킨 한천 표면과 접촉하여 두 개의 배양액에 넣는다. 조제한 배양플레이트마다 3 개의 이하의 검체를

쓴다. 이들 모두를 가급적 이산화탄소 농도가 4 ~ 6 %, 온도가 36 ~ 37 °C인 습윤 배양기를 써서 24 시간 이상 배양한다. 필요하다면 적절히 염색하고 현미경을 써서 각 검체, 음성대조 및 양성대조 주변의 배양 세포를 관찰한다.

결과의 판정 생물학적 반응성(세포 변성 및 기형)은 0 ~ 4의 등급(표 1)으로 표시된다. 각 검체, 음성대조 및 양성대조에 대한 세포 배양액의 반응성을 측정한다. 세포배양 시험시스템은 관측된 음성대조에 대한 반응성이 등급 0(무반응성)이고, 양성대조에 대한 반응성이 적어도 등급 3(중간)일 때 적합하다. 검체는 검체 제제에 대한 반응성이 등급 2(약한 반응성) 이하일 때 이 시험의 요건에 적합하다. 시스템의 적합성이 확인되지 않으면 조작을 반복한다.

표 1. 한천확산법 및 직접접촉법에 따른 반응성 등급

등급	반응성	반응성 구역의 성장
0	무반응성	검체 주변이나 아래에 반응성 구역이 없다.
1	미약한 반응성	검체 아래에 기형이나 변성된 세포가 약간 있다.
2	약한 반응성	검체 아래로 기형이나 변성이 한정되고, 검체 바깥의 반응성 구역이 0.45 cm 미만이다.
3	중간 반응성	검체 바깥의 반응성 구역이 0.45 ~ 1.0 cm 확장되어 있다.
4	심한 반응성	검체 바깥의 반응성 구역이 1.0 cm 넘게 확장되어 있다.

제 2 법 직접접촉법 이 시험은 세포에 기계적인 손상을 줄 수 있는 밀도가 매우 낮거나 높은 재료에는 적절하지 않을 수 있다.

검체 조제 표면적이 100 mm² 이상인 편평한 표면을 가진 시험 재료 부위를 쓴다.

양성대조 조제 검체 조제에 따라 조작한다.

음성대조 조제 검체 조제에 따라 조작한다.

조작법 세포배양액의 조제에 따라 만든 세포 부유액 2 mL를 취하여 지름이 35 mm인 배양플레이트에 단층으로 만든다. 배양을 하고 배양액으로부터 배지를 제거하고 신선한 배지 0.8 mL를 넣는다. 검체, 음성대조재료 및 양성대조재료를 두 개의 배양액의 각각에 하나씩 넣는다. 이들 모두를 가급적 이산화탄소 농도가 4 ~ 6 %, 온도가 36 ~ 37 °C인 습윤 배양기를 써서 24 시간 이상 배양한다. 필요하면 적절히 염색하고 현미경 하에서 또는 육안으로 검체, 음성대조 및 양성

대조 각각의 주변 배양액을 관찰한다.

결과의 판정 한천확산법의 결과의 판정에 따라 시험한다. 검체는 조제한 검체에 대한 반응성이 등급 2(약한 반응성)일 때 이 시험의 요건에 적합하다. 시스템의 적합성이 확인되지 않으면 조작을 반복한다.

제 3 법 용리법 이 시험은 고밀도 재료 및 용량-반응 평가에 적절하다.

검액 조제 추출액의 조제에 따라 추출용매로 염화나트륨 주사액(0.9% 염화나트륨)이나 무혈청 포유동물 세포배양 배지를 써서 만든다. 검체의 표면적을 쉽게 측정할 수 없을 때는 추출용매 mL 당 고무마개 0.1 g의 질량을 달아 쓸 수 있다. 다른 방법으로는 생리적 조건에 가깝게 하기 위해서는 혈청 첨가 포유동물 세포배양 배지를 쓴다. 이산화탄소 농도가 4 ~ 6 %인 습윤 배양기를 써서 24 시간 이상 배양하여 추출액을 만든다. 추출온도는 고온이면 혈청 단백질을 변성시키기 때문에 36 ~ 38 °C를 유지한다.

양성대조추출액 조제 검액 조제에 따라 조작한다.

