약학회지 제 55 권 제 2 호 131~137 (2011)
Yakhak Hoeji Vol. 55, No. 2

藥學會誌

도베실산칼슘 정 및 아세피필린 정의 용출시험법 개발

박찬호# · 이진하 · 김은정 · 손경희* · 김영옥* · 김동섭* · 송영미** · 사홍기*** · 최후균****
광주지방식품의약품안전청 유해물질분석과, *식품의약품안전평가원, **식품의약품안전청 약효동등성과,
***이화여자대학교 약학대학, ****조선대학교 약학대학
(Received February 10, 2011; Revised March 10, 2011; Accepted March 21, 2011)

Development of the Dissolution Test for Dobesilate Calcium Tablets and Acepifylline Tablets

Chan Ho Park#, Jin Ha Lee, Kim Eun Jung, Dong Sup Kim*, Young Ok Kim*, Kyung Hee Sohn*, Young Me Song**, Hong Kee Sah*** and Hoo-Kyun Choi****
Hazardous Substances Analysis Division, Gwangju Regional Food and Drug Administration, Gwangju 500-480, Korea
**National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Cheongwon 363-951, Korea*
***Korea Food and Drug Administration, Bioequivalence Evaluation Divison, Cheongwon 363-951, Korea*
****College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea*
*****College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea*

Abstract — The dissolution test method and an analytical procedure by HPLC were developed and validated for dobesilate calcium tablets and acepifylline tablets. These drugs were not yet characterized by the dissolution specifications in Korean Pharmaceutical Codex. So, with each reference and test drugs, we did the preliminary and standard experiments based on the Korean Pharmacopeia Guideline of dissolution testing for solid oral dosage forms. The dissolution test for dobesilate calcium tablets was carried out under sink conditions as following: dissolution medium water, paddle rotation speed 50 rpm and vessel volume 900 m*l*. More than 90% of its label amount was released within 30 min in this method. Also the dissolution test for acepifylline tablets was carried out under sink conditions as follows: dissolution medium water, paddle rotation speed 100 rpm and vessel volume 900 m*l*. More than 90% of its label amount was released within 45 min in this method. The dissolution samples were analyzed with a precise and accurate HPLC method. The developed dissolution test showed specificity, linearity, precision and accuracy within the acceptable range. The dissolution testing method described above was adequate for the purpose and may be proposed as a pharmacopeial standard to assess the performance of dobesilate calcium tablets and acepifylline tablets.

Keywords □ dissolution test, dobesilate calcium tablets, acepifylline tablets

용출시험은 제형으로부터의 약물 방출 및 생리적 조건에서 약물의 용출 또는 가용화를 조사하는 시험으로서 경구 투여된 제제가 생체 내에서 어떻게 작용할 것인가를 예측 가능하게 한다. 일반적으로 용출시험은 생체내외 상관성 설정뿐만 아니라 제품 롯트별 품질의 균일성, 생산 공정의 밸리데이션, 제품의 안정성, 제제 조성 및 처방 개발, 유효기간 중 품질의 적합성 여부 판단 등에 대한 유용한 정보를 제공하고, 의약품의 품질확보뿐만 아니라 제제학적인 면에서 처방 및 제조공정 등의 변동을 관리하기 위한 객관적이며 유효한 관리수단으로 활용되고 있다.[1-6] 종래에는 고형제제의 품질평가에 대하여 유효성분의 확인, 순도, 함량 등의 화학시험 외에 경도, 질량편차, 붕해시험 등의 제제학적 시험이 품질시험의 주를 이루었으나 최근 생체이용률에 관심이 점차 높아지고 제제 기술의 발달로 처방과 제조공정 등의 변경이 빈번하게 이루어져 용출시험은 경구용 고형제제에서 점차 필수적인 시험항목으로 인식되고 있다. 또한 국제적으로도 의약산업과 규격의 변화 · 발달이 진행되면서 그 중요성이 더욱 부각되고 있는 시험이다. 그러나 현재까지 허가(신고)된 의약품 중 많은 품목에서 용출규격이 설정되어 있지 않으며 「대한약전외 의약품 기준(Korean Pharmaceutical Codex, KPC)」에 수재된 의약품 중 용출규격 미설정 품목은 273품목에 달한다.[7] 따라서 국내유통 의약품의 품질관리 제고와 의약품 규격의 국제화를 위해 용출규격이 미설정된 품목에 대한 용출을 연구하여 규격을 새

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 062-602-1503 (팩스) 062-602-1440
(E-mail) beat75@korea.kr