음성대조추출액 조제 검액 조제에 따라 조작한다. 음성대조재료로는 고밀도 폴리에틸렌 표준품을 쓴다.

조작법 세포배양액의 조제에 따라 만든 세포 부유액 2 mL를 취하여 지름이 35 mm인 배양플레이트에 단층으로 만든다. 배양을 하고 단층으로부터 배지를 제거하고 검체, 음성대조 및 양성대조의 추출액

을 넣는다. 혈청 첨가 및 무혈청 세포배양 배지 추출액은 희석하지 않고(100 %) 2 회 반복하여 시험한다. 염화나트륨주사액 추출액은 혈청 첨가 세포배양 배지로 희석하여 25 % 추출액 농도로 하고 2 회 반복하여 시험한다. 모든 배양액을 가급적 이산화탄소 농도가 4 ~ 6 %, 온도가 36 ~ 38 °C인 습윤 배양기를 써서 48 시간 배양한다. 필요하다면 적절히 염색하고 현미경 하에서 각각의 배양액을 관찰한다.

결과의 판정 한천확산법의 결과의 판정에 따라 조작하지만, 표 2를 사용하여 판정한다. 검체는 검체 추출액에 대한 반응성이 등급 2(약한 반응성)일 때 이 시험의 요건에 적합하다. 시스템의 적합성이 확인되지 않으면 조작을 반복한다. 용량-반응성 평가를 위해서는 검체 추출액을 정량적으로 희석하여 조작을 반복한다.

표 2. 용리법에 따른 반응성 등급

등급	반응성	모든 배양액의 상태
0	무반응성	세포질 내 과립의 분리; 세포 용해는 없다.
1	미약한 반응성	세포 수의 20% 이하가 둥글고 느슨하게 붙어 있으며 세포질 내 과립이 없고, 가끔 용해된 세포가 존재한다.
2	약한 반응성	세포 수의 50% 이하가 둥글고 세포질 내 과립이 전혀 없다. 세포 용해가 심하지 않고, 세포들 사이에 빈 공간이 없다.
3	중간 반응성	세포층의 70% 이하가 둥근 세포이거나 용해되어 있다.
4	심한 반응성	세포층이 거의 완전히 파괴되어 있다.

나) 생체 내 시험(*in-vivo*)

이 시험은 검체가 시험관 내 시험 기준에 적합하지 않은 경우에 실시하며 생체 내 시험 결과로 최종 판정한다. 시험 조작 시 추출을 위한 특정 표면적이 필수적으로 필요하나, 시료의 표면적을 측정할 수 없을 때는 추출용매 mL 당 고무마개 0.1 g을 쓴다. 이 시험은 제 1 법 및 제 2 법에 따라 시험한다.

이 시험법의 목적상 정의를 다음과 같이 규정한다.

검체 시험 재료 또는 그 시험 재료로부터 만든 추출액.

공시험액 시험 재료의 추출에 쓴 같은 양의 추출용매로 시험 재료 없이 동일하게 처리한 액.

음성대조 시험 조건에서 반응을 일으키지 않는 재료로서 고밀도폴리에틸렌표준품.

조작법은 재료의 열적 저항에 따라 세 가지 표준온도, 즉 50, 70 및 121 °C 중 한 가지 조건으로 만든 추출액을 쓴다.

추출용매 염화나트륨 주사액(각조 참조), 0.9 % 염화나트륨을 함유하는 염화나트륨 주사액을 쓴다.

염화나트륨 주사액 · 에탄올 혼합액(19 : 1)

폴리에틸렌글리콜 400 (각조 참조)

식물유 새로 정제한 참기름 (각조 참조) 또는 면실유(각조 참조) 또는 그 밖의 적당한 식물유

의약품 용제 (해당되는 경우)

주사용수 (각조 참조)

[주: 새로 정제한 참기름 (각조 참조) 또는 면실유(각조 참조) 또는 그 밖의 적당한 식물유는 다음의 추가 요건에 적합하다. 가능한 한 새로 정제한 참기름을 구한다. 적절하게 사육한 동물 세 마리를 써서 부위당 기름 0.2 mL의 용량으로 10 개 부위에 피내 주사하고 24, 48, 72 시간에 동물을 관찰한다. 관찰 결과를 표 3에 표시한 점수로 각 부위의 등급을 기록한다. 세 마리의 토끼(30 개 주사 부위)에 대해 각 관찰 시점에서 홍반에 대한 평균 반응은 0.5 이하이고 부종은 1.0 이하이며 전체 지름이 10 mm 이상의 조직 반응을 나타내는 부위는 없다. 주사 부위에서의 기름 잔류물이 부종으로 오인되어서는 안된다. 부종 조직은 가볍게 누르면 희어진다.]

표 3. 피부반응 평가¹⁾

홍반 및 괴사딱지	점수
홍반이 없음	0
매우 미약한 홍반 (거의 감지할 수 없음)	1
명확한 홍반	2
중등도-심한 홍반	3
심한 홍반 (홍당무 홍색) - 약간의 괴사딱지 형성 (심부 손상)	4
부종 형성 ²⁾	점수
부종이 없음	0
매우 약한 부종 (거의 인지할 수 없음)	1
약간의 부종(부위의 가장자리가 명확하게 올라옴)	2
중등도 부종 (약 1 mm 부어오름)	3
심한 부종 (1 mm 넘게 부어오르고 노출 부위 위로 확장함)	4

- 1) Draize JH, Woodward G, Calvery HO. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. J Pharmacol Exp Ther 1944;82:377 - 390.
- 2) 공시험액 또는 추출용매로부터의 비염증성 (기계적) 부종은 제외한다.

장치 시험 장치는 다음과 같다.

고압증기멸균기 가)의 고압증기멸균기를 쓴다.

항온기 가)의 항온기를 쓴다.

추출용기 가)의 추출용기를 쓴다.

장치의 준비 모든 유리 기구를 크롬산 세척 혼합액으로 철저히 씻고, 필요하면 가열한 질산, 그 다음 물로 장시간 씻어낸다. 절단 도구는 검체를 절단하기 전에 적절한 방법으로 깨끗이 씻는다 (예, 아세트 및 염화메틸렌으로 연속적인 세척). 그 밖의 모든 장치는 적당한 세제로 철저히 문질러 닦고 여러 번 물로 잘 씻어낸다.

추출, 이동 및 투여에 쓰는 용기와 장비는 적당한 공정으로 멸균하고 말려 둔다. [주: 멸균제로 산화에틸렌을 쓰는 경우는 적절한 시간 방치하여 완전히 탈기한다.]

조작법

검체의 처리 전신주사법 및 피내시험법은 필요한 경우 모두 동일한 추출액을 써서 시험하거나 각 시험별로 별도의 추출액을 만들 수 있다. 표 4에 따라 검체를 준비하고 검체 또는 음성대조재료를 다음과 같이 처리하여 보풀이나 자유 입자와 같은 작은 입자들을 제거한다. 검체를 유리 마개가 달린 100 mL의 깨끗한 경질 유리 눈금실린더에 넣고 주사용수 약 70 mL를 넣는다. 약 30 초간 흔들고 물을 빼내고 이 조작을 반복한다. 식물유로 추출하기 위해 처리하는 조각들은 50 °C를 넘지 않는 온도의 건조기에서 말린다. [주: 검체는 마른 천이나 젖은 천으로 닦지 않으며 유기용매, 계면활성제 등으로 씻어 내거나 씻지 않는다.]

추출액의 조제 적절하게 처리한 시험용 검체를 추출 용기에 넣고 적절한 추출용매 20 mL를 넣는다. 시험에 필요한 각 추출용매에 대해

이 조작을 반복한다. 따로 주사용 및 비교용으로 각 추출용매를 가지고 공시험액 20 mL씩을 만든다. 고압증기멸균기에서 121 °C, 60 분, 항온기에서 70 °C, 24 시간, 또는 50 °C, 72 시간 가열하여 추출한다. 용기 내의 액체가 추출온도에 도달할 때까지 적절한 시간 방치한다. [주: 추출 조건은 어떤 경우에도 검체 조각의 용융이나 용해와 같은 물리적 변화를 일으켜 가용 표면적을 감소시켜서는 안 된다. 조각들이 약간 흡착하는 것은 허용할 수 있다. 추출용매에는 씻은 조각들을 항상 개별적으로 넣는다. 식물유를 써서 고압증기멸균기에서 추출하는 데 쓰는 배양 시험관은 나사 캡을 감압 접착성의 테이프로 적절히 밀폐한다.