로 설정하는 것이 시급히 요구되고 있다.[8,9] 이에 본 연구에서는 「대한약전외 의약품 기준」에 수재된 의약품 중 용출규격이 설정되지 않은 도베실산칼슘 정과 아세피필린 정을 선정하여 용출시험 분석을 위한 새로운 HPLC 분석법을 검증시험을 통해 확립하고, 「경구용의약품의 용출 규격 설정 지침」[10]을 기본으로 하여 용출시험을 실시하였다. 시험결과를 토대로 용출시험 규격을 설정하였고 이를 실험실간 교차시험을 통해 검증하였다. 또한 국내유통 의약품 중에서 대조약 이외의 제품을 시험약으로 선정하여 확립된 시험방법으로 시험하여 예상 용출규격에 적용해 보았다. 본 연구결과는 용출시험이 미설정된 제제의 용출규격 설정을 위한 기초자료로 활용되고, 국내 유통 의약품의 품질경쟁력을 높이는데 기여할 것으로 사료된다.

실험방법

품목선정

「대한약전외 의약품 기준」에 수재된 의약품 중 용출규격이 미설정된 단일성분의 경구용 고형제제 의약품 중 수용성 제제인 도베실산칼슘 정과 아세피필린 정을 선정한 후 국내 허가현황을 검색하여 각각 대조약과 시험약을 선정하였다(Table I). 대조약은 품목 당 세 개의 다른 제조번호를 가진 제품을, 시험약은 세 개의 제조회사에 대하여 각 한 개의 제품을 선정 · 구매하였다.

시약 및 기기

도베실산칼슘 표준품은 일성신약㈜, 아세피필린 표준품은 경동제약(주)에서 분양받아 사용하였으며, 액체크로마토그래프 분석용 메탄올 및 아세토니트릴은 Merck사(Darmstadt, Germany)의 HPLC 등급을 사용하였다. 이외 인산과 아세트산 및 아세트산나트륨은 Simga사(St. Louis, USA)에서 구입하여 사용하였다. 용출시험기는 DISTEK사(North Brunswick, NJ, USA) 4300 Dissolution system이 장착된 DISTEK EVOUTION 6300을 사용하였고, 액체크로마토그래프는 Shiseido사(Tokyo, Japan) Nanospace SI-2 system을 사용하였다.

Table I – List of reference and test drugs

Item	Product name	Sample No.	Dosage form	Label amount
Dobesilate calcium tablets	Reference A	A-1 A-2 A-3	Tablets	250 mg/tab.
	Test B	B		
	Test C	C		
	Test D	D		
Acepifylline tablets	Reference E	E-1 E-2 E-3	Tablets	250 mg/tab.
	Test F	F		
	Test G	G		
	Test H	H		

함량시험

도베실산칼슘 정 – 대조약 A-1, A-2, A-3 및 시험약 B, C, D에 대하여 「대한약전외 의약품 기준」 '도베실산칼슘 정' 정량법에 따라 시험하였다. 도베실산칼슘 정 약 50 mg에 해당하는 양을 정밀하게 달아 물을 넣어 녹여 100.0 m*l*로 한 다음 여과하였다. 여액 2.0 m*l*를 취하여 물을 넣어 50.0 m*l*로 하여 검액으로 하였다. 따로 도베실산표준품 약 50 mg을 정밀하게 달아 물을 넣어 녹여 100.0 m*l*로 한다. 이 액 2.0 m*l*를 취하여 물로 50.0 m*l*로 하여 표준액(약 20 μg/m*l*)으로 한다. 검액 및 표준액을 가지고 물을 대조로 하여 자외가시부흡광도측정법에 따라 시험하여 파장 301 nm에서 흡광도를 측정하여 함량을 계산하였다.

아세피필린 정 – 대조약 E-1, E-2, E-3 및 시험약 F, G, H에 대하여 「대한약전외 의약품 기준」 '아세피필린 정' 정량법에 따라 시험하였다. 아세피필린 약 250 mg에 해당하는 양을 정밀하게 칭량하여 물을 넣어 250.0 m*l*로 한 다음 여과하고 여액 25.0 m*l*을 취하여 물을 넣어 100.0 m*l*로 한 용액을 검액으로 하였다. 따로 아세피필린 표준품 약 250 mg을 정밀하게 달아 물에 넣어 녹여 100.0 m*l*로 하였다. 이 액 10.0 m*l*를 취하여 물을 넣어 녹여 100.0 m*l*로 하여 표준액(약 250 μg/m*l*)으로 하였다. 검액 및 표준액 각 10.0 m*l*을 취하여 0.1 mol/*l* 염산 10.0 m*l* 및 물을 넣어 100.0 m*l*로 한다. 이들 액을 가지고 0.1 mol/*l* 염산 10.0 m*l*에 물을 넣어 100.0 m*l*로 한 액을 대조액으로 하여 자외가시부흡광도측정법에 따라 파장 273 nm에서 흡광도를 측정하여 함량을 계산하였다.

용출예비시험

도베실산칼슘 정 및 아세피필린 정 – 대조약 A-1 및 E-1에 대하여 대한약전 일반정보 「경구용의약품의 용출 규격 설정지침」에 따라 예비시험 조건(Table II)을 설정하여 pH 1.2, pH 4.0, pH 6.8, 물을 시험액으로 하여 용출양상을 비교·검토하였다. 분석방법은 각 시험액을 대조액으로 하여 자외가시부흡광도측정법에 따라 각각 파장 301 nm 및 273 nm에서 흡광도를 측정하여 용출률을 계산하였다. 또한 표준액은 두 약물 모두 각 시험액에

Table II – Conditions of preliminary dissolution test for dobesilate calcium tablets and acepifylline tablets

Apparatus	KP general tests, dissolution test apparatus II (Paddle, under sinker)
Dissolution medium	pH 1.2, pH 4.0, pH 6.8, Water
Medium volume	900 m*l*
Sampling time	5, 10, 15, 30, 45, 60 min
Temp.	37±0.5°C
Rotation speed	50 rpm

Table III – HPLC conditions for dobesilate calcium tablets

Detector	UV 301 nm
Column	SP^ Column type UG120 (250×4.6 mm, 5 μm)
Temp.	40°C
Mobile phase	0.1% phosphoric acid : MeOH (90 : 10)
Injection vol.	10 μl
Flow rate	1.0 ml/min

Table IV – HPLC conditions for acepifylline tablets

Detector	UV 273 nm
Column	SP^ Column type UG120 (250×4.6 mm, 5 μm)
Temp.	40°C
Mobile phase	Acetate buffer (pH 3.5) : Acetonitrile (90 : 10) ※ Acetate buffer: Dissolve 1.36 g of sodium acetate 1.36 g and 10 ml of acetic acid (100) in about 1000 ml of water
Injection vol.	10 μl
Flow rate	1.0 ml/min

대하여 약 2, 4, 8, 16, 32 μg/ml가 되도록 조제하여 검량선을 작성하였고, 용출 후 검액은 0.45 μm 멤브레인필터로 여과 후 각 시험액으로 10배 희석하여 흡광도를 측정하였다.

분석법 밸리데이션

「대한약전외 의약품 기준」에 수재된 도베실산칼슘 정과 아세피필린 정의 정량법은 자외가시부흡광도측정법으로 고시되어 있으나, 본 연구에서는 정확성과 신뢰성 향상을 위해 용출시험 분석방법을 액체크로마토그래프법으로 확립하였다. 또한 본 분석조건에서 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성, 정량한계를 검토하여 새로운 HPLC 분석방법에 대한 검증을 하였다(Table III, Table IV).[11)]

도베실산칼슘 정 및 아세피필린 정

도베실산칼슘 및 아세피필린 각각 약 40 μg/ml 농도의 표준용액 및 제제희석액을 Table III, Table IV의 분석방법으로 측정하여 얻은 크로마토그램 및 스펙트럼을 이용하여 주성분 피크의 간섭여부를 확인하여 특이성을 검토하였다. 직선성의 경우 5~80 μg/ml을 농도범위로 하여 전 과정을 3회 수행하여 각각 직선식을 구하고 각 직선식의 상관계수(R^2)로부터 직선성을 평가하였다. 정확성의 경우 도베실산칼슘 표준용액과 제제 희석액을 혼합하여 정확성시험용액 I, II, III(도베실산칼슘 및 아세피필린으로서 각각 약 10, 30, 60 μg/ml 해당량)을 조제하여 분석하였고 분석법의 전 조작을 각 농도 당 3회씩 반복 측정한 결과로부터 회수율(%)을 계산하여 정확성을 평가하였다. 예상용출규격에 해당하는 농도로 정밀성시험용액을 조제하고 이 용액에 대하여 6회 반복 측정한 결과로부터 상대표준편차(%)를 계산하여 정밀성을 평가하였다. 또한 반응의 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하는 방법에 따라 정량한계를 구하였다.