실온으로 식히지만, 20 °C 아래로 내려가지 않도록 하고, 몇 분간 격렬하게 흔들고 각 추출액을 즉시 무균 조건에서 마른 멸균 용기에 따라낸다. 추출액은 20 ~ 30 °C에 저장하고 24 시간이 지난 것은 시험에 쓰지 않는다. 중요한 사항으로는 추출제와 플라스틱의 사용 표면적과의 접촉, 추출하는 동안의 시간과 온도, 적당한 냉각, 진탕 및 따르기 공정, 무균적 취급과 추출에 이은 추출액의 저장이다.

표 4. 사용하는 재료의 표면적¹⁾

재료의 형태	두께	추출용매 20 mL당 검체의 양	절단 방법
필름 또는 시트	< 0.5 mm	양면의 총 표면적 120 cm ² 에 해당하는 양	약 5 × 0.3 cm의 스트립
	0.5 ~ 1 mm	양면의 총 표면적 60 cm ² 에 해당하는 양	
판, 튜빙 및 성형품	> 1 mm	총 노출 표면적 60 cm ² 에 해당하는 양	약 5 × 0.3 cm 이하의 조각
고무마개	> 1 mm	총 노출 표면적 25 cm ² 에 해당하는 양	절단하지 않음 ²⁾

1) 검체의 구조 형상으로 인하여 표면적을 측정할 수 없을 때는 추출용매 1 mL 당 고무마개 0.1 g을 쓴다.

2) 고무마개는 그대로 쓴다.

제 1 법 전신주사법 이 시험은 마우스에 주사하여 시험 재료의 추출액에 대한 전신 반응을 평가하는 것이다. 타당성이 있을 때는 다른 주사 경로를 선택할 수 있다.

시험동물 시험에 쓴 적이 없는 체중 17 ~ 23 g의 건강한 알비노 마우스를 쓴다. 각 시험군에는 같은 기원의 마우스만을 쓴다. 물과 일반적으로 사용되고 조성을 아는 실험동물용 식이를 자유롭게 먹도록 한다.

조작법 각 추출액은 주사용량을 취하기 전에 격렬하게 흔들어 추출된 물질이 균일하게 분포되도록 한다. 시험군의 5 마리 마우스 각각에 표 5에 정해진 검체 또는 공시험액을 주사한다. 다만, 폴리에틸렌글리

콜 400으로 조제한 검체 추출액과 해당 공시험액은 각 g 당 염화나트륨주사액 4.1 용량으로 희석하여 mL 당 폴리에틸렌글리콜 약 200 mg 이 함유되도록 한다.

표 5. 주사 조작법 - 전신주사법

추출액 또는 공시험액	kg 당 용량	경로
염화나트륨 주사액	50 mL	IV
염화나트륨 주사액·에탄올(96) 혼합액 (19:1)	50 mL	IV
폴리에틸렌글리콜 400	10 g	IP
의약품 제제의 용제	50 mL	IV
(해당되는 경우)	50 mL	IP
식물유	50 mL	IP

IV : 정맥 주사(수성의 검체와 공시험액)

IP : 복강 주사(유성의 검체와 공시험액)

주사 후 즉시 동물을 관찰하고, 다시 주사 후 4 시간, 그 다음 적어도 24, 48, 및 72 시간에 관찰한다. 관찰 기간 동안 검체의 추출액으로 처리한 어느 동물도 공시험액으로 처리한 동물보다 생물학적 반응성이 유의하게 더 크게 나타내지 않으면 검체는 이 시험의 요건에 적합하다. 2 마리 또는 그 이상이 죽거나, 경련이나 탈진과 같은 비정상적인 거동이 2 마리 또는 그 이상에서 나타나거나, 2 g을 넘게 체중 감소가 3 마리 또는 그 이상의 마우스에서 나타나면 검체는 이 시험의 요건에 적합하

지 않다. 검체로 처리한 동물에서 어떤 동물이라도 생물학적 반응성을 약간이라도 나타내거나, 1 마리 이하의 동물이 전반적인 생물학적 반응성을 보이거나 죽으면 10 마리의 마우스를 써서 이 시험을 반복한다. 반복 시험에서는 시료로 처리한 10 마리 모두 관찰 기간 중에 공시험액으로 처리한 동물 이상의 유의한 생물학적 반응성을 나타내지 않는다.