Table V – Conditions of dissolution test for dobesilate calcium tablets and acepifylline tablets

Apparatus	KP general tests, dissolution test apparatus II (Paddle, under sinker)
Dissolution medium	Water
Medium volume	900 ml
Sampling time	5, 10, 15, 30, 45, 60 min
Temp.	37±0.5°C
Rotation speed	50 rpm

용출 본시험 및 실험실간 교차시험

예비시험 결과를 바탕으로 선정된 용출시험액 및 용출조건(Table V)으로 도베실산칼슘 정은 대조약 A-1, A-2, A-3에 대하여, 아세피필린 정 대조약 E-1, E-2, E-3에 대하여 한 품목당 검체 12개에 대하여 본시험 및 실험실간 교차시험(실험실 B)을 실시하였다.

시험약 용출시험

본시험 결과 및 실험실간 교차시험 결과를 바탕으로 설정된 용출 규격에 따라 시험약 한 제품 당 검체 6개에 대하여 용출시험을 실시하였다.

결과 및 고찰

함량시험

「경구용의약품의 용출 규격 설정지침」에 의하면 용출규격 설정에 사용되는 품목은 약물의 표시량과 5% 이내 또는 대조약과 시험약의 함량차이가 5% 이내인 롯트를 선정하도록 되어있다. 따라서 「대한약전외 의약품 기준」에 수재되어 있는 방법에 따라 도베실산칼슘 정과 아세피필린 정에 대한 대조약, 시험약에 대한 함량시험을 실시하였다. 도베실산칼슘 정 및 아세피필린 정에 대한 함량기준은 각각 95.0~105.0%이며 시험결과 모든 제품이 기준에 적합하였고 대조약과 시험약 사이의 함량차이도 5% 이내로 나타나 본 용출시험에 사용하였다.

용출시험 분석방법 밸리데이션

특이성, 직선성, 정밀성, 정확성 항목에서 양호한 결과를 나타내었다. 특이성의 경우 각 표준용액과 제제희석액을 시험액(물)에 용해하여 만든 검액을 HPLC로 측정하여 크로마토그램을 비교하였다. 도베실산칼슘 정 및 아세피필린 정 모두 검액 중 주성분의 피크에서 간섭인자가 없음을 확인하였다(Fig. 1, Fig. 2). 직선성의 경우 도베실산칼슘 정은 5~80 μg/ml 농도범위에서 3회 평균 기울기는 47572.42, Y절편은 12080.46, 상관계수는 0.9999이었다. 아세피필린 정은 5~80 μg/ml 농도범위에서 3회 평균 기울기는 94236.68, Y절편은 87324.19, 상관계수는 0.9999로 양호한 결과를 보였다. 용출률을 나타내는 가장 낮은 농도를 포함하

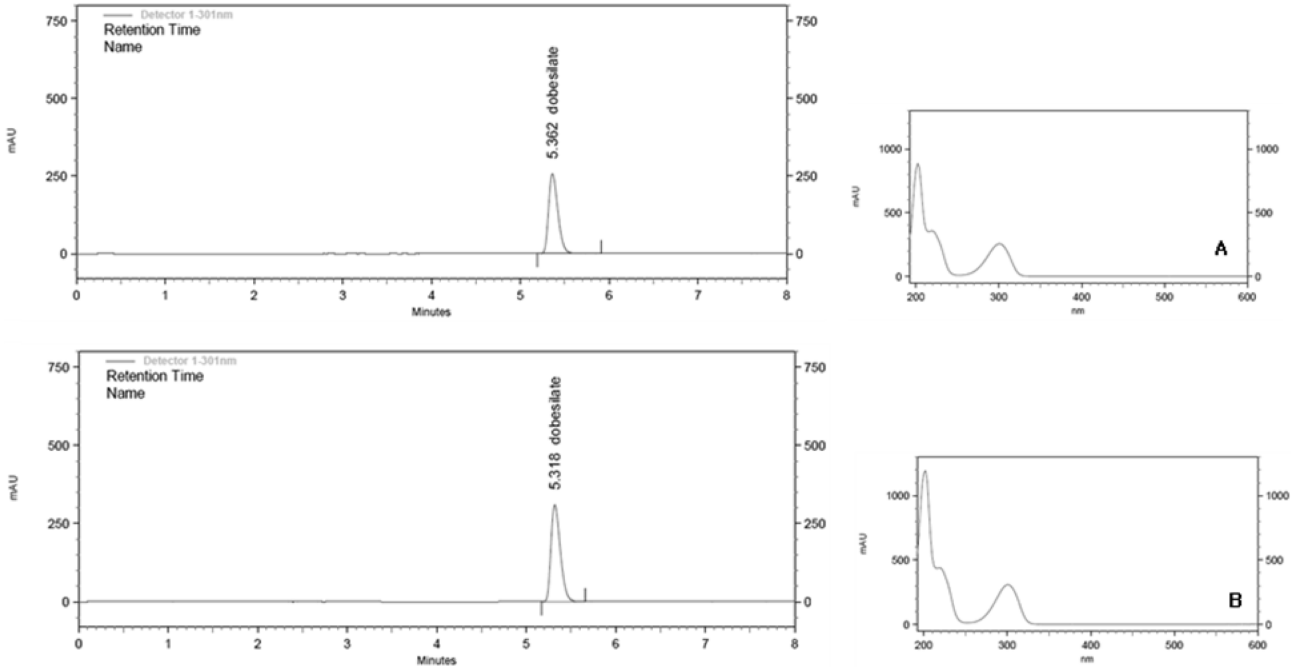

Fig. 1 – Chromatograms and PDA spectrum of Dobesilate Ca (A) standard (B) commercial sample (both at about 40 μg/m*l*).

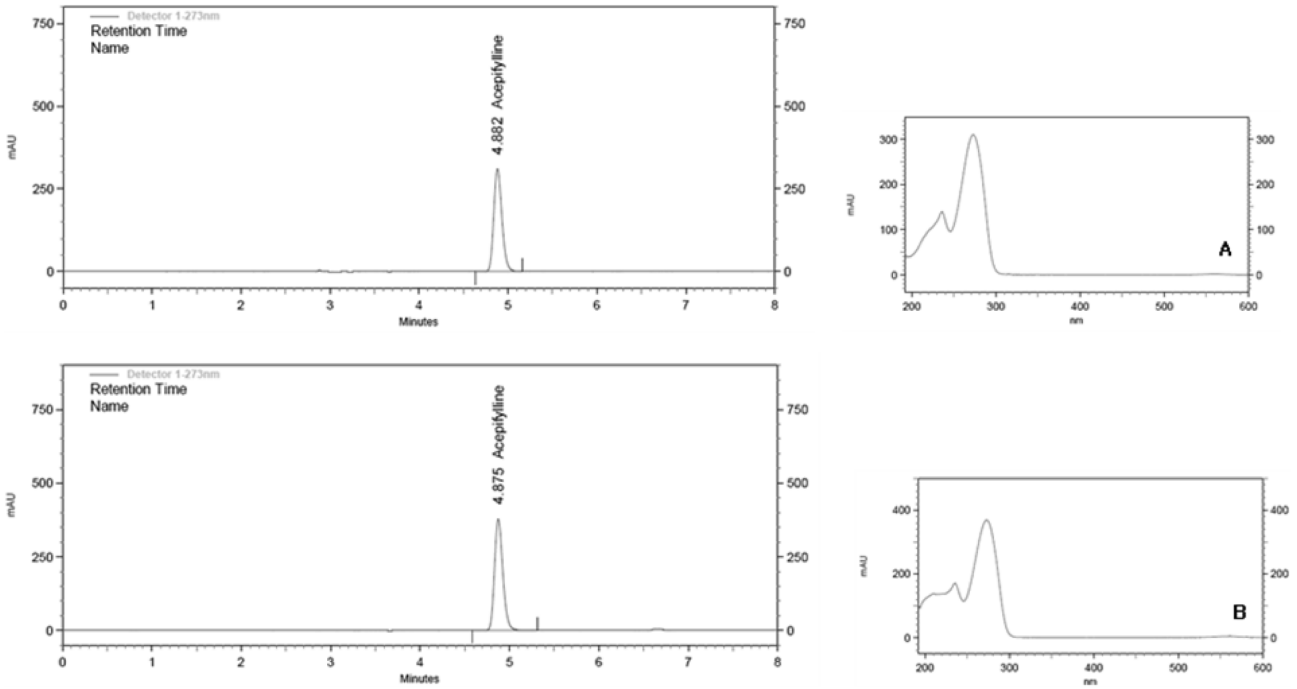

Fig. 2 – Chromatograms and PDA spectrum of Acepifylline (A) standard (B) commercial sample (both at about 40 μg/m*l*).