제 2 법 피내시험법 이 시험은 토끼 또는 기니피그에 피내 주사하여 시험 재료의 추출액에 대한 국소 반응을 평가하는 것이다.

시험동물 건강한 토끼 또는 기니피그로 털을 바짝 깎을 수 있고 피부에 기계적 자극이나 외상이 없는 것을 쓴다. 동물의 취급에 있어서는 관찰 기간 중에 부종과 기름 잔류물을 구별할 때를 제외하고는 주사 부위에 닿는 것을 피한다.

조작법 주사용량을 취하기 전에 추출 물질이 고르게 분산될 수 있도록 세계 흔든다. 시험 당일, 충분히 넓은 시험 면적 위로 동물의 척추 양쪽 등 위의 털을 집게로 꼭 고정한다. 기계적인 자극이나 외상을 피한다. 흐트러진 털은 감압으로 제거한다. 필요한 경우, 묽은 에탄올 솜으로 가볍게 닦고 주사하기 전에 피부를 말린다. 시험 결과에 영향이 없을 것으로 결정되면, 토끼 또는 기니피그 한 마리당 해당 검체에서 얻은 한 종류 이상의 추출액을 쓸 수 있다. 각 검체에 대해 동물 2 마리를 쓰고 각 동물의 한쪽에는 검체를, 다른 한쪽에는 공시험액을 표 6에 나타낸 바와 같이 피내 주사한다. 다만, 폴리에틸렌글리콜 400으로 조제

한 검체 추출액과 해당하는 공시험액은 1 g당 염화나트륨 주사액 7.4 용량으로 희석하여 mL당 폴리에틸렌글리콜 약 120 mg의 농도가 되도록 희석한다.

표 6. 피내시험법

추출액 또는 공시험액	동물당 부위 수	부위당 용량 (μL)
검체	5	200
공시험액	5	200

주사 부위에 홍반, 부종 및 괴사와 같은 조직 반응의 증거를 조사한다. 필요하다면, 주사 부위의 판독을 쉽게 하기 위하여 피부를 묽은 에탄올 솜으로 가볍게 닦는다. 주사 후 24, 48 및 72 시간에 모든 동물을 관찰한다. 검체 추출액과 공시험액에 대해 표 3을 사용하여 관찰 결과를 점수로 매긴다. 관찰 기간 중에는 필요한 만큼 털을 클립으로 다시 잡는다. 각 토끼 또는 기니피그에 대해 매 점수 부여 간격(24, 48 및 72 시간)마다 평균 홍반 및 부종 점수를 측정한다. 72 시간대 점수를 측정한 다음 각 검체와 공시험액에 대해 구분하여 모든 홍반 점수와 부종 점수를 합하여 총점을 계산한다. 각각의 총점을 12(2 마리 × 3 회의 점수측정 기간 × 2 종의 평가 영역)로 나누어 각각의 해당하는 공시험액에 대한 각 검체의 전체 평균 점수를 구한다. 검체와 공시험

액의 평균 점수의 차이가 1.0 또는 그 미만일 때 이 시험의 요건에 적합하다. 어떤 관찰 기간에서도 검체에 대한 평균 반응이 공시험액에 대한 평균 반응보다 의심스럽게 더 큰 경우에는 토끼 또는 기니피그 3 마리를 추가하여 시험을 반복한다. 검체와 공시험액의 평균 점수의 차이가 1.0 또는 그 미만일 때 이 시험의 요건에 적합하다.

3) 기능시험

이 시험은 주삿바늘을 쓰는 고무마개에 적용한다. 재밀봉성은 다회용 용기에 쓰는 고무마개일 경우에만 한다.

고무마개의 투침성, 파편화 및 재밀봉성은 마개 통째로 시험하고, 검체는 용출물시험의 검액 조제법에 따라 처리한 고무마개를 바람에 말린 것을 쓴다. 각 시험에서는 바깥지름 0.8 mm(21 게이지)이고 운할 처리된 긴 베벨(베벨 각도 $12 \pm 2^\circ$)의 새로운 주삿바늘을 가지고 각 마개에 대하여 돌리지 않고 마개의 표면에 대해 수직으로 찌른다.