여 용출률 120% 이상의 농도까지를 직선성의 범위로 설정하였으므로 직선성을 검증하는 농도범위가 다소 넓은 경향이 있지만 두 성분 모두 양호한 직선성을 보였다. 정확성은 저, 중, 고농도에서 각 3회 시험을 한 결과 도베실산칼슘은 약 10, 30, 60 μg/m*l*에서 평균 회수율로서 100.72%(편차 ±0.463)를, 아세피필린은 10, 30, 60 μg/m*l*에서 평균 회수율 100.41%(편차 ±1.014)를 나타내었다. 정밀성은 예상 용출규격에 해당하는 농도로 도베실산칼슘 및 아세피필린 모두 약 50 μg/m*l*의 용액을 6회 반복 측정하여 상대표준편차를 계산한 결과 각각 0.67%, 0.69%로서 기준인 1% 이하에 적합하였다. 본 분석조건에서 도베실산칼슘과

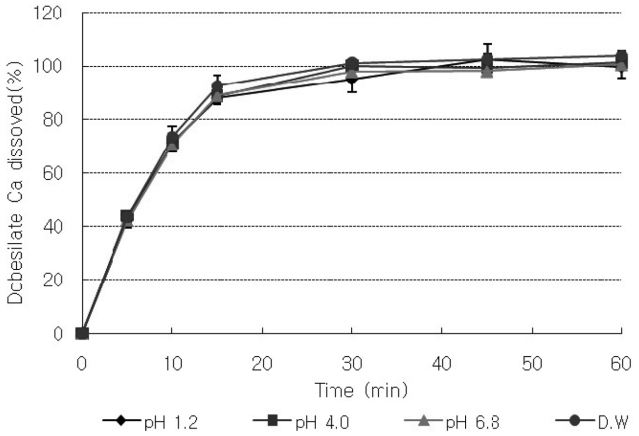

Fig. 3 – Dissolution profile of reference drug of dobesilate calcium tablets A-1.

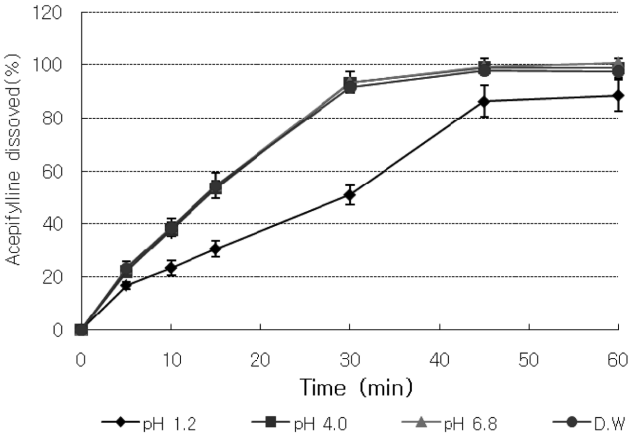

Fig. 4 – Dissolution profile of reference drug of acepifylline tablets E-1.

아세피필린의 정량한계는 각각 1.718 μg/m*l*, 0.773 μg/m*l*로 계산되었다.

용출시험

예비시험 결과

도베실산칼슘 정 – 대조약 A-1을 대상으로 Table II의 용출시험방법에 따라 예비시험한 결과는 Fig. 3에 나타냈다.

용출 개시 후 30 분이 경과하면 네 가지 시험액에서 모두 90% 이상의 평균용출률을 나타내었고, 평형에 도달하였다. 따라서 네 가지 시험액 중 시험상의 용이성과 경제적 측면에서 유리하고 환경친화적이라는 장점을 가진 물을 시험액으로 선정하는 것이 적절하다고 판단되었다.[12)]

아세피필린 정 – 대조약 E-1을 대상으로 Table II의 용출시험방법에 따라 예비시험한 결과를 Fig. 4에 나타냈다. pH 1.2 시험액을 제외하고 세 가지 시험액의 경우엔 용출 개시 후 30분이 되었을 때 90% 이상의 평균용출률을 나타내었고, 평형에 도달하였다. 이를 근거로 시험의 용이성 등을 고려하여 물을 시험액으로 선정하였다.

본시험 및 실험실간 교차시험 결과

도베실산칼슘 정 – 대조약 A-1, A-2, A-3을 대상으로 시험액을 물 900 m*l*로 하여 Table V의 방법으로 용출시험 한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 용출개시 30 분 후 대조약 세 롯트에 대한 평균용출률은 각각 97.2±4.0(%), 97.1±2.5(%), 102.2±0.7(%)로 전체에 대한 평균용출률은 98.8±3.6(%)였다. 또한 실험실 B의 교차시험 결과 세 롯트에 대한 평균용출률은 각각 104.4±2.3(%), 102.7±1.9(%), 99.3±4.0(%)로 전체에 대한 평균용출률은 102.1±3.5(%)였다. 따라서 「경구용의약품의 용출 규격 설정지침」에 따르면 중간 용출률을 나타내는 A-2의 평균용출률보다 약 10% 낮은 값인 약 85% 수준을 규격으로 설정하는 것이 타당하다고 사료된다.