가) 투침성 10 개의 적합한 바이알을 물로 표시 용량까지 채우고 검체로 바이알을 막고 캡으로 고정한다. 각 검체를 찌르는 데 필요한 힘은 ± 0.25 N의 정확도로 측정할 때 10 N 이하이다.

나) 파편화 고무마개를 수성 제제에 쓰는 경우 12 개의 깨끗한 바이알에 표시 용량에서 4 mL를 뺀 양에 해당하는 물을 넣고, 검체로 바이알을 막고 캡으로 고정한 다음 16 시간 동안 방치한다. 고무마개를 건조 제제에 쓰는 경우, 검체로 깨끗한 바이알 12 개를 막는다. 깨끗한 주사기에 끼운 바늘을 써서 1 mL의 물을 바이알에 주입하고 1

mL의 공기를 빼낸다. 이 조작을 각 마개에 대해 매번 마개의 다른 부위를 찢러 4 회 반복한다. 각 마개마다 새 바늘을 쓰고 시험하는 동안 바늘이 뭉툭해지지 않는지 확인한다. 그 다음 공경 0.5 μm 인 필터를 써서 바이알 속의 액체를 여과하여 육안으로 볼 수 있는 고무 파편의 수를 셀 때 총 파편의 수는 5 개 이하이다. 이 한도는 지름이 50 μm 이상인 조각이 육안으로 보인다는 가정을 기반으로 한 것이다. 의심이 있거나 논란의 여지가 있을 때는 현미경으로 조각을 검사하여 그 특성과 크기를 확인한다.

다) 재밀봉성 10 개의 바이알을 물로 채우고 검체로 바이알을 막고 캡으로 고정한다. 각 검체를 매번 다른 부위를 찢러 10 회 반복한다. 바이알을 0.1 % 메틸렌블루용액에 똑바로 세워 담그고 외부 압력을 10 분 동안 27 kPa까지 낮춘다. 대기압으로 복원하고 바이알을 30 분 동안 담근 상태로 둔다. 바이알의 외부를 씻고 관찰할 때 파란 색조를 띠는 것은 없다.

별표 6 16. 의약품 시험방법 베리피케이션 제4호 중 4.3을 다음과 같이 한다.

4.3 시험방법의 분류

시험방법은 목적(정량시험, 확인시험 등)에 따라 다양한 방법이 사용되므로, 서로 다른 목적에 대해서는 각기 다른 시험방법 베리피케이션 항목을 수행하는 것이 타당하다. 시험방법 베리피케이션이 필요한 4가지 시험 목적과 각 목적별 필요 파라미터를 제시하고자 한다.

- 1) 확인시험
- 2) 정량시험(낮은 농도)
- 3) 정량 및 한도시험(높은 농도)
- 4) 한도시험(정량한계와 근접한 기준농도)

별표 6 16. 의약품 시험방법 베리피케이션 제5호 중 5.2부터 5.4까지를 다음과 같이 한다.

5.2 정량시험(낮은 농도, 예: 순도시험의 정량시험 등)

파라미터	수행 여부	비고
특이성	○	-
정확성	○	
정밀성	○	
정량한계 (LOQ)	○	- 정량한계 근처 농도의 시료 분석

5.3 정량 및 한도시험(높은 농도, 예: 함량, 용출시험 등)

파라미터	수행 여부
특이성	○
정확성	○
정밀성	○

5.4 한도시험(정량한계와 근접한 기준농도)

파라미터	수행 여부	설명
특이성	○	-
검출한계 (LOD)	○	- 검출한계 근처 농도의 시료 분석

부 칙

제1조(시행일) 이 고시는 고시 후 3개월이 경과한 날부터 시행한다.

제2조(적용례) 이 고시는 이 고시 시행 후 최초로 제조업자가 제조하거나 수입자가 수입한 의약품부터 적용한다.

제3조(주사제용고무마개시험법 중 카드뮴, 납 항목에 관한 경과조치) 별표5 제34호 카드뮴 및 납의 개정규정에도 불구하고 「의약품의 품목허가·신고·심사 규정」(식품의약품안전처 고시 제2021-90호, 2021.11.11.) 제7조제2호다목4)나)(6)의 규정에 따른 자료를 제출하지 아니한 품목은 종전의 카드뮴, 납 항목에 관한 시험법을 적용해야 한다.