아세피필린 정 – 대조약 E-1, E-2, E-3을 대상으로 시험액을 물 900 m*l*, 회전속도를 50 rpm으로 하여 Table V의 방법으로 용출시험을 한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 용출개시 30분 후 대

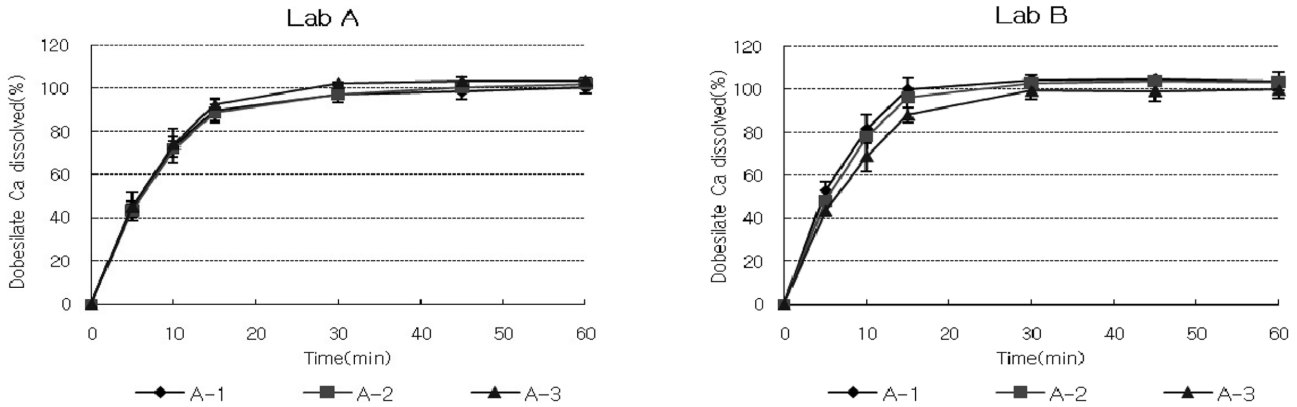

Fig. 5 – Dissolution profile in reference drugs of dobesilate calcium tablets between Lab A and Lab B.

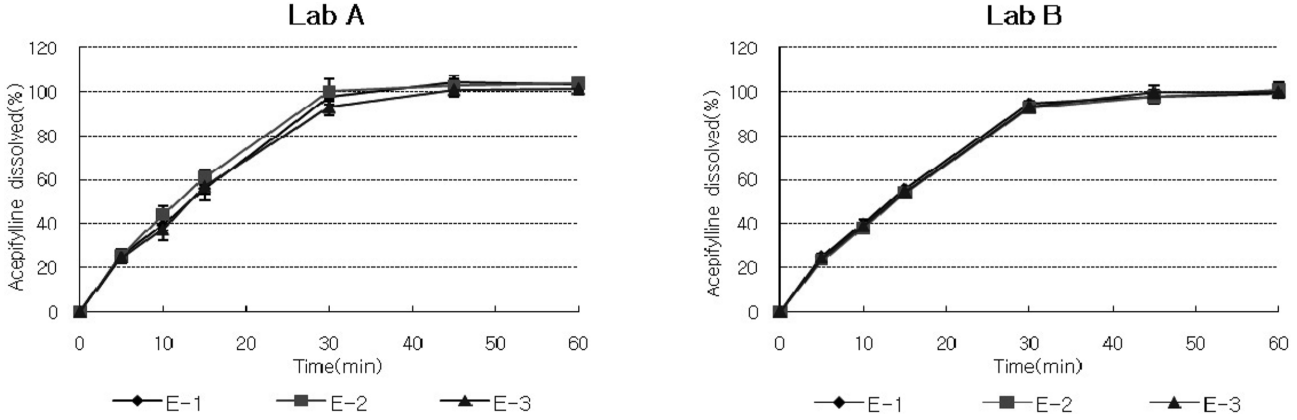

Fig. 6 – Dissolution profile in reference drugs of acepifylline tablets between Lab A and Lab B.

조약 세 롯트에 대한 평균용출률은 각각 97.9±2.0(%), 100.2±5.8(%), 93.1±3.9(%)였으며 전체에 대한 평균용출률은 97.1±5.1(%)였다. 또한 실험실 B의 교차시험 결과 세 롯트에 대한 평균용출률은 각각 94.8±1.7(%), 92.8±2.4(%), 93.2±2.7(%)였으며 전체에 대한 평균용출률은 93.6±2.4(%)였다. 아세피필린 정의 용출율은 두 시험실간 유사한 용출패턴을 보였고 롯트간 편차도 매우 작아 약 85% 수준을 규격으로 설정하는 것이 타당하다고 사료된다.

시험약 용출시험 결과

현재 유통되고 있는 도베실산칼슘 정과 아세피필린 정 중 대조약을 제외한 다른 품목을 구매하여 도베실산칼슘 정 시험약 B, C 및 D, 아세피필린 정 시험약 F 및 G로 하여 본 시험을 통한 예상 용출규격에 근거하여 용출시험을 진행하였다. 도베실산칼슘 정 시험약 B, C 및 D의 경우 30분에서 6개 검체 평균용출률은 예상 용출규격에 적합한 결과가 나왔다. 또한 아세피필린 정 시험약 F 및 G 역시 30분에서 평균용출률이 모두 예상 용출규격 85%를 상회하는 결과를 나타내었다.

결 론

도베실산칼슘 정 및 아세피필린 정의 용출시험조건 설정을 위해 각각 대조약과 시험약을 선정하여 「경구용의약품의 용출 규격 설정 지침」에 따라 각 용출액(물, pH 1.2, pH 4.0, pH 6.8)에 대한 용출 패턴을 확인하기 위해 예비시험을 수행하였다. 예비시험 결과를 바탕으로 용출액을 물로 선정하여 본 시험을 수행한 결과 용출조건을 설정할 수 있는 자료를 확보하였다. 또한, 용출액 중 도베실산칼슘 정 및 아세피필린 정 성분의 분석을 위해 새로운 HPLC분석법을 확립하였고, 타당성을 확인하기 위해 대한약전 「의약품등 분석법의 밸리데이션에 대한 지침」에 따라 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성을 확인하였다. 본시험 및 실험실간 교차시험 결과 각 용출시험 규격을 도베실산칼슘 정 및 아세피필린 정 모두 용출개시 후 30분에서 85% 이상으로 설정함이 타당하다고 사료된다. 또한 이들 각 품목의 시험약에 대해 용출시험을 수행하여 예상 용출규격에 근거하여 적합여부를 판정한 결과 모두 적합하였다. 본 연구에서 제안하는 용출규격은 「대한약전외 의약품 기준」 개정 시 기초자료로 활용가능하며, 국내 유통의약품의 품질을 향상시키는데 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 말씀

본 연구는 식품의약품안전청 2009년도 자체연구개발사업(09101 의약안221)으로 광주지방식품의약품안전청에서 수행되었습니다.

참고문헌

1) FDA : Center for Drug Evaluation and Research, Guidance for Industry-Extended release oral dosage forms: development, evaluation and application of in vitro/in vivo correlation (1997).
2) 사홍기 : 비교용출시험과 용출규격의 상관성 연구, 식품의약품안전청 용역연구개발사업 (2004).
3) 사홍기 : 의약품의 제제동등성 평가(II)-경구용 제제의 제제동등성 평가, 식품의약품안전청연구보고서, 852 (2003).
4) 사홍기 : 의약품의 제제동등성평가(III)-경구용 제제의 제제동등성 평가, 식품의약품안전청연구보고서, 2324 (2004).
5) 박상애, 장수현, 정혜윤, 장성재, 강신정, 장승엽, 최보경, 윤미옥, 최돈웅, 김영임, 최현철, 김호정, 김미정, 김희성, 민충식, 백경민 : 의약품 규격의 국제화사업(I), 식품의약품안전청연구보고서, 433 (2003).
6) Ansel, H., Allen Jr., L. and Popovich, N. : Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery systems (7th ed.), Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore (1999).
7) 식품의약품안전청 : 식품의약품통계연보 (2005).

8) Gudrun, F. : Guideline on dissolution profile comparison. *Drug Inform. J.* **35**, 865 (2001).
9) Food and Drug Administration : Guidance for Industry. Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. US department of health and human services/Food and drug administration/Center for drug evaluation and research, Rockville MD (1997).
10) 식품의약품안전청 : 경구용의약품의 용출 규격 설정 지침, 대한약전 제9개정 (2007).
11) 식품의약품안전청 : 의약품등 분석법의 밸리데이션에 대한 지침, 대한약전 제9개정 (2007).